

Bacillus cereus によるトリプシンインヒビター およびプロテアーゼの生産とそれら の関連性について

大 谷 元

信州大学農学部 畜産製造学研究室

著者は先に、トリプシンインヒビター生産菌株のスクリーニングを行ない、目的菌株として *Bacillus cereus* および *Neurospora* に属する一菌株を分離し、それら菌株の生産するインヒビターの性質について報告した^{1),2)}。

一般に、動植物内のプロテアーゼインヒビターの生理的役割りについては種々の検討がなされているが³⁾、微生物の生産するプロテアーゼインヒビターの生理的役割りについては、若干の報告があるのみで^{4),5)}、殆んど不明である。このことは、微生物の生産するインヒビターの多くは、その微生物の三次代謝産物で種特異的ではなく株特異的であること、抗生物質と同様にその生合成はプラスミッドの制御を受けていると考えられていることなど⁶⁾が原因しているためと思われる。しかしながら、これらインヒビターの生理的役割りを明らかにすることは、インヒビター生産菌株を合理的にスクリーニングする上で、また、微生物生理学上において、興味深い点である。そこで本報告では、*B. cereus* の生産するトリプシンインヒビターは自己の生産するプロテアーゼとどのような関係を有しているかを知る目的で、*B. cereus* のトリプシンインヒビター生産パターンと自己のプロテアーゼ生産パターンの比較およびその生産プロテアーゼの性質について検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株およびその培養法

供試菌株としては前報¹⁾で分離同定した *B. cereus* を用いた。また、その培養に際しては、表一に示した M-A 培地50ml を含む500ml 容振盪フラスコに、プイヨン寒天斜面培地での保存菌株一白金耳を接種し、30°Cで24時間振盪培養(140r. p. m)した。次いで、こ

Table 1 Medium M-A composition used in this experiment.

Peptone	4.5%
Glucose	1.5%
NaCl	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
(Initial pH7.0)	

の前培養液 1 ml を 50ml の M-A 培地を含む 500ml 容振盪フラスコに接種し、30°C で 0~168 時間振盪培養 (140r. p. m) した。

2. 菌体外および菌体内粗酵素液の調整法

上述した各培養液をそれぞれ遠心分離 (3000r. p. m, 20分) し、その上澄液を菌体外粗酵素液とした。

一方、上述の遠心分離により得られた菌体を滅菌生理的食塩水で 3 回遠沈洗滌後、菌体 1 g (湿重量) 当り、25ml の 0.1M 塩化ナトリウム溶液に懸濁した。続いて、この懸濁液を超音波処理 (20KC, 30分) 後、4°C で 30 分放置し、遠心分離 (3000r. p. m, 20分) して得られた上澄液を菌体内粗酵素液とした。

3. プロテアーゼ活性の測定法

プロテアーゼ活性の測定は Anson 変法に準じた⁷⁾。すなわち、上述の菌体外または菌体内粗酵素液 0.5ml, 4% カゼイン溶液 0.5ml および緩衝液 (pH 3 : 0.1M 酢酸緩衝液, pH 7 : 0.1M リン酸緩衝液あるいは pH 9 : 0.1M 炭酸緩衝液) 1.5ml を混合して 37°C で 60分反応した。続いて、5% トリクロル酢酸 2.5ml を加えて、その反応を停止し、37°C で 30分、さらに室温で 30分放置後、東洋口紙 No. 5 B を用いて口過した。その口液を蒸溜水で 2 倍希釈後、フェノール試薬により発色させ、その 660nm における吸光度をプロテアーゼ力価とした。

なお、必要に応じ、後述するように反応に先がけて粗酵素液の前処理、各種金属塩や化学試薬の添加などを行ったり、或いはまた、反応時における各種 pH および反応温度を変えることによって実験を行なった。

4. トリプシンインヒビターの精製およびプロテアーゼインヒビター活性の測定法

B. cereus のトリプシンインヒビターの精製法およびトリプシンインヒビター活性の測定法は前報¹⁾に準じた。また、*B. cereus* の生産プロテアーゼに対するトリプシンインヒビターおよび培養液の作用の検討は、上述の反応系に各種試験液を 0.5ml 加え、トリプシンインヒビター活性測定時と同様に操作を行なった。

結果および考察

1. トリプシンインヒビターおよびプロテアーゼ生産パターンの比較

培養過程に伴うトリプシンインヒビター、菌体外および菌体内プロテアーゼ生産の経時的变化を図-1に示した。

図より、トリプシンインヒビター活性は前報¹⁾で報告したのと同様の生産パターンを示し、培養 8 時間で認められ、48 時間で最高に達する。さらに培養を続けるとインヒビター活性は低下し、96 時間以降は全く認められなかった。

一方、プロテアーゼ活性は、まず菌体外では培養 8 時間頃から 20 時間頃までは中性 (pH 7) において高い活性が認められ、さらに培養 72 時間頃から 168 時間では中性側よりもアルカリ側 (pH 9) で高い活性が認められる。また、菌体内では培養 24 時間にアルカリ側で高いプロテアーゼ活性が、さらに培養 72 時間頃から 168 時間においてもアルカリ側で高い活性が認められる。なお、菌体外、菌体内ともに酸性側 (pH 3) におけるプロテアーゼ活性は認め

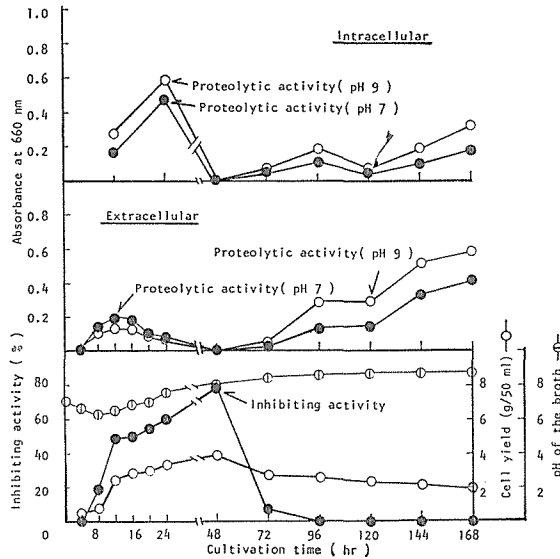


Fig. 1 Changes of trypsin inhibiting activity, proteolytic activities, pH of the brotn and cell yield during cultivaion at 30 C.

られなかった。

これらの結果より、トリプシンインヒビター活性が最も高い培養過程、すなわち、培養48時間においてはプロテアーゼ活性は殆んど検出されなかったことは興味深い現象である。

2. 生産プロテアーゼの性質

上述の結果より、培養12時間および培養168時間においては、それぞれ対数期の後期および自己消化期に位置し、さらに菌体外、菌体内ともに明らかにプロテアーゼ活性が認められたことより、培養12時間（以後、培養初期と呼ぶ）および168時間（培養後期と呼ぶ）の菌体外および菌体内粗酵素液を用いて、生産プロテアーゼの性質について各種検討を行ない、その結果を一括して表-2に示した。

(1) 至適pH

菌体外プロテアーゼの至適pHは培養初期のものでは6.5~7に、培養後期のものでは9付近に認められ、菌体内プロテアーゼは培養初期、後期のものともに至適pHは9~9.5に認められた。

(2) 至適温度

菌体外プロテアーゼの至適pH値における至適温度は培養初期のものでは40°Cに、培養後期のものでは50°Cに、また、菌体内プロテアーゼは培養初期、後期のものともに50°Cに認められた。

(3) pH安定性

各酵素液のpHを2, 4, 6, 7, 8, 10, 12に調整し、4°Cで15時間放置後、その残存プロテアーゼ活性を測定し、プロテアーゼのpH安定性を検討した。

表-2に示した通り、菌体外プロテアーゼは培養初期のものではpH 6~8で80%以上の、また、培養後期のものではpH 8~10で80%以上の活性が残存していた。一方、菌体内プロ

Table 2 Characters of proteases produced by *B. cereus*.

	Intracellular		Extracellular	
	12hr	168hr	12hr	168hr
Optimum				
pH	9	9-9.5	6.5-7	9
temperature	50C	50C	40C	50C
Stable*				
pH	6-10	6-10	6-8	8-10
temperature	60C	60C	40C	50C
Inhibitory**				
metal ion	Zn ²⁺ , Hg ²⁺	Zn ²⁺ , Hg ²⁺	Mn ²⁺ , Hg ²⁺ Fe ²⁺ , Pb ²⁺	Zn ²⁺ , Hg ²⁺
reagent	NBS***	NBS	EDTA****	NBS

* Stable : More than 80% of proteolytic activity remained.

** Inhibitory : More than 50% of proteolytic activity was inhibited.

*** NBS : N-Bromosuccinimide

**** EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

テアーゼは培養初期、後期のものともに pH 6~10で80%以上の活性が残存していた。

(4) 熱安定性

各酵素液の pH を 7 に調整後、30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C で10分間熱処理を行ない、その後の残存プロテアーゼ活性を測定することにより、熱安定性を検討した。

表-2 に示した通り、培養初期の菌体外プロテアーゼは 40°C 以下では安定であったが、50°C においては 80% 以上が失活した。培養後期のものは 50°C 以下では安定であったが、60°C の熱処理において80%以上のプロテアーゼ活性が失活した。一方、菌体内プロテアーゼは培養初期、後期のものともに 60°C の熱処理においても 20%以下の失活で、比較的熱処理に対して安定であった。

(5) 金属イオンによる阻害

各種 2 価の金属塩を反応液に 1 mM 添加し、その時のプロテアーゼ活性を測定することにより各種金属イオンの影響を検討した。

その結果は表-2 に示した通り、培養初期の菌体外プロテアーゼは、Mn²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺ イオンによって阻害され、その他の酵素は Zn²⁺, Hg²⁺ イオンによって阻害された。

(6) 阻害試薬の影響

一般に酵素の阻害試薬として用いられている各種試薬を 1 mM 添加して反応後、それらの影響を検討した。

表-2 に示した通り、培養初期の菌体外プロテアーゼはエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) により強く阻害され、培養後期の菌体外プロテアーゼおよび培養初期、後期の菌体内プロテアーゼは N-ブロムコハク酸イミド (NBS) により強く阻害された。

以上の結果から、*B. cereus* の生産プロテアーゼのうち、培養初期の菌体外プロテアーゼは中性に至適 pH を有し、pH や熱に対して比較的不安定であり、かつ Mn²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺ などの 2 価の金属イオンや金属キレート剤である EDTA により阻害される性質を有している。これは金属酵素の中性プロテアーゼを主としているためと推定される⁸⁾。

一方、培養初期、後期の菌体内プロテアーゼおよび培養後期の菌体外プロテアーゼは、と

もにアルカリ側に至適 pH を有し、pH や熱に対して比較的安定であり、かつ NBS により阻害されることなどから、セリン酵素のアルカリプロテアーゼを主としているものと推定される⁸⁾。しかし、培養後期の菌体外プロテアーゼは特異的に菌体外に生産されるのか、菌体の自己消化に伴って菌体外に放出されるのかは本結果からは明らかでない。

3. 自己の生産プロテアーゼに対するトリプシンインヒビターの影響

前述した通り、トリプシンインヒビター活性が最も高い培養48時間においては、プロテアーゼ活性は殆んど認められないこと(図-1)より、前項で性質を明らかにした培養12時間および168時間の菌体外および菌体内プロテアーゼが自己の生産したプロテアーゼインヒビターにより阻害されるか否か、また、培養48時間のトリプシンインヒビター生産時の培養口液あるいは菌体抽出物により阻害されるか否かについて検討を行ない、その結果を表-3に示した。

Table 3 Effects of a trypsin inhibitor, culture broth and cell extract on the proteolytic activity of proteases produced by *B. cereus*.

Proteases	Control	Trypsin inhibitor	Added	
			Culture broth	Cell extract
12 hr				
Intracellular	100*	101	100	101
Extracellular	100	98	104	102
168 hr				
Intracellular	100	100	103	102
Extracellular	100	96	101	102

* (%)

表より、自己の生産した精製トリプシンインヒビターは自己のプロテアーゼに対して殆んど影響を与えないことが認められた。また、培養48時間の培養口液およびその時の菌体抽出物はともに自己のプロテアーゼ活性を阻害するインヒビターは含んでいないことが認められた。

以上の結果より、本菌株の生産するトリプシンインヒビターは自己の生産する主要プロテアーゼである中性金属プロテアーゼやアルカリセリンプロテアーゼを阻害する作用は有していない。さらに、本菌株は自己のプロテアーゼ活性を調節するインヒビターは生産していないことが明らかになった。また、前報¹⁾において、*B. cereus* の生産するトリプシンインヒビターは、トリプシンおよびパバインを強く阻害することを報告したが、このことより、本菌株はトリプシン様、あるいはパバイン様プロテアーゼは殆んど生産していないことが確認された。

笠井ら⁵⁾は、トリプシンインヒビターであるロイペプチン生産菌株 *Streptomyces griseus* において、ロイペプチンが培養初期に培地中に放出され、その後かなり遅れてこの菌株の主要プロテアーゼであるアミノペプチダーゼやキモトリプシン様プロテアーゼが生産され、これらプロテアーゼはロイペプチンにより阻害されないこと、さらに、ロイペプチンにより阻害されるトリプシン様プロテアーゼは極微弱であることを報告している。著者が本実験で用いた *B. cereus* の生産するトリプシンインヒビターは、その分子量や阻害スペクトルにおいてロイペプチンと類似した性質を有していることを先に報告¹⁾したが、その生産主要ブ

ロテアーゼは自己の生産したトリプシンインヒビターにより阻害されないという点においても、ロイペプチン生産菌株に関する笠井らの結果と一致している⁵⁾。

これらのことから考え、微生物の生産するプロテアーゼインヒビターの役割りは、嶋田らが報告したカビの酸性プロテアーゼインヒビター⁴⁾や多くの動植物について知られているプロテアーゼインヒビター^{9),10)}のように、単に酵素活性レベルでの自己のプロテアーゼの調節だけでないものと思われる。しかしながら、本実験で明らかのように、インヒビター活性が最も高い時期にはプロテアーゼ活性が殆んど検出されないという現象は、インヒビター自身酵素活性レベルでの直接の調節因子ではなくとも、蛋白質代謝と関係した何らかの生理作用の存在が示唆され今後微生物起源のプロテアーゼインヒビターの生理的意義を解明する上で興味深い現象と思われる。加えて、本菌株のようなインヒビターおよびプロテアーゼの生産パターンを示す菌株では、インヒビター生産菌株をスクリーニングする上で自己の生産プロテアーゼを予め失活させておく必要がなく好都合である。しかし、このような現象はインヒビター生産菌株全般に言えるのか本菌株にのみ特有なのかは、さらに幅広い検討を待たねばならない。

要 約

トリプシンインヒビター生産菌株である *Bacillus cereus* について、インヒビターとプロテアーゼの生産パターンの比較およびその生産プロテアーゼの性質について検討した。得られた結果は次の通り要約される。

1. トリプシンインヒビター活性は培養8時間頃より培養口液に認められ、48時間で最高に達した。
2. プロテアーゼ活性は、菌体外、菌体内ともに培養8時間より24時間までと、培養72時間以降において認められた。しかし、インヒビター活性が最も高い値を示した培養48時間ではプロテアーゼ活性は認められなかった。
3. 生産プロテアーゼのうち、培養初期(培養12時間)の菌体外プロテアーゼは中性金属プロテアーゼとしての、また、培養後期(培養168時間)の菌体外プロテアーゼはアルカリセリンプロテアーゼとしての性質を有していた。また、菌体内プロテアーゼは培養初期、後期ともにアルカリセリンプロテアーゼとしての性質を有していた。
4. これらの生産プロテアーゼは自己の生産したトリプシンインヒビターにより阻害を受けなかった。また、本トリプシンインヒビターの阻害スペクトルから考え、本菌株はトリプシン様あるいはパパイン様プロテアーゼは殆んど生産していないものと思われる。

本研究を行なうに当り、終始御指導をいただいた同研究室教授嶋田文三郎博士、並びに同助教授細野明義博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 鵜田文三郎, 大谷元, 信大農紀, 13 : 1 (1976)
- 2) 大谷元, 鵜田文三郎, 信大農紀, 13 : 131 (1976)
- 3) 小谷昌司, 池中徳治, 生化学, 49 : 1 (1977)
- 4) 嶋田協, 松島欽一, 日農化誌, 41 : 454 (1967)
- 5) 笠井献一, 西方真, 倉持浩, 武山佳世子, 石井信一, 生化学, 47 : 398, (1975)
- 6) 青柳高明, 別冊蛋白質核酸酵素, 76 (5月) p.241, (1976)
- 7) Anson, M.L. *J. Gen. Physiol.*, 22 : 79 (1938)
- 8) Bunji Hagihara, *The Enzymes*, Vol.4, p.193 (1960)
- 9) Laskowski, Sr., *Methods in Enzymology*, Vol.2, p.36 (1955)
- 10) Kassell, B., *Methods in Enzymology*, Vol.19, p.839 (1970)

**Production of a trypsin inhibitor and proteases by
Bacillus cereus, and their properties.**

By Hajime OTANI

Laboratory of Animal Product Technology, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

The author examined production of a trypsin inhibitor and proteases by *Bacillus cereus*, and further characterized the proteases produced. Results obtained were summarized as follows :

1. Activity of the trypsin inhibitor was detected in the filtrate from the cultures incubated for 8 to 72 hrs and maximally occurred in 48 hrs.

2. Activities of both intra- and extra-cellular proteases were recognized in the cultures incubated for 8 to 24 hrs and more than 72 hrs, and not detected in 48 hrs, when the activity of the inhibitor reached maximum.

3. The extra-cellular protease prepared from 12 hr's culture principally consisted of a neutral metal protease, and that prepared from 168 hr's culture consisted of an alkaline serine protease. The intra-cellular protease produced throughout the incubation period principally consisted of an alkaline serine protease.

4. The trypsin inhibitor did not inhibit the proteases produced. It seems that the strain does not produce a trypsin-like and a papain-like protease.