[農化 第 40 卷, 第 6 号, p. 252~256, 1966]

好気性細菌による不溶性コラーゲンの分解に関する研究 (第 1 報)

プロテアーゼ生産菌の分離とその性質

古川 勇 次, 藤 井 義 紹, 植村定治郎*

(東北大学農学部農芸化学科, *東京大学応用微生物研究所)

昭和 41 年 2 月 10 日 受 理

Degradation of Insoluble Collagen by Aerobic Bacteria Part I. Isolation of the Protease-Producing Bacteria and their Bacteriological Characters

By Yûji FURUKAWA, Yoshitsugu FUJII and Teijirô UEMURA*

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University,
Sendai ; *Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo

Thirty-two strains of aerobic bacteria, isolated from eighty-seven soil samples, were tested for the protease-producing abilities. It was found that considerable differences existed in their capacities in producing D-collagenase, gelatinase and caseinase. Among three strains, which showed higher D-collagenase activity, strain Kp-931 was the strongest D-collagenase producer and thus selected as the test organism. The crude protease preparation obtained from the culture filtrate of this organism had pH optima at 8.0 to 10.0 with hide powder, at 9.0 with gelatin and at 8.0 with casein substrates. From further experiments on the protease produced into the medium at different phases of cell growth, it was observed that the maximum D-collagenase activity was found at the later stage of logarithmic growth phase while the maximum gelatinase activity was reached at the stationary phase. These results suggest that a specific enzyme which digests hide powder is produced by this aerobic organism. The strain Kp-931 was identified as *Bacillus cereus* from morphological and physiological studies.
(Received February 10, 1966)

緒 言

微生物の生産する蛋白分解酵素に関する研究は、糸状菌、好気性細菌、嫌気性細菌、放線菌などについて広範な報告があり、酵素的性質が次第に明らかにされつつある。蛋白質のうち特にコラーゲンについては、嫌気性菌の生産するコラーゲン分解酵素がとり上げられ、反応機構や基質特異性などの酵素化学的性質が研究されているが、好気性菌では 2, 3 の不溶性コラーゲン分解酵素能をもつ酵素が見出されているにすぎず、その酵素的性質はほとんど研究されていない。Evans⁽¹⁾ は *Bacillus subtilis* の蛋白分解酵素について検索し、粗酵素液が強力なゼラチン分解活性をもつと同時に、不溶性コラーゲンである hide powder をも分解する酵素能のあることを見出し、さらに *Bacillus* 属中にはゼラチン分解活性

を伴って不溶性コラーゲン分解活性をも有する酵素を生産するものと、ゼラチン分解活性のみの酵素を生産するものがあり、前者は異種の酵素によるものであらうと示唆している⁽²⁾。Mori-hara⁽³⁾ は *Pseudomonas aeruginosa* の生産する蛋白分解酵素が、強力なゼラチン分解活性をもつと同時に hide powder をもかなり分解することを認めている。

著者らは好気性細菌の培養濾液より得られる蛋白分解活性、特に不溶性コラーゲン分解活性がゼラチン分解活性、カゼイン分解活性などを有するいわゆるプロテアーゼと異質の酵素にもとづくものであるか、あるいは特殊な基質特異性のある 1 種のプロテアーゼにもとづくものであるか否かを検討する目的で、多数の単離菌株について不溶性コラーゲン分解活性とプロテアーゼ活性とを比

較検討し, hide powder に特異的に作用する不溶性蛋白分解酵素が存在するものであろうと推定される結果を得, この酵素能を示す菌株が *Bacillus cereus* 類縁の菌株であると同定したのでこれらを報告する.

実験方法

1. 菌株分離用培地: 好気性細菌を分離するために通常用いられているブイヨン寒天培地 (ポリペプトン 0.5%, 肉エキス 0.5%, 食塩 0.25%, 寒天 1.5%, pH 6.8) を使用した.

2. 酵素生産検索用培地: 分離された好気性細菌の酵素生産能を検索するためには, 一般にプロテアーゼ生産培地として用いられるグルコース-ブイヨン培地 (グルコース 1.0%, ポリペプトン 1.0%, 肉エキス 1.0%, 食塩 0.5%, pH 7.0) を使用した.

3. 菌株の分離, 培養方法と酵素活性測定法: 仙台, 長野, 静岡などの各地から採取した土壌, 泥土等各種の試料を滅菌水で適宜稀釈し, 上述した分離用培地を用いて常法により 30°, 2 日間平板培養して生じた集落を任意に分離し供試菌株とした. 分離した菌株は 100 ml の酵素生産検索用培地を含む肩つきコルベン (500 ml) に直接接種して, 30°, 2 日間振盪培養し得られた培養液は, 9,000×g, 10 分, 0° の遠心により菌体を除去して得られる上清を酵素液とし蛋白分解活性の測定に供した.

カゼイン分解活性 (以下 caseinase 活性) は, カゼイン (純正化学社製, Casein, Milk) を基質として用い, 次の 2 法を採用した.

(1) Pulp-disc 法⁽⁴⁾ または Pad-method⁽⁵⁾ を併用し, 30°, pH 7.0, 12~16 時間で出現した透明帯の直径をトリプシンの標準曲線から換算してトリプシン 1 mg 相当量を 1 単位とし [PU]_{mg-Try.} で表わした.

(2) Anson 法の萩原改良法⁽⁶⁾ に従い TCA による除蛋白液の 275 mμ における吸収を測定し [PU]_{Cas. 275. A γ-Tyr.} で表わした. ゼラチン分解活性 (以下 gelatinase 活性) は, ゼラチン (小宗化学薬品社製) を基質として用いた通常のゼラチン液化法⁽⁷⁾ により [LP]_{mg-Gel.} で表わした. 不溶性コラーゲン分解活性 (以下 D-collagenase 活性) は, 酵素液 1 ml が hide powder (Baird & Tatlock 社製) 100 mg から 30°, 36 時間のインキュベーションで遊離される L-ヒドロキシプロリンを Neumann, Logan⁽⁸⁾ の鬼塚氏改良法⁽⁹⁾ に従って測定し, 1 μg ハイドロキシプロリンを [HP]₃₆=1 としその酵素活性とした.

実験結果と考察

1. 不溶性コラーゲン分解酵素生産菌の検索

土壌, 泥土等の供試 87 試料から好気性細菌 1,560 株を分離し, caseinase 活性でその酵素生産能をしらべ, 優良菌株として 32 株を選択し, これら菌株の培養上清液の示す各基質に対する蛋白分解酵素活性を第 1 表に示した. この表から gelatinase 活性を伴う D-collagenase 活性の強い好気性細菌としては, K 103-6 株, 109-1 株, 103-1 株, Kp 931 株, 36-9 株などがあり, D-collagenase 活性を主体とし caseinase 活性, gelatinase 活性をもたないか, あるいは比較的微弱に有する菌株としては, G-1 株, K 111-3 株, 44-2 株等が認められた. Evans は, *Bacillus* 属の蛋白分解酵素を検索し, D-collagenase 活性を有する菌株は必ず gelatinase 活性を伴ない, その逆は必ずしも成り立たないことを指摘しており, この傾向は, 著者らの検索した多くの菌株にも符合するものである. また D-collagenase 活性のみ

第 1 表 分離細菌の蛋白分解酵素活性

菌株番号	Caseinase activity [PU] _{mg-Try.}	Gelatinase activity [LP] _{mg-Gel.}	D-Collagenase activity [HP] ₃₆
N 95-4	3.2	<30	90
N 96-4	0.8	—	—
N 44-18	3.8	—	—
N 52-6	5.6	60	81
N 44-15	1.2	<30	—
K 103-6	9.0	120	151.2
N 23-3	7.6	30	—
N 25-8	0.7	—	—
N 39-1	2.2	<30	—
N 62-2	0.8	—	—
91-6	0.9	—	—
G-1	1.6	30	165
G-5	0.7	30	48
109-1	14.0	120	144
109-3	3.8	<30	88
106-4	3.0	<30	—
103-1	33.0	375	139
Kp 931	30.0	250	180
Kp 11-4	15.0	167	180
K 111-3	1.8	<30	152
35-9	0.7	—	—
39-5	0.8	—	—
44-11	1.1	120	12
44-22	15.5	120	73
48-12	4.2	<30	—
62-2	20.2	<30	152
61-1	13.5	30	39
36-9	31.0	240	120
42-2	—	<30	150
A 25-4	1.7	<30	—
44-24	11.5	120	54
A 66-11	0.7	—	—

活性は pH 7.0 で測定し, 培養濾液 1 ml 当りの単位を示した.

を示す酵素生産菌が存在するだろうと推定される結果も得られたが、これらの菌株についてはさらに精査されなければならない。これらのことから Evans の指摘のように、hide powder を分解するある種の特異的なプロテアーゼが存在するものと考えられる。

2. 粗酵素標品の3種基質に対する活性

D-collagenase 活性と caseinase 活性, および gelatinase 活性とを比較検討し, その特殊性の有無をしらべるためには, D-collagenase 活性を強力にもち, ある程度の caseinase 活性および gelatinase 活性をも有する菌株を用いるのが有利であるという観点から, これらの酵素能を有する次の好気性細菌3株を選択して, 生産される酵素の各基質に対する活性と pH との関係をまずしらべた。細菌3株 (Kp 931 株, Kp 11-4 株, 103-1 株) を各々酵素生産培地に接種し, 30°, 48 時間振盪培養した。Kp 931 株, 103-1 株の培養濾液は硫酸 0~0.4 飽和区分, Kp 11-4 株の培養濾液は硫酸 0~0.6 飽和区分から粗酵素標品を調製し, 供試3基質に対する酵素の比活性をしらべた。第1図は各菌株の D-collagenase 活性, gelatinase 活性および caseinase 活性の3活性について pH-活性度曲線を示したものである。Kp 931 株の粗酵素はアルカリ性プロテアーゼであって, gelatinase 活性の至適 pH は 9.0, caseinase 活性のそれは 8.0 であるのに, D-collagenase 活性においては 8.0~10.0 にま

でおよぶ, gelatinase 活性をみると pH 9.0 で Kp 11-4 株の粗酵素は, Kp 931 株の粗酵素より比活性が高いにもかかわらず, D-collagenase 活性では, いずれの pH においても Kp 11-4 株の粗酵素の比活性はかなり低く, その比活性の高い pH 10.0 においても Kp 931 株の粗酵素の比活性の 1/2 以下しか認められない。これらのことから Kp 931 株の粗酵素は, D-collagenase 活性が特に優れていて, 他の2菌株に比べ, その生産する蛋白分解酵素が不溶性コラーゲンに対して特異的な親和性を有するものと考えられる。

3. Kp 931 株の生育と酵素の生産

粗酵素標品を用いて D-collagenase 活性, gelatinase 活性および caseinase 活性と pH との関係をしらべ, 特に Kp 931 株の生産する蛋白分解酵素は, 不溶性コラーゲンに対して特異的に作用する酵素を含むのではないかと推論した。そこで Kp 931 株の培養時において, それぞれの生育時期に生産される蛋白分解酵素活性を比較検討することによって, このような推論をさらに進め得るか否かを検討した。すなわち, D-collagenase 活性が比活性で最も高い Kp 931 株を用い, 生育に伴って生産される蛋白分解酵素の諸活性を経時的に測定し, それぞれの酵素活性が, 菌の生育時期によって別個に発現されるか否かをしらべた。

Kp 931 株を普通ブイヨン培地で 30°, 24 時間振盪培

養して得られる培養液を直接接種菌液とし, 酵素生産培地に 1% 接種した。すなわち, 酵素生産培地 A [グルコース 1%, ポリペプトン 1%, 肉エキス 1%, 塩類 (硫酸を含まない Davis の塩類), pH 7.0], および B (グルコース 1%, ポリペプトン 1.71%, ゼラチン 1.69%, 塩類, pH 7.0) を各々 100 ml を含む肩つきコルベン (500 ml) に, 上記接種菌液 1 ml を接種し, 30° にて振盪培養した。試料粗酵素液は経時的に採取した培養液を

第1図 好気性細菌3株の hide powder, ゼラチンおよびカゼインに対する pH 活性度曲線

—●— D-collagenase 活性 -○- gelatinase 活性
...○... caseinase 活性

第 2 図 Kp 931 株の生育と生産される酵素の活性
酵素活性は培養濾液 1 ml 当りの単位で示した。

●—● pH ●—● D-collagenase 活性
○—○ O.D. ○—○ gelatinase 活性

9,000×g, 10 分, 0° の遠心により菌体を除去して得られる上清を用い, 粗酵素液 1 ml 当りの酵素活性を pH 9.0, 30° で測定した。なお, 菌の生育は経時的に採取した培養液を純水で 10 倍に希釈し, 660 mμ における吸光度で表わした。得られた成績を第 2 図に示した。

A, B いずれの培地においても, 生産された酵素の D-collagenase 活性は, 菌の生育に伴って高まり, 対数生育期の末期にはほぼ最高の活性を示すが, gelatinase 活性は前者の活性が最高 (A 培地), またはそれに近い (B 培地) 時期にあっても, まだ弱い活性しか認められない。しかし菌の生育が定常期に達してからは, D-collagenase 活性は増大せずむしろ減少するのに反して, gelatinase 活性は漸次増加し最高の活性を示し, 以後そのレベルがほとんど維持される。すなわち D-collagenase 活性に着目すれば, 見かけ上では gelatinase 生産の弱い時期に, D-collagenase 生産があるとみることもできる。これらの結果からみると供試 Kp 931 株は D-collagenase 活性をもつ酵素と gelatinase 活性をもつ酵素をそれぞれ独立に生産しているか, あるいは D-collagenase 活性の比較的高い酵素を対数生育期に, gelatinase 活性の比較的高い酵素を定常期によく生産している等が考えられる。いずれにしてもこの菌の生産するプロテアーゼは,

不溶性コラーゲンに対して特異な親和性をもっており, 菌の生育の対数期に生産されるものは不溶性蛋白分解能が大で, 後期に生産されるものは可溶性蛋白分解能が大である異種, または同種の酵素であると推論される。これらの点は今後さらに精査されなければならない。

4. Kp 931 株の菌学的性質

好気性細菌のうちでは *Bacillus* 属菌株および *Pseudomonas* 属菌株が不溶性コラーゲンを分解する酵素を生産することは, すでに報告されているが, 上述の不溶性コラーゲン分解酵素能の強い Kp 931 株が如何なる種に属する菌株かをしらべた。

供試菌の形態, 培養の性質, および生理的性質について, 常法どおり Bergey's Manual of Determinative Bacteriology VII⁽¹⁰⁾ に準じて行い, 第 2 表に示した。まず *Eubacteriales* の *Bacillaceae* に属し, species はアセチルメチルカルビノールを

第 2 表 Kp 931 株の菌学的性質

- (1) Cells ; Rods, 1.0~1.2 μ×2.0~3.3 μ, Short to long, tangled chains, Lightly stain, Square ends.
- (2) Gram-positive.
- (3) Spore ; Positive, Ellipsoidal, Central.
- (4) Motile ; Positive.
- (5) Catalase ; Positive.
- (6) Sporangia ; Not swollen.
- (7) Gelatin stab ; Rapid crateriform liquefaction.
- (8) Gelatin agar streak plate ; Wide zone of hydrolysis.
- (9) Agar colonies ; Large, rough, flat, spreading dense.
- (10) Agar slants ; Growth abundant, rough, opaque, whitish, nonadherent, spreading.
- (11) Broth ; Heavy, easily dispersed sediment, with soft ring pellicle.
- (12) Starch ; Scant hydrolyzed.
- (13) Acetylmethylcarbinol ; Produced.
- (14) Nitrites ; Produced from nitrates.
- (15) Acid (with ammonium salts as source of nitrogen) from glucose, sucrose, glycerol, arabinose and mannitol. No acid from xylose and lactose.
- (16) No gas from carbohydrates.
- (17) Biotin required for growth.

生産し、ゼラチン穿刺培養の液化状態が Rapid Liquefaction で、キシロースから酸生成がみられない点等は *B. cereus* に類似しており、アラビノースおよびマニトールからかなりの酸生成がみられるなどの点は *B. megaterium* に類似しており、記載の合わない点が 2, 3 あるが、Agar colonies, Agar slants 等の性状から総じて *Bacillus cereus* に近縁のものと思われる。

要 約

(1) 土壌、泥土等から分離した好気性細菌の蛋白分解酵素生産能をそれらの培養濾液を用いてしらべ、hide powder, ゼラチンおよびカゼインに対する分解酵素活性は菌株により特異性を有することを見出した。

(2) D-collagenase 活性の強力な 1 菌株 (Kp 931 株) の培養濾液から調製した粗酵素標品で、蛋白分解の至適 pH をしらべ、これは D-collagenase 活性で 8.0~10.0, gelatinase 活性で 9.0, caseinase 活性で 8.0 にもつアルカリ性プロテアーゼであり、供試した他の 2 菌株に比べ Kp 931 株の蛋白分解酵素は、不溶性コラーゲン分解の比活性が特に優れていた。

(3) Kp 931 株の生育と蛋白分解酵素生産との関係をしらべ、供試菌は対数生育期の後期に最大の D-colla-

genase 活性を、また定常期に入ってから以後、最大の gelatinase 活性を示すことを認めた。

(4) D-collagenase 活性の強い菌株, Kp 931 株は *Bacillus cereus* に近縁のものと同定した。

なお本研究は、昭和 37 年度日本農芸化学会大会において発表した。

終りに臨み、御校閲を賜りました東北大学農学部高橋甫教授、および本研究に対し終始御鞭撻いただいた日本皮革研究所小嶋尚夫博士に深甚の謝意を表します。

- (1) D.G. Evans : *J. Gen. Microbiol.*, **7**, 397 (1952).
- (2) D.G. Evans : *ibid.*, **8**, 481 (1953).
- (3) K. Morihara : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 99 (1957).
- (4) 小嶋尚夫他 : 本誌, **32**, 33 (1958).
- (5) 藤井 実他 : 水産講習所報告, **8**, 147 (1959).
- (6) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, **2**, 240 (1956).
- (7) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, **2**, 253 (1956).
- (8) R. E. Neumann, M. A. Logan : *J. Biol. Chem.*, **184**, 299 (1950).
- (9) 鬼塚卓弥 : 生化学, **32**, 857 (1960).
- (10) R. S. Breed et al. : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7 Ed. (1957).