プロテアーゼ阻害剤を用いた枯草菌孢子形成 機構に関する研究†

(昭和 62 年度農芸化学奨励賞受賞)

西 野 豊 和

(倉敷紡績株式会社技術研究所)

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などの *Bacillus* 属細菌は内生孢子を形成する好気性細菌で、栄養細胞→孢子形成→成熟孢子→発芽という生活環を有し、わが国では古くから納豆の製造に用いられてきたのをはじめ、アミラーゼ、プロテアーゼなどの実用酵素の生産菌として、発酵工業においてきわめて重要である。これら *Bacillus* 属細菌、とりわけ枯草菌の孢子形成は単細胞生物の細胞分化のモデルとして興味を持たれ、その機構解明を目的として多くの研究が行われてきた⁽¹⁻³⁾。

枯草菌は孢子形成期に、菌体内と菌体外に数種のセリン、および金属プロテアーゼを生産する⁽⁴⁻⁸⁾。これらプロテアーゼのなかで菌体内セリンプロテアーゼが孢子形成に密接に関与することが、変異株を用いた遺伝学的研究から示唆されてきた^(4,9-16)。すなわち、*spoOA* と呼ばれる孢子形成初期過程の欠損株は孢子もセリンプロテアーゼも生産しないこと⁽⁹⁾、また高温で培養すると菌体内セリンプロテアーゼを生産しない温度感受性変異株が、高温で孢子も形成しないことなどが明らかにされた^(10,12)。しかしながら、これらを根拠とするセリンプロテアーゼ必須説は、これら変異株が必ずしもプロテアーゼ構造遺伝子の特異的な変異株でないと思われる点で、若干の疑問が残されていた^(4,17,18)。一方では、孢子形成期の多くの代謝経路にプロテアーゼの関与が示唆されているが、これに関与するプロテアーゼの詳細は明らかではない⁽⁴⁾。

すなわち、著者らが本研究を始めた 1977 年当時、セ

リンプロテアーゼ必須説をはじめとして、孢子形成とセリンプロテアーゼの関係については多くの疑問点が残されており、その解明には従来の変異株を用いた研究に加えて、より直接的な研究方法の開発が望まれていた。たまたま大阪府立大学では村尾らにより、微生物起源のプロテアーゼ阻害剤の研究が行われており、そのなかに MAPI (Microbial Alkaline Proteinase Inhibitor) と名づけられた低分子セリン (アルカリ) プロテアーゼの阻害剤が得られていた (図 1)⁽¹⁹⁻²²⁾。この阻害剤はセリンプロテアーゼの活性中心部位に結合して、その活性を阻害するなどの点で、孢子形成とセリンプロテアーゼの関係解明に有効に利用できると推測された。そこで MAPI の孢子形成への影響を検討したところ、本阻害剤が枯草菌の孢子形成を強く抑制するという興味ある事実を発見した⁽²³⁻²⁵⁾。さらにこの発見を端緒として、孢子形成に必須な新規膜結合セリンプロテアーゼの発見をはじめ⁽²⁶⁾、内在性タンパク性阻害剤を介した細胞質セリンプロテアーゼの活性調節機構の存在を明らかにするなど⁽²⁷⁻²⁹⁾、孢子形成とセリンプロテアーゼの関係について多くの新しい知見を得ることができた。

本稿では、枯草菌の孢子形成とセリンプロテアーゼの関係について、とくに著者らのセリンプロテアーゼ阻害剤 MAPI を用いた研究を中心に紹介する。

I. 孢子形成に必要な膜結合セリン プロテアーゼの発見

1. 増殖、孢子形成に対する MAPI の影響^(23-25,30)

B. subtilis IFO 3027 を被験菌として、その増殖と孢子形成に対する MAPI の影響を検討した (図 2)。対照では培養開始 20 時間後 (t_{10}) に 70~80% の孢子形成率を示したのに対して、MAPI を 10 $\mu\text{g/ml}$ (約 10^{-5} M)

† Studies on Sporulation of *Bacillus subtilis* Using MAPI, a Serine Protease Inhibitor. Toyokazu NISHINO (Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd., Shimokita-cho 14-5, Neyagawa 572)

表 I Some Properties of [^{14}C] MAPI-MAPI Binding Protein Complex and the Membrane Bound Serine Protease

Properties	[^{14}C] MAPI-MAPI binding protein complex	Membrane bound serine protease
Solubilization from membrane	1 M NaCl+0.5% Amphitol 24 B	1 M NaCl+0.5% Amphitol 24 B
Solubility in low ionic strength buffer	No	No
Elution from Phenyl-Sepharose	1 M NaCl+0.5% Amphitol 24 B	1 M NaCl+0.5% Amphitol 24 B
Molecular weight	540,000	540,000
Complex formation with MAPI	Yes	Yes
Protease activity	Yes (After removing MAPI)	Yes

表 II Properties of Intracellular Serine Proteases of *Bacillus subtilis* IFO 3027

Properties	Membrane bound protease	Cytoplasmic		
		IP-I	IP-II	IP-III
Solubility in low ionic strength	Low	High	High	High
Molecular weight (monomer)	540,000 (62,000)	46,000 (36,000)	92,000	38,000 (38,000)
Isoelectric point	—	4.5	below 4.0	4.2
Optimum pH	11	7~9	10~11	10~11
Inhibitor (inhibition %)				
PMSF	100	100	100	100
MAPI	95	100	82	88
S-SI	7	64	22	17
EDTA	0	72	34	26
Hydrolysis of synthetic substrate (nmol/min/40 PU)				
BAEE	320	0	160	190
BTEE	2,100	740	3,800	5,900
Suc-(L-Ala) ₃ -pNA	7	0	0	0
Z-(L-Ala) ₂ -Leu-pNA	2,200	550	300	630

らかにした。このように孢子形成に関与するセリンプロテアーゼを直接証明したのは、本研究が初めてである。

II. 枯草菌の生産する菌体内セリンプロテアーゼの性質

1. 膜結合セリンプロテアーゼの性質^(23,26)

B. subtilis IFO 3027 の生産する膜結合セリンプロテアーゼを、低イオン強度緩衝液に対する透析、有機溶媒洗浄、Phenyl-Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィ、Sephacryl S-300 によるゲル濾過などの操作により、SDS 電気泳動的に均一に精製した。本酵素の性質を表 II に示す。本酵素は分子量 62,000 のモノマー 8 個から構成される分子量 54 万の酵素で、低イオン強度で沈殿する。セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF, MAPI, キモスタチンで強く阻害されるが、S-SI (*Streptomyces* Subtilisin Inhibitor) で阻害されないという特徴を示す。合成基質に対してチロシンおよびアルギニンエステルのいずれも分解し、さらにエラスターゼの基質である

Suc-(L-Ala)₃-pNA も分解するという広い基質特異性を示した。膜に結合したセリンプロテアーゼの報告はあるが^(7,33)、このようなユニークな性質の酵素は知られておらず、本酵素は全く新規な膜結合セリンプロテアーゼである。

2. 細胞質セリンプロテアーゼの性質^(27,34)

B. subtilis IFO 3027 の生産する 3 種の細胞質セリンプロテアーゼ、IP-I, IP-II, IP-III を精製しその性質を明らかにした(表 II)。IP-I は細胞質セリンプロテアーゼの主成分であり、金属キレート剤 EDTA で阻害され、チロシンエステルを特異的に分解するのに対して、IP-II, IP-III はアルギニンエステルも分解するのが特徴であった。

以上の結果と、枯草菌の各種菌株についての諸家の報告を総合すると、孢子形成期の枯草菌は基質特異性からキモトリプシン型酵素 (IP-I に相当) と、アルギニン結合も分解する酵素 (トリプシン様酵素, IP-II, IP-III が相当) の少なくとも 2 種のセリンプロテアーゼを細胞質

に生産すると推定される⁽⁶⁻⁸⁾。これらのなかでキモトリプシン型酵素 (IP-I に相当) の性質が最も明らかにされている⁽³⁵⁻³⁸⁾。この酵素は分子量約 6 万, 酸性側に等電点を持ったダイマー酵素であり, セリンプロテアーゼであるにもかかわらず EDTA で阻害され, チロシンエステルを特異的に分解する。また, その全アミノ酸配列も明らかにされ⁽¹⁸⁾, スブチリシン (菌体外セリンプロテアーゼ) と約 45% のホモロジーを有する。

III. 内在性タンパク性阻害剤による細胞質プロテアーゼの活性調節

1. 細胞質セリンプロテアーゼ生産に対する MAPI の影響⁽²⁷⁾

孢子形成に必須な膜結合セリンプロテアーゼの役割解明の一環として, MAPI によるこの酵素の不活性化が細胞質プロテアーゼの生産にどのように影響するかを検討した。MAPI を 15 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で t_0 期に添加すると, 膜に加えて細胞質セリンプロテアーゼ活性も減少した。この原因を MAPI の阻害作用を解除する作用を持った, ヒドロキシルアミンを用いて検討した。膜結合セリンプロテアーゼの活性減少は予想されたように MAPI の阻害作用によるものであったが, 細胞質セリンプロテアーゼでは酵素 (活性酵素) の生産が著しく抑制されていることがわかった (図 3)。すなわち, 対照で $t_4 \sim t_8$ 期以後にこの画分の活性が急増するのに対して, MAPI を加えるとその生産が著しく抑えられ, t_8 期の生産量 (活性) は対照の約 30% であった。さらに, 細胞質に生産

される 3 種のセリンプロテアーゼのなかで, IP-I の活性が特異的に減少していることが, ゲル濾過, 阻害剤感受性の変化などから推定された。すなわち, IP-I の生産は, この酵素に固有な調節機構で制御されており, その機構が MAPI の添加で錯乱されると推測された。

最近, IP-I (原報では ISP-I) の抗体を用いて IP-I のタンパク量が測定され⁽³⁹⁾, 孢子形成初期では生産されるタンパク量に比較して, 活性酵素の量が異常に少ないことが明らかにされた。このような結果からも, IP-I に固有の調節機構の存在が支持される。

2. 内在性タンパク性阻害剤に対する MAPI の影響^(27,29)

B. subtilis, *B. megaterium* などの菌体内に, 菌体内セリンプロテアーゼを特異的に阻害するタンパク性プロテアーゼ阻害剤の存在が Millet らにより報告されていた^(40,41)。そこで MAPI 添加時の IP-I 活性の減少に, この阻害剤が関係しているかを検討した (図 3)。本阻害剤は孢子形成初期の t_0 付近から生産され始め, 対照では, IP-I 活性が増加する $t_4 \sim t_8$ 期ころからその菌体内レベルはほぼ一定となった。これに対して MAPI 添加培養では $t_4 \sim t_8$ 期以後も引続き生産, 蓄積され, t_8 期の量は対照の約 3 倍となった。この量は MAPI 添加による IP-I 活性の減少に見合った量であり, IP-I の活性が, このタンパク性阻害剤で調節されている可能性が強く示唆された。

3. タンパク性阻害剤の性質^(28,29)

タンパク性阻害剤を精製し, その性質を明らかにした (表 III)。本阻害剤は分子量 16,000, 等電点 4.8 の単純タンパクで, 熱, 酸に安定である。アミノ酸組成ではシステイン, ヒスチジン残基を含まない点, グルタミン酸含量が高い (22%) 点などが特徴であった。また, N 末端アミノ酸配列は表 III のように推定される。

表 III Properties of Proteinaceous Protease Inhibitor of *Bacillus subtilis* IFO 3027

Molecular weight	16,000
Isoelectric point	4.8
Stability	Unstable above pH 10.0 (100°C, 5 min)
Amino acid comp.	No Cys or His residue
N-terminal sequence	(Met)-Glu-Asn-Gln-Glu-Val-Val-Leu-X-X-Asp-Ala-Ile-Gln-Glu...
Enzyme inhibited	Microbial serine proteases
Inhibition	Complex formation

図 3 Effect of MAPI on Productions of Cytoplasmic Proteases and Proteinaceous Inhibitor of *B. subtilis*. Open symbols, control; closed symbols, culture with MAPI.

される。また一方では、細胞質セリンプロテアーゼは孢子形成に必ずしも必須でないと思われている(後述)。したがって、膜結合セリンプロテアーゼの必須な孢子形成過程については、今後の検討が必要である。

細胞質のキモトリプシン型酵素(IP-I)は不要となったタンパク質を分解し、孢子に特異的なタンパク質の合成に必要なアミノ酸を供給する^(4,12)。しかし、遺伝子工学的手法でこの酵素の構造遺伝子を変異させた菌株は、合成培地では孢子を形成しないが、天然培地では正常に孢子を形成することが明らかにされており⁽¹⁸⁾、IP-Iが通常の条件(培地)での孢子形成に必須ではないと推測されている。一方、トリプシン様酵素(IP-II, IP-III)が孢子コートタンパク質のプロセッシングに関係することが、この酵素の欠損株で明らかにされたが、生成された孢子の耐熱性などに正常な孢子との差は認められていない⁽⁴²⁾。以上の結果から、これらの細胞質セリンプロテアーゼは孢子形成に密接に関係しているが、必須ではないと推定される。

おわりに

本稿では枯草菌の孢子形成とセリンプロテアーゼの関係について、セリンプロテアーゼ阻害剤 MAPI を用いた著者らの結果を中心に紹介した。最近、枯草菌の孢子形成とセリンプロテアーゼの関係について、密接に関係するが、必須とまではいえないとする考えが大勢を占めていた。MAPIを用いた著者らの研究は、孢子形成にセリンプロテアーゼがやはり必須であり、しかもその酵素は全く新規な膜結合セリンプロテアーゼであることを明らかにしたものである。さらに、細胞質レベルのプロテアーゼの活性調節機構の存在を明らかにするなど、多くの新しい知見を得ることができた。

それではなぜ膜結合セリンプロテアーゼが孢子形成に必須なのであろうか。この酵素の役割については今後さらに検討されねばならない。

本研究は大阪府立大学農学部微生物利用学研究室で行ったものであり、終始御指導をいただきました大阪府立大学名誉教授村尾澤夫先生に深く御礼申し上げます。また、共同研究者の清水保広博士、亀田勝博士、ならびに、さまざまな御鞭撻と御援助をいただいた大阪府立大学農学部微生物利用学研究室の皆様方に、心から御礼申し上げます。

- (1) P. J. Piggot and J. G. Coote: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 908 (1986).
- (2) P. J. Piggot: *Biol. Rev.*, **54**, 347 (1979).
- (3) 小林泰夫:「耐久型細胞」, 蜂須賀養悦, 堀越弘毅編, 岩波書店, 1975, p.89.
- (4) M. R. Maurizi and R. L. Switzer: "Current Topics in Cellular Regulation," ed. by B. L. Horecker and E. R. Stadtman, Academic Press Inc., New York, 1980, p.163.
- (5) L. Prestidge, V. Gage and J. Spizizen: *J. Bacteriol.*, **107**, 815 (1971).
- (6) S. Hiroishi and H. Kadota: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1047 (1976).
- (7) A. Y. Strongin, L. S. Izotova, Z. T. Abramov, L. M. Ermakova, D. I. Gorodetsky and V. M. Stepanov: *Arch. Microbiol.*, **119**, 287 (1978).
- (8) O. P. Srivastava and A. I. Aronson: *Arch. Microbiol.*, **129**, 227 (1981).
- (9) J. P. Spizizen: "Spore," Vol. III, ed. by L. L. Campbell and H. O. Halvorson, Am. Soc. Microbiol., Ann. Arbor, Mich., 1965, p.125.
- (10) L. Santo, T. J. Leighton and R. H. Doi: *J. Bacteriol.*, **111**, 248 (1972).
- (11) J. H. Hageman and B. C. Carlton: *J. Bacteriol.*, **114**, 612 (1973).
- (12) P. Kerjan, E. Keryer and J. Szulmajster: *Eur. J. Biochem.*, **98**, 353 (1979).
- (13) J. F. Michel and J. Millet: *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 220 (1970).
- (14) M. Y. Yang, E. Ferrari and D. J. Henner: *J. Bacteriol.*, **160**, 15 (1984).
- (15) C. A. Roitsch and J. H. Hageman: *J. Bacteriol.*, **155**, 145 (1983).
- (16) F. Kawamura and R. H. Doi: *J. Bacteriol.*, **160**, 442 (1984).
- (17) J. O. Neway and R. L. Switzer: *J. Bacteriol.*, **155**, 522 (1983).
- (18) Y. Koide, A. Nakamura, T. Uozumi and T. Beppu: *J. Bacteriol.*, **167**, 110 (1986).
- (19) S. Murao and T. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2209 (1978).
- (20) T. Watanabe and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 243 (1978).
- (21) T. Watanabe and S. Murao: *Tetrahedron Lett.*, 625 (1979).
- (22) T. Shin-Watanabe, K. Fukuhara and S. Murao: *Tetrahedron*, **38**, 1775 (1982).
- (23) S. Murao, M. Kameda and T. Nishino: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1997 (1979).
- (24) S. Murao, Y. Shimizu, M. Kameda and T. Nishino: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 3075 (1982).
- (25) Y. Shimizu, T. Nishino and S. Murao: *Ag-*

- ric. Biol. Chem.*, **48**, 365 (1984).
- (26) Y. Shimizu, T. Nishino and S. Murao : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1775 (1983).
- (27) Y. Shimizu, T. Nishino and S. Murao : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3109 (1984).
- (28) T. Nishino, Y. Shimizu, K.-I. Fukuhara and S. Murao : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3059 (1986).
- (29) T. Nishino and S. Murao : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3065 (1986).
- (30) S. Murao, T. Nishino and M. Kameda : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 671 (1979).
- (31) B. N. Dancer and J. Mandelstam : *J. Bacteriol.*, **121**, 406 (1975).
- (32) K. Davis-Mancini, I. P. Lopez and J. H. Hageman : *J. Bacteriol.*, **136**, 625 (1978).
- (33) P. Mantsala and H. Zalkin : *J. Bacteriol.*, **141**, 493 (1980).
- (34) 味谷浩之, 西野豊和, 荒井基夫, 村尾澤夫 : 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p.102.
- (35) V. M. Stepanov, A. Ya. Strongin, L. S. Izotova, Z. T. Abramov, L. A. Lyublinskaya, L. M. Ermakova, L. A. Baratova and L. P. Belyanova : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 298 (1977).
- (36) A. Ya. Strongin, L. S. Izotova, Z. T. Abramov, D. I. Gorodetsky, L. M. Ermakova, L. A. Baratova, L. P. Belyanova and V. M. Stepanov : *J. Bacteriol.*, **133**, 1401 (1978).
- (37) A. Ya. Strongin, Z. T. Abramov, N. G. Yaroslavtseva, L. A. Baratova, K. A. Shaginyan, L. P. Belyanova and V. M. Stepanov : *J. Bacteriol.*, **137**, 1017 (1979).
- (38) A. Ya. Strongin, D. I. Gorodetsky, I. A. Kuznetsova, V. V. Yanonis, Z. T. Abramov, L. P. Belyanova, L. A. Baratova and V. M. Stepanov : *Biochem. J.*, **179**, 333 (1979).
- (39) T. J. Burnett, G. W. Shankweiler and J. H. Hageman : *J. Bacteriol.*, **165**, 139 (1986).
- (40) J. Millet : *FEBS Lett.*, **74**, 59 (1977).
- (41) J. Millet and J. Gregoire : *Biochimie*, **61**, 385 (1979).
- (42) K. J. Sastry, O. P. Srivastava, J. Millet, P. C. Fitz-James and K. Aronson : *J. Bacteriol.*, **153**, 511 (1983).