放線菌が産生するプロテアーゼによる エチゼンクラゲの分解への適用

土井宏育,¹ 岡達三,² 野々村禎昭^{1*}

(2007年11月20日受付, 2008年4月8日受理)

¹財団法人微生物化学研究会, ²鹿児島大学農学部獣医学科

Application of protease isolated from an actinomycete for
Nemopilema nomurai Kishinouye decomposition

HIROYASU DOI,¹ TATSUZO OKA² AND YOSHIKI NONOMURA¹

¹Microbial Chemistry Research Foundation, Specified Research Promoting Group, Tokyo 141-0021, ²Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

The bacterial strain 99-GP-2D-5 producing protease (E77) was isolated from Yatsuhigata tidal flat (Yatsuhigata) in Chiba Prefecture and its taxonomic classification was investigated in detail. From the result of molecular phylogenetic analysis based on base sequences of 16S rDNA, and amino acid analysis of the cell wall peptidoglycan, the bacterium was identified as an actinomycete of the genus *Streptomyces*. The optimal temperature and pH for enzyme activity were 70°C and 8, respectively. E77 could completely decompose *Nemopilema nomurai* Kishinouye under stable conditions (50°C and pH 8) within 60 min.

キーワード: *Streptomyces* sp., エチゼンクラゲ, プロテアーゼ, 分子系統解析

プロテアーゼ(蛋白質分解酵素)は、蛋白質のペプチド結合を加水分解する酵素であり、一般細菌、放線菌、糸状菌など多くの微生物が産生する。各種の蛋白質をペプチドあるいはアミノ酸に分解する技術は、医療用製剤や食品素材の加工など、極めて多様な産業分野において広範囲に利用されている。¹⁾ 蛋白質を分解するに当たり、塩酸等を用いる化学的分解方法は、分解効率には優れているものの、分解後中和の操作を必要とし環境汚染をまねく懸念があり、特に人体に関連する産業分野においては、プロテアーゼによる蛋白質の分解が利用されている。²⁻⁹⁾ また、ある一定温度以上の温度域での熱安定性と優れた蛋白質低分子化能力を併せ持ち、難分解性蛋白質を分解できる *Bacillus* 属に由来するプロテアーゼ¹⁰⁾ や、難分解性蛋白質性汚染成分に対して優れた洗浄力を持つ洗剤用プロテアーゼ¹¹⁾ が知られている。酵素活性、安定性が高く、製造コストが安価である産業上有用な新規プロテアーゼを得るには、新たな微生物を環境から分離する必要があると思われる。¹²⁾

著者らは2002年にProteinase-Kにより分解されにくい、密な構造をもった過塩素酸可溶性蛋白質(PSP)¹³⁾を分解する高プロテアーゼ活性を有する微生物を干潟底泥中から探索した。その結果、千葉県習志野市の谷津干潟から分離した放線菌がPSPだけではなく、ウシ海綿状脳症(狂牛病)、スクレイピー(ヒツジ)、クロイツフェルト・ヤコブ病(ヒト)など、プリオン病の原因となる異常プリオン蛋白質を分解するプロテアーゼE77を産生することを2004年に報告した。¹⁴⁾ さらにE77を陸揚げされたミズクラゲ(*Aurelia aurita*)の分解へ適用することを試み、E77によるミズクラゲの分解速度と酵素濃度、反応温度および塩分濃度の関係、さらに酵素溶液を繰り返してミズクラゲ個体の分解に供した場合の分解速度の変化について比較検討を行った結果、¹⁵⁾ E77が廃棄物としてのミズクラゲ個体の処理に極めて有効なことが分かった。本報ではクラゲ分解酵素E77(精製酵素プリオナーゼ)産生菌、99-GP-2D-5株の16S rDNAにもとづく相同性解析および分子系統解

析, 菌体アミノ酸の分析によって分類学的位置を調べた。プロテアーゼは, 他種の酵素と同様に酵素活性の発現には至適温度, pH を有する。本株が産生した E77 を最適な条件で使用するために, 熱および pH 安定性について詳細な検討を行ない, 各種阻害剤が酵素活性に与える影響を検討した。特に近年深刻な漁業被害をもたらしているエチゼンクラゲ (*Nemopilema nomurai* Kishinouye)^{16,17)} に対し, 各種既知プロテアーゼおよび E77 による分解を比較検討するとともに, E77 の最適条件下におけるエチゼンクラゲを完全に分解する時間を測定した。

材料および方法

99-GP-2D-5 株による E77 の産生 50 μ L のクラゲ分解酵素産生菌 99-GP-2D-5 株^{14,15)} 前培養液を FG 培地¹⁴⁾ に接種し, 5 日間振盪培養 (27°C, 180 rpm) 後, 培養液を遠心分離 (4°C, 15,300 $\times g$, 15 分間) し, 菌体を除去した。この培養上清を濾紙 (No. 2, アドバンテック, 東京) で濾過し, 終濃度が 70% となるように硫酸アンモニウム (和光純薬工業, 大阪) を添加し一昼夜低速で攪拌後, 混合液を 15,300 $\times g$ で 15 分間遠心分離 (4°C) し, 沈澱物を 0.05 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に溶解した。上記の溶解液は 7°C で 0.05 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に対して一昼夜透析を行った後, 透析液を SP-Sephadex C-25 (GE ヘルスケア, Uppsala, Sweden) カラムに通過させ 0.5 M NaCl で溶出して精製を行なった。

菌体アミノ酸の分析 菌体の細胞壁ペプチドグリカンに含まれるアミノ酸の分析を行なった。細胞壁およびペプチドグリカンの加水分解, 試料の分析は内田¹⁸⁾ および鈴木¹⁹⁾ の手法に準拠し, 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) プレートおよび Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (Waters, MA, USA) を用いて分析を行なった。本株の菌体に含まれるアミノ酸の種類は, UV スペクトルによるアミノ酸ピークの特長ならびにそのリテンションタイムと各種アミノ酸の混合標準試料で求められたピークリテンションタイムを比較して決定した。UPLC では以下の 2 種類の移動相を用いてグラジエント溶出を行なった。

移動相 A 5 : 95,

v/v = アセトニトリル/0.1 M 酢酸緩衝液

移動相 B 60 : 40,

v/v = アセトニトリル/0.1 M 酢酸緩衝液

16S rDNA の配列解析 本株の 16S rDNA の塩基配列約 1,500 bp を決定し, その塩基配列からデータベース上の配列と照合して相同性検索を行なった。また, 相同性検索の結果から推定される近縁菌群の基準株由来の

16S rDNA を取得して, 16S rDNA を含めた分子系統解析を行い, 本株の帰属分類群を推定した。

16S rDNA 分子系統解析 DNA の抽出は InstaGene Matrix (BIO-RAD, CA, USA) を用い, PCR は PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ, 滋賀) を使用した。以下の解析ツールの各プロトコールにもとづき, 塩基配列を解読し, 得られた塩基配列について相同性検索を行った。

サイクルシーケンシング : BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA)

シーケンシング : ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems, CA, USA)

使用プライマー²⁰⁾ : 9F, 339F, 785F, 1099F, 536R, 802R, 1242R および 1510R

解析ソフトウェア : Auto Assembler (Applied Biosystems, CA, USA), DNASIS Pro (日立ソフトウェアエンジニアリング, 東京)

相同性検索 : 国際塩基配列データベース (GenBank/ DDBJ/EMBL), 細菌基準株データベース (テクノスルガ・ラボ, 静岡), CLUSTAL W,²¹⁾ MEGA ver. 3.1²²⁾

プロテアーゼの活性の測定 1 試料あたり試験管 2 本 (試験区 1 本, 対照区 1 本), すべてに E77 精製溶液を 200 μ L, 0.05 M リン酸緩衝液を 800 μ L ずつ分注し, 試験区にはカゼイン溶液を 1 mL 加え, 十分に振盪しながら混和した。それぞれの実験で定められた温度で 20 分間反応させた後, 100% (v/w) トリクロロ酢酸溶液を 3 mL 加え反応を停止させた。反応停止後, 室温にて 30 分間以上放置し, 濾紙 (No. 2, アドバンテック, 東京) にて濾過後, それぞれの濾液について 280 nm の吸光度を測定した (吸光度 A)。なお対照区には E77 溶液のみを 37°C で 20 分間反応させた試料に, トリクロロ酢酸溶液を 3 mL ずつ加えてプロテアーゼを失活させた後, カゼイン溶液を 1 mL 加え, 試験区と同様の操作で, 吸光度を測定した (吸光度 B)。プロテアーゼ活性は吸光度 A から吸光度 B を減じた値を比活性 (Units/mL) として換算し, 最大活性の値を 100% とした時の相対値として示した。

1 Unit ; E77 溶液-基質混合用液 1 mL あたりの 280 nm の吸光度を 1 分間に 0.001 変化させるときの酵素活性と定義し, 比活性は以下に示す式で求めた。

比活性 (Units/mL) =

(吸光度 A - 吸光度 B) $\times$ 酵素-基質混合用液 /
1 mL $\times$ 1 / 反応時間 $\times$ 1 / 0.001

至適温度 E77 溶液を 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C で 20 分間カゼイン溶液と反応させ, 培養上清に含まれるプロテアーゼ活性の至適温度を測定した。プロテアーゼ活性は, 阻害剤を含まない対照区の活性を 100% とした場合の相対活性として評価した。

温度安定性 E77 溶液をそれぞれの温度 (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C) で 1 時間静置後急冷し, E77 の残存活性を 37°C, 20 分間で測定した。

至適 pH E77 溶液と等量の pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 (pH 3-6 はクエン酸-リン酸緩衝液, pH 7-9 は Tris-HCl 緩衝液, pH 10-12 はグリシン-NaOH 緩衝液) の緩衝液を混合し, それぞれの pH に調整した E77 溶液のプロテアーゼ活性を 37°C, 20 分間で測定した。

pH 安定性 E77 溶液と等量の pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 (pH 3-6 はクエン酸-リン酸緩衝液, pH 7-9 は Tris-HCl 緩衝液, pH 10-12 はグリシン-NaOH 緩衝液) の緩衝液を混合した後, 25°C で 24 時間保温した後, E77 の残存活性を 37°C, 20 分間で測定した。

プロテアーゼ阻害剤および各種金属イオンが E77 活性におよぼす影響 プロテアーゼ阻害剤および各種金属イオンは, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した E77 溶液 (20 Units/mL) に混合し, 37°C で 20 分間反応させた。プロテアーゼ活性は, 各種金属イオンおよび阻害剤を含まない対照区に対する相対活性で示した。プロテアーゼ阻害剤および各種金属イオンの種類と濃度はそれぞれ Table 3 と Table 4 に示した。

エチゼンクラゲの採取 エチゼンクラゲ (*Nemopilema nomurai* Kishinouye) は島根県浜田市沖で 2007 年 9 月に定置網で捕獲した。本研究で用いたエチゼンクラゲは, 3 cm 以下のブロック状にステンレスカッターで裁断したものをを用いた。

各種プロテアーゼによるエチゼンクラゲ分解の比較 200 mL 容ビーカーに人工海水 (ダイゴ人工海水 SP, 日本製薬, 東京) 100 mL を入れ, 0.1 g の各種プロテアーゼを混合し, 3 cm 角に切断したエチゼンクラゲを 1 個 (約 20 g) 浸漬し, 37°C に保温した。これを攪拌せず静置状態で所定の時間毎にクラゲブロックを取り出して重量変化を測定した。すべてのエチゼンクラゲブロック分解試験は, それぞれ同一条件で 3 回行い, 再現性を確認した。プロテアーゼは本研究で調製した粗精製 E77 のほか, Ficin (EC 3.4.22.3, MP Biomedicals LLC, OH, USA), Subtilisin (EC 3.4.21.14, MP Biomedicals LLC, OH, USA), Trypsin (EC 3.4.21.4, 和光純薬工業, 大阪) および Collagenase type V (EC 3.4.24.3, 和光純薬工業, 大阪) を用いた。なお, これらの酵素無添加を対照区とした。

最適条件下におけるエチゼンクラゲの分解 ホットスターラー上に 5 L 容量のビーカーを設置し, 人工海水 2 L を入れ, 約 300 g のクラゲブロックを浸漬した。これに 0.1% 濃度になるように粗精製 E77 溶液を混合し分解終了まで攪拌した。クラゲの分解温度は 50°C, pH 8 とし, これを最適条件とした。20 分間の測定では 70°C が最適であるが, 60 分後の安定性は 60°C 以上で低下す

るので, 安定性優先で考えて 50°C という便宜的な最適条件を設定した。¹⁵⁾ 所定時間ごとにクラゲを取り出してその重量変化を測定した。すべてのエチゼンクラゲの分解試験は, それぞれ同一条件で 3 回行い, 再現性を確認した。

酵素のクラゲ個体分解能の測定 酵素のクラゲ個体分解能は, クラゲが任意の時間で分解前湿重量を 100 とし, 以下に示す式で評価を行った。

クラゲ重量 (%) の変化 =

$$100 - \left[\frac{\text{分解前湿重量(g)} - \text{分解後湿重量(g)}}{\text{分解前湿重量(g)}} \right] \times 100$$

結 果

粗精製蛋白質分解酵素 E77 産生菌の培養 プロテアーゼ E77 産生放線菌 99-GP-2D-5 株は, ISP-4 (Difco) 寒天培地上に, 白の気菌糸を僅かに着生し, 可溶性色素の生成は認められなかった。液体培養開始後, 対数増殖期を経て 3 日目まで定常期に達した (Fig. 1)。一方, 酵素活性は培養開始後 3 日目から検出され, 5 日目に 370 Units/mL となり, 最大の活性となった。以上の結果から E77 は, 培養開始 5 日後に培養を停止させ, E77 を含む培養液から調製を行なった。

菌体アミノ酸の分析 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) プレートによるジアミノピメリン酸の分析結果より, 本株の培養菌体から, LL-ジアミノピメリン酸 (LL-diaminopimelic acid) が検出された。

ACQUITY UPLC (Ultra Performance LC) System (Waters, MA, USA) によるアミノ酸分析の結果, 本株の菌体にはグルタミン酸, セリン, グリシン, アラニン, LL-ジアミノピメリン酸の存在が確認された (Fig. 2)。

16S rDNA 塩基配列による同定 BLAST²³⁾を用いた細菌基準株データベースによる相同性検索の結果, 本株

Fig. 1 Time course of growth of strain 99-GP-2D-5 and E77 production. ●; O.D. at 600 nm, □; Protease activity.

Fig. 2 UPLC chromatograms of amino acids. A: Chromatogram of an amino acid standard mixture, B: Chromatogram of amino acids from strain 99-GP-2D-5 cell body and peptidoglycan hydrolysates. Lys; Lysine, Ser; Serine, Ala; Alanine, Glu; Glutamic acid, Thr; Threonine, Orn; Ornithine, Asp; Aspartic acid, Gly; Glycine, Hse; Homoserine, A₂Bu; 2,4-diaminobutyric acid, LL-A₂pm; LL-diaminopimelic acid, meso-A₂pm; meso-diaminopimelic acid.

の16S rDNA塩基配列は*Streptomyces*属由来の16S rDNAと高い相同性を示し、*S. chrestomyceticus*²⁵⁾ DSM40545株および*S. rimosus subsp. paromomycinus*²⁵⁾ DSM41429株と97.3%の最も高い相同性を示した(Table 1)。GenBank/DDBJ/EMBLに対する相同性検索においても、本株の16S rDNA塩基配列は*Streptomyces*属由来の16S rDNAに対し高い相同性を示した(Table 2)。本株に近縁と考えられる*Streptomyces*属各種の基準株由来の16S rDNAを取得し、分子系統樹を作成した。分子系統解析の結果、本株の16S rDNAは*Streptomyces*属の16S rDNAが形成するクラスター内に含まれたが、単独で系統枝を形成した(Fig. 3)。

酵素至適温度 E77の酵素至適温度をFig. 4Aに示す。この図からわかるように10–40℃では温度が高くなるほど酵素活性は増大した。50℃以上では急激に活性が上昇し、至適温度は70℃であり、60℃では70℃の50%程度であった。80℃以上では活性が減少し、100℃では40、50℃とほぼ同等であった。Fig. 4Aの結果から、酵素活性は60–70℃に加温すると増大した。

温度安定性 E77の温度安定性をFig. 4Bに示す。30–50℃にかけて温度の上昇とともに活性が減少したが、60℃以上では活性が急激に低下し、60℃では30℃の75%程度であった。また70℃以上では60分間の加熱で活性がほとんど消失し、90℃以上では60分間加熱すると失活するということが明らかになった。

至適pH E77の至適pHをFig. 5Aに示す。至適pHは8であった。酸性側では低活性であり、pH 6ではpH 8の50%程度の活性であった。一方8以上のpHではおおむね75%以上の活性があった。

pH安定性 E77のpH安定性をFig. 5Bに示す。pH安定性は酸性側で低く、pH 6ではpH 9の約50%であった。pH 8以上のアルカリ側では安定性が高かった。至適pHとpH安定性を測定した結果からpH 8付近が最も活性が高く、しかも安定であることがわかった。

プロテアーゼ阻害剤および金属イオンの影響 各種プロテアーゼ阻害剤および金属イオンをE77溶液と混合し、プロテアーゼ活性への影響を測定したところ(Table 3, 4)、金属キレート剤である1 mMのEDTA

Table 1 Base homology between strain 99-GP-2D-5 and bacteria closely related to DNA sequence of strain 99-GP-2D-5 by using an Apollon DB-BA 3.0 (TechnoSuruga Laboratory)

Registration name	Strain name	Accession No.	Similarity
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	DSM 40545	AJ621609	1458/1499 = 97.3%
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i>	DSM 41429	AJ621610	1457/1498 = 97.3%
<i>Streptomyces sampsonii</i>	ATCC25495	D63871	1471/1522 = 96.6%
<i>Streptomyces albofaciens</i>	JCM 4342	AB045880	1448/1491 = 97.1%
<i>Streptomyces caelestis</i>	NRRL 2418	X80824	1475/1526 = 96.7%
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	DSM 40313	AJ621602	1453/1500 = 96.9%
<i>Streptomyces sclerotialis</i>	DSM 43032	AJ621608	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces emmpens</i>	DSM 40941	AJ621603	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces catenulae</i>	DSM 40258	AJ621613	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces hebeiensis</i>	YIM 001	AY277529	1468/1523 = 96.4%
<i>Streptomyces thermodiastaticus</i>	JCM 4840	AB018095	1467/1523 = 96.3%
<i>Streptomyces albognseolus</i>	NRRL B-1305	AJ494865	1473/1528 = 96.4%
<i>Streptomyces lydicus</i>	ATCC 25470	Y15507	1437/1483 = 96.9%
<i>Streptomyces eulythermus</i>	ATCC14975	D63870	1462/1521 = 96.1%
<i>Streptomyces griseocameus</i>	DSM40004	X99943	1466/1522 = 96.3%
<i>Streptomyces niger</i>	DSM 43049	AJ621607	1446/1499 = 96.5%
<i>Streptomyces sodiophilus</i>	YIM 80305	AY236339	1439/1488 = 96.7%
<i>Streptomyces tubercidicus</i>	DSM 40261	AJ621612	1445/1499 = 96.4%
<i>Streptomyces chattanoogaensis</i>	DSM 40002	AJ621611	1436/1486 = 96.6%
<i>Streptomyces violaceus</i>	ISP 5209	AJ399480	1434/1481 = 96.8%
<i>Streptomyces mashuensis</i>	DSM40221	X79323	1464/1523 = 96.1%
<i>Streptomyces yunnanensis</i>	YIM 41004	AF346818	1437/1488 = 96.6%
<i>Streptomyces violens</i>	DSM 40597	AJ621605	1444/1499 = 96.3%
<i>Streptomyces yogyakartensis</i>	C4R3	AJ391827	1435/1484 = 96.7%
<i>Streptomyces tendae</i>	ATCC19812	D63873	1461/1522 = 96.0%
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i>	JCM 4667	AB045883	1438/1489 = 96.6%
<i>Streptomyces coelestis</i>	ICSSB 1021	AF503496	1458/1519 = 96.0%
<i>Streptomyces kasugaensis</i>	M338-MI	AB024441	1440/1492 = 96.5%
<i>Streptomyces armeniacus</i>	JCM 3070	AB018094	1461/1524 = 95.9%
<i>Streptomyces africanus</i>	CPJVR-H	AY208912	1446/1496 = 96.7%

では活性の低下は観察されなかった。一方 1 mM の PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) ではプロテアーゼ活性は阻害剤を加えなかった対照区より 86.9% 減少した。ヨード類, SDS は強く活性を阻害した。ほとんどの各種金属イオンはプロテアーゼ活性に影響を与えなかったが, 水銀イオンにより 39.5% の阻害が認められた。一方ナトリウムイオンは 11.4% 活性を増大させた。

各種プロテアーゼによるエチゼンクラゲ分解の比較 99-GP-2D-5 株培養液から調製した E77 の他, Ficin (システインプロテアーゼ), Subtilisin および Trypsin (セリンプロテアーゼ), Collagenase type V (メタロプロテアーゼ) を人工海水に溶解し, 3 cm 角に切断したエチゼンクラゲブロックの溶解を静置状態で観察した (Fig. 6)。人工海水中に浸漬しただけのエチゼンクラゲ対照区では, 7 時間経過後も重量比で約 80% の組織が溶解せずに残存していた。これに対し, E77 では浸漬

開始から 3 時間後に約 20% にまで減重し, 7 時間後には完全に消失していた。E77 と同じセリンプロテアーゼに属する Subtilisin および Trypsin では 7 時間経過しても約 20% のクラゲが未溶解であった。植物由来システインプロテアーゼである Ficin は, 対照区と同様にほとんどエチゼンクラゲを減重することができなかった。Collagenase type V 試験区では, 7 時間経過後にも 50% のエチゼンクラゲが溶解していなかった。

最適条件下におけるエチゼンクラゲの分解 Fig. 4, 5 および既報¹⁵⁾で検討したクラゲ分解の最適条件下で, E77 によるエチゼンクラゲの分解を検討した (Fig. 7A, B)。30 分間経過後, E77 を混合しなかった対照区は約 30% のクラゲが残存していたが, E77 試験区では約 3% にまで減重化することができた (Fig. 7B)。60 分間経過後も対照区で約 10% のクラゲが未分解のまま残存していたが, E77 ではエチゼンクラゲは完全に溶解し, 液状となった。

Table 2 Base homology between strain 99-GP-2D-5 and bacteria closely related to DNA sequence of strain 99-GP-2D-5 by using the International Nucleotide Sequence Database

Registration name	Strain name	Accession No.	Similarity
<i>Streptomyces cebimarensis</i>	DSM 41798	AJ560629	1477/1520 = 97.2%
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	DSM 40545	AJ621609	1458/1499 = 97.3%
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i>	DSM 41429	AJ621610	1457/1498 = 97.3%
<i>Streptomyces somaliensis</i>	DSM 40760	AJ007399	1447/1486 = 97.4%
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	NBRC 13444	AB184407	1441/1482 = 97.2%
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i>	NBRC 15454	AB184680	1441/1482 = 97.2%
<i>Streptomyces daliensis</i>	YIM 31724	AY785161	1472/1523 = 96.7%
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	DSM 40313	AJ621602	1453/1500 = 96.9%
<i>Streptomyces catenulae</i>	ISP 5258	AY999778	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces catenulae</i>	DSM 40258	AJ621613	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces sclerotialis</i>	DSM 43032	AJ621608	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces emmpens</i>	DSM 40941	AJ621603	1451/1499 = 96.8%
<i>Streptomyces lividus</i>	NBRC 13787	AB184480	1437/1481 = 97.0%
<i>Streptomyces</i> sp.	E1351	DQ303455	1443/1487 = 97.0%
<i>Streptomyces muconavus</i>	NBRC 13973	AB184555	1435/1481 = 96.9%
<i>Streptomyces chattanoogaensis</i>	DSM 40002	AJ621611	1436/1486 = 96.6%
<i>Streptomyces gibsonii</i>	LMG 19912	AJ781753	1435/1485 = 96.6%
<i>Streptomyces rangoonensis</i>	LMG 20295	AJ781366	1435/1485 = 96.6%
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	NBRC 3418	AB184771	1435/1484 = 96.7%
<i>Streptomyces gibsonii</i>	NBRC 15415	AB184663	1433/1481 = 96.8%
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	NBRC 3710	AB184781	1434/1483 = 96.7%
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	NBRC 13014	AB184257	1429/1477 = 96.8%
<i>Streptomyces cattleya</i>	JCM 4925	AB045871	1435/1488 = 96.4%
<i>Streptomyces almquistii</i>	NBRC 13015	AB184258	1425/1473 = 96.7%
<i>Streptomyces rangoonensis</i>	NBRC 13078	AB184295	1422/1470 = 96.7%
<i>Streptomyces naganishii</i>	NBRC 12892	AB184224	1427/1477 = 96.6%
<i>Streptomyces albus</i>		AJ697941	1421/1470 = 96.7%
<i>Streptomyces armeniacus</i>	JCM 3070	AB018094	1461/1524 = 95.9%
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i>	PNK1-3	AB231803	1402/1454 = 96.4%
<i>Streptomyces</i> sp.	VA26256_03	AY436366	1389/1438 = 96.6%

考 察

日本近海で大量発生するエチゼンクラゲ (*Nemopilema nomurai* Kishinouye) は、海流に乗って日本各地の沿岸に出現し、近年沿岸の定置網漁、底曳網漁、まき網漁などの漁業に甚大な被害をもたらす、社会的にも大きな問題になっている。^{16,17)} 一方海水に浮遊しているミズクラゲ (*Aurelia aurita*) は、主に温暖な時期にしばしば大発生し、主として海水を利用している臨海産業に甚大な被害をもたらしている。²⁴⁾ 例えば、大量の冷却水が必要とする発電所や製鉄所などの臨海プラント施設においては、海水を冷却水として多量に使用するため、海水取水口をクラゲ類が閉塞してしまうことにより、取水が制限または停止され、発電などの業務に支障をきたすという被害が問題となってきている。このようなクラゲ類による臨海工業被害対策としては、人手による排除作業が主であるが、防除網を設置してクラゲ類が取水口に入

り込むことを防ぐ方法と回転式除塵機（ロータリースクリーン）、ポンプを用いてクラゲ類を陸揚げ処分する方法が行われている。陸揚げしたクラゲ類はこれまで廃棄物ヤードに搬送後、自然乾燥により脱水、減容化し産業廃棄物として委託処理するか、あるいは独自に焼却処理または埋め立て処分するのが一般的であった。天日乾燥によるクラゲ処理は、天候に左右されやすく、処理時間も数日程度必要とする。陸揚げしたクラゲはそのまま放置すると腐敗して悪臭を発生し、腐敗したクラゲから浸出してくる塩分を含んだ有機性廃液は COD 値が高い。また、クラゲ個体の 95-98% は水であり、焼却による処理は極めて非効率的である。処分場までクラゲを運搬する場合、クラゲ個体から流出する塩分により運搬トラックが錆びることや、最終的な廃棄物も塩分を含んでいるため埋め立て地やその周辺に塩害をもたらす。またクラゲ類はゼラチン状で流動性に乏しいため、通常の廃水処理施設での処理も極めて困難である。また埋め立ては

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree showing relationship between strain 99-GP-2D-5 and related species of the genus *Streptomyces*, on the basis of nearly complete 16S rDNA gene sequences. The scale bar denotes the number of substitutions per nucleotide position. The numbers on the branches indicate the percentage bootstrap values. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

Fig. 4 Effect of temperature on protease activity (A) and stability (B) of E77. Protease stability (B) was measured at 37°C for 20 min after incubation at each temperature for 1 hour.

Fig. 5 Effect of pH on protease activity (A) and stability (B) of E77.

Table 3 Effects of various chemical modifiers on E77 activity

Chemicals	Concentration	Relative activity (%)
None		100
2,3-Butanedione	1 mM	96.1
	10 mM	88.0
<i>p</i> -CMB	1 mM	95.3
	10 mM	78.1
DEP	10 mM	17.1
DFP	1 mM	41.1
	10 mM	18.8
DTNB	1 mM	88.3
	10 mM	87.1
H ₂ O ₂	1 mM	83.4
	10 mM	81.6
Hydroxylamine	10 mM	98.9
I ₂	1 mM	11.4
	10 mM	7.9
Iodoacetate	1 mM	14.3
	10 mM	10.2
NEM	1 mM	101.9
	10 mM	106.1
PMSF	1 mM	13.1
	10 mM	7.8
Phenylglyoxal	1 mM	73.8
	10 mM	75.6
TLCK	10 mM	82.1
TPCK	10 mM	96.0
ZPCK	10 mM	64.1
β -Mercaptoethanol	20 mM	108.9
EDTA	1 mM	99.9
SDS	3.46 mM	9.9
Urea	6 M	185.9

p-CMB: *p*-chloromercuribenzoic acid, DEP: diethyl pyrocarbonate, DFP: diisopropyl phosphorofluoridate, DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), NEM: *N*-ethylmaleimide, PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride, TLCK: L-1-chloro-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanone, TPCK: L-1-chloro-3-(4-tosylamido)-4-phenyl-2-butanone, ZPCK: N-benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone.

Table 4 Effect of various metal ions on E77 activity

Metal ions (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
AgNO ₃	83.6
MgSO ₄	97.1
FeSO ₄	94.6
MgCl ₂	99.5
CaCl ₂	98.0
HgCl ₂	60.5
KCl	96.1
NiCl ₂	101.0
NaCl	111.4
CoCl ₂	94.6

法律規制が強まり不可能となった。

本研究では、プロテアーゼ産生微生物の同定を行い、プロテアーゼの諸性質を検討した上で各種既知プロテアーゼとエチゼンクラゲ分解時間の比較検討を行った。さらにプロテアーゼの最適条件下でエチゼンクラゲの分解時間の短縮化について検討した。

プロテアーゼ E77 産生微生物 99-GP-2D-5 株の液体培養開始後、培養液中の酵素活性は培養開始後 3 日目から検出され、5 日目に 370 Units/mL となり、最大活性となった。以上の結果から本研究において用いた E77 は、培養開始 5 日後に培養を停止させ、E77 を含む培養液から調製を行なった。高性能薄層クロマトグラフィ (HPTLC)、および ACQUITY UPLC (Ultra Performance LC) System (Waters, MA, USA) プレートによる菌体アミノ酸の分析結果から本株の菌体にはグルタミン酸、セリン、グリシン、アラニン、LL-ジアミノピメリン酸の存在が確認された。以上の結果から、本株は *Streptomyces* 属の放線菌に特徴的な菌体アミノ酸を含有することが分かった。²⁶⁾ 16S rDNA の塩基配列によ

Fig. 6 Effect of proteases on jellyfish *Nemopilema nomurai* Kishinouye static decomposition at 37°C. Values in figure were expressed as average and standard deviation ($n=3$).

Fig. 7 Decomposition of jellyfish *Nemopilema nomurai* Kishinouye by E77 at 50°C. A: Changes of jellyfish weight. Values in figure were expressed as average and standard deviation ($n=3$). ▲; Control, ●; 0.1% E77. B: Photograph of jellyfish decomposition after 30 min. Upper and lower photographs indicate Control and addition of 0.1% E77, respectively.

る同定および分子系統解析の結果, 本株は *Streptomyces* 属の 16S rDNA が形成するクラスター内に含まれたが, 単独で系統枝を形成した (Fig. 3). 本株の系統枝

(分枝) の信頼性を示すブートストラップ²⁷⁾値は 33% と低く, 周囲に形成される *Streptomyces* 属各種の系統枝も比較的低いブートストラップ値を示していることから, 系統枝の安定性はやや低いと判断された。この理由は, 本株および解析に供した *Streptomyces* 属各種の 16S rDNA が互いに非常に似ているためと推定される。*Streptomyces* 属の基準種は *S. albus*²⁶⁾であるが, 本株の分類学的位置は *S. albus* に比較的近いことから, 属レベルの帰属先は *Streptomyces* 属と考えられる。しかし, 分子系統解析の結果から本株が既知の *Streptomyces* 属各種とは系統的にやや異なることを示唆していることから, 本株の種レベルでの帰属分類群の推定は困難と考えられる。よって分子系統解析の結果からは本株を *Streptomyces* sp. とすることが妥当であると言える。また, 塩基配列が既知の *Streptomyces* 属放線菌とは最大で 97.3% の相同性しか示さなかったことから, 本株は *Streptomyces* 属の新種であることが示唆された。^{28,29)} 今後, DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行ない, 種レベルでの同定を行なう予定である。柳川³⁰⁾は, ミズクラゲ分解活性を有する放線菌 *Brachybacterium* 属 J26W 株を広島県安芸灘の海底堆積物から分離した。J26W 株が産生するクラゲ分解酵素はプロテアーゼと推定され, ミズクラゲを特異的に分解する。また, Miura and Nagata³¹⁾は, 神奈川県油壺湾の海水中から耐塩性放線菌 *Brevibacterium* 属の JCM 6894 株を分離し, クラゲ体成分の水溶性画分を JCM 9894 株が産生するプロテアーゼによって分解されることを報告している。クラゲを分解する酵素の産生微生物についての報告は少ないが, 本報で報告した *Streptomyces* 属 99-GP-2D-5 株も海洋から分離した放線菌であることから, クラゲを分解する酵素の産生菌を海洋放線菌から探索することは一

つの方法として選択され得ると考えられる。

Fig. 4-A の結果から、酵素活性は 60–70℃ に加温することによって増大した。著者らの以前の報告¹⁵⁾では、50℃ と 70℃ でミズクラゲの分解を検討した結果、両温度での分解速度はほぼ同等であった。これは E77 が極めて強力なクラゲ分解能を有するため、短時間では Fig. 4-A で得られた結果のような差異が顕在化しなかったためと考えられる。

E77 の温度安定性は、30–50℃ にかけて温度の上昇とともに活性が減少し、60℃ 以上では活性が急激に低下した。90℃ 以上で 60 分間加熱すると失活することが明らかになった。90℃ 以上に加熱することによってクラゲ分解処理後、残存プロテアーゼを完全に失活させることができ、残存プロテアーゼによる周辺環境および人体への影響を極小にすることができる。至適温度と温度安定性の結果から、40–60℃ の加熱が高い酵素活性を安定的に維持できる温度であることが示唆された。著者らは既報¹⁵⁾において、反応温度が 50℃、70℃ のそれぞれについて、酵素で分解処理したクラゲ重量の変化に関する酵素溶液の再利用（繰り返し）試験の検討を行った。反応温度が 50℃ の場合、ミズクラゲは 60 分間経過後ほとんど分解した。その後、新たにクラゲ個体を加えても 60 分間経過後には、ほぼ消失し、以下 5 回繰り返し加えても分解反応は維持された。一方、70℃ の場合ミズクラゲ個体の未溶解残存重量は繰り返しクラゲ個体を加えた場合、3 回目より残存重量は増加しはじめ、5 回目では最大で 13.4% の残存が認められた。これは Fig. 4-B の結果から、70℃ での 60 分間以上の継続した加熱によって酵素活性がしだいに低下したためと考えられる。

E77 の至適 pH は 8 であった。酸性側では低活性であったが 8 以上の pH ではおおむね 75% 以上の活性があった。海水は弱アルカリ性であることから、E77 活性はクラゲの分解に適した至適 pH 範囲にあるといえる。

E77 の pH 安定性は酸性側で低かったが、pH 8 以上のアルカリ側では安定性が高かった。至適 pH と pH 安定性を測定した結果から pH 8 付近が最も活性が高く、安定であることがわかった。海水の pH 付近で最も安定で活性が高いことから、E77 は体成分のほとんどが海水であるクラゲの分解に適していることが示唆された。著者らは E77 がすでにアルカリセリンプロテアーゼ I の C 末端配列と同一であることを報告した。¹⁴⁾ プロテアーゼ活性は PMSF の存在によって急激に活性が低下し、EDTA により酵素活性が阻害されなかったことから、E77 は金属プロテアーゼではなく、セリンプロテアーゼであることが判明した。また E77 は β -メルカプトエタノールで失活したことから、E77 は蛋白質分子中に S-S 結合を有することが推定された。一方ナトリウムイオンは 11.4% 活性を増大させたが、これは E77

産生菌 99-GP-2D-5 株は、ナトリウムイオンが豊富に存在する干潟環境から分離されたことから理解できる。著者らは既報¹⁵⁾で、人工海水濃度を 0, 50, 100% (v/v) としたときのミズクラゲの酵素による減重率について報告した。人工海水濃度が 0% の場合、分解処理開始後から 30 分間経過後に 5.9% のクラゲ個体が残存していたが、人工海水濃度が 50% 以上の場合は 30 分間以内で完全にミズクラゲ個体は液化されて分解された。酵素活性は塩分濃度の増加にともない活性が低下する例が報告されている。⁴⁰⁾ ミズクラゲ個体は体成分のほとんどが海水に由来する水分であるが、酵素によってクラゲを分解すると塩分濃度が増加する。しかしながら著者らの報告では、塩分濃度が増加しても E77 活性の発現を阻害せず、逆にミズクラゲ個体の分解を促進することが認められた。

これまでに各種プロテアーゼによるクラゲの分解が提案されている^{30–32)}が、エチゼンクラゲの分解については報告がない。各種プロテアーゼによってエチゼンクラゲの分解を観察した結果 (Fig. 6), E77 と同様なセリンプロテアーゼである Subtilisin および Trypsin では、時間の経過とともにエチゼンクラゲ重量が減少したが、7 時間経過後において約 20% の残存が認められた。E77 では 1–3 時間経過後に急激なエチゼンクラゲの分解が観察され、7 時間後には完全に消失した。Subtilisin は蛋白質ペプチドを非特異的に加水分解し、Trypsin はアミノ酸エステル Arg, Lys 残基の C 末端側を特異的に加水分解する。^{33,34)} Ficin は対照区と同様に 7 時間経過後も 20% しか減重できなかった。エチゼンクラゲは約 96% の水分、0.1–0.2% の蛋白質などから構成されている。²⁴⁾ Miura and Kimura³⁵⁾ は、エチゼンクラゲを構成するコラーゲンは $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ 鎖のヘテロダイマーから構成され、type V のコラーゲンに類似していると報告している。本研究において type V の Collagenase によってエチゼンクラゲのコラーゲンが容易に分解されるか検討したところ、7 時間経過後でも 50% 程度しか分解されず、他に検討したセリンプロテアーゼより緩慢な減重化が観察された。以上の結果から、エチゼンクラゲは複雑な構造を有するコラーゲン蛋白質から構成されると推測されるため、E77 のように基質特異性が低く、非特異的な蛋白質分解機構を有するプロテアーゼがクラゲの分解に有効であることが示唆された。50℃、弱アルカリ性の E77 最適条件下で、エチゼンクラゲは 60 分間以内で完全に分解することができた (Fig. 7)。Fig. 7-B に示したように、E77 非存在下における 50℃ の加熱でも水溶性コラーゲンの溶解により約 80% の減重は可能であるが、その後の継続した加熱でもクラゲ組織は完全に消滅しなかった。著者らは、完全に酵素溶解したクラゲ廃液をさらに微生物処理して浄化する方法を報告し

ており,³⁶⁾ これにより酵素処理とあわせて, 陸揚げしたクラゲの完全な廃棄物処理が可能である。クラゲのコラーゲンはブタコラーゲンより約 10°C 低い 30°C 前後で変性するが,^{37,38)} Fig. 6 の結果は 37°C で加熱した変性クラゲコラーゲンを分解したため, Collagenase type V がエチゼンクラゲをほとんど溶解できなかった可能性がある。ケラチンなどの難分解性細胞外構造蛋白質は, 広く動物体に存在している。そのほとんどが焼却処理されているが, 焼却により発生した地球温暖化の原因となる二酸化炭素を削減するため, エネルギー消費が少ない酵素による廃棄物処理の可能性が検討されている。³⁹⁾ 本研究の成果は, 強力な蛋白質分解酵素により蛋白質を溶解し減重化が可能であることから, 陸揚げしたエチゼンクラゲの廃棄処理だけでなく, クラゲ以外の蛋白質性海産廃棄物の処理にも適用が期待される。

謝 辞

エチゼンクラゲの提供にご尽力下さった漁業協同組合 JF しまね浜田支所販売部, 江木修一郎に心から感謝します。また, E77 の大量生産にご協力下さった財団法人微生物化学研究会, 特定研究推進グループの大澤育子, 高橋裕子, 馬渡貴子各氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 上島孝之. 「酵素テクノロジー」 幸書房, 東京. 1999; 1-2.
- 2) 平野賢一, 伊藤浩史, 藤吉隆司, 中村哲郎, 宿野部幸孝. 特許公報 H07-53106, 日本国特許庁. 1995.
- 3) 館 博, 一島英治, 平野賢一. 公開特許公報 H11-75765, 日本国特許庁. 1999.
- 4) 小串泰之, 竹内善幸, 河野 進, 中山博之, 川畑豊喜, 岡 洋祐, 柳川敏治, 長沼 毅, 永尾浩司. 公開特許公報 2003-53303, 日本国特許庁. 2003.
- 5) 小串泰之, 竹内善幸, 河野 進, 中山博之, 川畑豊喜, 岡 洋祐, 柳川敏治, 長沼 毅, 永尾浩司. 公開特許公報 2004-57209, 日本国特許庁. 2004.
- 6) 浜畑松尚, 田中亮三, 高崎啓太, 島田行雄. 公開特許公報 2004-73906, 日本国特許庁. 2004.
- 7) 川畑豊喜, 岡 洋祐, 柳川敏治, 長沼 毅, 小串泰之, 竹内善幸, 河野 進. 公開特許公報 2004-122118, 日本国特許庁. 2004.
- 8) 土井宏育, 岡 達三. 公開特許公報 2005-262105, 日本国特許庁. 2005.
- 9) 小田圭一, 眞田浩一. 公開特許公報 2007-189906, 日本国特許庁. 2007.
- 10) Yoshioka M, Miwa T, Horii H, Takita M, Yokoyama T, Nihizawa K, Watanabe M, Shinagawa M, Murayama Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. *J. Appl. Microbiol.* 2007; **102**: 509-515.
- 11) Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T, Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J. Biosci. Bioeng.* 2007; **103**: 501-508.
- 12) 上島孝之. 「産業用酵素」 丸善, 東京. 1995; 137-158.
- 13) Oka T, Tsuji H, Noda C, Sakai K, Hong Y, Suzuki I, Munoz S, Natori Y. Isolation and Characterization of novel perchloric acid-soluble protein inhibiting cell-free protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 2000; **270**: 30060-30067.
- 14) Zhao H, Doi H, Kanouchi H, Matsuura Y, Mohri S, Nonomura Y, Oka T. Alkaline serine protease produced by *Streptomyces* sp. degrades PrP^{Sc}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; **321**: 45-50.
- 15) 土井宏育, 武田美貴雄, 岡 達三, 野々村禎昭. 微生物酵素によるミズクラゲの分解処理. 日本海水学会誌 2006; **60**: 426-433.
- 16) 上 真一. エチゼンクラゲ大発生: 海から人類への警告. 化学と生物 2007; **45**: 355-359.
- 17) 飯泉 仁. エチゼンクラゲの大量出現と水産業への影響. 日本プランクトン学会報 2005; **52**: 32-35.
- 18) 内田欣哉. 細胞壁. 「微生物の化学分類実験法」(駒形和男編) 学会出版センター, 東京. 1982; 5-45.
- 19) 鈴木健一郎. 細胞壁のアミノ酸分析法. 「放線菌の分類と同定」(日本放線菌学会編) 日本学会事務センター, 東京. 2001; 50-55.
- 20) 中川恭好, 川崎浩子. 遺伝子解析法 16S rDNA 遺伝子の塩基配列決定法. 「放線菌の分類と同定」(日本放線菌学会編) 日本学会事務センター, 東京. 2001; 88-117.
- 21) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; **22**: 4673-4680.
- 22) Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3 integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004; **5**: 150-163.
- 23) Altschul SF, Madden TF, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Ripman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 3389-3402.
- 24) 安田 徹. 「エチゼンクラゲとミズクラゲ-その正体と対策」 成山堂書店, 東京. 2007.
- 25) Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (eds.). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980; **30**: 225-420.
- 26) 宮道慎二. 放線菌の属の同定法. 「放線菌の分類と同定」(日本放線菌学会編) 日本学会事務センター, 東京. 2001; 9-19.
- 27) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; **39**: 783-791.
- 28) 笠井宏朗. 海洋微生物資源ライブラリー: 培養可能株の多様性と産業利用. 日本海水学会誌 2005; **59**: 12-16.
- 29) Hiraishi A. Distribution of viable but non-culturable bacteria in wastewater treatment systems. *Microb. Environ.* 1999; **14**: 91-99.
- 30) 柳川敏治, 小串泰之, 長沼 毅. クラゲ分解菌の利用. 海洋と生物 2004; **26**: 142-147.
- 31) Mimura H, Nagata S. Degradation of water-soluble fraction of jellyfish by a marine bacterium. *Brevibacterium* sp. JCM 6894". *Microb. Environ.* 2001; **16**: 121-123.
- 32) Yanagawa T, Kawabata T, Ogushi Y, Kohno S, Ozaki K, Nagao K, Morikawa Y, Miyoshi T, Hoshii D, Nishikawa Y, Naganuma T (2004) Pilot system for mass degradation of jellyfish by marine bacterial enzyme. *Marine Biotechnology*, **6** (Special Proceeding Issue): S218-S222.
- 33) 吉本 忠, 鶴 大典. 微生物プロテアーゼ. 「蛋白質分解酵素Ⅱ」(鶴大典, 船津勝編) 学会出版センター, 東京. 1993; 199-214.
- 34) 高橋孝行, 高橋健治. 消化系プロテアーゼ. 「蛋白質分解

- 酵素Ⅱ」(鶴大典, 船津勝編) 学会出版センター, 東京. 1993; 7-11.
- 35) Miura S, Kimura S. Jellyfish mesogloea collagen. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 15352-15356.
- 36) 土井宏育, 岡 達三, 野々村禎昭. 微生物包括固定化法によるクラゲ分解廃液の COD_{Mn} 除去. 日本海水学会誌 2007; **61**: 342-351.
- 37) Nagai T, Ogawa T, Nakamura T, Ito T, Nakagawa H, Fujiki K, Nakao M, Yano T. Collagen of edible jellyfish exumbrella. *J. Sci. Food Agric.* 1999; **79**: 855-858.
- 38) Nagai T, Worawattanamatekul W, Suzuki N, Nakamura T, Ito T, Fujiki K, Nakao M, Yano T. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). *Food. Chem.* 2000; **70**: 205-208.
- 39) Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 2006; **102**: 73-81.
- 40) Bressolier P, Letourneau F, Urdaci M, Verneuil B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; **65**: 2570-2576.