Aeromonas salmonicida, Ar-4 (EFDL) の産生する プロテアーゼの特性^{*1}

田島 研一・高橋 恒人・絵面 良男・木村 喬久

(1983 年 5 月 9 日受理)

Enzymatic properties of the purified extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*, Ar-4 (EFDL)

Kenichi TAJIMA,^{*2} Tsuneto TAKAHASHI,^{*2,*3} Yoshio EZURA,^{*2}
and Takahisa KIMURA^{*2}

In a previous paper, we examined the toxicity of the extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL) on yamabe (*Oncorhynchus masou f. ishikawai*) and goldfish (*Carassius auratus*). From these results, we considered the protease secreted by this bacterium was a causative agent of furunculosis.

In this paper, we observed enzymatic properties of the purified protease.
The results obtained were summarized as follows:

1. The molecular weight of purified protease was estimated to be 71,000 by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
2. The purified protease showed maximal activity at pH 9.4 and 50°C. It was stable over the pH range 5.0 to 10.0 and was completely inactivated by temperature at 56°C.
3. The protease was presumably classified an alkaline serine protease and it showed chymotryptic properties since it was significantly inhibited by diisopropylfluorophosphate (DFP) and tosyl-phenylalanine-chloromethyl ketone (TPCK) and hydrolyzed *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE).

前報¹⁾において魚類せつそう病原菌 *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) 株の産生するプロテアーゼのヤマベ及び金魚に対する毒性の検討を行った結果、これが本菌感染に起因するせつそう病における一つの起病因子としての作用を有するものと推察した。そこで本報では本菌の精製プロテアーゼについて種々の酵素化学的性質を検討した。

実験方法

供試プロテアーゼ 前報¹⁾で述べた精製の各段階（アセトン沈澱、硫酸分画、DEAE-Cellulose カラムクロマト分画、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマト分画）の最終段階である DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマト分画により 173 倍に精製された菌体外プロテアーゼ（比活性 3,290 units/mg, 収量 11.3%）を供試プロテアーゼとした。なお本プロテアーゼはディスク電気泳動に

よる均一性の検定を行ったところ、その純度は約 90% で、ほぼ均一と思われた。

プロテアーゼ活性の測定 プロテアーゼ活性は 2% カゼイン H₃BO₃ 緩衝液を基質溶液として供試プロテアーゼ溶液を 30°C で 10 分間反応させた後、ANSON-萩原の方法²⁾ に基いて測定した。なおプロテアーゼの活性 1 単位を反応時間 1 分間に 660 nm における吸光値を 0.001 増加させる活性とし、活性単位は蛋白質 1 mg 当りに換算した値として表わした。

SDS 電気泳動による分子量の測定 SDS 電気泳動は、モノマー濃度を 6% としたアクリルアミドゲルを用いた他は林・大場の方法³⁾ に従って行った。また標準マーカーとして Serum albumin (分子量 68,000) Catalase (分子量 60,000), Aldolase (分子量 40,000) (以上 Baehringer Mannheim 製), Phosphorylase (分子量 90,000) 及び Triose phosphate dehydrogenase, GPDH

^{*1} サケ科魚類せつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の産生する病因物質について-III (Studies on the virulent factors produced by *Aeromonas salmonicida*, a causative agent of furunculosis in salmonidae-III).

^{*2} 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, Japan).

^{*3} 現在持田製薬株式会社 (Present, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.)

(分子量 36,000) (以上当学部生物化学講座から分与されたもの) を用いた。

反応至適 pH 緩衝液として、 $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COO}-\text{Na}$ 緩衝液、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液、 $\text{Tris}-\text{HCl}$ 緩衝液、 $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{H}_3\text{BO}_3$ 緩衝液及び $\text{Glycine}-\text{NaOH}$ 緩衝液を用い、反応時の pH が 5.9 から 11.7 までの範囲でそれぞれ異なるように調製し、前述の方法で活性を測定し、各 pH における活性の程度を比較した。

pH 安定性 前項で用いた緩衝液のうち、 $\text{Tris}-\text{HCl}$ 緩衝液のみを $\text{Glycine}-\text{HCl}$ 緩衝液に替えて用い、供試プロテアーゼを pH 2.0 から pH 11.7 のそれぞれ異なった pH の各緩衝液中で 30°C 、1 時間保持した後、反応時の pH が 8.9 となるように調製した H_3BO_3 緩衝液を加え、前述の方法で活性を測定した。なお、 30°C 、1 時間保持せずに、ただちに pH 8.9 で活性を測定した場合を 100% としてそれぞれの pH における安定性を比較した。

反応至適温度 反応温度を 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 及び 70°C の各温度とし、反応 pH を 8.9 に設定して前述の方法で活性を測定し、各温度における活性の程度を比較した。

温度安定性 供試プロテアーゼを含んだ $\text{Tris}-\text{HCl}$ 緩衝液 (pH 7.8) を 30, 40, 50, 60 及び 70°C の各温度に 10 分間保持した後に急冷し、前述と同様に反応時の pH を 8.9 に調製して前述の方法で各温度における残存活性を測定した。

温度安定性に及ぼすカルシウムイオンの影響 供試プロテアーゼ溶液 (pH 7.8) に CaCl_2 をそれぞれ 0, 0.2, 2, 5, 10 及び 20 mM となるように加え 56°C で 10 分、30 分及び 60 分間保持した後に急冷し、前述と同様に反応時の pH を 8.9 に再調製して前述の方法で残存活性を測定した。

金属イオンの影響 NaCl , KCl , CaCl_2 , BaCl_2 , MgSO_4 , CuSO_4 , AgNO_3 , HgCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MnSO_4 を用い、各塩類をそれぞれ 2 mM 含む供試プロテアーゼ溶液 (pH 7.8) を 30°C 、1 時間保持した後、前述と同様に反応時の pH を 8.9 に再調製し、前述の方法で活性を測定し、塩類無添加の場合の活性を 100% として各金属イオンの影響の有無を比較した。

阻害剤の影響 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *o*-phenanthroline, CH_3ICOOH , $\text{CH}_3\text{ICOO}-\text{Na}$, *p*-chloromercuric benzoate (PCMB), 5, 5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB), diisopropylfluorophosphate (DFP), tosylphenylalanine-chloromethyl ketone (TPCK), *p*-toluene-sulfonyl-L-lysine-chloromethyl ketone (TLCK), KCN, KMnO_4 , L-cysteine,

Na-citrate, sodium lauryl sulfate (SLS) 及び 2-mercaptoethanol の各阻害剤をそれぞれ 2 mM 含んだ供試プロテアーゼ溶液 (pH 7.8) を 30°C 、30 分間保持した後、前述と同様に反応時の pH を 8.9 に再調製して活性を測定し、阻害剤無添加の場合の活性を 100% として各阻害剤の影響の有無を比較した。

基質特異性 天然基質としては casein (milk), gluten (wheat), egg albumin, bovine serum haemoglobin, gelatin (以上和光純薬工業製); bovine plasma albumin (Armour Pharmaceutical 製), human α -globulin, keratin (以上、東京化成工業製) を用い、各蛋白質の 2% 溶液 (pH 8.9) を前述までの基質であるカゼインと替えて用いた他は前述と同様の方法で活性の測定を行い、カゼインを基質とした場合を 100% として各基質に対する供試プロテアーゼ活性の程度を比較した。なお bovine serum haemoglobin 及び keratin は MERKEL らの方法⁴⁾に従って尿素で変性させた後に供試した。

一方、合成基質に対する供試プロテアーゼの活性については、N-2-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE) 及び N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) (以上、半井化学製) を供試して検討した。これら合成基質に対する活性の測定法は、反応時間を 4 時間とした他は HUMMEL の方法⁵⁾に従った。なお合成基質に対するプロテアーゼ活性 1 単位は、BAEE の場合は 247 nm, BTEE の場合は 256 nm において 1 時間に吸光値を 0.001 増加させる活性とし活性単位を蛋白質 1 mg 当りに換算した値として表わした。

結 果

SDS 電気泳動による分子量の測定 標準マーカー及び供試プロテアーゼの SDS 電気泳動を行い、常法に従って易動度と分子量を基に検量線を作製した。結果は Fig. 1 に示した。この結果に供試プロテアーゼの SDS 電気泳動による易動度の測定値を挿入してその分子量を求めたところ、約 71,000 と推定された。

反応至適 pH 反応至適 pH の検討を行った結果は Fig. 2 に示した。使用した緩衝液の pH 範囲が重複している部分で活性に若干の差が認められたが、pH 9.4 付近に最大の活性が認められたことから、供試プロテアーゼの反応至適 pH は 9.4 付近と推定された。

pH 安定性 pH 安定性を検討した結果は Fig. 3 に示した。供試プロテアーゼの活性は pH 5.0 から pH 10.0 の範囲で高い値で残存していることから、この pH 域では安定と考えられた。なお前述の反応至適 pH の結果をも勘案して、以後の実験における反応時の pH は、最適の 9.4 より若干低い 8.9 とすることにした。

反応至適温度 基質分解能におよぼす温度の影響を調

Fig. 1. Determination of molecular weight of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL) by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

1. Phosphorylase (M.W. 90,000)
2. Serum albumin (M.W. 68,000)
3. Catalase (M.W. 60,000)
4. Aldolase (M.W. 40,000)
5. GPDH (M.W. 36,000)
6. Ar-4 (EFDL), protease

Fig. 3. Effect of pH on stability of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL). Buffers:

- x— Glycine-HCl
- Δ— $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$,
- ▲— $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{H}_3\text{BO}_3$
- Glycine-NaOH

Fig. 2. Effect of pH on activity of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL)

Buffers:

- Δ— $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, —▲— $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{KH}_2\text{PO}_4$, —x— Tris-HCl,
- $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{H}_3\text{BO}_3$, —○— Glycine-NaOH

Fig. 4. Effect of temperature on activity of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL).

Fig. 5. Thermostability of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL).

Fig. 6. Effect of Ca^{2+} on thermostability of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL).

- 20 mM
- 10 mM
- △— 5 mM
- ▲— 2 mM
- ×— 0.2 mM
- ...×... 0 mM

べた結果は Fig. 4 に示した。この結果から、供試プロテアーゼの反応至適温度は 50°C と推定された。

温度安定性 温度安定性を調べた結果は Fig. 5 に示した。図から明らかなように、供試プロテアーゼは熱に対して比較的不安定であり、30°C で 13%、反応至適温度の 50°C では 40% 失活し、56°C では殆んど活性は残存しなかった。

温度安定性におよぼす Ca^{2+} イオンの影響 前述の温度

Table 1. Effect of metal salts on activity of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL)

Metal salt	Conc. (mM)	Relative activity (%)
None (control)	0	100
NaCl	2	105.6
KCl	"	102.8
CaCl_2	"	107.7
BaCl_2	"	103.5
MgSO_4	"	108.4
CuSO_4	"	78.3
FeSO_4	"	97.9
ZnSO_4	"	52.4
AgNO_3	"	12.8
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	"	86.5
MnSO_4	"	151.1
HgCl_2	"	12.8
NiCl_2	"	85.0
CoCl_2	"	95.5

Table 2. Effect of various inhibitors on activity of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL)

Inhibitor	Conc. (mM)	Relative activity (%)
None (control)	0	100
EDTA-2Na	2	102.8
<i>o</i> -Phenanthroline	"	88.9
CH_2ICOOH	"	96.6
$\text{CH}_2\text{ICOO}^-\text{Na}$	"	93.7
PCMB	"	99.9
DTNB	"	98.2
DFP	"	0.0
TPCK	"	0.0
TLCK	"	75.9
KCN	"	102.2
KMnO_4	"	54.8
L-Cysteine	"	0.0
Na-Citrate	"	111.7
SLS	"	6.2
2-Mercaptoethanol	"	59.4

EDTA-2Na: Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt
 PCMB : *p*-Chloromercuric benzoate.
 DTNB : 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid).
 DFP : Diisopropylfluorophosphate.
 TPCK : Tosyl-phenylalanine-chloromethyl ketone.
 TLCK : *p*-Toluene-sulfonyl-L-lysine-chloromethyl ketone.
 SLS : Sodium lauryl sulfate.

安定性の検討結果より、供試プロテアーゼは 56°C において急激な失活を示したことから、従来種々のプロテアーゼに保護の効果を有するといわれている⁹⁾ Ca^{2+} イオンについて、供試プロテアーゼの 56°C における失活におよぼす効果について検討を行った。結果は Fig. 6 に示

Table 3. Substrate specificity of purified extracellular protease of *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL)

(A) Natural substrate

Substrate	Relative activity (%)
Casein (milk)	100
Gluten (wheat)	48.1
Gelatin	0.9
Bovine plasma albumin	2.1
Human α -globulin	8.9
Egg albumin	2.7
Bovine serum haemoglobin	98.1
Keratin	21.1

(B) Synthetic substrate

Substrate	Specific activity (units/mg protein)
<i>N</i> - α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE)	0
<i>N</i> -benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE)	573

した。添加 Ca イオン濃度が増加するにつれて供試プロテアーゼの安定性は明らかに高まり、20 mM 添加では 60 分後でも約 25% の失活にとどまり、無添加の場合に比較して極めて安定であった。

金属イオンの影響 供試プロテアーゼ活性におよぼす各種金属塩の影響を調べた結果は Table 1 に示した。供試プロテアーゼは Ag 及び Hg イオンにより強い阻害を受け、Zn, Cu, Pb 及び Ni イオンによっても若干の阻害が認められた。なお Mn イオンにはむしろ賦活効果が認められた。

阻害剤の影響 供試プロテアーゼの活性におよぼす種々の酵素阻害剤の影響について検討した結果は、Table 2 に示した。供試プロテアーゼは金属酵素阻害剤である EDTA や α -phenanthroline によっては全くあるいは殆んど影響を受けず SH 酵素阻害剤である CH_2ICOOH , CH_2ICOONa , PCMB 及び DTNB についても同様に全く阻害作用は認められなかった。しかしセリン酵素阻害剤である DFP 及び TPCK は活性を完全に阻害し、TLCK も若干の阻害作用を示した。また酸化剤である KMnO_4 、還元剤の L-cystein 及び 2-mercaptoethanol 並びに界面活性剤である SLS にもかなりの阻害作用が認められた。

基質特異性 天然及び合成基質に対する分解活性を調べた結果は Table 3 に示した。供試プロテアーゼは天然基質の bovine serum haemoglobin に対してはカゼインの場合とほぼ同程度の活性を示し、gluten 及び kelin ではカゼインの場合と比較してそれぞれ 48%,

21% に消化率が低下した。一方、合成基質の場合ではトリプシンの特異的な基質といわれている BAEE に対しては全く分解活性が認められなかったが、キモトリプシンの特異的な基質といわれる BTEE に対しては明らかな分解活性が認められた。

考 察

供菌試 *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL) 株の産生するプロテアーゼを精製し、その酵素化学的性質を調べた結果、供試プロテアーゼの分子量は約 71,000、反応至適 pH は 9.4 付近にあり、反応至適温度は 50°C で、SHIEH and MACLEAN の報告⁷⁾している *A. salmonicida* のプロテアーゼ (分子量 11,000、反応至適 pH 10.5、反応至適温度 60°C) とは多少異なるものであった。ついで pH 安定性及び温度安定性についての検討結果、pH 5.0 から pH 10.0 で安定であり、温度安定性については 30°C でも徐々に失活がみられ、56°C においては急激な失活を示した。一方、温度安定性は Ca イオンの添加により明らかに保護効果が認められた。このことは BARACH *et al.*⁸⁾ の *Pseudomonas* の他に KATO *et al.*⁹⁾ の *Vibrio*, YAGI *et al.*⁹⁾ の *Cephalosporium*, LESK and BLACKBURN¹⁰⁾ の *Bacteroides* 及び TSUBOTA and OKADA¹¹⁾ の *Bacillus* の産生するプロテアーゼにおいても同様の効果が認められている。次に活性におよぼす種々の金属塩の影響について検討した結果、Ag, Hg, Zn, Cu, Pb 及び Ni イオンにより阻害を受け、Mn イオンにより賦活効果が認められた。同様の効果は前述の KATO *et al.*⁹⁾ YAGI *et al.*⁹⁾ GNOSPILIUS¹²⁾ 及び WRETLIND and WADSTRÖM の報告¹³⁾にもみられる。

次に供試プロテアーゼに対する各種酵素阻害剤の影響について検討を行った結果、前述したように金属酵素阻害剤や SH 酵素阻害剤では影響は認められず、セリン酵素阻害剤である DFP, TPCK 及び TLCK に、活性阻害が認められたことから、供試プロテアーゼはセリン酵素のカテゴリーに包含されるものと思われる。なお酸化剤である KMnO_4 、還元剤である L-cystein 及び 2-mercaptoethanol さらに界面活性剤の SLS によってもかなり強い阻害が認められた。また供試プロテアーゼはセリン酵素の一つであるキモトリプシンに対して阻害作用を示す TPCK により完全に阻害されるが、同じくセリン酵素の一つのトリプシンに対して阻害作用を示す TLCK では約 24% の阻害を受けるにすぎない。なお TPCK 及び TLCK は SH 酵素に対しても阻害作用があるといわれている¹⁴⁾が、供試プロテアーゼは前述したように SH 酵素阻害剤では阻害を受けなかった。

次に基質特異性について検討を行った結果、天然基質

では bovine serum haemoglobin に対してカゼインと同程度に分解活性を有し, gluten 及び keratin に対しても若干の活性が認められた。また合成基質においては, キモトリプシンに対して特異的な基質である BTEE に対しては明らかな分解活性を示したが, トリプシンに対する特異的な基質である BAEE に対しては全く活性が認められなかった。これらの結果から供試プロテアーゼはセリン酵素のカテゴリーの中でもキモトリプシン型のプロテアーゼと推察される。

以上, 要約すると, 供試菌 *A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL) 株の産生する菌体外プロテアーゼは, 分子量約 71,000 で, 反応至適 pH を 9.4 付近に有するキモトリプシン型のアルカリ性セリン酵素の一つと考えられる。

謝 辞

本実験を遂行するに当り SDS 電気泳動による分子量の測定に, 種々便宜頂いた当学部生物化学講座の各位にお礼申し上げる。

文 献

- 1) 田島研一, 高橋恒人, 絵面良男, 木村喬久: 北大水産彙報, **34**, 104-110 (1983).
- 2) 萩原文二: 標準生化学実験 (江上不二夫, 石本真・丸尾文治・三浦義彰・関根隆光・須田正巳・

- 田宮信雄編), 文光堂, 東京, 1953, pp. 207-225.
- 3) 林 健志・大場義樹: 蛋白質・核酸・酵素, **17**, 304-311 (1972).
- 4) J. R. MERKEL, E. D. TRAGANZA, B. B. MUKHERIGEE, T. B. GRIFFIN, and J. M. PRECOTT: *J. Bacteriol.*, **87**, 1227-1233 (1964).
- 5) B. C. W. HUMMEL: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393-1399 (1959).
- 6) J. T. BARACH, D. M. ADAMS, and M. L. SPECK: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 875-879 (1976).
- 7) H. S. SHIEH and J. R. MACLEAN: *Int. J. Biochem.*, **6**, 653-656 (1975).
- 8) N. KATO, T. NAGASAWA, S. ADACHI, Y. TANI, and K. OGATA: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1185-1192 (1972).
- 9) J. YAGI, T. YANO, Y. KUBOCHI, S. HATTORI, M. OHASHI, H. SAKAI, K. JOMON, and M. AJISAWA: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 810-815 (1972).
- 10) E. M. LESK and T. H. BLACKBURN: *J. Bacteriol.*, **106**, 394-402 (1971).
- 11) Y. TSUBOTA and H. OKADA: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 25-31 (1979).
- 12) G. GNOSSPELIUS: *J. Bacteriol.*, **133**, 17-25 (1978).
- 13) B. WRETTLIND and T. WADSTRÖM: *J. Gen. Microbiol.*, **103**, 319-327 (1978).
- 14) 村地 孝: 蛋白質分解酵素と生体制御 (村地孝・田 敏雄・藤井節郎編), 学会出版センター, 東京, 1979, pp. 253-270.