

耐熱性中性プロテアーゼ（アスパルテーム合成酵素） 遺伝子のバチルス属細菌における発現及び遺伝的解析

久 保 幹
肥 後 裕 仁

Expression and Genetic Analysis of the Highly Thermostable Neutral Protease (Aspartame Synthetic Enzyme) Gene in *Bacillus Subtilis*

Motoki KUBO
Yuji HIGO

Bacillus stearothermophilus MK 232, which produces a highly thermostable neutral protease, was isolated from natural environment. After several steps of mutagenesis, a hyper-producing mutant strain YG 185 was obtained. The enzyme productivity was twice as much as that of the original strain. The thermostability and specific activity of the new protease are around 10% and 40% higher than those of thermolysin (the neutral protease form *Bacillus thermoproteolyticus*), respectively. In order to obtain a more producing strain, the gene of this protease (*nprM*) was cloned in *Bacillus subtilis* using pTB53 as a vector. The nucleotide sequence of *nprM* and its flanking regions were determined. A Shine-Dalgarno (SD) sequence and a possible promoter sequence were found. The deduced amino acid sequence contained a signal sequence, a pro sequence and mature sequence. The amino acid sequence of the extracellular form of this protease (316 amino acids, molecular mass 34266) was identical to that of thermolysin except for two amino acid substitutions (Asp 37 to Asn 37 and Glu 119 to Gln 119).

1. 緒 言

酵素を工業的に生産する場合、高生産株の育種が必須になってくる。従来は NTG, UV 処理等の変異処理による高生産株の育種が中心であったが、最近では遺伝子工学的手法を用い遺伝子増幅効果による増産も試みられている。

土壌より新規に従来の方法に従ってスクリーニングしたアスパルテーム合成用酵素は従来のサーモライシン (EC3. 4. 24. 4) より耐熱性、比活性共に優れたプロテ

アーゼ (NprM) であり、また我々は数回の変異処理によりこの酵素を生産する高生産株を取得した。

さらに遺伝子工学的技術を用いこのプロテアーゼ遺伝子 (*nprM*) を *Bacillus subtilis* 中にクローン化し生産性の向上を試みた。併せて、*nprM* を遺伝子レベルで解析を行った。

2. 実験及び材料

(1) 菌株、プラスミド及び培養条件

枯草菌の宿主菌として *Bacillus subtilis* MT-2 (*trpC2*,

leuC7, *hsdR*, *hsdM*, *Npr*⁻²) を用いた。*Escherichia coli* K12 JM103 ($\Delta(lac-pro)$, *thi*, *strA*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*) をフェージ M13mp10 と M13mp11 の宿主菌として用いた。プラスミドは、pTB53 (Km^r , Tcr)^{3,4)} を用いた。培地はL培地, L寒天培地, LC寒天培地 (L寒天培地 + 1%カゼイン)²⁾ を用いた。WSG培地は 30 g/l 小麦粉, 15 g/l 大豆かす, 10 g/l グルコース, 4 g/l カゼイン, 1.5 g/l KH_2PO_4 , 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, NaOH で pH 7.5 を含む。好熱菌の酵素生産はコンピューター制御の 200 l 醗酵槽 (実動 120 l) を用いた。温度は 50°C, pH は 6 以上にし溶存酸素濃度は 9 時間迄 2 ppm 以上にし, それ以降は徐々に減少させた。

(2) 菌株の同定

菌株の同定は, 酸素要求性, カタラーゼ反応, グラム染色, 及び孢子形成等標準法に従った⁵⁾。

(3) 変異処理

50°C, L培地で対数増殖期迄培養後, 遠心 (5,000×g, 10分) し, 20 μ g/l の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を含むL培地で 50°C, 15分静かに培養した。遠心集菌後, L培地で2回洗浄し, 再びL培地に懸たくした。さらに 50°C, 2時間培養し, LC寒天培地上で選択した。

(4) 酵素の精製

培養上清を限外ろ過膜 (UF-10ps 及び UF-100ps, 東ソー社製) を用いて低分子と高分子タンパク質をそれぞれ除去した。濃縮タンパク質をアセトンで沈澱させ, 凍結乾燥した。この粗酵素を 10 ml の緩衝液 (50 mM-Tris/HCl, pH 7.5, 5 mM $CaCl_2$) に懸たくし, これをトヨパール HW-50 及び TSKgel G-2000SW HPLC カラムクロマトグラフィーにより精製した。

(5) プラスミド及び染色体 DNA の分離, 制限酵素処理, 及び形質転換

プラスミド DNA はラピッドアルカリ抽出法もしくは $CsCl$ /エチジウムブロマイド密度勾配遠心法により調製した⁶⁾。染色体 DNA は今中等の方法⁷⁾ に従った。DNA の制限酵素処理, ライゲーションは市販のものを用いた。枯草菌の形質転換はコンピテントセル法³⁾ を用いた。

(6) DNA のゲル電気泳動による分析及び分離

DNA の分析は標準法に従いアガロースかポリアクリルアミド電気泳動を用いた⁸⁾。アガロース又はポリアクリルアミドゲルからの DNA の抽出は標準法に従った⁸⁾。

(7) DNA 塩基配列分析

DNA塩基配列決定は *E. coli* JM103 及び M13 フェージを用いたダイデオキシ法で決定した⁹⁾。塩基配列決定は両方向行った。

(8) プロテアーゼ生産株の同定及び活性測定

プロテアーゼ生産株は LC寒天培地上で同定した。また活性はカゼイン消化法により測定した²⁾。37°C で 1 分間に遊離する 1 μ g のチロシン量を 1 ユニットと定義した。

(9) N末端アミノ酸配列の決定

N末端アミノ酸配列はエドマン分解法により決定した¹⁰⁾。

(10) 酵素及び化学薬品

制限酵素及び M13 シークェンスキットは東洋紡より購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dCTP はアマーシャムから, 他の化学薬品は和光から購入した。

3. 結 果

(1) プロテアーゼを生産する好熱菌の分離

温泉等から土壌を採取してきてL培地で 55°C, 4時間培養した。培養後 100 μ l の試料を LC寒天培地上にまき 55°C で一夜培養した。その結果約2,000の高熱菌を分離することができた。その中から微生物学的に種の異なると思われるお, プロテアーゼを産生することのできる菌株が見出された。おのおのの菌株をL培地, 55°C, 16時間培養後, 上清から菌体外プロテアーゼを部分精製し, 酵素の耐熱性試験を行った。その結果, 好熱菌である MK232 株が, 最も耐熱性の高いプロテアーゼを産生していることが判明した。

(2) 好熱菌 MK232 株の同定

MK232 株は, 絶対好気性, グラム陽性, カタラーゼ産生, 及び孢子形成細菌であった。それゆえ, この株は, *Bacillus* 属であると同定した。一方, MK232 株は 70°C 迄生育可能であった。

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹¹⁾ により, 我々はこの株を *Bacillus stearothermophilus* であると同定した。

(3) プロテアーゼ増産のため *B. stearothermophilus* の改良

孢子形成はアルカリプロテアーゼ生産と非常に深い関係があり, リファマイシン耐性 (R^r) 変異株は孢子形成欠損となる場合があるという報告がある¹²⁾。一般に中性プロテアーゼは対数増殖期に産生され, アルカリ性プロテアーゼは定常期におのおの生産される。そして中性プロ

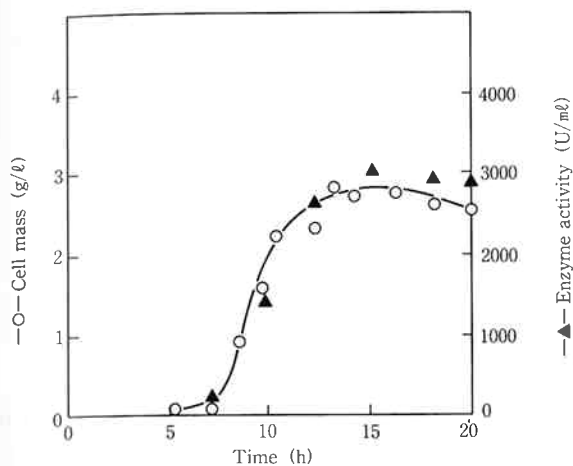


Fig. 1 Course of enzyme production by strain YG185. Cells were grown in WSG medium at 50°C for 20 h. ○, Cell mass; ▲, enzyme activity.

ロテアーゼはアルカリ性プロテアーゼにより分解を受ける。このようなことから数種のリファマイシン耐性株を NTG 処理により取得した。ほとんどの変異株は孢子欠損株であり生育が悪かったが、1株、R⁴株が通常通り生育し、さらに多くの中性プロテアーゼを生産した。このように R⁴株は孢子形成とアルカリ性プロテアーゼ欠損株で、中性プロテアーゼの分解を押えることができた。

我々が工業的にこの株を用い酵素生産をする場合、グルコース抑制と窒素抑制を取り除くことがさらに必要となる。このような理由から1%のグルコースを含む LC 寒天培地上で大きなハローを形成するグルコース耐性株、G20株、を R⁴株から作った。さらに G20株からカザミノ酸耐性株を作った。さらに高アンモニウム耐性株、YG185株、を GC51株から同様の方法により得た。

(4) 中性プロテアーゼの生産

B. stearothermophilus YG185株とその親株、MK232株、を WSG 培地で 50°C、20時間培養した。YG185株の酵素生産のパターンを Fig. 1 に示す。培地中に小麦粉等が入っているため、菌体温度は CO₂ ガス量から求めた。変異株である YG185株は親株、MK232株、に比べ約2倍高い酵素活性 (3,000単位/ml) を示した。

(5) 中性プロテアーゼの精製及び特性

B. stearothermophilus YG185株からプロテアーゼ (NprM) の精製を行った。SDS-PAGE、及び TSKgel G3000SW (東ソー社製) を用いて分子量の測定を行ったところおのおの約34,000ダルトンであった。

Fig. 2 に NprM の pH 特性を示した。至適 pH は 7

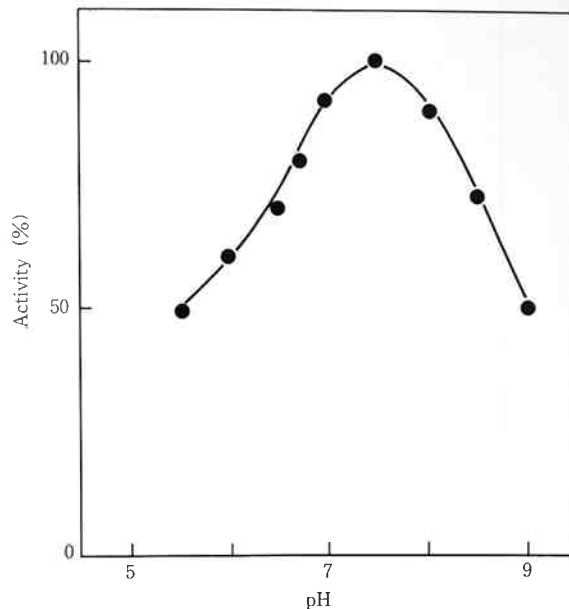


Fig. 2 Optimum pH of NprM. Enzyme activity was measured at 37°C in each buffer. pH 5.5-7.5, 10 mM citric acid-sodium phosphate buffer; pH 7.0-8.5, 10 mM Tris-HCl buffer; pH 8.0-9.0, 10 mM boric acid buffer.

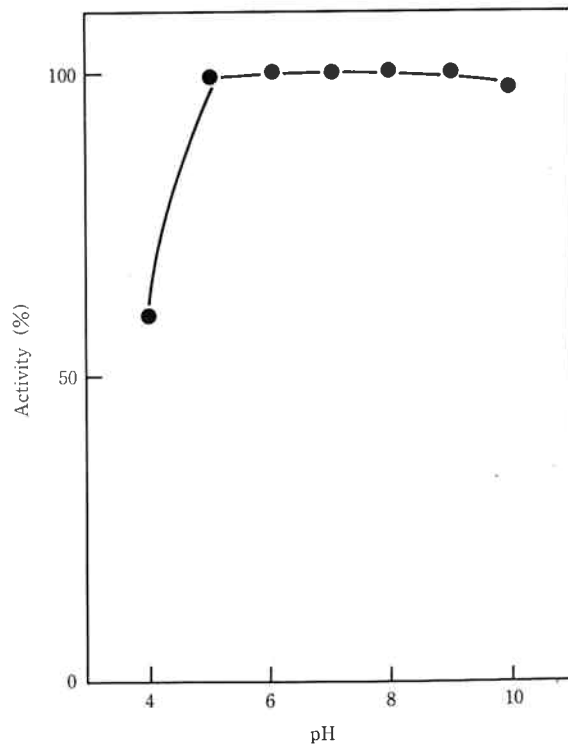


Fig. 3 pH stability of NprM. Enzyme solution was kept at room temperature for 24 h at each pH indicated. Then the solution was neutralized and enzyme activity was measured at 37°C.

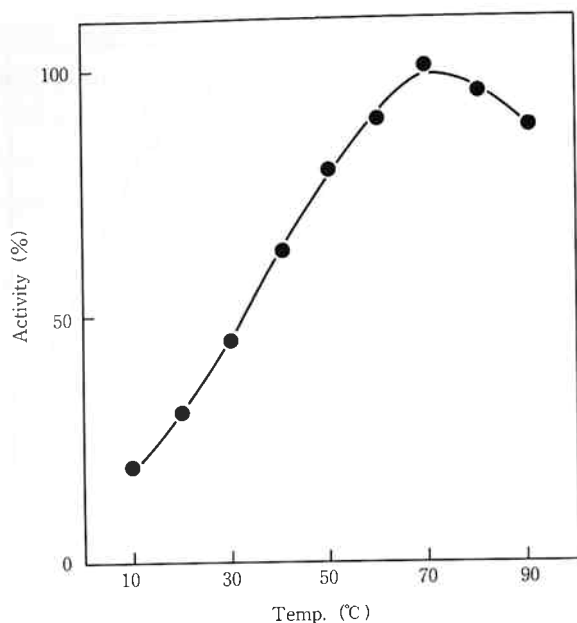


Fig. 4 Optimum temperature of NprM. Enzyme activity was measured in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at the temperature indicated.

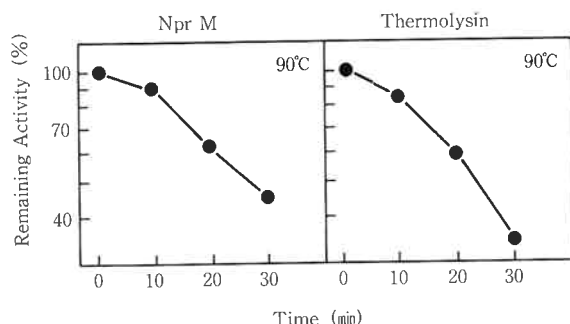


Fig. 5 Heat inactivation of NprM and thermolysin versus time. The enzymes were kept at 90°C. Samples were taken at the time indicated, cooled quickly, and assayed for remaining activity at 37°C.

～8であった。この酵素は室温で24時間 pH 5～10 の範囲で安定であった (Fig. 3)。酵素活性の至適温度は約 70°C であった (Fig. 4)。この酵素の熱安定性は次のように試験した：酵素液を各温度で30分間保温し、37°C で残存活性を測定した。その結果、NprM は 70°C 以下では安定であった。次に NprM とサーモライシンの熱安定性を比較した (Fig. 5)。90°C、30分の熱処理後 NprM はサーモライシンに比べ約10%高い耐熱性を示した。さらにこれらの酵素のカゼイン分解法による比活性の測定を行った。NprM は27,700ユニット/mg タンパクであり、サーモライシンの比活性 (19,200ユニット

Table 1. Inhibitors of protease NprM

Inhibitor ^a (mM)	Activity (%)
None	100
EDTA (1)	19
(5)	11
(10)	2
DFP (1)	90
(5)	86
PMSF (1)	92
(5)	88

^a EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; DFP, Diisopropyl fluorophosphate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.

/mg タンパク) と比べ約40%高かった。

次に酵素活性に影響を与える添加物の影響を調べた (Table 1)。活性はキレート物質 (EDTA) により阻害されたが、PMSF や DFP によっては阻害されなかった。これらの結果から我々は *B. stearothermophilus* MK232 株からのプロテアーゼは、耐熱性中性 (金属) プロテアーゼであると結論した。

(6) *nprM* 遺伝子の枯草菌中でのクローニング

NprM の生産性の解析を行うため、*nprM* 遺伝子のクローニングを枯草菌中で試みた。*B. stearothermophilus* MK232 株より染色体 DNA (約 5 μg) を *Pst* I で切断後、全容量 50 μl で pTB53 を *Pst* I で切断 (約 2 μg) と連結した。連結混合物を *B. subtilis* MT-2 株に形質転換し、5 μg/ml のカナマイシンを含む LC 寒天培地上で約 10⁵ コ 形質転換株を得た。その中で8株ハローを形成する株を取得できた。それらの株はすべてテトラサイクリン耐性であった。またそれらの株 (Km^r, Tc^r, Npr⁺) からプラスミド DNA を調製し、MT-2 株に再形質転換しても表現型は変らなかった (Km^r, Tc^r, Npr⁺)。

さらに耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子がクローニングされていることを確めるため、形質転換体の菌体外プロテアーゼのアッセイを行った。このプロテアーゼは EDTA によっては阻害を受けるが、PMSF によって阻害されなかった。このことはこのプロテアーゼが中性 (金属) プロテアーゼであるということを示している。また至適 pH は 7～8 であった。さらに 65°C、15分間の熱処理を加えてもこのプロテアーゼは活性を有しており、耐熱性のプロテアーゼであった。これらの結果から *B. stearothermophilus* MK232 株からの耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子 (*nprM*) が枯草菌中にクローン化されたことが明らかになった。

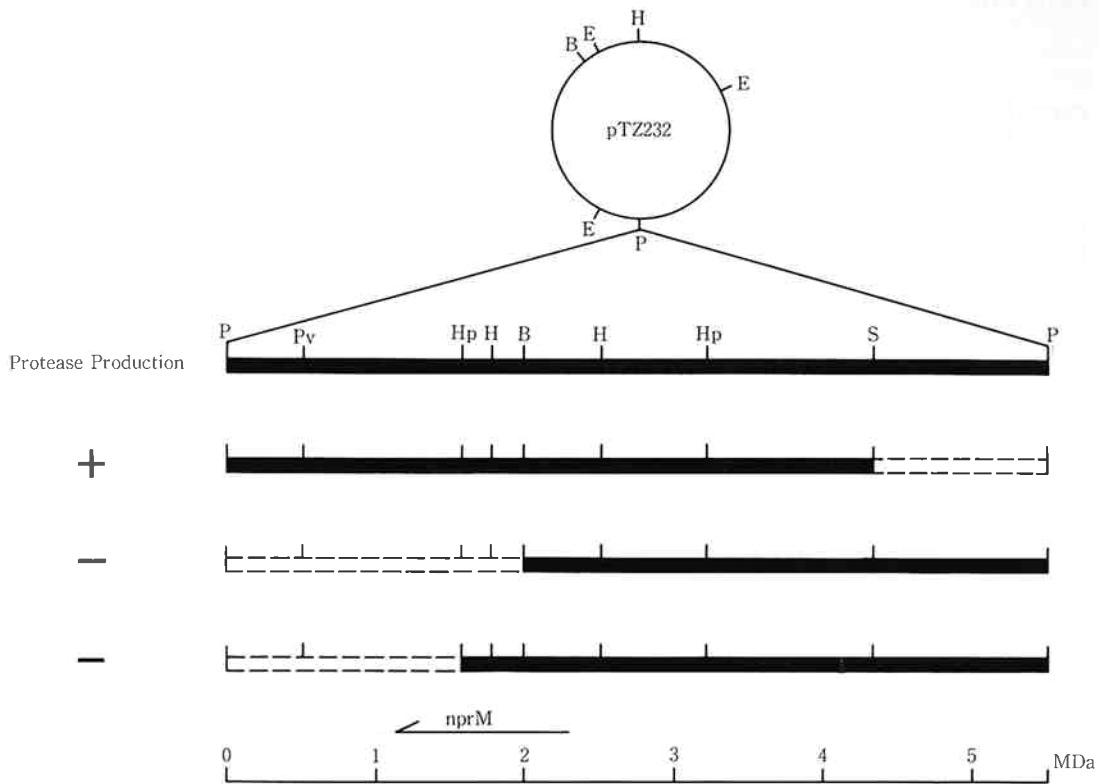


Fig. 6 Structure of plasmid pTZ232 and its derivatives. Black bars indicate the DNA from *B. stearothersophilus* MK232. The neutral protease gene is contained in a black bar representing the 5.5 MDa *Pst* I fragment of pTZ232. Broken parallel lines indicate deletion of the corresponding fragments. Cleavage site of *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind*III, *Hpa* I, *Pst* I, *Pvu* II and *Sal* I are indicated by B, E, H, Hp, P, and Pv, respectively. The position and direction of transcription of the *nprM* gene are indicated by an arrow.

nprM 遺伝子を有する組換えプラスミドを pTZ232 と名命した。pTZ232 は *B. stearothersophilus* MK232 由来の遺伝子を 5.5 Md 含んでいた。pTZ232 株の制限酵素地図を Fig. 6 に示す。1.2 MDa の *Sal* I -*Pst* I 断片を欠失させたとき、プロテアーゼ活性は失われなかったが、2.0 MDa の *Bam*H I -*Pst* I 断片や、1.5 MDa の *Hpa* I -*Pst* I 断片を pTZ232 から欠失させたときは、プロテアーゼ活性が見出せなくなった。それらの結果から *nprM* 遺伝子は pTZ232 の 2 MDa *Hind*III -*Pvu* II 付近に存在していると結論できた。

(7) *nprM* の塩基配列

nprM 遺伝子とその周辺領域の塩基配列を決定した (Fig. 7)。塩基配列は唯一の読み枠からなり、1656塩基 (552アミノ酸残基) から成立っていた。シャインーダールガノ (SD) 配列が翻訳開始部位 (ATG) から上流 12 bp に見出された¹³⁾。他の耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子、*nprT*¹⁰⁾ のプロモーター配列 (-35領域: TTTTCC; -10領域: TATTTT) と非常によく似た、*nprM* のプロモーター配列と予想される配列(-35領域:

TTTTCC; -10領域: TATTGT) が見出された。この配列は SD 配列の約 40 bp 上流に位置していた。塩基配列から予想されるN末のアミノ酸配列は塩基性のアミノ酸 (Lys, Arg) 等がつかがりその後方に疎水性のアミノ酸がつかった典型的なシグナル配列が見られた¹⁴⁾¹⁵⁾。また、典型的なターミネーター配列が読み枠の直後に見られた。

(8) 菌体外中性プロテアーゼのアミノ酸配列

このプロテアーゼを *B. stearothersophilus* YG185 株の培養液から精製を行った。N末端アミノ酸配列は全自動シーケンサーを用い5サイクル決定した。最初の5つのアミノ酸は Ile-Thr-Gly-Thr-Ser であった。この配列は ATA から始まる配列と完全に一致した (+709 から+711, Ile237 Fig. 7)。その配列に対応するアミノ酸を矢印で Fig. 7 に示した。アミノ酸配列から菌体外プロテアーゼの分子量を測定したところ (316アミノ酸, 34266ダルトン) 前に測定した分子量 (約34000ダルトン) と一致した¹⁶⁾。これらの結果は読み枠が、長いプレープロ構造として翻訳されることを示している。この配列は

-100
-35 region

CTGTCATAGGAAAATGTGAAA AAAACCGTAGGGAATTATCAACTATATCAGACTCTATTTTCCCAATACAAATA

-10 region SD

CTGTAATATTGTGTAAATATTCTAAATACAAAGAATAAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGAATAATTGGAAA

+1
ATGAAAAGGAAAATGAAAATGAAAATGAAAATACGATCGTTTGGTGTGTCAGCAGGACTAGCGGCCAAGTATTTTACCT
MetLysArgLysMetLysMetLysLeuArgSerPheGlyValAlaAlaGlyLeuAlaAlaGlnValPheLeuPro 25
1

100

TACAATCGGCTGGCTTCATCGGAAACGTTACATGGAACCAACAATTTCAAACCCTCAATTCACTCCGGTGAAT
TyrAsnArgLeuAlaSerThrGluHisValThrTrpAsnGlnGlnPheGlnThrProGlnPheIleSerGlyAsp 50

200

CTGCTGAAAATGAAATGGCACATCCCCAGAAAGAACTCGTCTATCAATATGTTGAAAAAAAAGAAAACAAGTTTAA
ArgLeuLysValAsnGlyThrSerProGluGluLeuValTyrGlnTyrValGluLysAsnGluAsnLysPheLys 75
300

TTTCATGAAAACGCTAAGGATACTCTACAATTGAAGAAAAGAAAATGATAACCCTGGTTTTACGTTTATGCGC
PheHisGluAsnAlaLysAspThrLeuGlnLeuLysGluLysLysAsnAspAsnLeuGlyPheThrPheMetArg 100

400

TTCCAACAAACGTATAAAGGATTCCTGTGTGTTGGACAGGTAGTAAGTGCACGCGTAAAGATGGCAGCCTGACG
PheGlnGlnThrTyrLysGlyIleProValPheGlyGlnValValThrAlaHisValLysAspGlySerLeuThr 125

500

GCGCTATCAGGGACACTGATTCCAATTCCGAATTTGGACACGAAAAGGATCCTTA AAAAGCGGGAAGAAATGAGT
AlaLeuSerGlyThrArgIleProIleProAsnLeuAspThrLysGlySerLeuLysSerGlyLysLysLeuSer 150

600

GAGAAACAAACGCGTGACAATGCTGAAAAAGATTAGTGGCAAATGTAACAAAGGAAGTACCGGAATATGAACAG
GluLysGlnAlaArgAspIleAlaGluLysAspLeuValAlaAsnValThrLysGluValProGluTyrGluGln 175
800

GGAAAGACACCGAGTTTGTGTTTATGTCAATGGGACGAGGCCTCTTTAGCGTACGTTGTCAAATTTAACTTT
GlyLysAspThrGluPheValValTyrValAsnGlyAspGluAlaSerLeuAlaTyrValValAsnLeuAsnPhe 200

700

TTAACTCCTGAACCAGGAAACTGGCTGTATATCATTGATGCCGTAGACGGAAAAATTTTAAATAAATTTAAACAA
LeuThrProGluProGlyAsnTrpLeuTyrIleIleAspAlaValAspGlyLysIleLeuAsnLysPheAsnGln 225

800

CTTGACGCCGAAAACCAGGTGATGTGAAGTCGATAACAGGAACATCAACTGTCGGAGTGGGAAGAGGAGTACTT
LeuAspAlaAlaLysProGlyAspValLysSerIleThrGlyThrSerThrValGlyValGlyArgGlyValLeu 250
→ → → →

900

GGTGATCAAAAATATTAATACAACCTACTCTACCTACTATTTTACAAAGATAATACCGGTGAAATGGGATT
GlyAspGlnLysAsnIleAsnThrThrTyrSerThrTyrTyrLeuGlnAspAsnThrArgGlyAsnGlyIle 275
900

TTCACTGATGATGCGAAATACCGTACGACATGCCGGGAAGCTTATGGGCAGATGCAGATAACC AATTTTGGC
PheThrTyrAspAlaLysTyrArgThrThrLeuProGlySerLeuTrpAlaAspAlaAspAsnGlnPhePheAla 300

1000

AGCTATGATGCTCCAGCGGTGATGCTCAATATTACGCTGGTGTGACATATGACTACTATAAAAATGTTCCATAAC
SerTyrAspAlaProAlaValAspAlaHisTyrTyrAlaGlyValThrTyrAspTyrTyrLysAsnValHisAsn 325



Fig. 7 Nucleotide sequence and amino acid sequence of the neutral protease gene *nprM*. The nucleotide sequence is counted from the first base of the translation start site at +1. The amino acid sequence is shown beneath the nucleotide sequence. The amino-terminal amino acid sequence of extracellular protease, determined by Edman degradation, is specified below the amino acid sequence by arrows. The first amino acid of translation (Met) is counted as 1. The putative Shine-Dalgarno (SD) sequence (nucleotide -18 to -12) and promoter region (-35 to -10 regions) are shown by solid lines below the nucleotide sequence. Asterisks (***) indicate a stop codon. A putative transcriptional terminator containing an inverted repeat is shown by arrows (->-) below the nucleotide sequence. Amino acid substitutions in comparison with thermolysin are indicated by broken lines.

他にも報告されている¹⁰⁾¹⁷⁾。

このポリペプチドのアミノ酸配列を以前に報告されている耐熱性中性プロテアーゼと比較した¹⁰⁾¹⁸⁾。サーモライシンとは2つのアミノ酸置換が生じている以外は全く同一であった (Asp37 から Asn37, Glu119 から Gln119)。一方, *B. stearothermophilus* CU21 由来の耐熱性プロテアーゼ (NprT) との比較を行ったところ成熟タンパク領域では高い相同性を示した (85%) がプルー

プロ領域においては余り相同性が認められなかった (40%) (Fig. 8)。

(9) 枯草菌中での *nprM* と *nprT* の発現

前に示したように *nprT* と *nprM* のプロモーター配列は非常によく似ていた。しかしながら *B. stearothermophilus* MK232 (*nprM* 遺伝子を含む) と *B. stearothermophilus* CU21 (*nprT* を含む) のプロテアーゼの発現率を比較すると MK232 株の方がはるかに多

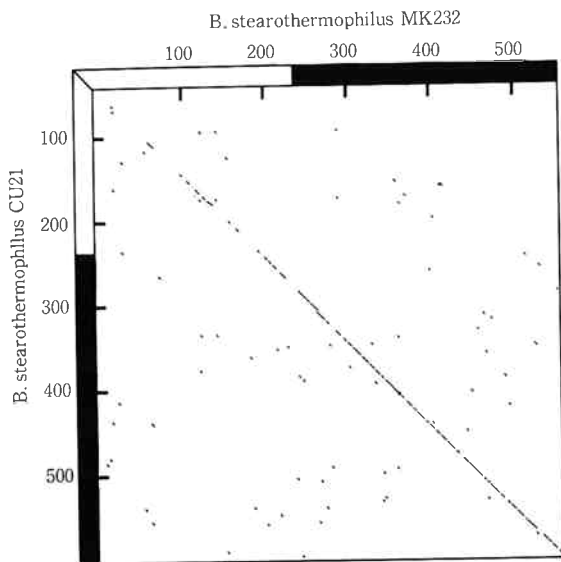


Fig. 8 Computer search for homologous regions of the amino acid sequence. The neutral protease of *B. stearothermophilus* MK232 and *B. stearothermophilus* CU21 are compared along the entire coding region. Open and solid bars in both axes correspond to the pre-pro and extracellular region of protease, respectively. Sequence number is shown on both axes. The minimum length of the homologous region was taken as three amino acids.

量のプロテアーゼを産生していた。そこで同じ条件下で酵素生産性の違いについて調べるため、それら2つのプロテアーゼ遺伝子を Fig. 9 に示したように低コピー数プラスミドである pTB53 を用い、枯草菌中にサブクローニングした。*nprM* と *nprT* を含む組換えプラスミドを、それぞれ pTNM53 と pTNT53 と名命した。pTNM53 と pTNT53 を有する *B. subtilis* を24時間、同条件で培養したところ、pTNM53 を有する株の方が約20倍高い生産性を示した。一方、生育は両株共ほぼ同様であった (Fig. 10)。

(10) NprM の枯草菌を用いた醗酵

NprM を遺伝子増幅効果により増産する目的で、*nprM* 遺伝子を種々のプラスミドベクターにサブクローニングした (Fig. 11)。その結果、高コピー数ベクタープラスミドである pUB110 を用いた場合、予想に反し高い酵素活性は得られなかった。しかしながら低コピー数ベクタープラスミドを用いた場合は pMK1, pMK2 共高い酵素活性を示した。そこで pMK1 を有する枯草菌を用い、酵素の醗酵について調べた (Fig. 12, 13)。その結果、フラスコを用いた振とう培養にもかかわらず、

高い酵素活性を示した。また SDS-PAGE で培養上清のタンパク質の挙動を分析したところ酵素活性の上昇につれ NprM (約34000ダルトン) のバンドが増大し、分泌されていた。24 h 後には総分泌タンパクのうち NprM タンパクがかなりの割合を占めていることが判明した。

4. 討 論

我々が新規に分離した耐熱性中性プロテアーゼ、*nprM* はサーモライシンに比べ耐熱性で約10%、比活性で約40%それぞれ高かった。これらのアミノ酸配列を比較するため、枯草菌中で *nprM* 遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。塩基配列から推定した NprM のアミノ酸配列は、2つのアミノ酸置換 (Asp37 から Asn37, Glu119 から Gln119) を除いて全く等しかった。両アミノ酸置換共、酸性アミノ酸へのアミドの付加であり、その結果電荷を有さないアミノ酸への置換であった。2つのアミノ酸置換は、図13¹⁹⁾ 中で示した Domain A 中で生じたものであり、Domain B 中ではなかった。それはタンパク質の3次構造の変化がなく Domain A 中の静電的バランスに役立っているのかもしれない。さらに Asn37, Gln37 というアミノ酸置換は近傍のアミノ酸と水素結合を形成し、Domain A を強化したのかもしれない。事実、Asn37 のまわりには、水素結合形成可能なアミノ酸、Asn19, Asn21, Asn33, Thr34, Arg35, Asn96 及び Asn97 が存在する。一方 Gln119 の周辺にも Arg101, Ser102, Asn116, Ser118 及び Met120 が存在する (Fig. 14)。アルゴス等²⁰⁾ による酵素の耐熱化の統計的処理によると、Asp→Asn へのアミノ酸置換は熱安定性を向上させる置換である。これらは自然の中で、水素結合の付加あるいは良好な静電状態形成可能なアミノ置換が生じ耐熱性、比活性が上昇した1つの例であると思われる。

一般的に好熱性細菌由来の遺伝子における GC 含量は高いと言われている²¹⁾²²⁾²³⁾。*nprT* 遺伝子のコーディング領域の GC 含量は 58 mol% であり、コドンの3文字目のそれは 72 mol% であった¹⁰⁾。驚いたことに *nprM* 遺伝子のコーディング領域の GC 含量は 42 mol% で、3文字目はさらに低かった (36 mol%)。この数値は *B. amyloliquetaciens* の中性プロテアーゼ遺伝子 (それぞれ46と 49 mol%)²⁴⁾ や *B. subtilis* の中性プロテアーゼ遺伝子 (それぞれ44と 42 mol%)²⁵⁾ の GC 含量と似た数値であった。しかしながら NprM と NprT のアミノ酸配列の類似性は非常に高かった (Fig.

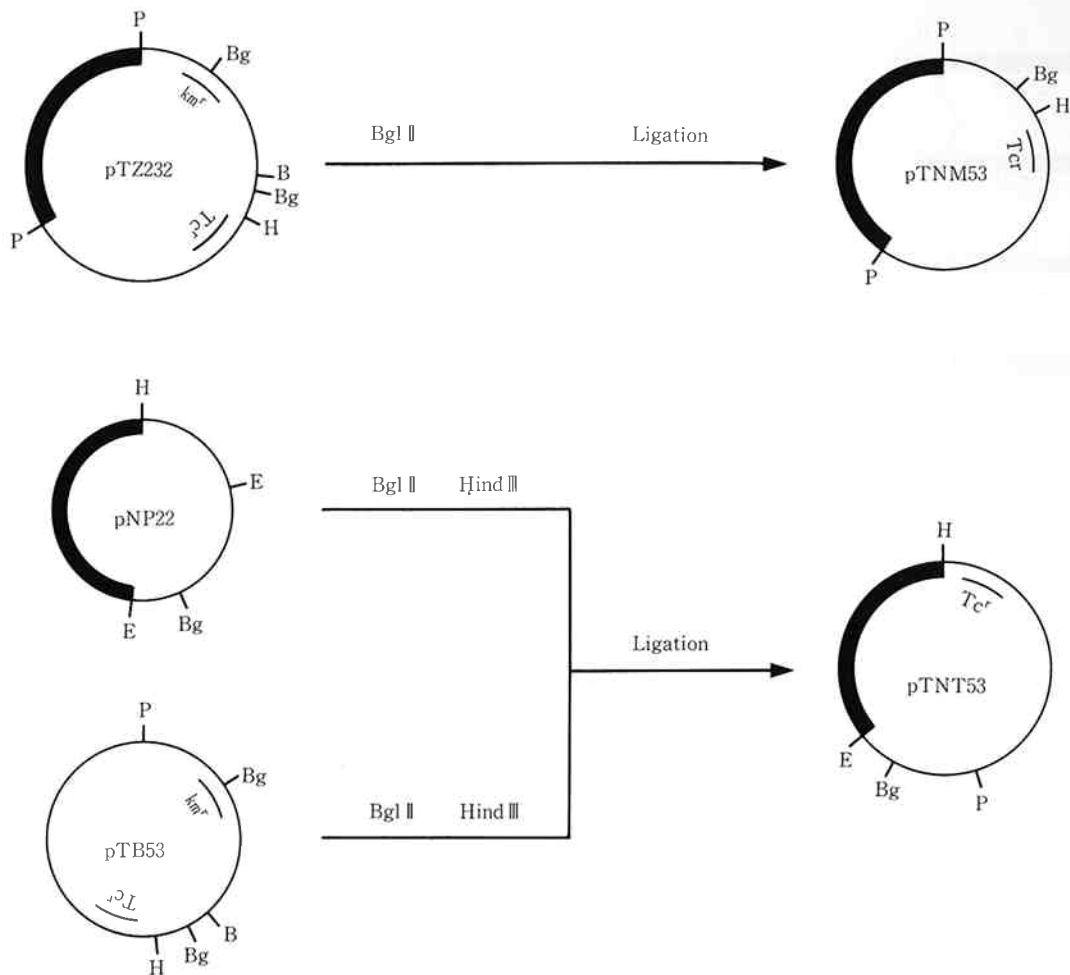


Fig. 9 Construction of pTNM53 and pTNT53. Thick lines in pTZ232 and pNP22 represent *B. stearothermophilus* MK232 DNA and *B. stearothermophilus* CU21 DNA, respectively. Km^r and Tc^r indicate kanamycin- and tetracycline-resistance genes, respectively.

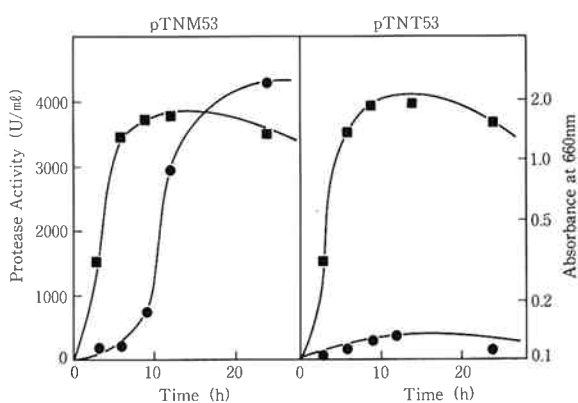


Fig. 10 Time course of neutral protease production and cell growth for *B. subtilis* MT-2 carrying either pTNM53 or pTNT53. Cell were grown at 37°C in L broth containing 5 μg tetracycline ml⁻¹ on a rotary shaker. The supernatants were used for enzyme assay (●). Bacterial growth (■) was measured as the optical density at 660 nm.

8)。一方、GC 含量は大きく異なっていた。これらの2つの遺伝子の違いは、進化的に起源が異なるところから進化してきた可能性が強いものと思われる。

我々は枯草菌中で *nprM*, *nprT* 遺伝子の発現を行った。同様の条件下で培養を行ったにもかかわらず、酵素生産性は *NprM* の方が *NprT* に比べ約20倍も高かった。この違いは以下のように考えている。(1)Fig. 8 で示したようにシグナル配列や、プロ構造がかなり異なっている。このようなことから、分泌効率に差が現われたのではないかと。(2)両遺伝子の GC 含量がかなり違い、枯草菌中におけるコドン利用の違いが発現に影響を与えているのではないかと。このようなことが考えられるが、今後詳細な検討を行う必要がある。

一方、*nprM* 遺伝子を枯草菌にクローン化することは遺伝子増幅効果により、酵素の高生産が期待できた。フラスコでの培養で約8,000単位/ml (Fig. 12) に達し、親株である *B. stearothermophilus* MK232 株を同条件

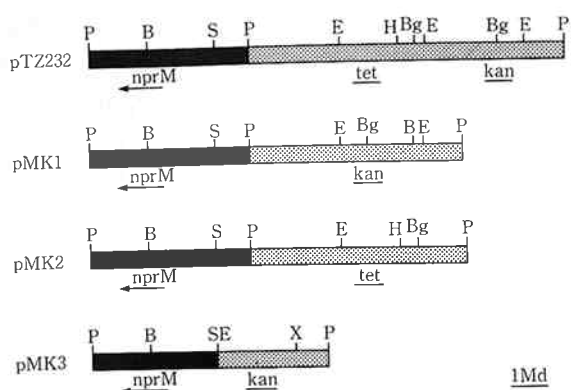


Fig. 11 Construction of pMK1, pMK2, pMK3 and pMK3. Black bars represent the DNA from *B. stearothermophilus* MK232. pTZ232, pMK1 and pMK2 was constructed using pTB53, pTB51, pTB522 as low copy vector plasmids, respectively. pMK3 was constructed using pUB110 as a high copy vector plasmid. Cleavage site of *Bam* H I, *Bgl* II, *Eco* R I, *Pst* I, *Sal* I and *Xba* I are indicated by B, Bg, E, P, S and X, respectively. The position and direction of transcription of the *nprM* gene are indicated by an arrow. The positions of kanamycin resistance and tetracycline resistance genes are indicated by kan and tet, respectively.

で培養した場合の約10倍高い活性であった。pTB53のコピー数は約8であり、コピー数に見合った遺伝子増幅効果が現われたものと思われた。工業的利用を考えた場合も枯草菌を用いた組換え体の醗酵が有利であると思われる。今後、枯草菌に合う培地の検討、ジャーフェメンターによる醗酵条件等を検討すれば飛躍的に高い酵素生産が期待できる。

5. この論文に関する論文

- 1) "Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*", Motoki Kubo, Keiich Murayama, Koji Seto, and Tadayuki Imanaka; *Journal of Fermentation Technology*, **66**, 13-17 (1988)
- 2) "Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*", Motoki Kubo and Tadayuki Imanaka; *Journal of General Microbiology*, **134**, 1883-1892 (1988)

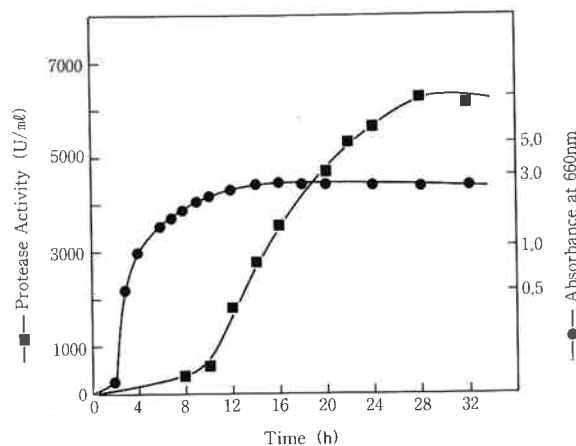


Fig. 12 Time course of neutral protease production and cell growth for *B. subtilis* MT-2 carrying pMK1. Cells were grown at 37°C in L broth containing 5 µg kanamycin ml⁻¹ on a rotary shaker. The supernatants were used for enzyme assay (■). Bacterial growth (●) was measured as the optical density at 660 nm.

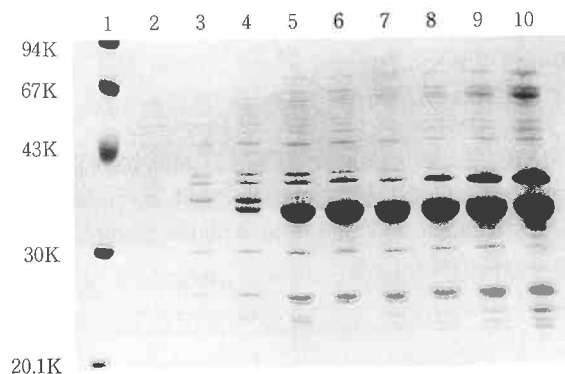


Fig. 13 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the culture broth of *B. subtilis* MT-2 carrying pMK1.

Lane 1, relative molecular mass standards (94.0 K, phosphorylase b; 67 K, albumin; 43 K, ovalbumin; 30 K, carbonic anhydrase; 20.1 K, trypsin inhibitor). K, Kilodaltons.

Lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10, indicate cultivation time (4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 20 h, and 24 h, respectively)

6. この論文に関する特許

- 1) 耐熱性プロテアーゼの製造法; 久保 幹, 村山敬一, 今中忠行, 合葉修一, 特開昭63-192388
- 2) その他7件