

Arthrobacter nicotinovorans 23-0-11 が生産する カドミウム遊離プロテアーゼに関する研究

生命分子化学講座 応用菌学分野
桑原 亜希

【背景と目的】 ホタテガイの養殖は北海道の主要な水産業の一つであり、その生産高は年々増加している。それに伴い加工で生じる廃棄物、特にカドミウムが高濃度で蓄積しているウロと呼ばれる部位(中腸線)の処理が問題になっている。一方でウロは良質なタンパク質や有用な脂質を豊富に含んでいるため、カドミウムを除去できればウロを飼料や肥料として有効利用することができる。

ウロにおいて、カドミウムはメタロチオネイン様の金属キレートタンパク質と結合しており、現在は酸分解後電解法によって除去されている。しかし、この方法には大掛かりな装置を必要とし、装置の劣化が激しいなどの問題がある。そこで、タンパク質の損傷をより少なく、かつ簡便に処理するため、プロテアーゼを用いて金属キレートタンパク質を分解させ、カドミウムを遊離させるという方法が提案された。当研究室のスクリーニングの結果、カドミウム汚染土壌より単離した *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 が、ウロからカドミウムを特異的に遊離させる菌体外プロテアーゼを生産することが明らかになった (Ren et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2004 68 (8), 1627-33)。本酵素はプロテアーゼ 23-0-11 と命名され、その遺伝子が取得され、セリンプロテアーゼであることが明らかになった。本研究では、本酵素の更なる詳細な解析を目的とした。

【方法】 *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11の培養上清から、2段階のイオンクロマトグラフィーにより約23 kDaの酵素を精製し、結晶化・構造解析を行った。構造解析及び前任者の行った一次構造解析の結果から、本プロテアーゼは活性中心と予測される部位にSer170及びSer171の二つのセリン残基を持ち、一方が活性残基であると予想した。そこでこれらのセリン残基の一方、または両方をアラニンに置換した変異酵素を作製し、活性を比較することで活性残基の特定を行った。前任者が作製した大腸菌用発現ベクターpDEST14/990ATGにDpnI法による点変異導入を行い、変異酵素発現ベクターを3種構築した。大腸菌BL21-AIを形質転換し、各種プロテアーゼの発現を行い、菌体破碎後の可溶性タンパク質を陰イオンクロマトグラフィーに供し部分精製を行った。粗酵素液を用いヘモグロビン、カゼイン分解活性を測定し、活性残基の特定を行った。

【結果】 精製酵素はホタテウロからカドミウムを遊離させる活性を示した。またヘモグロビン、カゼインに対して高い分解活性を示し、わずかにケラチン分解活性を示した。構造解析の結果、トリプシン様のセリンプロテアーゼで、ケラチン及びエラスチン分解酵素の探索から得られた *Nesterenkonia* sp. AL20由来のプロテアーゼと同様の構造を持つことがわかった。変異酵素を作成し、SDS-PAGE電気泳動により発現を確認した。粗酵素液の活性測定を行った結果、171番目のセリンをアラニンに置換したS_171_A及びS_170/171_Aプロテアーゼはタンパク質分解活性を示さなかった。この結果から、本プロテアーゼの活性残基はSer171であることが示唆された。