

放線菌 *Streptomyces* sp. P-3 株由来
新規エラスターゼの機能解析とその応用

2021 年 1 月

藤井 大樹

放線菌 *Streptomyces* sp. P-3 株由来
新規エラスターゼの機能解析とその応用

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命農学学位プログラム
博士(生命農学)学位論文

藤井 大樹

目次

第一章 序論	3
第一節 微生物酵素の食品産業への応用	3
第二節 エラスチン	4
第三節 エラスターゼ	5
第四節 酵素による食肉軟化	6
第五節 本研究の目的と本論文の構成	7
第二章 エラスターゼ生産菌の単離	10
第一節 緒言	10
第二節 材料及び方法	10
第三節 エラスターゼ生産菌の単離	13
第四節 まとめと考察	15
第三章 <i>Streptomyces</i> sp. P-3 株のエラスターゼ生産条件の検討	17
第一節 緒言	17
第二節 材料及び方法	17
第三節 <i>Streptomyces</i> sp. P-3 株の培養条件検討	22
第四節 まとめと考察	26
第四章 <i>Streptomyces</i> sp. P-3 株由来エラスターゼ (SEL)の精製と遺伝子の単離 ..	28
第一節 緒言	28
第二節 材料及び方法	28
第三節 <i>Streptomyces</i> sp. P-3 株由来 SEL の精製	38
第四節 <i>selA</i> のクローニング	47

第五節 SEL の推定分子構造と分子系統学的解析	52
第六節 まとめと考察.....	58
第五章 SEL の食肉軟化への応用	エラー! ブックマークが定義されていません。
第一節 緒言	エラー! ブックマークが定義されていません。
第二節 材料及び方法	エラー! ブックマークが定義されていません。
第三節 エラスチンの局在	エラー! ブックマークが定義されていません。
第四節 天然基質の分解性.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
第五節 牛肉由来結合組織への軟化効果の確認.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
第六節 まとめと考察.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
第六章 総括	62
引用文献.....	66
謝辞	79

第一章 序論

第一節 微生物酵素の食品産業への応用

人類の酵素の利用の歴史は古く、紀元前 2300 年頃のエジプトの壁画にはビール醸造についての記録がある。その中では、ビールの原料である麦芽中のアミラーゼを利用した糖化处理の様子も見られる。また、紀元前 800 年頃ホメロスの叙述詩「オデュッセイア」の中ではチーズ作りに子ヤギの胃が使われていたことが記述されている。偶蹄目の第四胃袋にはレンネットと言われる凝乳酵素であるキモシンが存在しており、古代人は酵素の存在を知らずとも経験的に利用してきたといえる。一方我が国では、高温多湿な気候の影響で麹菌を利用した酒、味噌、醤油などの醸造・発酵食品づくりが平安時代頃より行われてきた。それら食品の製造では、麹菌は固体状態の原料である米などの穀物に繁殖させる固体培養法がとられている。固体培養法では、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼなどの多種類の酵素を生成することが可能となっており、酵素の供給源として醸造をささえる技術となっている (Gomi et al., 1993; Iwashita et al., 1998)。19 世紀になり、酵素という存在が Kuhne や Buchner らにより明らかにされ、酵素の産業利用も同時に始まった。1874 年にクリスチャン・ハンセン社が世界最初の産業用酵素として、仔牛の胃より抽出したチーズ製造用酵素レンネットの販売が開始され、1894 年には、高峰讓吉が小麦ふすまを用いた固体培養法により麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来のアミラーゼ製剤が微生物由来の酵素製剤として初めて製品化された。20 世紀以降は、発酵技術、精製技術の向上により、様々な酵素が発見、産業化されている。現在、食品業界では糖質関連酵素、タンパク質関連酵素、核酸関連酵素、脂質関連酵素などが主に使用されている。糖質関連酵素は、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルナラーゼ、セルラーゼ、グルコースイソメラーゼなどが糖、異性化オリゴ糖、醸造、製パン、飲料製造で利用されている。タンパク質関連

酵素では、タンパク質の N 末端あるいは C 末端よりアミノ酸を一つずつ遊離させるエキソプロテアーゼと非末端の配列内部を加水分解するエンドプロテアーゼがそれぞれ、醸造、製パン、天然調味料、酵母エキス、食肉軟化剤、チーズ製造で利用されている。核酸関連酵素では、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、AMP デアミナーゼが酵母エキス、核酸調味料製造で利用されている。脂質関連酵素では、リパーゼ、ホスファターゼが製パン、油脂加工製造で使用されている。これらの酵素の由来は様々であるが、真菌では、*Aspergillus* 属、*Rhizomucor* 属、*Trichoderma* 属など、細菌では *Bacillus* 属、*Streptomyces* 属などの微生物由来の酵素が一般的に使用される(井上國世, 2009, 2015)。最近では、食品分野においては忌避されがちであった組換え技術を用いた酵素生産もキモシンや α -アミラーゼ、アスパラギナーゼなど一部の酵素では利用が広がってきている。

第二節 エラスチン

結合組織は、脊椎動物の体内において組織の構造的安定性に必要な支持組織の一種であり、細胞外マトリックスと細胞から成る。細胞外マトリックスを構成する不溶性繊維は、膠原繊維、弾性繊維、細網繊維から成る。膠原繊維と細網繊維の主成分がコラーゲンなのに対して、弾性繊維の主成分はエラスチンとなっている。エラスチンは、皮膚、血管、肺、乳房、腱、靭帯などの伸縮性が必要とされる部位に多く存在しており、組織の弾力性に大きく寄与する。エラスチン自体は、線維芽細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞等より細胞外に分泌されるトロポエラスチンから成る。トロポエラスチンは約 70 kDa の可溶性タンパク質であり、一次構造は疎水性領域と架橋領域で構成される。疎水性領域はグリシン、プロリン、バリン、ロイシンなどの非極性アミノ酸が多く含まれるのに対して、架橋領域はリジンとアラニンがその構成アミノ酸のほとんどを占

める(Kielty et al., 2002; Schröder et al., 2018; Wise & Weiss, 2009)。疎水性領域は β 構造を有しており、エラスチンの伸張性に寄与していると考えられている(Muiznieks et al., 2010)。一方、架橋領域は α -ヘリックスの二次構造を形成し、エラスチンの収縮性に関与していると考えられている(Reichheld et al., 2014)。トロポエラスチンはコアセルベーションと呼ばれる自己凝集を起こしたのちに、リジルオキシダーゼの作用により、架橋領域中のリジン残基を酸化脱アミノ化する。リジルオキシダーゼによる反応により、デスモシン、イソデスモシンというエラスチン特有のアミノ酸が形成され、トロポエラスチンの架橋化、繊維化が起こり、不溶性のエラスチンとなる (Fig. 1-1-1)。

第三節 エラスターゼ

エラスターゼは、エラスチンの加水分解を触媒するプロテアーゼであり、1949 年に Baló らによって最初に定義づけられた (Baló & Banga, 1949)。Baló らは、膀胱抽出物より弾性繊維を可溶化する酵素を見出し、エラスターゼとして命名した。哺乳類には、キモトリプシン様エラスターゼファミリーメンバー1 (CELA1)、好中球エラスターゼ、マクロファージメタロプロテアーゼなど、いくつかの異なるタイプのエラスターゼが存在している (Naughton & Sanger, 1961; Shapiro et al., 1993; Watanabe et al., 1990)。エラスターゼ活性を持つ酵素は、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼファミリーとプロテアーゼ内に広く分布している (Cheng et al., 2004; Miyoshi & Shinoda, 2000; Naughton & Sanger, 1961; Werb et al., 1982)。微生物由来のエラスターゼは、*Pseudomonas* 属、*Clostridium* 属、*Vibrio* 属、*Aeromonas* 属、*Bacillus* 属、*Streptomyces* 属、*Aspergillus* 属の一部の種より報告がある。*P. aeruginosa* (Moriyama et al., 1965)、*C. histolyticum* (Takahashi et al., 1970a)、*V. cholerae*、*V. vulnificus* (Janda et al., 1999)、*Aeromonas hydrophila* (Cascón et al.,

2000a)、*Aspergillus fumigatus* (Lee & Kolattukudy, 1995)の生産するエラスターゼはメタロプロテアーゼに分類される。いずれの菌種も病原性が確認されており、エラスターゼ自体は病原性の決定因子とはなっていないが、侵襲性と感染の確立を助けるものと考えられている (Cascón et al., 2000; Lee & Kolattukudy, 1995; Takahashi et al., 1970)。*Bacillus* 属と *Streptomyces* 属が生産するエラスターゼは主にセリンプロテアーゼに分類される (Bressollier et al., 1999; He et al., 2003; Hung & Hedstrom, 1998; Jurásek et al., 1974; Kitadokoro et al., 1994; Tsai et al., 1988)。Tsai らは、*Bacillus* sp. YaB 株が高いエラスターゼ活性を持つ subtilisin サブファミリーのアルカリ性エラスターゼ (subtilisin YaB)を生産することを報告している (Kaneko et al., 1989; Tsai et al., 1986, 1988)。*Bacillus* 属と *Streptomyces* 属などの非病原性微生物由来のエラスターゼは、食品、化粧品、および医療業界での利用が期待される。

第四節 酵素による食肉軟化

食肉において、肉質の軟らかさは食肉の品質を評価する重要な指標の一つである。食肉の硬さは、ミオシン、アクチンなどから成る筋原線維タンパク質と、コラーゲンやエラスチンなどの結合組織の総量の変化によって引き起こされる (Christensen, Ertbjerg, et al., 2013; Christensen, Løje, et al., 2013; Cross et al., 1973)。食肉の軟化方法としては、浸漬液の pH の最適化、保存温度の最適化、機械的軟化、酵素処理による軟化など食肉の硬さを改善するための多くの技術が今日まで開発されてきた。その中でも食肉加工業界では、筋原線維の軟化法として、アクトミオシンの等電点である pH 5.3 よりも酸性側もしくはアルカリ性側の浸漬液に食肉を浸漬することで軟化させる浸漬法がしばしば採用される。本方法は、食肉中の筋原線維間の隙間が大きくなり保水率が上昇するため軟化効果が得られると考えられている。専用の高度な設備が必要でなく手

軽な方法である浸漬法ではあるが、食肉中の結合組織、特にその構成要素の 1 つであるエラスチンは非常に安定しており、化学的、物理的、および酵素的変化に対して耐性がある (Ryder et al., 2015)。一方、酵素による軟化法は、浸漬法や機械的軟化法と併用して実施される。酵素の由来としては、パパイヤやパイナップル、しょうが等に見られるような植物由来のプロテアーゼが一般的によく用いられる (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016)。ただし、これらの植物性の酵素は一般的に幅広い基質特異性を持っているため、筋原線維の過剰分解を引き起こす。この過剰分解は、食感や味などの嗜好性の低下につながることで知られており、食肉加工時における軟化状態の制御を困難にさせる原因となっている。微生物由来のプロテアーゼもまた食肉の軟化に用いられる (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016; Sullivan & Calkins, 2010)。特に、*Bacillus* 属由来のプロテアーゼは広く研究され、その機能が解析されてきている。*B. subtilis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis* およびその他のいくつかの種によって産生される subtilisin は、結合組織に対して高い基質特異性を持っていることが報告されている (Takagi, Arafuka, et al., 1992; Tsai et al., 1988)。高木らは、強いエラスターゼ活性を持っている subtilisin YaB がパパインなどの植物由来のプロテアーゼよりも、コラーゲン及びエラスチンに対して高い基質特異性を示し、食肉においても結合組織に有意な軟化効果があったことを報告している (Takagi, Kondou, et al., 1992)。

第五節 本研究の目的と本論文の構成

前述のとおり、種々のエラスターゼは既に報告があり、*Bacillus* 属の生産する subtilisin の中には高いエラスターゼ活性の報告があるが、実際の食肉軟化剤としての酵素製品は市場に存在していないのが現状である。そこで本研究では、微生物由来の新奇エラスターゼを探索し、その食肉軟化への応用の可能性を検討することとした。

本研究の構成は以下の通りである。まず第二章では、エラスターゼ生産菌を自社保有菌株ならびに自然界より単離することを目的とした。第三章では、第二章において取得したエラスターゼ生産菌のエラスターゼ生産条件の検討について述べる。第四章では、第二章で取得したエラスターゼ生産菌培養上清からのエラスターゼ精製、本酵素遺伝子の同定ならびに酵素の機能について述べる。第五章では、取得したエラスターゼの実際の畜肉に対する軟化効果を確認した。第六章では、本研究全体の総括と今後の展望について述べる。

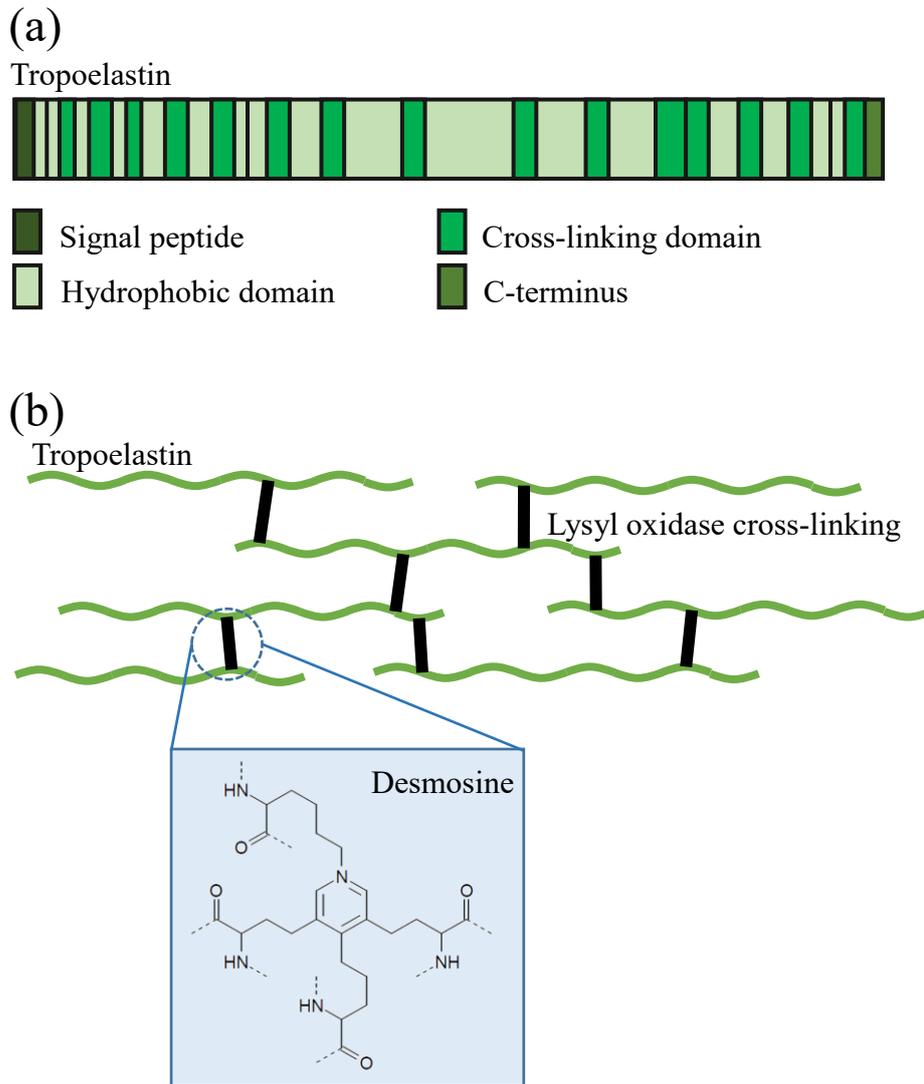


Figure 1-1-1. Structure of elastin

(a) Primary structure of tropoelastin. (b) Cross-linking model of elastin.

第二章 エラスターゼ生産菌の単離

第一節 緒言

前述の通り、*Pseudomonas* 属、*Clostridium* 属、*Vibrio* 属、*Aeromonas* 属、*Bacillus* 属、*Streptomyces* 属、*Aspergillus* 属の一部の種よりエラスターゼ生産菌の報告はされてはいるが、実際の肉軟化剤として利用可能な製剤は世に出ていないのが現状である。その理由としては、エラスターゼ生産菌の多くが病原菌であり、食品加工への利用は難しいことに加えて、基質特異性の高いと言われている微生物由来の酵素でも、エラスチン以外に筋原線維の分解も同時に起きてしまい、食味の低下を引き起こすことが原因だと考えられる。本研究では、まずエラスターゼ生産菌を効率的に単離するためのスクリーニング法について構築を行った。次に構築したスクリーニング法を用いて、実際にエラスターゼ生産菌の取得を目指した。

第二節 材料及び方法

2-2-1. 実験材料

使用培地

集積培養には、エラスチン液体培地 (Table 2-2-1)を用いた。固体培地における寒天の濃度は 1.5 % (w/v)とした。

2-2-2. エラスターゼ生産菌のスクリーニング法

1) 集積培養

自然界からのサンプルは試料を滅菌生理食塩水に懸濁後、エラスチン液体培地 7

ml に植菌し、28°Cで振盪培養を行った。一部試料は、50°C、20 min の熱処理を行い出来るだけ芽胞形成菌以外の菌株を除去した。熱処理後の試料は、0.2 ml をエラスチン液体培地 7 ml に植菌し、同様に培養を行った。エラスチン分解の有無を目視にて確認し、消失が確認できた試験区のみ 1 次スクリーニングに供した。

2) 1 次スクリーニング

エラスチン寒天培地を用いて、三菱商事ライフサイエンス(株)保有菌株、集積培養により得られた培養液 (適宜希釈) を塗布した。エラスチンの分解をクリアゾーン形成により目視で確認し、クリアゾーン形成があった株については、2 次スクリーニングに供した。

3) 2 次スクリーニング

1 次スクリーニングにより得られた菌株を 1 白金耳分掻き取り、エラスチン液体培地 7 ml に植菌し、28°C 24~48 時間、振盪培養を行った。得られた培養液を用いてエラスターゼ活性をエラスチンコンゴレッド法にて測定した。

2-2-3. エラスターゼ活性測定法

エラスターゼ活性は、5 mg/ml のエラスチンコンゴレッド (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 900 μ l で測定した。酵素溶液 100 μ l を加えることにより反応を開始し、25°C で 1 時間攪拌した。0.1 M NaOH を 200 μ l 加え、反応を停止させ、20,400 \times g で 15 分間遠心して未反応の固体基質を除去した。上清に放出された可溶性コンゴレッド色素を A_{495} で測定した。この活性の 1 unit (U) は、25° C で 1 時間に A_{495} の吸光度を 1.0 上昇させる酵素量として定義した。

Table 2-2-1. Elastin medium

Elastin	50.0 g
K ₂ HPO ₄	7.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
MgSO ₄	0.1 g
Yeast Extract	0.5 g
<hr/>	
1 L (pH 6.8)	

第三節 エラスターゼ生産菌の単離

2-3-1. エラスターゼスクリーニング法の確立

集積培養、2 次スクリーニングにおいて、液体培地中のエラスチンが実際にブタ膵臓由来エラスターゼ (Merck Millipore)により消失するか確認したところ、0.05 U の酵素量であれば 48 時間で消失することが確認された。また、同様に 1 次スクリーニングのエラスチン寒天培地についても検討した。寒天培地上で、0.01 Uの酵素濃度であれば 48-96 時間でクリアゾーンが形成されることが確認された。

2-3-2. エラスターゼ生産菌の取得

自社内の保有菌株ならびに自然界の土壌、工場廃液、畜肉残渣等より 2-3-1 で確立した方法を使用してスクリーニングを行った。集積培養、1 次スクリーニングの結果、自社内保有菌株、自然界から単離した菌株においてそれぞれでクリアゾーンを形成する菌株が得られた。具体的には、社内保有菌株からは *Bacillus* 属 18 株、*Streptomyces* 属 12 株、自然界からは土壌由来 19 株 (未同定)、工場廃液、畜肉残渣物由来 17 株 (未同定)を取得することができた。

2 次スクリーニングによる培養上清中のエラスチン分解活性を測定した結果、活性を示した菌株は *Bacillus* 属 18 株、*Streptomyces* 属 12 株、その他 3 株となっていた (Fig. 2-3-1)。その中で、最も活性の高かった菌株は自社保有菌株の *Streptomyces* sp. P-3 株であり、1.3 U/ml のエラスターゼ活性が培養上清に検出された。。

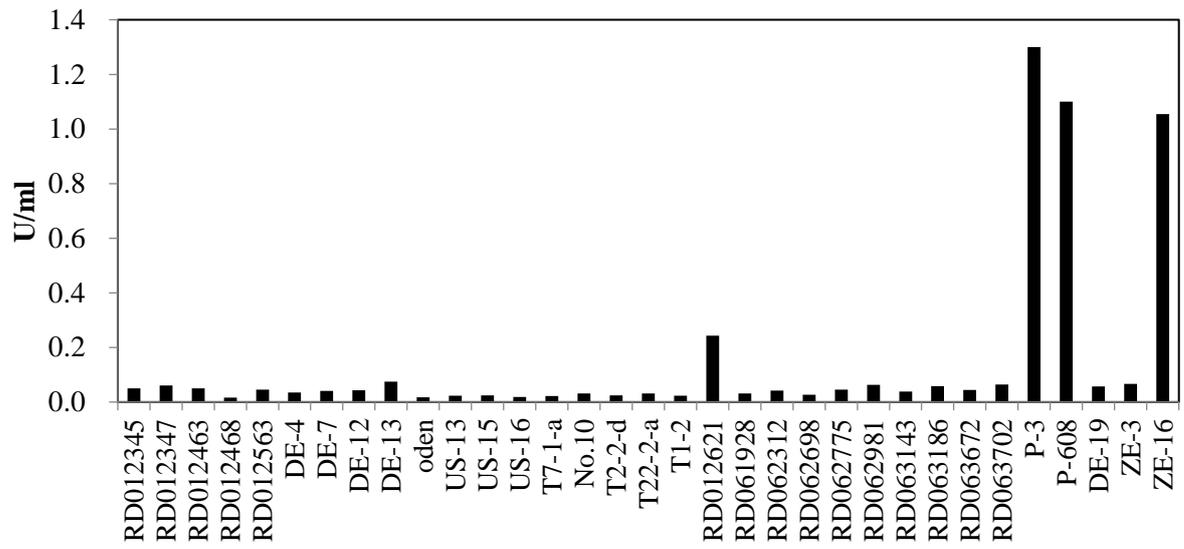


Figure 2-3-1. Elastase activity in the culture supernatant in secondary screening

第四節 まとめと考察

本章では、エラスチンを炭素源、窒素源としたエラスチン培地を用いることで、自社保有菌株、自然界の土壌、工場廃液、畜肉残渣等よりエラスターゼ生産菌の取得に成功した。1次スクリーニングにおいて、寒天培地上でのクリアゾーンの形成能の大きい菌種が必ずしも2次スクリーニングにおいて高い活性を示すというわけではなかった。これは1次スクリーニングが寒天培地なのに対して、2次スクリーニングが液体培地と性状の違いが酵素の生産性に違いを与えているものと考えられる。しかしながら、1次スクリーニングでクリアゾーンを形成した菌株の大半は2次スクリーニングでも酵素活性を示していたことより、本スクリーニング法は十分に機能していたものと考えられる。2次スクリーニング時にエラスターゼ活性を示していた菌種のほとんどは *Bacillus* 属、*Streptomyces* 属の細菌であった。*Bacillus* 属、*Streptomyces* 属ともに菌体外プロテアーゼを作る菌株として知られており、今回のスクリーニング結果の菌種の偏りもそれを支持したものと考えられる (Busche et al., 2018; Contesini et al., 2018)。*Bacillus* 属の作る菌体外プロテアーゼの一種である subtilisin には、その種類により活性の強弱はあるもののエラスターゼ活性を示すことが報告されている (He et al., 2003; Tsai et al., 1988)。一方 *Streptomyces* 属では、*S. griseus* や *S. albidoflavus* の生産するプロテアーゼにエラスターゼ活性があることが報告されているものの (Bressollier et al., 1999; Jurásek et al., 1974; Kitadokoro et al., 1994)、エラスターゼ活性に着目した研究の報告は十分と言えない。今回のスクリーニングでは、*Streptomyces* sp. P-3 株が最も高いエラスターゼ活性を示していた。*Streptomyces* sp. P-3 株は、光学顕微鏡による観察を行ったところ、菌糸形状は直線もしくは曲状であり、単純分枝を形成していた (Fig. 2-4-1)。次章では、*Streptomyces* sp. P-3 株の生産するエラスターゼについて生産条件を検討することとした。

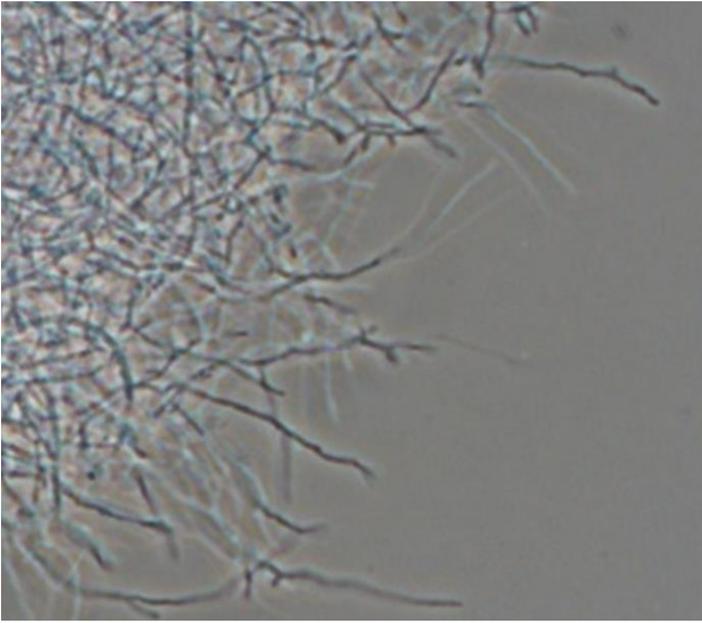


Figure 2-4-1. Optical micrograph of *Streptomyces* sp. P-3.

第三章 *Streptomyces* sp. P-3 株のエラスターゼ生産条件の検討

第一節 緒言

酵素の工業生産において、目的酵素の生産性を最大化させることは必須の検討と言える。pH、温度などの環境要因や窒素源などの培地組成は、発酵生産において酵素の生産性に大きく影響をあたえる因子である。特に培地原料は、生産コストの大部分を占めることより、効率的な生産のためにより安価な原料への代替が求められる。本章では、*Streptomyces* sp. P-3 株のエラスターゼ生産のための窒素源、pH、温度の検討を行った。更に工業用発酵槽での培養を想定してジャーファーメンターを用いた通気攪拌培養を行い、酵素の生産挙動の把握を行った。

第二節 材料及び方法

3-2-1. 実験材料

使用培地

窒素源の検討には、窒素源検討培地 (Table 3-2-1)、前章より若干改変を加えた改変エラスチン液体培地 (Table 3-2-2)を用いた。エラスターゼ生産の経時変化測定においては、前培養、本培養ともに Glucose-Yeast extract-Defatted soybean meal (GYD) 培地 (Table 3-2-3)を用いた。

3-2-2. 培養条件の検討

バツフル付き 300 ml 容三角フラスコに 70 ml の窒素源検討培地、エラスチン液体培地を用いて培養条件の検討を行った。前培養は試験管に各培地 7 ml、72 h の条件で

行い、植菌量は遠心(20,400 × g, 10 min)にて菌体を回収後、等量の 0.85% 滅菌生理食塩水にて洗浄後、0.7 ml を各培地に植菌した。

窒素源の検討は、ゼラチン、脱脂大豆、酵母エキス、コーンステープパウダー、ペプトンを用いて培養を行った。pH の検討と培養温度の検討は、エラスチン液体培地を用いて pH(6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0)、温度(24, 28, 32°C)の各条件で培養を行い、上清中のエラスターゼ活性を測定した。

3-2-3. *Streptomyces* sp. P-3 株のエラスターゼの生産

Streptomyces sp. P-3 株は、50 ml の GYD 培地にて、28°C、200 rpm で 24 時間前培養を行った。次に、前培養液 25 ml を 2.5 L の GYD 培地に植菌し 5 L ジャーフェーマンター (三ツワフロンテック社、大阪)にて本培養を行った。5 L ジャーフェーマンターは 28°C、600 rpm、1.0 vvm の条件で培養を行った。

3-2-4. グルコース濃度の定量

培地中のグルコースの定量は、グルコース CII-テストワコー (富士フイルム和光純薬社、大阪)を用い、取扱説明書に従って行った。

Table 3-2-1. Nitrogen source medium

Nitrogen source	7.0 g
Glucose	0.5 g
K ₂ HPO ₄	7.0 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄	0.1 g
Yeast Extract	0.5 g

1 L (pH 6.8)

Table 3-2-2. Modified elastin medium

Elastin	7.0	g
Glucose	0.5	g
K ₂ HPO ₄	7.0	g
KH ₂ PO ₄	2.5	g
MgSO ₄	0.1	g
Yeast Extract	0.5	g
<hr/>		
1 L (pH 6.8)		

Table 3-2-3. GYD medium

Glucose	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Defatted soybean meal	1.5 g
Yeast Extract	10.0 g
<hr/>	
1 L (pH 6.5)	

第三節 *Streptomyces* sp. P-3 株の培養条件検討

3-3-1. 窒素源の検討

エラスチン以外を窒素源として用いた際のエラスターゼの生産性について検討した。窒素源はゼラチン、脱脂大豆、酵母エキス、コーンステープパウダー、ペプトンの 5 種を用いた。その結果、脱脂大豆、酵母エキスを窒素源として用いた際に、酵素の生産性がそれぞれ 0.91、0.48 U/ml と、エラスチンを窒素源とした際の 3.6、1.9 倍高くなることが明らかになった (Table 3-3-1)。

3-3-2. 培養初発 pH の検討

培養時の初発 pH の検討を行った。培地の初発 pH を pH 6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 に調整し、培養を行ったところ、初発は pH 6.5 の条件で最も高いエラスターゼの生産性が確認された (Table 3-3-1)。

3-3-3. 培養温度の検討

培養温度の検討を行った。培養温度を 24、28、32°C の条件にて培養を行ったところ、培養温度 28°C で最も高いエラスターゼの生産性が確認された (Table 3-3-1)。

3-3-4. *Streptomyces* sp. P-3 株のエラスターゼの生産

Streptomyces sp. P-3 株のエラスターゼの生産に関わる挙動を調べるためにジャーフアーメンターにおける継時変化を測定した (Fig. 3-3-1)。培養は、脱脂大豆、酵母エキスを主要窒素源とした GYD 培地を用い、初発 pH 6.5、28°C で行った。その結果、培養開始 6 時間より対数増殖期がはじまり、それに伴い菌体濁度の上昇、グルコース濃度の低下が起きていた。培養開始 20 時間目では、グルコースが完全に枯渇し、代わ

りにエラスターゼの生産が始まり、培養 44 時間目に最高の酵素活性 4.5 U/ml を示していた。

Table 3-3-1. Effect of nitrogen sources and physical parameters on SEL production

Group	Parameters	Elastase activity (U/ml)
Nitrogen sources	Elastin	0.25
	Gelatin	0.12
	Defatted soybean meal	0.91
	Yeast extract	0.48
	Corn steep powder	0.16
	Peptone	0.06
	Initial pH	pH 6.5
pH 7.0		0.25
pH 7.5		0.22
pH 8.0		0.17
pH 9.0		0.14
Temperature (°C)	24	0.15
	28	0.25
	32	0.14

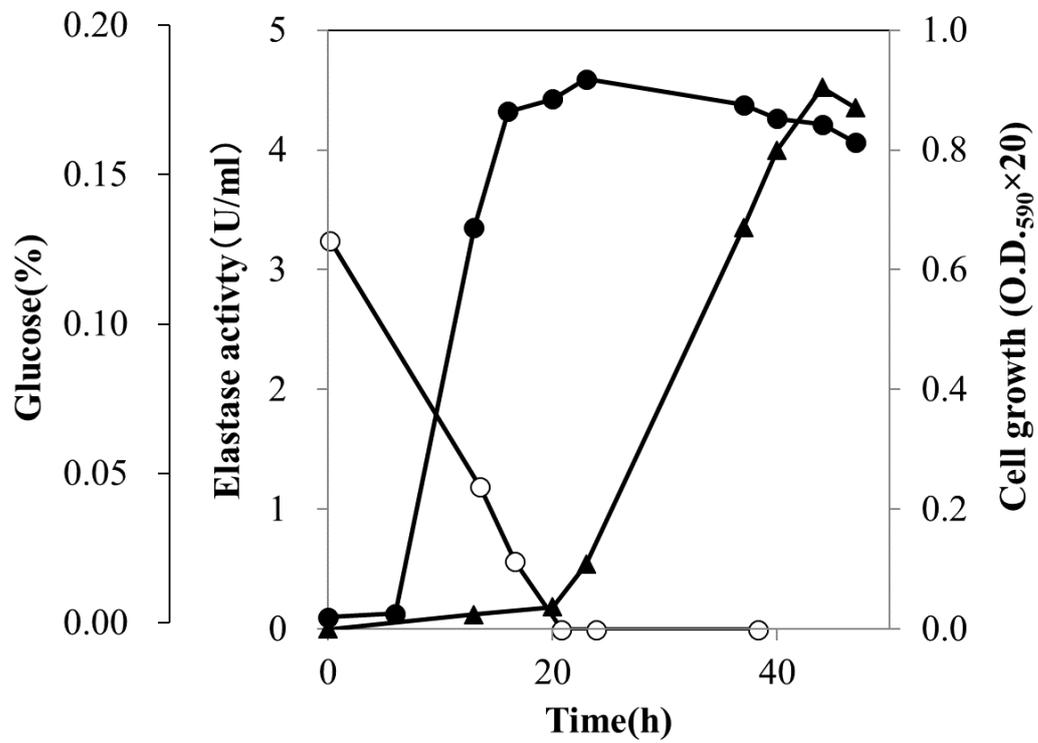


Figure 3-3-1. Growth and elastase production from *Streptomyces* sp. P-3

Closed circles, cell growth; *triangles*, elastase activity; *open circles*, glucose.

第四節 まとめと考察

本章では、*Streptomyces* sp. P-3 株の生産するエラスターゼについて、生産条件の検討を行った。検討された培養条件では、窒素源として脱脂大豆、酵母エキス、培地初期 pH は 6.5、培養温度 28°C の条件でエラスターゼ活性 4.5 U/ml の最大値を示していた。培地中のグルコースが枯渇してから酵素の生産が開始されたことより、本菌の生産するエラスターゼは、カーボンカタボライト抑制を受けているものと考えられた。Mehta らは、*Streptomyces* 属の生産するアルカリプロテアーゼがグルコース濃度 0.5 % で酵素の生産が最大となったが、それ以上の濃度になるとカーボンカタボライト抑制により酵素生産性が低下することを報告している (Mehta et al., 2006)。プロテアーゼは、菌体に炭素源、窒素源としてのアミノ酸やペプチドを供給するための役割を担っており、グルコース存在下の富栄養状態では、プロテアーゼ合成は抑制されることが考えられる。*Geobacillus caldoproteolyticus* のプロテアーゼ生産においては、フルクトースを炭素源として用いることで、カーボンカタボライト抑制を受けず酵素生産性を上げることが報告されている (X. G. Chen et al., 2004)。エラスターゼ生産のための炭素源の検討は、今回は実施しなかったため今後の検討課題である。ただ、実際の生産には安価な炭素源の利用が求められるため、グルコースで十分な生産が認められた点は評価できる。窒素源については、Hosseini らが *S. griseoflavus* ではカゼインによりアルカリプロテアーゼの誘導が起きることが報告されている (Hosseini et al., 2016)。*S. roseiscleroticus* は、カゼイン、酵母エキス、牛肉エキス、ペプトンを窒素源とした際に、高いプロテアーゼの生産が起こることが報告されている (Vonothini et al., 2008)。Mehta らは、酵母エキスとペプトンの組み合わせでプロテアーゼの生産性が向上することを報告している (Mehta et al., 2006)。本菌では、エラスターゼの誘導には必ずしもエラスチンが必要ではなく、酵母エキスと脱脂大豆で高い酵素生産が認められた。一部放線菌でプロテアーゼ誘

導の報告のあったペプトンは、本菌では良い生産性を示さなかった。*Streptomyces* 属の報告を見ても、プロテアーゼ生産に最適な窒素源は菌株ごとに異なっており、それぞれの菌株で最適化する必要がある。*Streptomyces* sp. P-3 株の培養時間は、定常期後期の 44 時間で酵素の生産が最大となった。このことは、*S. bikiniensis*、*S. pseudogrisiolus*、*S. griseoflavus* などの放線菌のプロテアーゼ生産の報告と一致している (Hosseini et al., 2016; Mehta et al., 2006; Thumar & Singh, 2007)。培地の初期 pH は、*S. griseoflavus* のアルカリプロテアーゼの生産検討において、pH 6.5 で生産性は最大となっており、本菌の結果と一致していた (Hosseini et al., 2016)。*S. sodiophilus* では、pH 9.0 でアルカリプロテアーゼの生産性が最大となっていた (Thumar & Singh, 2007) ことより、菌種による影響が大きいものと思われる。次章では、*Streptomyces* sp. P-3 株の生産するエラスターゼについて詳細に解析するために、酵素の同定を行うこととした。

第四章 *Streptomyces* sp. P-3 株由来エラスターゼ (SEL)の精製と遺伝子の単離

第一節 緒言

現在までに、*Streptomyces* 属のエラスターゼ活性を持つプロテアーゼとしては、*S. albidoflavus* の SAKase、*S. griseus* の SprB、SprT、*S. fradiae* の SFase-2 などのプロテアーゼが報告されている(Bressollier et al., 1999; Jurášek et al., 1974; Kitadokoro et al., 1994)。いずれの酵素も S1 セリプロテアーゼに分類される酵素ではあるが、エラスターゼ活性に着目した系統学的な分類は調べられていない。また、*Bacillus* 属の生産する subtilisin や *Pseudomonas* 属、*Clostridium* 属、*Vibrio* 属などの病原性細菌が生産する LasB、哺乳類の CELA1、好中球エラスターゼ、マクロファージメタロプロテアーゼなど様々なエラスターゼ活性を持つプロテアーゼが知られている。本章では、*Streptomyces* sp. P-3 株の生産するエラスターゼについて既知のエラスターゼ、セリンプロテアーゼとの比較を行うことを目的とした。*Streptomyces* sp. P-3 株の培養上清より、エラスターゼの活性本体 *Streptomyces* elastase (SEL)の精製、酵素学的解析を行い、さらに遺伝子のクローニング、分子系統解析を行うこととした。

第二節 材料及び方法

4-2-1. 実験材料

使用培地

Streptomyces sp. P-3 株の培養は、前章と同様に前培養、本培養ともに GYD 培地 (Table 3-2-3) を用いた。*Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3)pLysS の培養は 50 µg/ml のカナマイシンと 20 µg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 培地 (Table 4-

2-1)を用いた。固体培地における寒天の量は 1.5 % (w/v)とした。

4-2-2. 培養液の調製

前章と同様の条件で、5 L ジャーファーマンターを用いて培養を行った。

4-2-3. 酵素活性測定

1) エラスチンコンゴレッド法

エラスチンコンゴレッド法によるエラスターゼ活性測定は、2-2-3 に記載の方法に従った。

2) 合成基質法

合成基質法による活性測定では、ペプチドの C 末端側に発色基質である *p*-ニトロアニリン (*p*-NA)が結合した合成基質を用いた。20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 490 μ l に各濃度の合成基質 60 μ l を加え、25°C で 15 分間プレインキュベーションした。加温後、酵素溶液 50 μ l を加えることにより反応を開始し、25°C で 20 分間反応させた。50 %酢酸溶液 100 μ l を加え、反応を停止させ、上清に放出された *p*-NA 量を A₄₁₀ で測定した。この活性の 1 unit (U)は、25° C で 1 分あたり 1 μ mol の基質を遊離させる酵素の量として定義した。

4-2-4. SEL の精製

培養液を遠心分離 (3,000 \times g, 30 min)により菌体を除去した。得られた上清 2,500 ml を限外濾過モジュール Microza AIP-0013D (旭化成、東京)により 500 ml まで濃縮し、緩衝液 A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5)により 4°C で一晩透析を行った。透析液は緩衝液 A で平衡化した DEAE Sepharose (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA)に供し、非吸着画分を得た。得られた非吸着画分は緩衝液 A で平衡化した CM Sepharose (GE

Healthcare)に供した。溶出は、緩衝液 A と 0.2 M NaCl の直線濃度勾配 (0-20 %)により溶出を行った。各画分のエラスターゼ活性、タンパク質濃度を測定し、活性のあった画分を回収したのち、緩衝液 B (20 mM リン酸緩衝液, pH 6.0, 20 %硫酸アンモニウム)で 4°C一晩透析を行った。透析液は緩衝液 B で平衡化した Phenyl Sepharose (GE Healthcare)に供し、20-0% 硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により溶出を行った。得られた活性画分は精製 SEL として各実験に用いた。

4-2-5. 分子量の測定

変性した精製 SEL の分子量測定は SDS-PAGE により決定した。またネイティブな分子量は、ゲル濾過法による測定を行った。測定カラムは、YMC-Pack Diol-200 (粒子サイズ 2.0 μm 、4.6 \times 300 mm、YMC、京都)を用いて測定した。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出は 0.2 M NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)を用いて流速 0.7 ml/min にて行った。標準タンパク質として、牛血清アルブミン (M.W. 67,000)、 α -アミラーゼ (M.W. 45,000)、トリプシン (M.W. 23,302)、リゾチーム (M.W. 14,314)を用いた。

4-2-6. SDS-PAGE

Laemmli の方法に従った (Laemmli, 1970)。15 %アクリルアミドゲルを用いて 20 mA の定電流で泳動した。染色には Coomassie Brilliant Blue を用いた。

4-2-7. タンパク質濃度の定量

タンパク質濃度の測定は、Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い、取扱説明書に従って行った。検量線の作製には bovine serum albumin (富士フイルム和光純薬社) を用いた。

4-2-7. 精製酵素の polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜) への転写

濾紙を A 溶液 (0.3 M Tris、5%メタノール)に 2 枚、B 溶液 (25 mM Tris、5%メタノール)に 1 枚、C 溶液 (25 mM Tris、40 mM 6-アミノカプロン酸、5%メタノール)に 3 枚それぞれ浸した。精製した SEL (4-2-3 参照)を SDS-PAGE で電気泳動した。泳動したゲルをそれぞれの溶液に浸した濾紙を重ね、転写装置(ホライズプロット AE-6670P/N、ATTO)を用いて電氣的に PVDF 膜(AE-6665、ATTO)に転写し、CBB にて染色した。

4-2-9. N 末端アミノ酸配列の同定

乾燥させた PVDF 膜より目的のバンドを切り出し、アミノ酸配列分析装置 (Applied Biosystems Procise 492 cLC) に供した。

4-2-10. 内部アミノ酸配列の同定

SDS-PAGE で電気泳動後のゲルより、目的のバンドを切り出し、10 mM ジチオスレイトールを使用して還元した後、50 mM ヨードアセトアミドを使用してアルキル化した。アルキル化したゲルは、トリプシンによるゲル内消化を行った。ゲル内消化は MS 用ゲル内消化キット XL-Trp Kit (アンテグラル社、東京)を用いて行った。得られたペプチド溶液は、0.22 μ m フィルター Ultrafree-MC (Merck Millipore)でろ過した後、液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析 (LC/Q-TOF/MS)に供した。

LC/Q-TOF/MS 解析は、液体クロマトグラフィーは ACQUITY UPLC CSH130 1.7 μ m 2.1 \times 150 mm カラム (Waters, MA, USA)を用いて、流速 0.3 ml/min、溶液は 0.1% ギ酸溶液、0.1% ギ酸含有アセトニトリル溶液を用いて溶出させた。溶出条件は、アセトニトリル濃度 2%で 1 分間ホールドした後、60 分間でアセトニトリル終濃度 50%となる濃度勾配により溶出させた。サンプル温度は 10°C、カラムオープン温度は 40°Cに設定した。質量分析計は Q-TOF 型質量分析計 SYNAPT G2 HDMS (Waters)を使用し

た。リファレンスにはロイシンエンケファリン (m/z 556. 2771[M+H]⁺)を用いた。質量分析計の条件は Table 4-2-2 の通りである。また取得したデータの解析は ProteinLynx Global SERVER (PLGS, Waters)を用いた。

4-2-11. 全 DNA の調製

GYP 培地で一夜培養した *Streptomyces* sp. P-3 株の菌体は、ガラスビーズを用いて MonoFas バクテリアゲノム DNA 抽出キットVII (アニモス社、埼玉)にて全 DNA を調製した。

4-2-12. プラスミドの抽出

プラスミドの抽出には QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。

4-2-13. SEL をコードする遺伝子、*selA* のクローニング

1) 縮重プライマーを用いた inverse PCR を介した *selA* 部分塩基配列の同定

全 DNA 30 μ l に *Eco*RI、*Pst*I、*Hind*III 各 6 μ l、緩衝液 14 μ l、計 140 μ l の反応系で 37°C、一晚反応させたのち、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて反応液を精製した。得られた DNA 断片 15 μ l と Ligation high (TOYOBO、京都)7.5 μ l を 16°C、4 時間反応させ、DNA 断片を環化させた。得られた反応物を精製後、鋳型として PCR を行った。PCR は KOD -Plus- Neo (TOYOBO)を使用し、熱変性 94°C、2 分処理後、熱変性 98°C、10 秒、アニーリング温度 60°C、30 秒、伸長 68°C、2 分を 30 サイクル行った。プライマーは内部アミノ酸配列を基に設計した縮重プライマー Inv-F (5' - ACACSAACGTSACCGCSTAC-3')、Inv-R (5' -GTGTAGGCNGTCGTGGTYTG-3') を用いた。得られた PCR 産物を鋳型として更に PCR を行った。プライマーは Inv-F2

(5'-AGTCSATCGCSGGCGTCTGA-3'), Inv-R2 (5'-TGGATGCCGTTSGCSGTCAT-3')を使用した。PCR 条件は上記条件と同様に行った。得られた PCR 産物より約 2000 bp の領域を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて精製を行った。ゲル抽出物を 10 倍希釈したものを鋳型として、プライマー Inv-F2、Inv-R2 を用いて再度 PCR を行った。得られた PCR 産物をもとに、プライマー Inv-F2、Inv-R2 を用いて DNA シーケンスを行った。PCR 産物 10-40 ng、Bigdye terminator v3.1 4 μ l、1 μ M プライマー 1.6 μ l の反応系で行い、PCR 条件は熱変性 96°C、1 分処理後、熱変性 96°C、10 秒、アニーリング温度 50°C、5 秒、伸長 60°C、4 分を 25 サイクル実施した。

2) *selA* 全長配列の解析

得られた配列情報をもとに *selA* の全長の取得を試みた。ゲノム DNA 10 ng を鋳型として、プライマー P-3-F (5'-TGGGACTGGGTACAGCCACCTAG-3')、P-3-R (5'-CTGGGGTGGCGGGCCCGACA-3')を用いて、熱変性 94°C、2 分処理後、熱変性 98°C、10 秒、アニーリング温度 64°C、30 秒、伸長 68°C、35 秒を 27 サイクル実施した。得られた PCR 産物を精製した後、20 倍希釈したものを鋳型として、シーケンス PCR を行った。

3) 塩基配列の決定

DNA シーケンスは ABI PRISM 3130xl ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用した。

4-2-14. *selA* 発現用ベクターの構築

selA の開始コドンの前に *Nde*I、終始コドンの手前に *Xho*I サイトを付加したプライマー His-F (5'-GGTTCCATATGATCATCGGCGGCGGTTA-3')、His-R (5'-AAGCTCGAGTCAGACGCCCGCGATGGAC-3')を作製し、*Streptomyces* sp. P-3 株の全 DNA を鋳型とした PCR 反応を行った。PCR 条件は熱変性 94°C 2 分、熱変性

96°C10 秒、アニーリング温度 64°C30 秒、伸長 68°C30 秒を 20 サイクル実施した。得られた PCR 産物をアガロースゲルに泳動後、目的断片を抽出し、*Nde*I、*Xho*I で 2 時間制限酵素処理を行った。電気泳動、ゲル抽出後に同様の処理をした pET28a (+) と Ligation High (Toyobo) で 16°C2 時間ライゲーション反応を行った。得られたプラスミドを *E. coli* JM109 へ形質転換を行い、カナマイシンを含む LB プレートにて選択を行った。インサートの確認は Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) を用いたダイレクトコロニー-PCR にて行い、目的断片の増幅が確認された株のみを以降の実験に使用した。選択された株よりプラスミドを抽出し、DNA シーケンスにて塩基配列の確認を行った。プラスミドに問題が無い事を確認し、目的のプラスミド pET28selA を得た。

4-2-15. His₆-rSEL の精製

1) 培養

プラスミド pET28selA を *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Agilent Technologies, CA, USA) に導入し、10 ml のカナマイシン、クロラムフェニコール含有 LB 液体培地に 1 白金耳分植菌し、37°C、150 rpm で一晩培養した。この全量を 150 ml のカナマイシン、クロラムフェニコール LB 液体培地に植菌し、160 rpm、37°C、2 時間培養後、終濃度 0.4 mM の IPTG を添加し、同様の培養条件で 4 時間培養した。

2) 精製

培養後の菌体を集菌し、20 mM 緩衝液 A に懸濁し、氷上で 15 秒間 20 サイクル超音波処理により細胞を破碎した (Branson Sonifier, CT, USA)。破碎液を 20,400 × g、30 分間遠心分離し、沈殿物を得た。沈殿物を 1 % TritonX-100 を含む緩衝液 A で洗浄を行い、遠心分離の沈殿物を封入体とした。封入体の可溶化は 8 M 尿素、10 mM DTT を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁を行い、室温に 1-2 時間静置した。リフォールディングは常温にて、段階的に尿素濃度を 1 M ずつ低くした 20 mM

Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)で透析することで活性型 His₆-rSEL を得た。精製は、予め Ni²⁺を吸着させた後 20 mM imidazole を含んだ buffer A で平衡化した HisTrap column (粒子サイズ 34 μm、1×2 cm、GE Healthcare)に無細胞抽出液を供した。500 mM imidazole と 300 mM NaCl を含んだ buffer A で溶出した画分を回収し、得られた画分を buffer A で透析し、以降の解析に用いた。

4-2-16. アライメント解析およびホモロジーモデリング解析

取得した *selA* の推定アミノ酸配列と相同性のある配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI)のデータベース内で BLAST 検索を行った。シグナルペプチドの解析は、SignalP version 5.0 プログラム (Almagro Armenteros et al., 2019) を用いて推測した。得られた配列情報を利用して Clustal Omega によるマルチプルアライメント解析を行った。取得した *selA* のホモロジーモデルの描画および解析には PyMOL 2.1.0 (Schrödinger, New York, NY, USA) を用いた。

4-2-17. 分子系統解析

SEL とその関連タンパク質を含むデータセットは、Uniprot データベースの 38 の配列で構成され、MEROPS データベースによってスブチリシン/トリプシン/メタロプロテアーゼファミリーの配列を選抜し、マルチプルアライメント解析を行った。系統樹の作成には MEGA X (Kumar et al., 2018)を用い、近隣接合法にて行った。ブートストラップ値は、1,000 回の繰り返しから計算された。

Table 4-2-1. LB medium

Peptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
<hr/>	
	1 L (pH 6.8)

Table 4-2-2. Analysis conditions of LC / Q-TOF / MS

Ionization source	ESI+
Measurement mode	Resolution, MS ^E
Capillary voltage	3 kV
Cone voltage	24 V
Collision energy	Low: 6 V, High: 20-45 V
Source temperature	120°C
Desolvent temperature	350°C
Desolvent gas flow rate	800 L/h
Mass range	<i>m/z</i> 50-1990

第三節 *Streptomyces* sp. P-3 株由来 SEL の精製

4-3-1. SEL の精製

Streptomyces sp. P-3 株の培養液を遠心分離し、2.5 L の培養上清を得た。得られた培養上清中の総タンパク量は 2,139.4 mg であり、総活性は 10,298 U であった。培養上清を限外濾過により 500 ml まで濃縮し、DEAE-Sepharose (陰イオン交換カラム)、CM-Sepharose (陽イオン交換カラム)、Phenyl-Sepharose (疎水カラム) に順次供した。その結果、4.6% の収率で 22.9 倍まで精製することができた (Table 4-3-1)。精製した SEL を SDS-PAGE に供した結果、18 kDa 付近に単一バンドが確認された (Fig. 4-3-1)。また、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定を行ったところ分子量 17,000 と計算されたことより、SDS-PAGE の結果と近似していた (Fig. 4-3-2)。これらの結果より SEL はモノマー酵素であることが確認された。精製した SEL のエラスチンコンゴールレッドを基質とした時の比活性は 110.0 U mg⁻¹ であった。

4-3-3. 精製 SEL の性質検討

精製した SEL の反応至適 pH を検討したところ、pH 7.5-11 の中性-アルカリ域で 95% 以上の活性を示した (Fig. 4-3-3)。つづいて、プロテアーゼ阻害剤、界面活性剤、還元剤、有機溶媒、金属イオンのエラスチンコンゴールレッドを基質にした際の阻害活性を測定した (Table 4-3-2)。その結果、プロテアーゼ阻害剤では、1 mM の PMSF によりエラスターゼ活性は著しく阻害されていた。TPCK と EDTA では、わずかな活性の低下が確認された。PMSF は、活性部位のセリン残基のヒドロキシル基をスルホニル化して不可逆的に作用するセリンプロテアーゼ阻害剤である。この結果より、本酵素はセリンプロテアーゼに分類されると推察された。1 mM の金属イオンとの反応性は、最も活性の低下していた試験区 (Mg²⁺ 添加) で、83 % であった。界面活性剤、還元剤、有機

溶媒では、SDS 以外で有意に活性に影響を与える化合物は見られなかった。

4-3-2. キネティックパラメーターの測定

精製 SEL の合成基質に対する基質特異性を検討した。その結果、エラスターゼの特異的な基質として知られている Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-*p*NA、Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*NA (Foster, 1982) で高い活性を示していた (Table 4-3-3)。Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-*p*NA の活性値を 100% とした時に、Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*NA の活性値は 86.3% となっていた。また、P1 位が Val になった合成基質である MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*NA では相対活性は 12.7% まで低下しており、P1 位が Leu、Phe となっているキモトリプシン特異的な基質では更に活性が低く、それぞれ 1.3%、0.2% となっており、SEL は P1 位に非極性で小さい側鎖を有するアミノ酸を含む基質を認識する傾向があった。

また、精製 SEL を用いて、合成基質に対する反応速度論的解析を行った。精製 SEL は基質濃度 0.02-1.0 mM の Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-*p*NA、Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*NA に対して典型的なミカエリスメンテン型の動態を示した。精製 SEL は Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*NA を最も良く加水分解し、 K_m は 0.189 ± 0.009 mM、 k_{cat} は 38.0 ± 2.8 sec⁻¹ で、 k_{cat}/K_m は 202 sec⁻¹ mM⁻¹ であった (Table 4-3-4)。もう一つのエラスターゼ特異的な合成基質である Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-*p*NA に対しても Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*NA と近い値を示しており、 K_m は 0.197 ± 0.015 mM、 k_{cat} は 32.7 ± 4.9 sec⁻¹ で、 k_{cat}/K_m は 165 sec⁻¹ mM⁻¹ であった。また、MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*NA および Suc-Ala-Ala-Ala-*p*NA に対する K_m 値は >3 倍高く、 k_{cat} 値は >48 倍低かった。P1 位が Val、P2 位が Ala になった場合では基質との親和性、触媒反応効率がどちらも低下していたことより、P1 位、P2 位ともに SEL の基質認識に重要であることが示された。

Table 4-3-1. Summary of SEL purification from *Streptomyces* sp. P-3

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	2,139.4	10,298	4.8	100	1
Ultrafiltration	975.5	8,140	8.3	79	1.7
DEAE-Sepharose	671.0	6,625	9.9	64	2.1
CM-Sepharose	57.1	2,406	42.1	23	8.8
Phenyl-Sepharose	4.3	475	110.5	4.6	22.9

Table 4-3-2. Effects of various compounds on SEL activity

Group	Compound	Conc. ^a	Residual activity ^b (%)
Inhibitor	PMSF	1 mM	3.5
	TPCK	1 mM	82.1
	EDTA	1 mM	84.0
Detergent	SDS	0.1%	1.4
	Triton X-100	0.1%	99.3
Reducing agent	DTT	0.1%	126.7
	β-Mercaptoethanol	0.1%	91.6
Solvent	Acetonitrile	1.0%	101.2
	Ethanol	1.0%	93.0
	Isopropanol	1.0%	93.0
	DMSO	1.0%	90.9
Metal ion	Ca ²⁺	1 mM	88.9
	Co ²⁺	1 mM	85.4
	Cu ²⁺	1 mM	93.4
	Fe ²⁺	1 mM	86.8
	Mg ²⁺	1 mM	83.3
	Mn ²⁺	1 mM	88.2
	Ni ²⁺	1 mM	89.2

^a Concentrations in preincubation mixtures.

^b Residual activities are reported as percentages of control reactions with no added compound.

Table 4-3-3. Hydrolysis of various synthetic peptides by purified SEL from *Streptomyces*

sp. P-3

Substrate ^a	Relative activity (%)
Suc-Ala-Ala-Pro-Ala- <i>p</i> NA	100.0
Suc-Ala-Ala-Val-Ala- <i>p</i> NA	86.3
MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val- <i>p</i> NA	12.7
Suc-Ala-Ala-Pro-Leu- <i>p</i> NA	1.3
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> NA	0.2
Suc-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> NA	10.9
Tos-Pro- <i>p</i> NA	0.2
Bz-Arg- <i>p</i> NA	1.6

^a Substrate concentration was 0.2 mM.

Table 4-3-4. Kinetic parameters of SEL isolated from *Streptomyces* sp. P-3

Substrate ^a	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ mM ⁻¹)
Suc-Ala-Ala-Pro-Ala- <i>p</i> NA	0.189±0.009	38.0±2.8	202
Suc-Ala-Ala-Val-Ala- <i>p</i> NA	0.197±0.015	32.7±4.9	165
MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val- <i>p</i> NA	0.56±0.08	0.68±0.07	1.22
Suc-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> NA	0.83±0.15	0.78±0.05	0.95

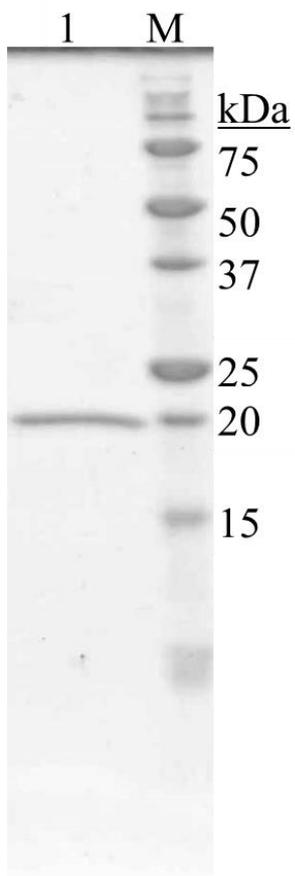


Figure 4-3-1. SDS-PAGE of SEL protein purified from *Streptomyces* sp. P-3

Lane 1, SEL purified from *Streptomyces* sp. P-3; lane M, molecular mass standards (Precision Protein Standard Kit, Bio-Rad).

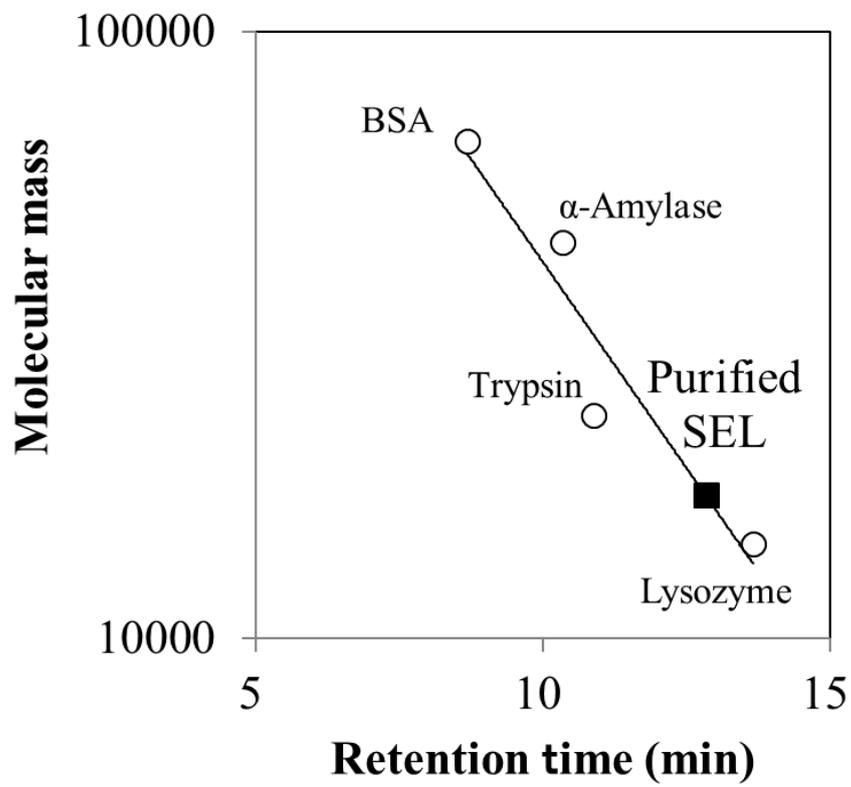


Figure 4-3-2. Estimation of molecular mass of purified SEL by gel filtration chromatography

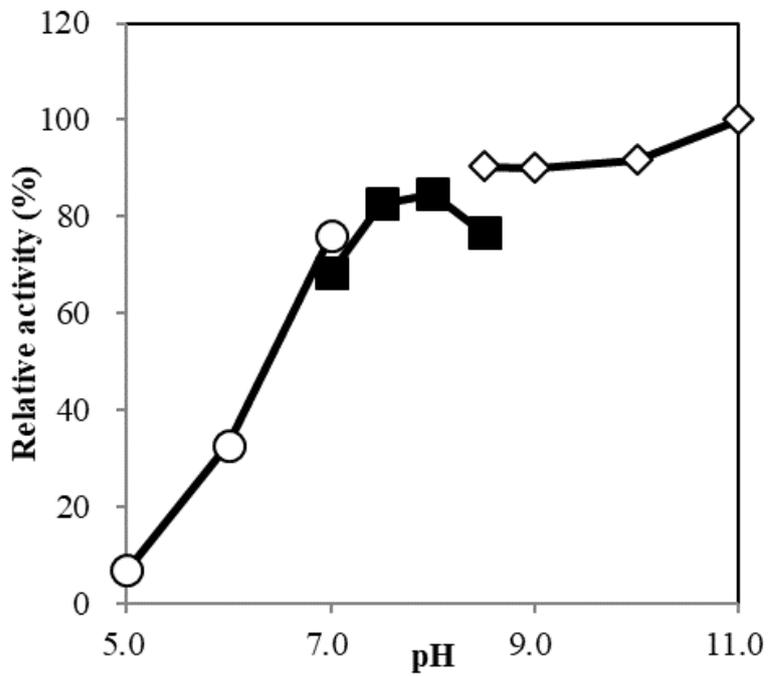


Figure 4-3-3. Effect of pH on SEL activity from *Streptomyces* sp. P-3

The buffer used were 50 mM potassium phosphate (pH 5.0-7.0) (○), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0-8.5) (■), 50 mM and carbonate-bicarbonate (pH 8.5-11.0) (◇).

第四節 *selA* のクローニング

4-4-1. SEL の N 末端アミノ酸配列の同定

精製 SEL を SDS-PAGE にて電気泳動した後、PVDF 膜に電氣的に転写を行った。18 kDa のバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列解析に供した。その結果、IIGGGYAQNAPWAARLFSNG からなる 20 残基の N 末端アミノ酸配列を決定することができた。

4-4-2. SEL の内部アミノ酸配列の同定

SDS-PAGE 上で分離した 18 kDa の SEL のバンドを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後、LC/Q-TOF/MS 解析に供した。その結果、 m/z 2803.3435、1489.7288、および 960.5159 の 3 つのペプチド断片の配列を得た (Fig. 4-4-1 (a)-(c))。それらのペプチドは *S. griseus* 由来推定トリプシン配列 (アクセッション番号 A0A2P5JN62) の C 末端 52 残基 RGNGITAGGDSGGPMTANGIQVGVASTSDRQTTTAYTNVTAYRSWIQSIAGV に由来する 3 つのペプチドの質量と完全に一致していた。

4-4-3. SEL 遺伝子(*selA*)の全長取得

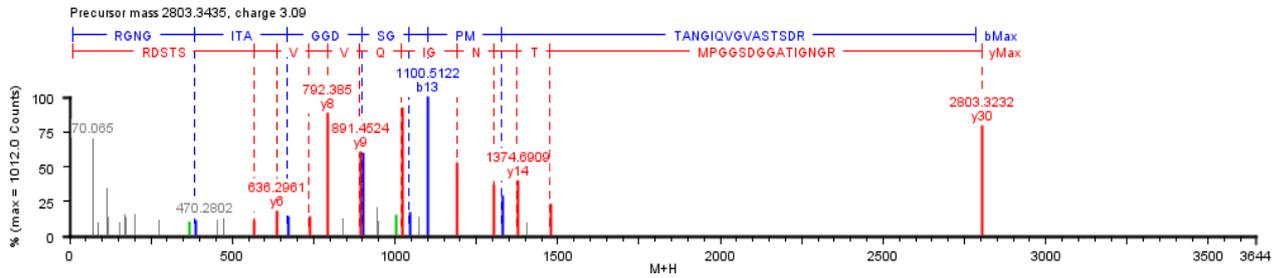
得られたアミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計し、制限酵素処理、ライゲーションにより環状化した P-3 株の全 DNA を鋳型として inverse PCR を行った。増幅断片を DNA シーケンスし、得られた配列情報を基に、ORF の外側の配列より設計したプライマーと全 DNA を鋳型とした PCR を行うことで、*selA* の全長を取得した。*selA* の ORF は ATG の開始コドンから始まり TGA の終止コドンを含む 726 bp の塩基からなり、241 のアミノ酸をコードしていた (Fig. 4-4-2)。この ORF 中には N 末端アミノ酸配列解析により得られた配列、内部アミノ酸配列解析により得られた配列のいずれも含まれていることが確認できた。LC/Q-TOF/MS によるアミノ酸配列解析は、SEL の全配列の 26.1%

の配列カバー率であった。また、SignalP プログラムによるシグナルペプチドの予測を行ったところ、N 末端 27 残基のアミノ酸であると予測された。更に、N 末端アミノ酸配列の解析結果より、成熟型 SEL は 43 番目の Ile から始まることより、シグナルペプチドと成熟体の間の PQQPLTDAPPPTTQ 配列部分はプロ配列に相当すると推察された。成熟型の SEL は 199 のアミノ酸 (I43-V241) からなり、分子量は 20 kDa であった。この結果は、SDS-PAGE、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を支持するものとなっていた。

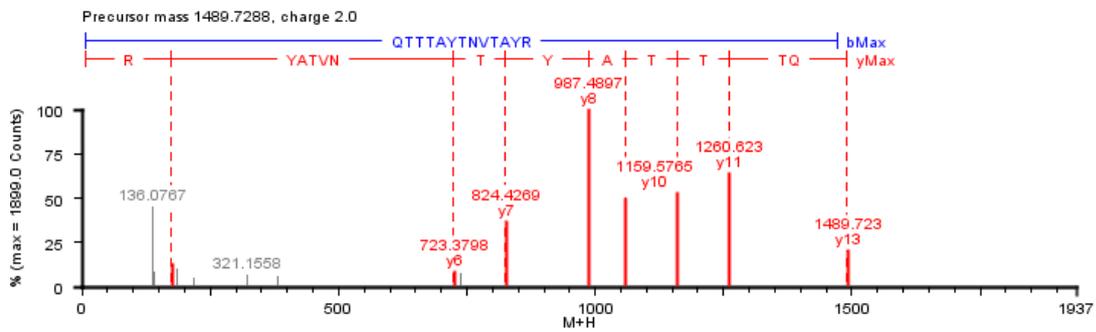
4-4-4. ヒスチジンタグ (His-tag) 融合組換え SEL タンパク質の調製

大腸菌を用いて、シグナルペプチドとプロ配列を除いた成熟型 SEL の N 末端に 6× His タグを付与した酵素として活性型の rSEL を調製した。*selA* ORF を PCR 増幅して得た断片を用いて、発現プラスミド pET28*selA* を構築した。封入体から得られた組換えタンパク質を、8 M 尿素を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解させ、HisTrap カラムにより精製した。His タグの付加により、native な SEL よりも高分子量の大きい 23kDa の位置に、rSEL が SDS-PAGE 上で確認することができた (Fig. 4-4-3)。rSEL の比活性は 14.5 U/mg であり、native な SEL と比較して 13.1% に低下していた。この低下はリフォールディングの影響によるものと考えられる。

(a)



(b)



(c)

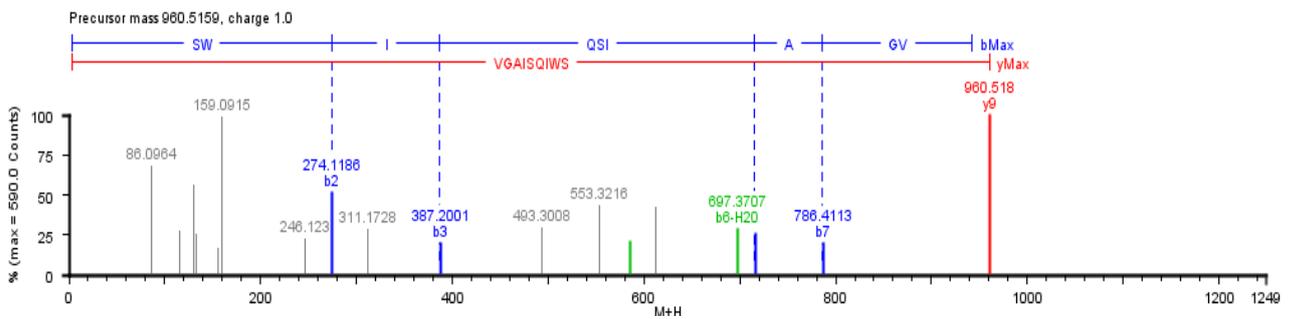


Figure 4-4-1. MS/MS spectra of tryptic peptides from SEL measured by LC/Q-TOF-MS.

MS/MS spectra of mass ion peaks with $m/z = 2803.3435$ (a), $m/z = 1489.7288$ (b), and

$m/z = 960.5159$ (c)

gcctaacgcgacgttatggggaagcgttagtaccggcggggtcggttcttcgacaacct
aggggcccgtcaacccccacaaacacgccctcagcgtgatccccgaaatgaggaacc**atg**
M
cgaatagcaaggctagttcccgctgccctcgccgcccggccaccgctcctcgctcttctc
R I A R L V P A A L A A A A T V L A L L
acccccaccgccaccgcccgcagccgctcacggacgccccgcccaccaca
T P T A T A A **Δ** P Q P P L T D A P P P T T
cagatcatcggcggcggttacgcgcagaacgcgcggtgggcccgcgcggtcttctccaac
Q **▲** I I G G G Y A Q N A P W A A R L F S N
ggcagagagacctgttcggcgacgatcatcgccgacctggatcctcaccgcccggcac
G R E T C S A T I I A P T W I L T A R H
tgcgtcaccggcggcgggctgtcgttcgcgatcggcagcctcgaccagcacagcggcggc
C V T G G G L S F R I G S L D Q H S G G
gtggtggccaacggcgtccagacgtacaaccacagcgcggacatctcgctggtccgcctg
V V A N G V Q T Y N H S A D I S L V R L
gaccgctccgtgcagaccactactcccgcctcgggcagcccggcacggtgagggcggc
D R S V Q T T Y S R L G Q P G T V R V G
cagaacgtccaggtctggggtcgggcccacctcgagtgccggtcggaggccaactgc
Q N V Q V W G W G A T S Q C G S E A N C
cagtcgctacctgaaggtcgcgaacgtgacggtgacggcggctgaggtagcgcgtac
Q S R Y L K V A N V T V T G G C G D A Y
ggcggctcggcgatctgcgcccgcggcaacggcatcacggcccggcggcactccggc
G G S A I C A R R G N G I T A G G D S G
ggccgatgacggccaacggcatccaggtcggcgtggcctccaccagcgaccgagacc
G P M T A N G I Q V G V A S T S D R Q T
acgacggcgtacacgaacgtcaccgctaccgctcctggatccagtcctatcgggcgctc
T T A Y T N V T A Y R S W I Q S I A G V
tgaccgaccgt
*

Figure 4-4-2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of SEL from *Streptomyces* sp. P-3

The start codon ATG and the stop codon TGA are in *bold*. The *underlined* amino acid sequence is identical to that determined for the purified enzyme by Edman degradation, and the *double underlined* amino acid sequence is identical to that determined by LC/Q-TOF-MS. The white triangle indicates the cleavage site for signal peptide, and the black triangle indicates the cleavage site for the pro peptide.

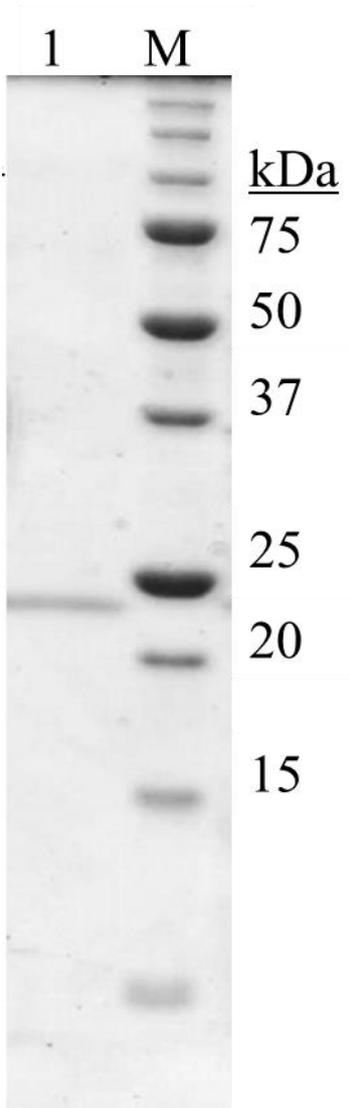


Figure 4-4-3. SDS-PAGE of purification of rSEL

Lane 1, rSEL purified from *E. coli*; lane M, molecular mass standards (Precision Protein Standard Kit, Bio-Rad).

第五節 SEL の推定分子構造と分子系統学的解析

4-5-1. SEL と他種プロテアーゼとの比較

成熟型 SEL のアミノ酸配列を BLAST 検索したところ、S1 セリンプロテアーゼファミリーに属し、*Streptomyces* 属の推定トリプシン様セリンプロテアーゼと高い相同性を示していた。具体的には、*S. nanshensis* (NCBI WP_070205397)と 100.0 %、*S. bacillaris* (NCBI WP_112490531)と 99.0 %、*S. anulatus* (WP_03057890)と 98.5 %の相同性であった。*Streptomyces* 属のトリプシンとして報告されている *S. griseus* の SprT (Uniprot P00775) (Hung & Hedstrom, 1998; Kim et al., 1991; Olafson & Smillie, 1975)と成熟型 SEL のアミノ酸配列は 31.0 %の相同性しか示さなかった。エラスターゼ活性の報告されているプロテアーゼの中で最も相同性の高かった酵素は、豚 (*Sus scrofa*)由来の CELA1 (Uniprot P00772)であり、相同性は 31.5 %であった。また、S1 セリンプロテアーゼファミリーの代表的なプロテアーゼであるヒト由来のキモトリプシノーゲン (Uniprot P0077)は、成熟型 SEL と 26.5%の相同性を示したのみであった。これらのアミノ酸配列と成熟型 SEL とでアライメント解析を行った (Fig. 4-5-1)。その結果、セリンプロテアーゼの触媒三残基 (His39, Asp73, Ser158) (Olafson & Smillie, 1975)は全てのプロテアーゼで保存されていた。また、キモトリプシノーゲンのオキシアニオンホール形成に重要な役割を果たすことが知られている Gly156 と Asp157 残基(Blow et al., 1969)も SEL で保存されていた。エラスターゼの基質特異性は、S1 ポケットの Val および Thr 残基によって決定される。SEL のアライメント解析の結果、Thr183 は保存されていたが、Val 残基に該当する残基は見られなかった。CELA1 を鋳型にしたホモロジーモデリング解析の結果、Val 残基の位置に Ser175 残基が配置されていた (Fig. 4-5-2)。このことより、SEL では Ser175 残基、Thr183 残基が基質認識の役割を果たしているものと考えられた。

4-5-2. SEL の分子系統学的解析

SEL と同源性の有った *Streptomyces* 属の SEL 様配列と Uniprot データベース中の既知各種トリプシン、キモトリプシン、subtilisin、他種のエラスターゼのアミノ酸配列を用いて系統学的解析を行った。その結果、SEL と SEL 様配列は機能既知の酵素とは異なるクラスターを形成しており、一次配列の機能予測から推定されていた放線菌トリプシン (S/T, Fig. 4-5-3)とも早期に分岐していた。エラスターゼ活性を有する動物由来のエラスターゼ (A/E)、真菌類由来エラスターゼ (F/E)、*Bacillus* sp. YaB の生産するエラスターゼ subtilisin YaB (B/S)、*Pseudomonas* 属の生産するエラスターゼ LasB (B/M)ともいずれも系統的に離れて分類されていることから、SEL クラスターは放線菌に保存されたエラスターゼ機能を持つ酵素群であることが推察された。

```

SEL          ----- I I G G G Y A Q N A P W A A R - - L F S N - - - G R E T C S A T I I A P T W I L T A R H 39
CELA1       ----- V V G G T E A Q R N S W P S Q I S L Q Y R S G S S W A H T C G G T L I R Q N W V M T A A H
SprT        ----- V V G G T R A A Q G E F P F M V R L S - - - - - M G C G G A L Y A Q D I V L T A A H
Chymotrypsinogen CG V P A I H P V L S G L S R I V N G E D A V P G S W P W Q V S L Q D K T G - - - F H F C G G S L I S E D W V V T A A H
                : : . * * : * * . . . : : : * * * *

SEL          C V T G G G L S F R I - - - - G S L D Q H S - - G G V V A N G V Q - - - - - T Y N H S A D I S L V R L D R S 82
CELA1       C V D R E L T F R V V V - - - G E H N L N Q N D G T E Q Y V G V Q K I V V H P Y W N T D D V A A G Y D I A L L R L A Q S
SprT        C V S G S G N N T S I T A T G G V V D L Q S - - S S A V K V R S T K V L Q A P G Y N G - - - - T G K D W A L I K L A Q P
Chymotrypsinogen CG V R T S D V - V V A - - - G E F D Q G S D E E N I Q V L K I A K V F K N P K F S I - - L T V N N D I T L L K L A T P
                * : * : . . . * : * : * : *

SEL          V Q T T - Y S R L G - - - Q P - G T V R V G Q N V Q V W G W G A T S Q C G S E A N C Q S R Y L K V A N V T V T - - G G C 135
CELA1       V T L N S Y Q L G V L P R A G T I L A N N S P C Y I T G W G L T R T N G Q - - - L A Q T L Q Q A Y L P T V D Y A I C
SprT        I N Q P T L - - - - - K I A T T T A Y N Q G T F T V A G W G A N R E G G S - - - - Q Q R Y L L K A N V P F V S D A A C
Chymotrypsinogen AR F S Q T V S A V C L P S A D D D F P A G T L C A T T G W G K T K Y N A N K - - - T P D K L Q Q A A L P L L S N A E C
                * * * . . . * * : . *

SEL          G - - - - - D A Y G G S A I C A R R - - - G N G I T A G G D S G G P M T A N G - - - - I Q V G V A S T S - - - - - 175
CELA1       S S S S Y W G S T V K N S M V C A G G D - - G V R S G C Q G D S G G P L H C L V N - G Q Y A V H G V T S F V S R L G C N
SprT        R S - A Y G N E L V A N E E I C A G Y P D T G G V D T C Q G D S G G P M F R K D N A D E W I Q V G I V S W G Y - - G C A
Chymotrypsinogen K - - K S W G R R I T D V M I C A G A S - - G V - S S C M G D S G G P L V C Q K D - G A W T L V G I V S W G S D T - - C
                . : * * * . * * * * * : * : . *

SEL          D R Q T T T A Y T N V T A Y R S W I Q S I A G V - 199
CELA1       V T R K P T V F T R V S A Y I S W I N N V I A S N
SprT        R P G Y P G V Y T E V S T F A S A I A S A A R T L
Chymotrypsinogen S T S S P G V Y A R V T K L I P W V Q K I L A A N
                . : : . * : : .

```

Figure 4-5-1. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of mature SEL from *Streptomyces* sp. P-3 and its related proteins

SEL, SEL from *Streptomyces* sp. P-3; CELA1, chymotrypsin-like elastase family member 1 from *Sus scrofa* (Uniprot P00772); SprT, *Streptomyces* trypsin from *Streptomyces griseus* (Uniprot P00775); Chymotrypsinogen, chymotrypsinogen from *Homo sapiens* (Uniprot P00777). Asterisks indicate identical amino acids. Dots and colons indicate conserved amino acids with substitutions. Dashes indicate gaps. Amino acids of the catalytic triad are highlighted. Amino acids forming an oxyanion hole are displayed with a dark gray background. Amino acid residues involved in elastase specificity are boxed.

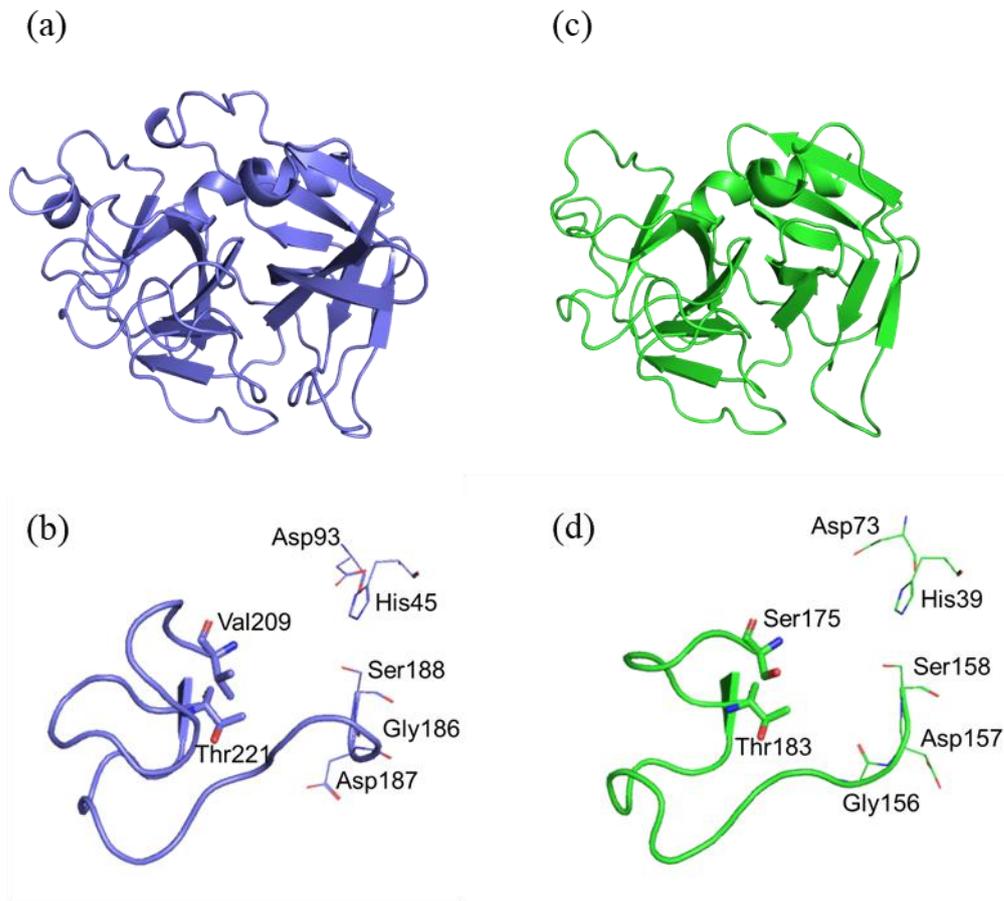


Figure 4-5-2. Homology model for *Streptomyces* Sp. P-3 SEL

Tertiary structure prediction was accomplished by using the Swiss-model protein modeling server (Waterhouse et al., 2018) and the CELA1 (PDBID:1hay) as template. (a)The overall structure of CELA1. (b)The S1 subsite structure of CELA1. Side chain of residues important for determining elastase specificity (Thr209 and Val221) are shown as sticks. Side chains of conserved residues of catalytic triad (His45, Asp93 and Ser188) and forming oxyanion hole (Asp187 and Gly186) are shown as lines. (c) The overall predicted structure of SEL. (d) The predicted S1 subsite structure of SEL. Side chains of residues at the same position as those important for determining substrate specificity (Thr183 and Ser175) are shown as sticks. Side chains of conserved residues of catalytic triad (His39, Asp73 and Ser158) and forming oxyanion hole (Asp157 and Gly156) are shown as lines.

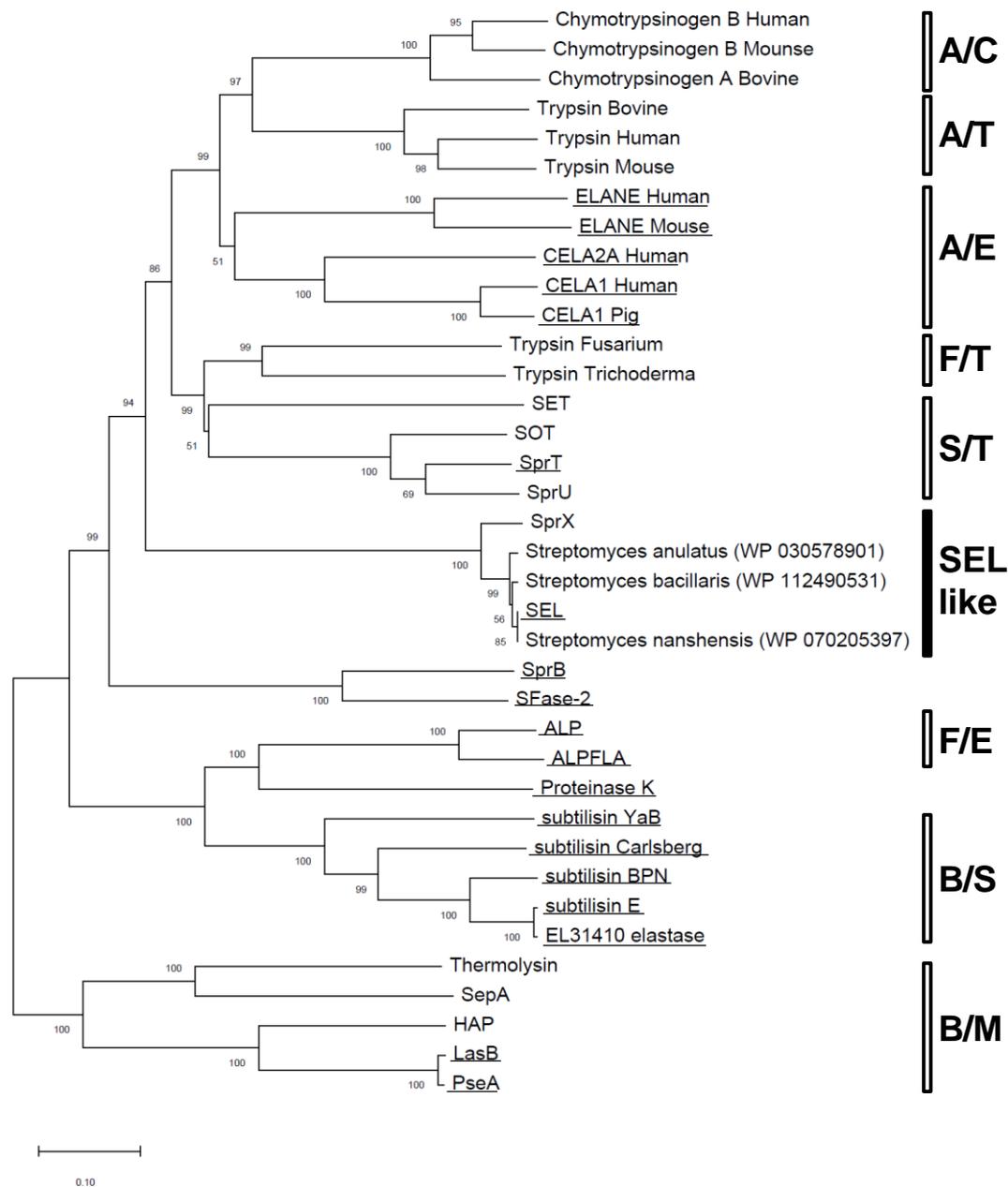


Figure 4-5-3. Phylogenetic analysis of SEL-related proteins

A/C, animal chymotrypsin; A/T, animal trypsin; A/E, animal elastase; F/T, fungal trypsin; S/T, *Streptomyces* trypsin; F/E, fungal elastase; B/S, bacterial subtilisin; B/M, bacterial metalloprotease. Numbers at nodes represent bootstrap values of 1,000 replicates.

Proteins with elastase activity are underlined. Abbreviations and accession numbers:

Human Chymotrypsinogen B (Uniprot P17538), Mouse Chymotrypsinogen B (Uniprot Q9CR35), Bovine Chymotrypsinogen A (Uniprot P00766), Bovine Trypsin (Uniprot P00760), Human Trypsin (Uniprot P07477), Mouse Trypsin (NCBI AAI38699), Human ELANE (neutrophil elastase, Uniprot P08246), Mouse ELANE (Uniprot Q3UP87), Human CELA2A (chymotrypsin-like elastase family member 2A, Uniprot P08217), Human CELA1 (Uniprot Q9UNI1), Pig CELA1 (Uniprot P00772), Fusarium Trypsin (Uniprot P35049), Trichoderma Trypsin (Uniprot Q8WZM5), SET (Trypsin from *Saccharopolyspora erythraea*, Uniprot P24664), SOT (Trypsin from *S. omiyaensis*, Uniprot C9K160), SprT (Trypsin from *S. griseus*, Uniprot P00775), SprU (Trypsin from *S. griseus*, Uniprot Q6I695), sprX (Putative trypsin-like protease from *S. griseus*, Uniprot B1W410), SprB (Streptogrisin-B from *S. griseus*, Uniprot P00777), SFase-2 (Uniprot P41140), ALP (Alkaline protease 1 from *Aspergillus flavus*, Uniprot B8N106), ALPFA (Alkaline protease 1 from *Aspergillus fumigatus*, Uniprot P28296), Proteinase K (Uniprot P06873), subtilisin YaB (Uniprot P20724), subtilisin Carlsberg (Uniprot P00780), subtilisin BPN' (Uniprot P00782), subtilisin E (Uniprot P04189), EL31410 elastase (Uniprot H9CH13), Thermolysin (Uniprot P00800), SepA (elastase from *Staphylococcus epidermidis*, Uniprot P0C0Q4), HAP (Hemagglutinin from *Vibrio cholerae*, P24153), LasB (elastase from *Pseudomonas aeruginosa*, Uniprot P14756), PseA (elastase from *P. aeruginosa*, Uniprot Q3Y6H8).

第六節 まとめと考察

本章では、*Streptomyces* sp. P-3 株の生産するエラスターゼ SEL を精製し、酵素学的な解析を行い、さらに SEL 遺伝子を同定することが出来た。また、分子系統解析により、SEL とその相同性のあった *Streptomyces* 属の SEL 様配列は、既知の他のエラスターゼとは異なる新たなクラスターを形成することが明らかとなった。以前の研究で、*Pseudomonas aeruginosa* によって生産される LasB や *Bacillus* sp. YaB によって生産される subtilisin YaB が微生物由来のエラスターゼとして報告されていた。しかしながら、それらのエラスターゼは、それぞれ M4、S8 ファミリーに分類されるプロテアーゼであった(Kaneko et al., 1989; Okamoto et al., 1997; Tsai et al., 1986, 1988)。*S. albidoflavus* の SAKase、*S. griseus* の SprB、SprT、*S. fradiae* の SFase-2 などは、*Streptomyces* 属によって生産されるプロテアーゼの中でエラスターゼ活性を有していることが報告されている。これらの酵素は、P1 位に Phe や Arg、Lys などの比較的分子サイズの大きなアミノ酸側鎖を持つ合成基質を分解するが(Bressollier et al., 1999; Jurásek et al., 1974; Kitadokoro et al., 1994)、本章の実験より *Streptomyces* sp. P-3 株の生産する SEL は、Ala などの非極性型で分子サイズの小さなアミノ酸側鎖を持つ合成基質を好む傾向があった。動物由来のエラスターゼでは、S1 基質結合ポケット様構造の入口は Val 残基のイソプロピル側鎖によって部分的に閉塞されており、ポケットの底部も Thr の側鎖により部分的に閉塞されている。これらの残基は基質の P1 位の特異性に関与しており、動物由来のエラスターゼは Ala または Val の C 末端側を優先的に切断することが既に知られている(Blow et al., 1969)。*Streptomyces* sp. P-3 株由来の SEL と SEL オルソログでは、P1 位の基質認識に重要な Thr 残基は 183 位に保存されていたが、Val 残基に相当するアミノ酸(175 位)は Ser 残基へと置換されている。既知の *Streptomyces* 属のトリプシンである SprT などでは、それら残基は Gly となっている。SprT などの S1 基

質結合ポケットは比較的大きな側鎖を受け入れることのできる構造となっており、P1 位が Phe、Arg、Lys などの基質を認識することと一致している。SEL の 175 位の Ser 残基は側鎖のヒドロキシメチル側鎖が、他のエラスターゼの Val 残基のイソプロピル側鎖と同様の機能を果たしているものと推察された。分子系統解析の結果から、subtilisin サブファミリーや LasB などの *Pseudomonas* 属由来のエラスターゼ、動物、真菌由来のエラスターゼとも、SEL と *Streptomyces* 属の SEL 様配列を含むクラスターは系統的に独立していたことから、SEL 酵素群はエラスターゼ活性を持つ新規酵素群であることが示唆された。これらの結果は、*Streptomyces* 属に分布する新規エラスターゼの最初の報告であり、S1 セリンプロテアーゼファミリーの機能に関する新たな知見となる。土壌細菌として知られている *Streptomyces* 属にこのようなエラスターゼが分布していることは、*Streptomyces* 属が環境中の窒素循環の分解者として重要な役割を果たしている可能性があることを示している。

subtilisin は様々な *Bacillus* 属によって生産されるセリンプロテアーゼであり、食品、洗濯用洗剤、皮製品加工など幅広く産業的に利用されている酵素である(Li et al., 2013)。subtilisin サブファミリーでは、subtilisin Carlsberg (Fuchita et al., 2012; Tsai et al., 1983, 1986), subtilisin BPN' (Tsai et al., 1983, 1986), subtilisin E (Takagi et al., 1996; Takagi, Arafuka, et al., 1992), and subtilisin YaB (Tsai et al. 1988; Y. C. Tsai et al. 1983; Tsai et al. 1986)など、広くエラスターゼ活性を有していることが報告されている。これらの報告は subtilisin サブファミリー内に普遍的にエラスターゼ活性が保存されていることを示している。特に、Tsai らは、subtilisin YaB が高いエラスターゼ活性を示し、合成基質として Suc-Ala-Ala-Val-Ala-pNA および Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA に対する反応性が高いことを報告している。Suc-Ala-Ala-Val-Ala-pNA および Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA を基質とした際の k_{cat} / K_m を比較したところ、SEL は subtilisin YaB よりもそれぞれ 12 倍、121 倍高くなっていた (Table 4-5-1)。また、ヒト白血球由来のエラスターゼ

(Stein et al., 1987)や、subtilisin E (Takagi et al., 1996)と比較しても SEL の Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*NA および Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-*p*NA へ対する反応性は高いことより、既知酵素よりも高いエステラーゼ活性を持つ酵素であることが示された。これらの結果は、SEL が産業的に利用しうる可能性を示唆するものであり、次章では、SEL の応用検討として、肉の軟化作用について検討することとした。

Table 4-5-1

Substrate	Organisms	Enzyme	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (sec^{-1} mM^{-1})
Ala-Ala-Pro-Ala	<i>Streptomyces</i> sp. P-3	SEL	38.0	0.189	202
	<i>Bacillus</i> sp. YaB ^a	YaB	2.04	1.43	1.67
	Human ^b	Leukocyte Elastase	22	0.833	26.4
Ala-Ala-Val-Ala	<i>Streptomyces</i> sp. P-3	SEL	32.7	0.197	165
	<i>Bacillus</i> sp. YaB ^a	YaB	3.04	0.214	14.2
	<i>Bacillus subtilis</i> ^c	Subtilisin E	2.89	0.830	3.44

^a Mei *et al.* Protein Eng. 1998 ;11(2):109-17

^b Ross *et al.* Biochemistry. 1987 10;26(5):1301-5.

^c Takagi *et al.* FEBS Lett. 1996 ;395(2-3):127-32.

第六章 総括

エラスチンは、脊椎動物の構造安定に寄与する弾性繊維を構成する主要タンパク質であり、その組成は非極性アミノ酸からなる疎水領域、リジン、アラニンなどからなる架橋領域の繰り返しからなる。さらに分子間の架橋化により繊維化することで、物理化学的な変化だけでなく、一般的なプロテアーゼからの分解に対しても耐性を獲得している。エラスチンを含む結合組織部は食肉産業において食肉の硬さの原因となっているが、調理加工の工程においてエラスチンを軟化させる方法は問題部位の除去以外に無いのが現状である。エラスチンは、前述のとおり強固な構造ではあるが、エラスターゼは繊維状エラスチンを分解できる数少ない酵素の一つである。微生物由来のエラスターゼは一部の *Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属などの細菌の他に、一部の *Aspergillus* 属などの真菌類由来のプロテアーゼに活性があることが報告されている。しかしながら実際の食肉加工に応用可能な酵素としての知見は十分でない。食肉加工へ応用が困難な理由としては、酵素の基質特異性が挙げられる。現状の市販酵素では、食肉中の結合組織部だけでなく、赤身部の筋原線維タンパク質の分解も同時に起きてしまい、結果として嗜好性の低下を引き起こしてしまう。そこで本研究では、食肉軟化剤へ応用可能なエラスターゼの開発を目指し、新たにエラスターゼ生産菌の探索から始めた。

第二章では、エラスチンを炭素源、窒素源としたエラスチン培地を用いることで、エラスターゼ生産菌の取得に成功した。スクリーニング時にエラスターゼ活性を示していた菌種のほとんどは *Bacillus* 属、*Streptomyces* 属の細菌であった。*Bacillus* 属、*Streptomyces* 属ともに菌体外プロテアーゼを生産する菌株として知られており、今回のスクリーニング結果の菌種の偏りもそれを支持したものと考えられる。*Streptomyces* 属のエラスターゼに関する知見は少なく、エラスターゼ活性を持つことが知られている

Bacillus 属と同程度の確率で *Streptomyces* 属の菌株が取得されたのは大変興味深い。

第三章では、前述のスクリーニング系で最も活性の高かった *Streptomyces* sp. P-3 株の生産するエラスターゼについて、生産条件の検討を行った。検討の結果、窒素源として脱脂大豆、酵母エキス、培地初期 pH 6.5、培養温度 28°C で培養した際に定常期後期の培養開始 44 時間目で最大のエラスターゼ生産性を示していた。既報の *Streptomyces* 属のプロテアーゼの生産条件と比較したが、酵素の誘導も含めて菌種の違い大きく影響していた。

第四章では、SEL を精製し、酵素学的な解析を行うとともに、SEL 遺伝子の同定に成功した。また、基質特異性の解析より、SEL はエラスターゼ特異的な合成基質を用いた際に既存の酵素よりも高い反応触媒効率を示しており、また、得られた推定アミノ酸配列はどの機能既知の酵素とも低い相同性であった。アミノ酸配列の 1 次配列比較、ホモロジーモデリング解析により、SEL はユニークな構造で基質認識している可能性が示唆された。更に分子系統解析により、SEL と相同性のあった *Streptomyces* 属の SEL 様配列は既知の他のエラスターゼとは異なる新たなクラスターを形成しており、*Streptomyces* 属に分布する新規エラスターゼであることが示唆される結果となった。

第五章では、SEL の食肉加工への応用が可能か検討を行った。まず、食肉産業で課題となっている結合組織部にはエラスチンが多く含まれていることを確認した。続いて、食肉軟化剤に使用される酵素であるパパイン、subtilisin Carlsberg と SEL とで基質特異性について確認したところ、SEL は他の酵素よりも有意にエラスチンに対する特異性が高いことを明らかにした。続いて、食肉を構成する筋原線維タンパク質ならびにエラスチンの分解について詳細に検討した結果、SEL は使用した酵素の中で、筋原線維タンパク質の分解性は最も低く、エラスチンの分解性は最も高い結果であり、基質特異性のデータを支持するものとなっていた。更に、反応後のエラスチン残渣を SEM により観察を行ったところ、繊維構造の崩壊が確認された。最後に実際の牛肉を

用いて、調理効果を確認したところ、SEL 処理区で最も破断強度が低下していた。

本研究は、エラスチンを分解できる微生物を探索し、その中で最も強いエラスターゼ分解活性を持っていた *Streptomyces* sp. P-3 株より新規エラスターゼ SEL の生産条件、活性本体、応用性を明らかにしたものである。SEL とその相同性のあるアミノ酸配列が *Streptomyces* 属に保存されており、既存のエラスターゼとは別に、S1 セリンプロテアーゼファミリー内で新たにクラスターを形成していた点、また、その SEL が高いエラスチン特異性ならびに触媒効率を有していた点は、本研究により得られた新たな知見であり、セリンプロテアーゼの分子進化、基質認識メカニズムの基礎的知見に対しても貢献することができるものと考えられ、学術的に大変意義深いものであると考える。また、本研究により見出された SEL は実際の食肉を用いても課題となっている部位に対して高い軟化効果を示していたことより、新たに見出した SEL 酵素群が食肉加工への応用が可能であることを示している。この結果は、食品科学における新規酵素の利用法として大変意義深いものである。

今回新たにエラスターゼ生産菌として *Streptomyces* sp. P-3 株を見出した。エラスターゼ生産菌としては、*Pseudomonas* 属、*Clostridium* 属、*Vibrio* 属などの病原性を示す菌種が知られており、エラスターゼは侵襲性と感染の確立を補助しているとされている。一方で、エラスターゼ生産菌は、陸上の土壌ならびに海底堆積物からも分離の報告がある (X. L. Chen et al., 2009; Giudice et al., 2012)。今回エラスターゼ活性を示していた *Bacillus* 属、*Streptomyces* 属も土壌中の多くを占める細菌である。更に、実際に海底堆積物よりエラスターゼ生産菌をスクリーニングしたところ、低温でも高いエラスターゼ活性を持つ複数の菌株を単離することができた (寺内 et al., 2019)。これらのことより、エラスターゼ生産能を持つ微生物は環境中に広く分布していることがわかる。エラスチンは前述の通りプロテアーゼに耐性のある構造タンパク質であり、動物の死骸に含まれるエラスチンの分解にエラスターゼ生産菌が関与していると考えerことは合理的

である。本研究において、新たなエラスターゼ酵素群が *Streptomyces* 属より見つかったことは、エラスターゼ生産菌が分解者として窒素循環に関与することを裏付ける結果と言える。

最後に今後の展望について述べる。プロテアーゼは市販酵素の売上の中で占める割合は 60%と言われており、セリンプロテアーゼはその内、約 9 割を占める (Mukhtar, 2016)。今回取得したエラスターゼ SEL が示す高い反応触媒効率、基質特異性、幅広い pH での反応性、キレート剤耐性、溶媒耐性はその応用の幅を広げるものである。本研究では、SEL が食肉軟化への応用が可能であることを一例として示した。近年、エラスチンの加水分解物であるエラスチンペプチドには、皮膚の弾力性の増加、血流の改善、靭帯細胞の活性化など、さまざまな健康および美容機能を持っていることが報告されている (Sato et al., 2011; Shiratsuchi et al., 2010)。また医薬品分野においては、エラスターゼ投与が体内のリパーゼ亢進効果を引き起こすことが報告されており、脂質代謝に影響するとされている。更に血中のエラスターゼ濃度も上昇することより、動脈硬化性プラークの脆弱化に有用であり、高脂血症により惹起されるアテローム性動脈硬化を抑制するという報告もされている (Johnson et al., 2011; Usami et al., 1983)。このようにエラスターゼを含むセリンプロテアーゼの産業用酵素の需要は高く、今後、SEL の更なる応用研究が進み、多くの産業で活用されることが期待される。

引用文献

- Abdel-Naeem, H. H. S., & Mohamed, H. M. H. (2016). Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat Science*, *118*, 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.021>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, *37*(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Aminlari, M., Shekarforoush, S. S., Gheisari, H. R., & Golestan, L. (2009). Effect of Actinidin on the Protein Solubility, Water Holding Capacity, Texture, Electrophoretic Pattern of Beef, and on the Quality Attributes of a Sausage Product. *Journal of Food Science*, *74*(3), C221–C226.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01087.x>
- Baló, J., & Banga, I. (1949). Elastase and elastase-inhibitor. *Nature*, *164*(4168), 491.
<https://doi.org/10.1038/164491a0>
- Blow, D. M., Birltoft, J. J., & Hartley, B. S. (1969). Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin. *Nature*, *221*(5178), 337–340.
<https://doi.org/10.1038/221337a0>
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., & Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(6), 2570–2576.
<https://doi.org/10.1128/aem.65.6.2570-2576.1999>
- Busch, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E., & Suzuki, A. (1972). Ca²⁺-specific removal

of Z lines from rabbit skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, 52(2), 367–381.

<https://doi.org/10.1083/jcb.52.2.367>

Busche, T., Tsolis, K. C., Koepff, J., Rebets, Y., Rückert, C., Hamed, M. B., Bleidt, A., Wiechert, W., Lopatniuk, M., Yousra, A., Anné, J., Karamanou, S., Oldiges, M., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., & Economou, A. (2018). Multi-Omics and Targeted Approaches to Determine the Role of Cellular Proteases in *Streptomyces* Protein Secretion. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1174.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01174>

Cascón, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J. M., & Naharro, G. (2000a). A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3233–3241.

<https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3233-3241.2000>

Cascón, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J. M., & Naharro, G. (2000b). A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3233–3241.

<https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3233-3241.2000>

Chen, X. G., Stabnikova, O., Tay, J. H., Wang, J. Y., & Tay, S. T. L. (2004).

Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8(6), 489–498.

<https://doi.org/10.1007/s00792-004-0412-5>

Chen, X. L., Xie, B. Bin, Bian, F., Zhao, G. Y., Zhao, H. L., He, H. L., Zhou, B. C., & Zhang, Y. Z. (2009). Ecological function of myroilysin, a novel bacterial M12 metalloprotease with elastinolytic activity and a synergistic role in collagen hydrolysis, in biodegradation of deep-sea high-molecular-weight organic nitrogen.

Applied and Environmental Microbiology, 75(7), 1838–1844.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02285-08>

Cheng, X. W., Kuzuya, M., Sasaki, T., Arakawa, K., Kanda, S., Sumi, D., Koike, T., Maeda, K., Tamaya-Mori, N., Shi, G.-P., Saito, N., & Iguchi, A. (2004). Increased Expression of Elastolytic Cysteine Proteases, Cathepsins S and K, in the Neointima of Balloon-Injured Rat Carotid Arteries. *The American Journal of Pathology*, 164(1), 243–251. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63114-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63114-8)

Christensen, L., Ertbjerg, P., Løje, H., Risbo, J., van den Berg, F. W. J., & Christensen, M. (2013). Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times. *Meat Science*, 93(4), 787–795.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.001>

Christensen, L., Løje, H., Risbo, J., Van Den Berg, F. W. J., & Christensen, M. (2013). Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times. *Meat Science*, 93, 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.001>

Contesini, F. J., Melo, R. R. de, & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>

Cross, H. R., Carpenter, Z. L., & Smith, G. C. (1973). Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *Journal of Food Science*, 38(6), 998–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02133.x>

Foster, J. A. (1982). [30] Elastin structure and biosynthesis: An overview. In *Methods Enzymol* (Vol. 82, pp. 559–570). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)82087-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)82087-9)

- Fuchita, N., Arita, S., Ikuta, J., Miura, M., Shimomura, K., Motoshima, H., & Watanabe, K. (2012). Gly or Ala substitutions for Pro210Thr211Asn212 at the β 8– β 9 turn of subtilisin Carlsberg increase the catalytic rate and decrease thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(4), 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.01.015>
- Giudice, M. C., Reis-Menezes, A. A., Rittner, G. M. G., Mota, A. J., & Gambale, W. (2012). Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 895–902. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300007>
- Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., & Kumagai, C. (1993). Cloning and Nucleotide Sequence of the Acid Protease-encoding Gene (pepA) from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(7), 1095–1100. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1095>
- Ha, M., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & Hopkins, D. L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 134(1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.071>
- Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M., and Okunuki, K. (1958). Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biochemistry*, 45, 185–194.
- Han, J., Morton, J. D., Bekhit, A. E. D., & Sedcole, J. R. (2009). Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Science*, 82(3), 324–330.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.003>

He, G., Chen, Q., Zhang, L., & Liu, X. (2003). Influence of medium components on elastase production using crude sources by *Bacillus* sp. EL31410. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, 4(2), 142–151.

<https://doi.org/10.1631/jzus.2003.0142>

Hosseini, S. V., Saffari, Z., Farhanghi, A., Atyabi, S. M., & Norouzian, D. (2016). Kinetics of alkaline protease production by *Streptomyces griseoflavus* PTCC1130. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(1), 8–13.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27092219>

Hung, S. H., & Hedstrom, L. (1998). Converting trypsin to elastase: Substitution of the S1 site and adjacent loops reconstitutes esterase specificity but not amidase activity. *Protein Engineering*, 11(8), 669–673.

<https://doi.org/10.1093/protein/11.8.669>

Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi, H., & Ito, K. (1998). Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(10), 1938–1946. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1938>

Janda, J. M., Abbott, S. L., & Khashe, S. (1999). Identification and Initial Characterization of Elastase Activity Associated with *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology*, 39(2), 73–78. <https://doi.org/10.1007/s002849900421>

Johnson, J. L., Devel, L., Czarny, B., George, S. J., Jackson, C. L., Rogakos, V., Beau, F., Yiotakis, A., Newby, A. C., & Dive, V. (2011). A selective matrix metalloproteinase-12 inhibitor retards atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular*

- Biology*, 31(3), 528–535. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.219147>
- Jurášek, L., Carpenter, M. R., Smillie, L. B., Gertler, A., Levy, S., & Ericsson, L. H. (1974). Amino acid sequence of *Streptomyces griseus* protease B, a major component of pronase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 61(4), 1095–1100. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(74\)80396-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(74)80396-7)
- Kan, C. K., & Rice, E. E. (1970). Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *Journal of Food Science*, 35(5), 563–565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1970.tb04809.x>
- Kaneko, R., Koyama, N., Tsai, Y. C., Juang, R. Y., Yoda, K., & Yamasaki, M. (1989). Molecular cloning of the structural gene for alkaline elastase YaB, a new subtilisin produced by an alkalophilic Bacillus strain. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 5232–5236. <https://doi.org/10.1128/JB.171.9.5232-5236.1989>
- Kielty, C., Sherratt, M., & Shuttleworth, C. (2002). Elastic fibres. *Journal of Cell Science*, 2817–2828. <https://jcs.biologists.org/content/joces/115/14/2817.full.pdf>
- Kim, J. C., Cha, S. H., Jeong, S. T., Oh, S. K., & Byun, S. M. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(2), 707–713. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91248-B](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91248-B)
- Kitadokoro, K., Tsuzuki, H., Okamoto, H., & Sato, T. (1994). Crystal Structure Analysis of a Serine Proteinase from *Streptomyces fradiae* at 0.16-nm Resolution and Molecular Modeling of an Acidic-amino-acid-specific Proteinase. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 735–742. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00735.x>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular

- evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee, J. D., & Kolattukudy, P. E. (1995). Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. *Infection and Immunity*, 63(10), 3796–3803. <https://doi.org/10.1128/iai.63.10.3796-3803.1995>
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>
- Mehta, V. J., Thumar, J. T., & Singh, S. P. (2006). Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology*, 97(14), 1650–1654.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.023>
- Mei, H. C., Liaw, Y. C., Li, Y. C., Wang, D. C., Takagi, H., & Tsai, Y. C. (1998). Engineering subtilisin YaB: restriction of substrate specificity by the substitution of Gly124 and Gly151 with Ala. *Protein Engineering Design and Selection*, 11(2), 109–117. <https://doi.org/10.1093/protein/11.2.109>
- Melendo, J. A., Beltrán, J. A., Jaime, I., Sancho, R., & Roncalés, P. (1996). Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases toughness of coarse dry sausage. *Food Chemistry*, 57(3), 429–433. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00247-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00247-2)
- Miyamoto, K., Atarashi, M., Kadozono, H., Shibata, M., Koyama, Y., Okai, M.,

- Inakuma, A., Kitazono, E., Kaneko, H., Takebayashi, T., & Horiuchi, T. (2009). Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.014>
- Miyoshi, S., & Shinoda, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection*, 2(1), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00280-X)
- Moriyama, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inoue, H., & Ebata, M. (1965). *Pseudomonas aeruginosa* elastase: Isolation, crystallization, and preliminary characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 3295–3304. <https://europepmc.org/article/med/14321366>
- Muiznieks, L. D., Weiss, A. S., & Keeley, F. W. (2010). Structural disorder and dynamics of elastin [National Research Council of Canada]. In *Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 88, Issue 2). <https://doi.org/10.1139/O09-161>
- Mukhtar, H. (2016). Industrial Applications and Production Sources of Serine Alkaline Proteases: A Review. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 3(1). <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.03.00051>
- Naughton, M. A., & Sanger, F. (1961). Purification and specificity of pancreatic elastase. *Biochemical Journal*, 78(1), 156–163. <https://doi.org/10.1042/bj0780156>
- Okamoto, T., Akaike, T., Suga, M., Tanase, S., Horie, H., Miyajima, S., Ando, M., Ichinose, Y., & Maeda, H. (1997). Activation of Human Matrix Metalloproteinases by Various Bacterial Proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 6059–6066. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.6059>
- Olafson, R. W., & Smillie, L. B. (1975). Enzymic and Physicochemical Properties of

Streptomyces griseus Trypsin. *Biochemistry*, 14(6), 1161–1167.

<https://doi.org/10.1021/bi00677a010>

Oreskovich, D. C., Bechtel, P. J., Mckeith, F. K., Novakofski, J., & Basgall, E. J. (1992). Marinade pH Affects Textural Properties of Beef. *Journal of Food Science*, 57(2), 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05482.x>

Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J., & Hui, N. (2006). Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98(4), 624–629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.043>

Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Stahl, R., Simonetti, K., Sharpe, S., & Keeley, F. W. (2014). Conformational transitions of the cross-linking domains of elastin during self-assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 10057–10068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533893>

Ryder, K., Ha, M., Bekhit, A. E. D., & Carne, A. (2015). Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. *Food Chemistry*, 172, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.061>

Sato, M., Iwai, K., Onitsuka, E., Takahata, Y., Morimatsu, F., & Sato, Y. (2011). Effect of Long-term Ingestion of Porcine Elastin Peptide on Human Skin Elasticity. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 58(4), 159–163. <https://doi.org/10.3136/nskkk.58.159>

Schräder, C. U., Heinz, A. ;, Majovsky, P. ;, Karaman, B. ;, Brinckmann, J. ;, Sippl, W. ;, & Schmelzer, C. E. H. (2018). Elastin is heterogeneously cross-linked. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(39), 15107–15119. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004322>

- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K., & Ley, T. J. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(32), 23824–23829.
<https://europepmc.org/article/MED/8226919>
- Shiratsuchi, E., Ura, M., Nakaba, M., Maeda, I., & Okamoto, K. (2010). Elastin peptides prepared from piscine and mammalian elastic tissues inhibit collagen-induced platelet aggregation and stimulate migration and proliferation of human skin fibroblasts. *Journal of Peptide Science*, *16*(11), 652–658.
<https://doi.org/10.1002/psc.1277>
- Stein, R. L., Strimpler, A. M., Hori, H., & Powers, J. C. (1987). Catalysis by Human Leukocyte Elastase: Proton Inventory as a Mechanistic Probe. *Biochemistry*, *26*(5), 1305–1314. <https://doi.org/10.1021/bi00379a016>
- Sullivan, G. A., & Calkins, C. R. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*, *85*(4), 730–734.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.033>
- Takagi, H., Arafuka, S., Inouye, M., & Yamasaki, M. (1992). The Effect of Amino Acid Deletion in Subtilisin E, Based on Structural Comparison with a Microbial Alkaline Elastase, on Its Substrate Specificity and Catalysis. *The Journal of Biochemistry*, *111*(5), 584–588.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123801>
- Takagi, H., Kondou, M., Hisatsuka, T., Nakamori, S., Tsai, Y. C., & Yamasaki, M. (1992). Effects of an Alkaline Elastase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain on the Tenderization of Beef Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(12), 2364–2368. <https://doi.org/10.1021/jf00024a008>

- Takagi, H., Maeda, T., Ohtsu, I., Tsai, Y.-C., & Nakamori, S. (1996). Restriction of substrate specificity of subtilisin E by introduction of a side chain into a conserved glycine residue. *FEBS Letters*, *395*(2–3), 127–132. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01014-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01014-9)
- Takahashi, S., Seifter, S., & Binder, M. (1970a). Elastolytic activities of *Clostridium histolyticum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *39*(6), 1058–1064. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90666-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90666-2)
- Takahashi, S., Seifter, S., & Binder, M. (1970b). Elastolytic activities of *Clostridium histolyticum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *39*(6), 1058–1064. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90666-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90666-2)
- Thumar, J. T., & Singh, S. P. (2007). Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, *38*(4), 766–772. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400033>
- Tsai, Y. C., Juang, R. Y., Lin, S. F., Chen, S. W., Yamasaki, M., & Tamura, G. (1988). Production and Further Characterization of an Alkaline Elastase Produced by Alkalophilic *Bacillus* Strain Ya-B. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(12).
- Tsai, Y. C., Lin, S. F., Li, Y. F., Yamasaki, M., & Tamura, G. (1986). Characterization of an alkaline elastase from alkalophilic *Bacillus* Ya-B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *883*(3), 439–447. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90282-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90282-5)
- Tsai, Y. C., Yamasaki, M., Yamamoto-Suzuki, Y., & Tamura, G. (1983). A new

- alkaline elastase of an alkalophilic bacillus. *Biochemistry International*, 7(5), 577–583. <https://europepmc.org/article/med/6385982>
- Usami, E., Nomura, K., Uchida, Y., Seyama, Y., & Yamashita, S. (1983). Effect of an Oral Elastase Preparation (Elaszyme) on the Elastase Activity and Lipid Levels in Blood. *Japanese Journal of Clinical Chemistry*, 12(1), 79–85. https://doi.org/10.14921/jssc1971b.12.1_79
- Vonothini, G., Murugan, M., Sivakumar, K., & Sudha, S. (2008). Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *African Journal of Biotechnology*, 7(18), 3225–3230. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Watanabe, H., Hattori, S., Katsuda, S., Nakanishi, I., & Nagai, Y. (1990). Human Neutrophil Elastase: Degradation of Basement Membrane Components and Immunolocalization in the Tissue. *The Journal of Biochemistry*, 108(5), 753–759. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/108/5/108_5_753/_article/-char/ja/
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Werb, Z., Banda, M. J., Mckerrow, J. H., & Sandhaus, R. A. (1982). Elastases and Elastin Degradation. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(1), 154–159. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.28>
- Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2009). Tropoelastin. In *International Journal of*

Biochemistry and Cell Biology (Vol. 41, Issue 3, pp. 494–497). *Int J Biochem Cell Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.017>

井上國世. (2009). *フードプロテオミクスー食品酵素の応用利用技術*. シーエムシー出版.

井上國世. (2015). *産業酵素の応用技術と最新動向*. シーエムシー出版.

寺内美結, 藤井大樹, 衛藤晋一, & 飯田章博. (2019). 深海底泥由来食肉加工用プロテアーゼ生産菌の探索. *第71回日本生物工学会 大会講演要旨集*, 262.

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始ご指導とご高配を賜りました筑波大学理工情報生命学術院生命地球科学研究群生命農学学位プログラム 中村顕教授に深甚なる謝意を表します。また、副査をお引き受け頂き、様々なご助言を賜りました同プログラム 高谷直樹教授、橋本義輝准教授、柘尾俊介助教に心より感謝申し上げます。実験手法に関して、ご指導賜りました土肥祐希助教に篤く感謝申し上げます。

本研究を遂行する機会と多大なるご便宜を賜りました三菱商事ライフサイエンス株式会社フードサイエンス研究所 井村聡明所長に深く感謝申し上げます。また、本研究を始める機会や細部にわたるご助言、ご指導を与えてくださいました同 飯田章博博士に心より感謝申し上げます。

研究を進めるにあたりご指導いただきました三菱商事ライフサイエンス株式会社 森英郎氏、小笠原正志氏、衛藤晋一氏、原圭志氏、末永新氏には感謝申し上げます。実験に関して数々のご協力いただきました同 松山勇介氏、深野和紘氏、平野啓太氏、見村晃紀氏、寺内美結氏、谷川蔵氏、酒井祐貴子氏、十時繁幸氏、川尻彩音氏、山縣智裕氏、渡邊剛弘氏、田村蒼氏、佐藤直登氏に心より御礼申し上げます。また、ご支援いただきました三菱商事ライフサイエンス株式会社の多くの皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究活動を応援し、支えてくれた家族に深く感謝致します。