

Sphaerotilus natans のプロテイナーゼ (第1報)

プロテイナーゼの生産条件について

Proteinase of *Sphaerotilus natans* (Part I)

Some Cultural Conditions for the Proteinase Production

都 築 俊 文 井 上 勝 弘

Toshifumi Tsuzuki and Katsuhiko Inoue

緒 言

Sphaerotilus natans は Kützing¹⁾ により、汚水中より発見された細菌で、*Chlamidobacteriaceae* に属する。

この細菌は、通常有機物により汚染された河川²⁾、あるいは下水処理場の活性汚泥中にしばしば見出され、特に活性汚泥の Bulking はこの細菌が原因とされている³⁾。自然界では sheath (鞘) を形成し、外見が糸状体を呈するので、filamentous bacteria と呼ばれ、またその棲息場所が水中であるところから水棲細菌ともいわれている。

われわれは、この細菌の生理機能を研究中、ある培養条件下で比較的強いプロテイナーゼを培養液中に分泌することを見出した。

微生物によって生産されるプロテイナーゼについては、すでに多くの報告があるが、*S. natans* のプロテイナーゼについての報告はない。本研究は、*S. natans* の生産するプロテイナーゼの性質を明らかにする目的で行なわれた。

本報告は、該菌のプロテイナーゼ生産条件について報告する。

実験方法

供試菌株：実験に用いた菌株は *S. natans strain 52* である。

本菌株は1963年 Mulder⁴⁾ によって下水中より分離されわれわれが分与を受けた。本菌株の諸性質は Mulder により報告されている。

供試培地：実験に用いた基礎培地の組成は次の通りである。KH₂PO₄ 0.1%、K₂HPO₄ 0.4%、NaCl 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.05%、Glucose 0.5%、Polypeptone 0.5%、pH は7.1である。

培養方法：プロテイナーゼ生産に対して前記基礎培地に種々の C-源、N-源を加え好氣的に培養した。すなわち 500 ml 容坂口フラスコに 200 ml の培養液を入れ、振幅 6 cm、毎分 120 回往復の振盪機を用いて 30°C で振盪培養した。植種はあらかじめ普通寒天斜面培地で培養した菌体を

0.85%食塩水中に懸濁し、その 2 ml 宛をフラスコに加えた。

細菌の生育度測定：培養液について、610 nm における混濁度 (O. D.) を 10 mm セルを用いて平間光電比色計で測定した。

プロテイナーゼ活性の測定：培養液を 9,000 r.p.m. 10 分間遠心分離して菌体を除き、その上澄液を酵素液としてプロテイナーゼ活性の測定に供した。酵素活性の測定は、Anson-萩原⁵⁾ の方法に準じ Folin 呈色法で測定した。すなわち、0.6% ハンマスティンカゼイン溶液 (pH 7.2) 5 ml に適当に稀釈した酵素液 1 ml を加え、35°C、10 分間反応後、5 ml の沈殿試薬 (0.11 M CCl₃COOH, 0.22 M CH₃COONa, 0.33 M CH₃COOH の混液) を加えて反応を停止する。この反応混合液をろ過後、ろ液 2 ml に 0.55 M Na₂CO₃ 溶液 5 ml, Folin 試薬 1 ml を加えて 30°C、30 分間放置してから 660 nm における吸光度を測定した。

実験結果

1. 生育、プロテイナーゼ産生におよぼす N-源の影響

Lackey と Wattie ら⁶⁾ は、本菌の生育には無機 N-源として、NH₄ 態 N が有効であると述べている。基礎培地の N-源を種々置き換えて培養した場合の、菌の生育およびプロテイナーゼの産生を観察した。結果は Table 1 に示す通りである。

すなわち、有機 N-源は本菌の生育に利用されるが、無機 N-源は利用されない。また、プロテイナーゼ産生は、Polypeptone (Daigo) を加えたときのみ認められた。

2. Yeast extract の影響

さきに Stokes⁷⁾ は *S. natans* の生育には、特別な growth factor は必要ではないことを報告した。しかし、Pringsheim⁸⁾ は土壌抽出液の添加が、また Mulder⁹⁾ は V.B₁₂ の添加が、その生育を促進すると述べている。

われわれは、基礎培地に V.B₁₂ をはじめ、V.B₁、V.B₂ および V.B₆ などのビタミン類や数種の核酸塩基などを添加して、生育とプロテイナーゼ産生に与える影響を検討

Table 1. Effects of Nitrogen Sources on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Nitrogen source	Growth (O. D. at 610 nm)	Proteinase (O. D. at 660 nm)
Control	0.00	0.00
NH ₄ Cl	0.03	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.01	0.01
NaNO ₃	0.08	0.01
Polypeptone (Daigo)	0.98	0.14
Casitone (Difco)	0.85	0.01
Casamino acid (Difco)	0.32	0.01

Basal medium ; KH₂PO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.4%, NaCl 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, glucose 0.5%, nitrogen source 0.5%.

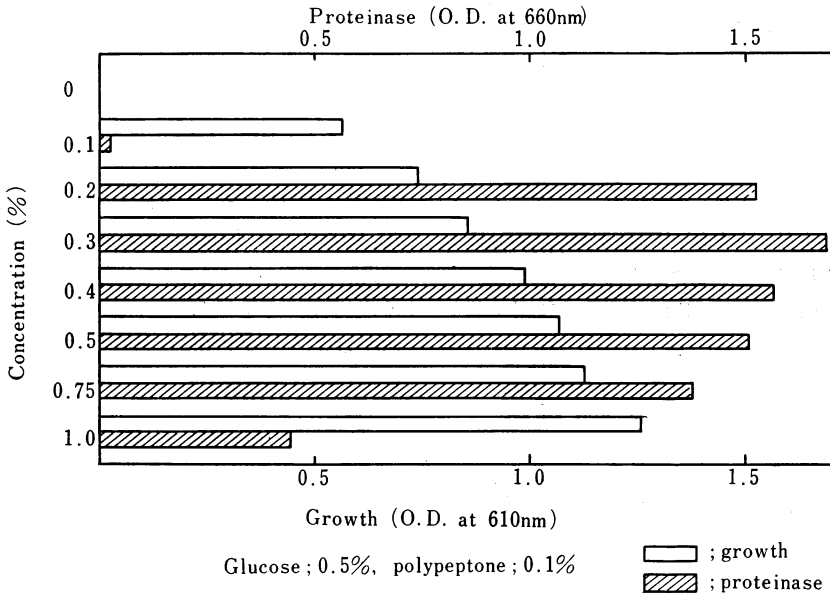
したが、総て効果は認められなかった。しかし、Yeast extract の添加は菌の生育およびプロティナーゼ産生にきわめて効果的であった。

すなわち、Fig. 1 に示すごとく Yeast extract の0.1%添加でも、その生育は促進され、さらに0.2~0.3%の添加は生育はもちろんプロティナーゼ産生もいちじるしく増大した。しかし、過剰の添加はプロティナーゼ産生の低下を招いた。現在、Yeast extract 中に含まれる酵素産生促進因子については明らかでない。

3. N-源の影響 (Yeast extract 共存)

前実験によって Yeast extract の添加が *S. natans* のプロティナーゼ産生にきわめて効果的であることが明らかにされた。したがって Yeast extract を基礎培地に添加した状態で、ふたたび各種の N-源のプロティナーゼ産生

Fig. 1. Effects of Yeast extract Concentrations on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.



におよぼす影響を検討した。その結果は Table 2 に示す通りである。すなわち、有機 N-源の添加は菌の生育を促進したが、無機 N-源ではそのような効果は認められなかった。一方、プロティナーゼ産生に対しては、無機 N-源では (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄ が、また有機 N-源では Polypeptone および Casitone の添加が酵素産生を抑制した。

4. 各種有機 N-源の影響

前実験の結果、有機N-源の中、Polypeptone, Casitone の添加 (0.5%) は酵素産生を抑制したにもかかわらず、Casamino acid はまったく抑制しなかった。本実験では種々の有機 N-源を基礎培地に添加して、酵素産生におよぼす影響を調べた。その結果を Table 3 に示す。

すなわち、各種有機 N-源を0.5%宛添加した場合、

Table 2. Effects of Nitrogen Sources on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Nitrogen Source	Relative Growth (%)	Relative activity (%)
Control	100	100
NH ₄ Cl	104	107
NH ₄ NO ₃	107	97
(NH ₄) ₂ SO ₄	121	68
(NH ₄) ₂ HPO ₄	70	24
NaNO ₃	94	104
KNO ₃	102	102
Polypeptone (Daigo)	152	15
Casitone	182	3
Casamino acid	159	103

Incubation : 30°C, 18 hrs.

Glucose ; 0.5%, nitrogen source ; 0.5%, yeast extract ; 0.3%.

Table 3. Effects of Various Peptones on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Polypeptone	Concentration (%)	Growth (O. D. at 610 nm)	Proteinase (O. D. at 660 nm)
Polypeptone (Daigo)	0.5	1.17	0.24
Trypticase (BBL)	0.5	1.08	0.08
Casitone (Difco)	0.5	0.82	0.05
Lactalysate (BBL)	0.5	1.09	0.65
Proteose peptone (Difco)	0.5	0.85	0.05
Thiotone (BBL)	0.5	1.15	0.97
Polypeptone (BBL)	0.5	1.05	0.48
Casamino acid (Difco)	0.5	0.99	1.59

Glucose ; 0.5%, yeast extract ; 0.3%.

Proteose peptone (Difco) > Casitone (Difco) > Trypticase (BBL) > Polypeptone (Daigo) > Polypeptone (BBL) > Lactalysate (BBL) > Thiotone (BBL) の順で酵素産生を抑制した。しかし、Casamino acid (Difco) の添加は抑制しなかった。この結果は、有機 N-源の中でも比較的高分子化合物を含む Peptone 類の添加が、酵素産生を抑制することを示している。

5. N-源添加濃度の影響

これまでの実験で、種々の N-化合物の添加によって酵素産生量が大きく変動することが観察された。そこで、これらの N-化合物を種々の濃度で添加した場合の酵素産生におよぼす影響を検討した。その結果は Table 4 に示す通りである。すなわち、基礎培地に各種の N-化合物を

Table 4. Effects of Nitrogen Sources Concentration on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Nitrogen Source	Concentration (%)	Relative Growth (%)	Relative activity (%)	
Control	—	100	100	
NH ₄ Cl	0.05	112	90	
	0.1	116	115	
	0.5	115	106	
	1.0	88	57	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.05	98	102
	0.1	97	102	
	0.5	69	42	
	1.0	60	4	
	Polypeptone	0.05	121	129
		0.1	125	138
0.5		130	15	
1.0		166	4	
Casamino acid		0.05	115	122
	0.1	122	128	
	0.5	142	117	
	1.0	125	113	

Glucose ; 0.5%, yeast extract ; 0.3%.

0.05%, 0.1%, 1.0%の割合で添加した場合、Casamino acid については濃度の変化によって酵素産生量の増減は認められないが、NH₄Cl の1.0%, (NH₄)₂HPO₄ では0.5%添加で酵素産生量は対照のほとんど半量に低下した。また Polypeptone では0.05~0.1%で対照よりやや多いが、0.5%以上加えると急激に低下することが明らかとなった。

6. アミノ酸類の影響

N-源として8種類のアミノ酸およびアミノ化合物を基礎培地に添加し、その酵素産生におよぼす影響を検討した。その結果を Table 5 に示す。

表から明らかのように、特に酵素産生を促進したり、あるいは抑制するものは見られないが、Asparagine, Glycine および Glutamine は菌の生育、プロティナーゼ産生をわずかに抑制した。

Table 5. Effects of Amino Acids on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Amino acid	Concentration (%)	Relative Growth (%)	Relative activity (%)
Control	—	100	100
Aspartic acid	0.25	136	117
Glutamic acid	0.25	151	122
Glycine	0.5	77	73
Lysine	0.25	116	117
Phenylalanine	0.25	125	116
Tryptophane	0.25	106	98
Asparagine	0.5	67	66
Glutamine	0.5	77	73

Glucose ; 0.5%, yeast extract ; 0.3%.

7. 菌の成育およびプロティナーゼ産生におよぼす糖類の影響

C-源として11種の単糖類、2糖類および澱粉を基礎培地に添加して、その影響を検討した。その結果を Table 6 に示す。

Table 6. Effects of Carbon Sources on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Carbon source	Relative Growth (%)	Relative activity (%)
Control	67	1
Glucose	100	100
Xylose	48	5
Arabinose	49	6
Ribose	79	95
Fructose	82	90
Mannose	85	5
Galactose	54	1
Lactose	38	3
Maltose	96	87
Raffinose	39	4
Starch (soluble)	90	4

Carbon source ; 0.5%, polypeptone ; 0.1%, yeast extract ; 0.3%.

すなわち、Glucose は菌の生育、酵素産生にもっとも有効な C-源であった。また Ribose, Fructose, Maltose はこれに次ぐが、その他の糖類は菌の増殖およびプロテナーゼ産生に対するエネルギー源としてはまったく効果が認められなかった。

8. Glucose 濃度の影響

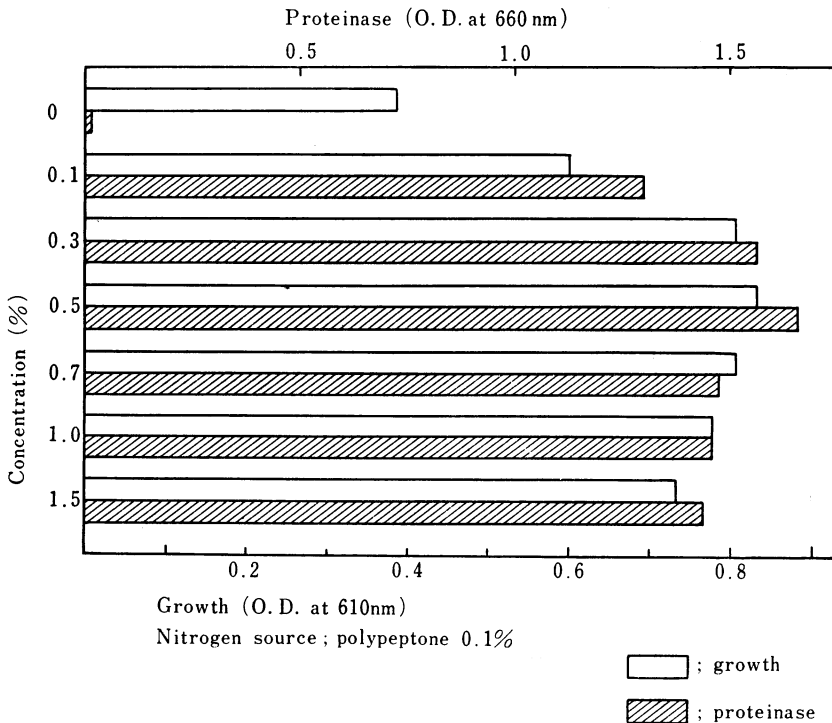
種々の誘導酵素が産生される場合、Glucose の存在はむ

Table 7. Effects of Metal salts on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.

Metal salt	Concentration (mM)	Relative Growth (%)	Relative activity (%)
Control	—	100	100
CaCl ₂	0.1	99	56
ZnCl ₂	0.1	83	70
	1.0	105	93
NiCl ₂	0.1	98	76
	1.0	14	11
BaCl ₂	0.1	100	86
	1.0	96	18
MnCl ₂	0.1	135	66
	1.0	133	81
SrCl ₂	0.1	100	98
	1.0	93	86
HgCl ₂	0.1	0	0
	1.0	4	0
CoCl ₂	1.0	8	0
CuCl ₂	1.0	47	0
SnCl ₂	1.0	61	0
Pb(CH ₃ COO) ₂	0.1	97	77
	1.0	95	0
FeSO ₄	0.1	103	76
	1.0	132	0

Glucose ; 0.5%, polypeptone ; 0.1%.

Fig. 2. Effects of Glucose Concentrations on Growth and Proteinase Production of *S. natans*.



しろその産生を阻害することが知られている¹⁰⁾。

基礎培地中の Glucose 濃度を種々に変化させて、プロティナーゼ産生におよぼす影響を検討した。その結果を Fig. 2 に示す。図によると、Glucose 添加濃度 0.5% で酵素産生量はもっとも高く、また添加量を 1.5% まで高めてもプロティナーゼ産生にはほとんど影響は認められなかった。したがってこの酵素はおそらく *S. natans* の構成的な酵素であろうと思われる。

9. 各種金属塩の影響

ある種のプロティナーゼはその活性発現に、ある金属元素の存在を必要とし¹¹⁾、またある種の酵素は Ca 塩の存在によって安定性を増すことは広く知られていることである。

われわれも基礎培地に11種類の金属塩を加えて、酵素産生におよぼす影響を検討した。その結果を Table 7 に示

す。

この結果、本実験の限りでは酵素産生の増大に寄与する金属元素は特に認められず、Ni, Co, Hg, Cu, Sn などは菌の生育および酵素産生をいちじるしく阻害し、Fe, Pb の添加は酵素産生を阻害した。

10. 培地の始発 pH とプロティナーゼ産生

基礎培地の始発 pH を種々に変えて培養した場合の酵素産生に与える影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示す。

この結果、中性付近で酵素産生量はもっとも増大した。

11. 酵素産生と培養時間

以上の実験によって得られた結果をもとに、プロティナーゼ産生に最適な培地組成で *S. natans* を培養させて、酵素産生の Time course を検討した。その結果を Fig. 4 に示す。

Fig. 3. Effects of Initial pH on Proteinase Production of *S. natans*.

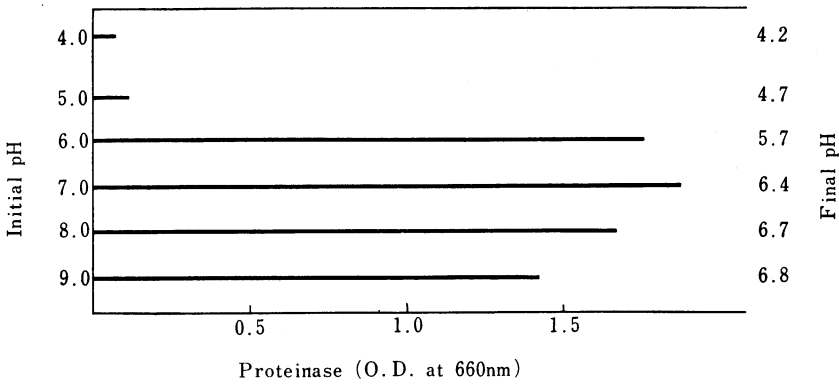
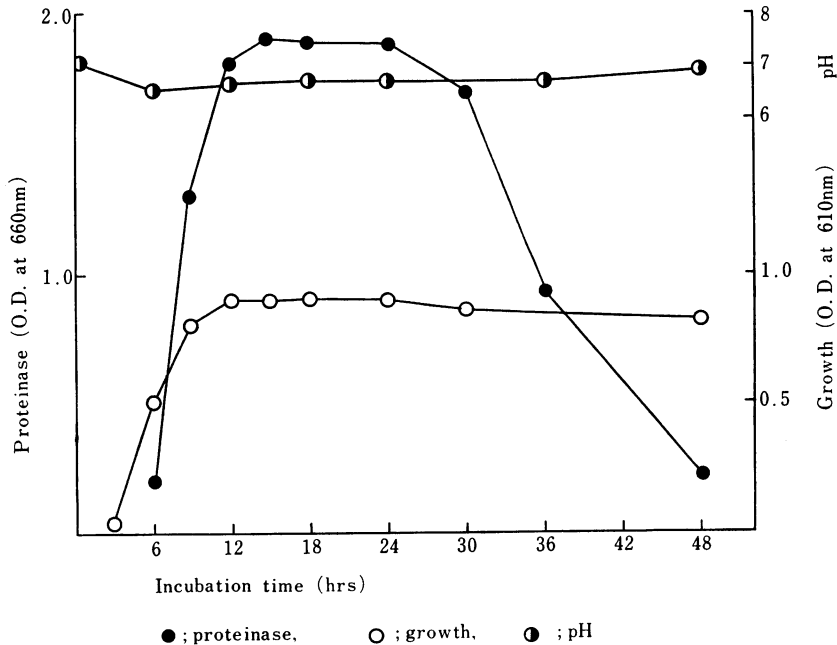


Fig. 4. Time course of Proteinase Production of *S. natans*.



すなわち、培養開始後3時間目に細胞の増殖ははじまり、その対数増殖期の後期に至りプロティナーゼが培養液内に分泌される。培養液中の酵素活性はその後約10時間ほとんど変化しないが、30時間後に至って急激に減少しはじめる。

考 察

さきに述べたように、*S. natans* は汚水中にしばしば見出される水棲細菌であるが、下水処理場でこの菌の出現は活性汚泥の bulking 現象を起す原因菌として有害と考えられている。

しかし、本実験で示されたように、本菌はある条件下で比較的多量のプロティナーゼを産生するから、一面において汚水中に含まれる蛋白質の分解、すなわち汚水の消化に関与しているものと推察される。

本菌のプロティナーゼ産生は、その細胞増殖とはかならずしも一致せず、その生育する培地組成によって大きく変動する。たとえば Yeast extract に含まれているある種の成分は、本菌のプロティナーゼ産生に重要な役割をはたしている。また、ある種のペプチド、あるいは無機アンモニア化合物が過剰に存在することによってプロティナーゼ産生はほとんど完全に抑制されてしまう。

このような知見は細菌細胞の蛋白質の生合成の機構を追究するためにきわめて興味ある問題であり、今後さらに研究を続けたい。

要 旨

Sphaerotilus natans strain 52 によるプロティナーゼ産生条件について、2, 3の検討を行なった。その結果本菌のプロティナーゼ産生は、生育する培地組成によって大きく変動することが明らかになった。

1. プロティナーゼ産生には、培地への Yeast extract の添加が必須である。しかし、その過剰の存在は、むしろ酵素産生を抑制した。

2. N-源として、ある種の有機 N-化合物を基礎培地に加えると、菌の生育およびプロティナーゼ産生は促進された。しかし、ポリペプトンのようなある種のペプチド、または無機アンモニウム化合物が過剰に存在すると、酵素産生は完全に阻害された。

3. 本菌のプロティナーゼ産生に対する最適培養条件は次の通りである。すなわち、培地組成は KH_2PO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.1%, Glucose 0.5%, Polypeptone 0.1%, Yeast extract 0.3%, 培地初発 pH 7.2, 振盪培養時間は30°Cで 18 hr である。

文 献

- 1) Breed, R. S. et al.: 1957 Bergey's Manual of determinative bacteriology, 7th ed. p. 262
- 2) Zikes, H.: Zbl. Bakt. (Abt 2), 43, 529 (1915)
- 3) Mulder, E. G.: J. appl. Bact., 27, 151 (1964)
- 4) Mulder, E. G.: J. Microbiology and Serology, 29, 121 (1963)
- 5) 赤堀四郎: 酵素研究法, 2巻, 朝倉書店, p. 242 (1968)
- 6) Lackey, J. B. and Wattie, E.: Public Health Repts. (U.S.), 55, 975 (1940)
- 7) Stokes, J. L.: J. Bact., 1, 67 (1954)
- 8) Pringsheim, E. G.: Trans. Roy. Soc., Series B, 233, 453 (1949)
- 9) Mulder, E. G.: J. Gen. Microbiol., 31, XViii (1963)
- 10) Cohn, M. and Monod, J.: 1953 Adaptation in Micro-Organisms, p. 132
- 11) Sekine, H.: Agr. Biol. Chem., 36, 2143 (1972)

Proteinase of *Sphaerotilus natans* (Part 1) Some Cultural Conditions for the Proteinase Production

Toshihumi Tsuzuki and Katsuhiro Inoue
(Hokkaido Institute of Public Health)

Some cultural conditions for the proteinase of *Sphaerotilus natans strain 52* were studied. The enzyme production was found to be markedly affected by some components of the cultural medium.

1. It was observed that the addition of yeast extract to the medium was essential for the enzyme production. However, the enzyme production was repressed in its high concentration medium.

2. The presence of some organic nitrogenous compounds in the medium enhanced the enzyme production as well as the cell growth. However, when a high concentration of some peptides, such as polypeptone, or inorganic ammonium compounds were added, the enzyme production was completely repressed.

3. The maximal production of the proteinase was obtained when the organism was grown aerobically at 30°C for 18 hrs in the medium containing 0.1% KH_2PO_4 , 0.4% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% NaCl , 0.5% glucose, 0.1% polypeptone and 0.3% yeast extract with an initial pH value of 7.2.