

## 藍藻溶解細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株の産生する プロテアーゼの精製とその性状について\*<sup>1</sup>

満谷 淳\*<sup>2</sup>・武居 薫\*<sup>2</sup>

### Purification and Properties of a Protease from a Cyanobacteria-lytic Bacterium *Lysobacter* sp. LB-1

Atsushi Mitsutani\*<sup>2</sup> and Kaoru Takesue\*<sup>2</sup>

A protease from the culture medium of a cyanobacteria-lytic bacterium, *Lysobacter* sp. strain LB-1, was purified by ammonium sulfate precipitation, anion-exchange chromatography, cation-exchange chromatography (first), hydrophobic chromatography, cation-exchange chromatography (second), and gel filtration in order. The protease was purified 36-fold, and the final yield of it was 4.0%. A molecular weight of the purified enzyme (LB-1 protease A) was estimated as 32,000 from the elution volume at gel filtration. Optimum temperature and pH of the enzyme were 50~60°C and 10~11, respectively. The enzyme was strongly inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and weakly inhibited by antipain, but not inhibited by ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), pepstatin, leupeptin, and phosphoramidon. The enzyme was considered to be concerned in the lysis of cyanobacterial cell by the bacterium, because it could lyse the cell of a cyanobacteria, *Anabaena cylindrica*, treated in sodium dodecyl sulfate solution at 100°C.

#### 1 緒言

諏訪湖、霞ヶ浦そして琵琶湖南湖のような富栄養化の進んだ湖沼においては、夏季に藍藻のブルームが発生し、浄水場でのろ過障害や水道水のカビ臭といった社会問題を引き起こしている<sup>1)</sup>。

藻類のブルームの発生・消滅のメカニズムについては、従来より光、水温、栄養塩濃度など、藻類の増殖や一次生産に影響を及ぼすと考えられる物理的・化学的側面から、多くの研究がなされてきた<sup>2)</sup>が、近年、微生物間の相互作用の観点から、ブルームの消長、特にブルームの消滅現象を解明しようとする試みが行なわれるようになってきた。

水産大学校研究業績第1436号。1992年8月17日受付。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1436. Received Aug. 17, 1992.

\*<sup>1</sup> 平成元年4月3日 平成元年度日本水産学会春季大会(東京)にて発表。

\*<sup>2</sup> 水産大学校増殖学科水産環境学講座(Laboratory of Fishery Environmental Science, Department of Biology and Aquaculture, Shimonoseki University of Fisheries).

藍藻を溶解する能力を持つ微生物としては、細菌<sup>3)</sup>、放線菌<sup>4)</sup>、カビ<sup>5)</sup>、ファージ<sup>6)</sup>、およびアメーバ<sup>7)</sup>などが知られている。中でも細菌については、環境中において藻類のブルームの消滅に関与している可能性が示唆されている。Daftら<sup>8)</sup>はスコットランドの湖沼において藍藻溶解細菌の現存量の変動が、藍藻のブルームの変動とよく一致することを指摘した。著者ら<sup>3)</sup>も琵琶湖南湖において、同様の現象を観察している。

細菌が藍藻を溶解する機作については、細菌が菌体外に溶解酵素を放出し藻体と接触することなく藍藻を溶解する<sup>9)</sup>、もしくは細菌が藻体に接触することによって藍藻を溶解する<sup>10)</sup>という2通りの観察がなされている。しかしながら、これらの観察は主として顕微鏡下でなされたものであり、どのような酵素作用によって藍藻細胞が溶解されるのかは明らかでない。また藍藻溶解酵素を精製したという報告もみられない。

著者らは、琵琶湖南湖から単離した藍藻溶解細菌 *Lyso-bacter* sp. LB-1 株をカシトンを含む培地で培養すると、培養上清中に藍藻溶解活性を持つプロテアーゼが蓄積されることを見出した<sup>11)</sup>。本研究では、同株が菌体外に放出するプロテアーゼを精製し、その若干の性状について検討した結果について報告する。

## 2 材料および方法

### 2.1 藍藻溶解細菌

藍藻溶解細菌（以後、溶藻細菌と略記する）として、1984年5月30日に琵琶湖南湖の湖水中から単離された *Lyso-bacter* sp. LB-1 株<sup>3)</sup>を用いた。

### 2.2 細菌の培養

溶藻細菌の培養には、0.5%カシトン(Difco)を含むCT培地(Table 1)を用いた。前々培養および前培養ののち、細菌を5/10の同培地を入れた細胞培養用フラスコに接種し、無菌ろ過した空気を送り込みながらマグネチックスターラーにより攪拌(250rpm)し、30℃で48時間培養した。溶藻細菌の培養液を連続遠心分離(13,000rpm)により集め、得られた培養上清を試料とした。この試料をもとに、精製操作を行った。なお、精製操作はすべて5℃で行った。

Table 1. Composition of CT medium supplemented by 0.5% casitone

Casitone (Difco)	0.5	g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15	mg
KNO <sub>3</sub>	10	mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4	mg
Na <sub>2</sub> -β-glycerophosphate	5	mg
Vitamin B <sub>1</sub>	1	μg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.01	μg
Biotin	0.01	μg
TAPS*	40	mg
P IV metal mixture	0.3	ml
Distilled water	99.7	ml
pH	8.2	
P IV metal mixture		
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	19.6	mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.6	mg
ZnCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2	mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.4	mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	mg
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	100	mg
Distilled water	100	ml

\*: N-Tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulfonic acid.

### 2.3 酵素の精製操作

#### 2.3.1 硫酸塩析

培養上清をマグネチックスターラーにより緩やかに攪拌しながら、あらかじめ乳鉢ですり潰した固形の硫酸アンモニウムを少量ずつ徐々に添加した。硫酸アンモニウムが80%飽和に達したのち、攪拌を止め、一晚放置した。翌日、連続遠心分離(13,000rpm)により沈澱を集め、5%グリセロールおよび0.1M塩化ナトリウムを含む20mMトリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)に再溶解した。不溶性の物質を遠心分離(8,000rpm×10min)によって除去したのち、100倍量の同緩衝液に対して一晚透析し、粗酵素液とした。

#### 2.3.2 Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー

脱塩した粗酵素液について、Q-Sepharose Fast Flow (ファルマシア社) 陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期緩衝液には5%グリセロールおよび0.1M塩化ナトリウムを含む20mMトリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)を用い、溶出は塩化ナトリウム濃度による段階溶出法により行った。ゲルベッド容積は40ml(2.6×10cm)、流速は

1ml/min, 分画サイズは5mlとした。

### 2.3.3 Mono S陽イオン交換クロマトグラフィー (1回目)

Q-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーの結果, 活性画分を集め, 透析により緩衝液を交換したのち, Mono S HR5/5カラム (ファルマシア社) による陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期緩衝液には5%グリセロールを含む5mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。溶出は, 0~0.2M塩化ナトリウム直線濃度勾配法によって行った。流速は0.5ml/min, 分画サイズは1mlとした。

### 2.3.4 Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィー

Mono S カラムクロマトグラフィーの結果, 活性画分を集め, 透析により緩衝液を20mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0) に交換した。更に, 2M硫酸アンモニウムを含む20mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し, 硫酸アンモニウム濃度を1.2Mに調整した試料について, Phenyl-Superose HR5/5カラム (ファルマシア社) によるハイドロフォービッククロマトグラフィーを行った。初期緩衝液には1.2M硫酸アンモニウムを含む20mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。溶出は, 硫酸アンモニウム濃度を1.2~0Mに下げると同時に, エチレングリコール濃度を0~10%に上げることにより行った。流速は0.5ml/min, 分画サイズは1mlとした。

### 2.3.5 Mono S陽イオン交換クロマトグラフィー (2回目)

Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィーの結果, 活性画分を集め, 透析により, 硫酸を除去したのち, Mono S HR5/5カラム (ファルマシア社) による陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期緩衝液は1回目と同様のものを用いた。溶出は, 0~0.1M塩化ナトリウム直線濃度勾配法により行った。流速は0.5ml/min (但し濃度勾配中は0.1ml/min), 分画サイズは0.5mlとした。

### 2.3.6 Superose 6ゲルろ過

Mono S カラムクロマトグラフィー (2回目) の結果, 活性画分を集め, 透析により緩衝液を交換したのち, 限外ろ過ユニット (ミリポア社, モルカットII) により濃縮し

た試料について, Superose 6 HR10/30カラム (ファルマシア社) によるゲルろ過を行った。緩衝液には20mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。流速は0.5ml/min, 分画サイズは0.5mlとした。

分子量マーカーとして, チトクロームC, ミオグロビン, キモトリプシノーゲンA, オボアルブミン, および牛血清アルブミンの5種類のタンパク質を用いた。これらの混合液について, 同条件下でゲルろ過を行ない, それらの溶出時間を測定した。

### 2.3.7 電気泳動

Superose 6ゲルろ過の結果, 活性画分を集め, 限外ろ過ユニット (ミリポア社, モルカットII) により約10倍に濃縮し, 電気泳動用試料とした。0.0625Mトリス/塩酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析を行ったのち, 同試料10に対して70%グリセロールおよび0.05%プロモチモールブルーを含む0.0625Mトリス/塩酸緩衝液 (pH 6.8) を1の割合で混合し, アクリルアミドゲルに添加した。市販のミニスラブゲルPAGプレート4/15 (第一化学薬品社) を用い, 試料添加量は2, 5, および10 $\mu$ lとした。泳動用緩衝液には0.192Mグリシン/0.025Mトリス緩衝液 (pH 8.4) を用いた。泳動終了後, クーマシープリリアントブルーG250染色液により, 室温で1時間タンパク質の染色を行ったのち, 脱色液により適当なバックグラウンドが得られるまで脱色した。

## 2.4 プロテアーゼ活性の測定

基質にアゾカゼインを用い, Charney and Tomarelli の方法<sup>12)</sup>により測定した。緩衝液には20mMトリス/塩酸緩衝液 (pH 8.5) を用いた。アゾカゼインを同緩衝液に溶解し (25mg/ml), 基質溶液とした。その0.5mlに対して酵素溶液0.5mlを加え, 40℃のウォーターバス中で反応させた。30分後に, 5%トリクロロ酢酸4mlを加えて反応を止め, 同時に未分解の基質を沈殿させた。遠心分離 (10,000rpm $\times$ 10min) ののち上澄みを0.5ml取り, 0.5N水酸化ナトリウム溶液0.5mlを加えた。基質が切断された結果溶液中に放出されたアゾ色素の赤色を, 分光光度計により測定した。440nmにおける吸光度を30分間に0.001増加させるような活性を1 unitとした。

## 2.5 精製酵素の性状の検討

### 2.5.1 溶藻活性の検討

無菌培養の藍藻 *Anabaena cylindrica* の藻体を, 4%ド

デシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し, 100℃, 30分間の加熱処理を行った。室温まで自然冷却したのち, SDS を除く目的で, 藻体を大量の脱イオン水に懸濁し, 遠心分離 (8,000rpm ×5min) により沈澱させる操作を繰り返した。6回の洗浄操作ののち, 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.5) に再懸濁し, 基質とした。730nm における濁度を1に調整した同懸濁液 1ml に対して, 試料を0.05ml 加え, 30℃で保温しながら, 730nm における濁度の経時変化を測定した。

### 2.5.2 至適温度および至適 pH の検討

精製酵素標品の至適温度および至適pHについて検討した。至適pHの測定には, 以下の緩衝液系を用いた。pH 4.0~6.0については20mM クエン酸緩衝液を, pH 6.0~7.5については10mM リン酸緩衝液を, pH 7.5~8.5については20mM トリス/塩酸緩衝液を, pH 8.5および9.0については20mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール/塩酸緩衝液を, pH 9.0および10.0については20mM グリシン/水酸化ナトリウム緩衝液を, pH 10.0~12.0についてはリン酸二ナトリウム/水酸化ナトリウム緩衝液をそれぞれ用いた。プロテアーゼ活性は, 前述の方法により測定した。

### 2.5.3 プロテアーゼ阻害剤の効果の検討

精製酵素標品の活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の効果について検討した。阻害剤としては, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), ふっ化フェニルメチルスルフォニル (PMSF), アンチパイン, ペプスタチン, ロイペプチン, およびフォスホラミドンをを用いた。プロテアーゼ活性は前述の方法により測定した。

## 3 結果

### 3.1 プロテアーゼの精製

#### 3.1.1 Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー

硫酸塩析後の試料についてQ-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ, 活性は未吸着画分に認められた。同画分を集め, 次のカラムクロマトグラフィーに用いた。

#### 3.1.2 Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1回目)

Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1回目) の結果をFig. 1に示す。プロテアーゼはMono S カラムに吸着し, 塩化ナトリウム濃度を上げることによって溶出した。プロテアーゼ活性は4本のピークに分かれて認められたが, 塩化ナトリウム濃度0.044M および0.068M の画分が最も高い活性を示した。塩化ナトリウム濃度0.032M~0.108M の範囲の溶出画分を集め, 次のカラムクロマトグラフィーに用いた。

#### 3.1.3 Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィー

Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィーの結果をFig. 2に示す。プロテアーゼはカラムに吸着し, 硫酸アンモニウム濃度を下げると同時にエチレンジアミン濃度を上げることによって溶出した。プロテアーゼ活性は4本のピークに分かれて認められたが, 硫酸アンモニウム濃度が0.72M~0.82M の画分が, 最も高い活性を示した。この画分を集め, 次のカラムクロマトグラフィーに用いた。

#### 3.1.4 Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2回目)

Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2回目) の結果をFig. 3に示す。プロテアーゼはカラムに吸着し, 塩化ナトリウム濃度を上げることによって溶出した。プロテアーゼ活性は塩化ナトリウム濃度0.03M および0.064M を中心とした2本のピークに分かれた。より活性の高かった塩化ナトリウム濃度0.024M~0.036M の範囲の画分を集め, 限外ろ過により濃縮したのち, 次のゲルろ過を行った。

#### 3.1.5 Superose 6 ゲルろ過

Superose 6 カラムによるゲルろ過の結果をFig. 4に示す。280nm における吸光度およびプロテアーゼ活性は, 共に溶出液量17.6mlの画分において, 単一のピークとして認められたことから, 精製が終了したものと判断した。精製の各段階における比活性の上昇と収率をTable 2に示す。得られた精製プロテアーゼは, 培養ろ液試料と比較して比活性が36倍に上昇し, また収率は4.0%であった。同条件下で求めた分子量マーカータンパク質の溶出液量から, このプロテアーゼの分子量を求めたところ, 約32,000であった (Fig. 5)。

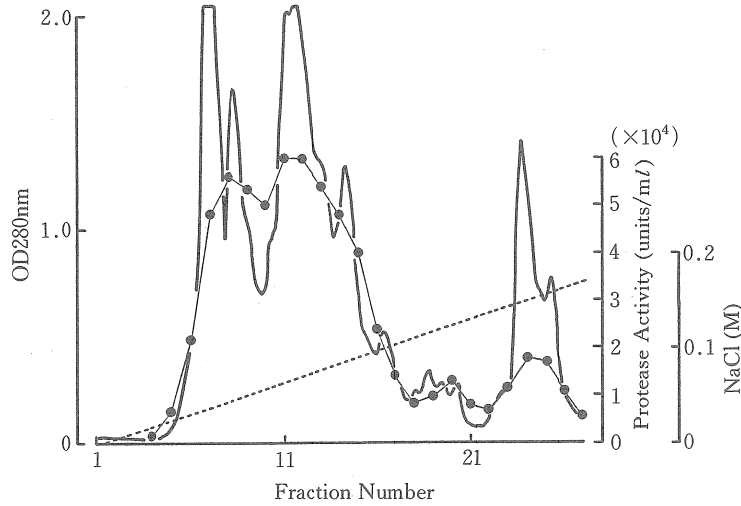


Fig. 1. Ion exchange chromatograph profile of active fraction from Q Sepharose FF on Mono S, eluted with linear gradient of 0-0.2M NaCl in 5mM citrate buffer containing 5% glycerol (pH 5.0). Optical density at 280 nm, protease activity, and NaCl concentration are shown as (—), (●—●), and (-----), respectively.

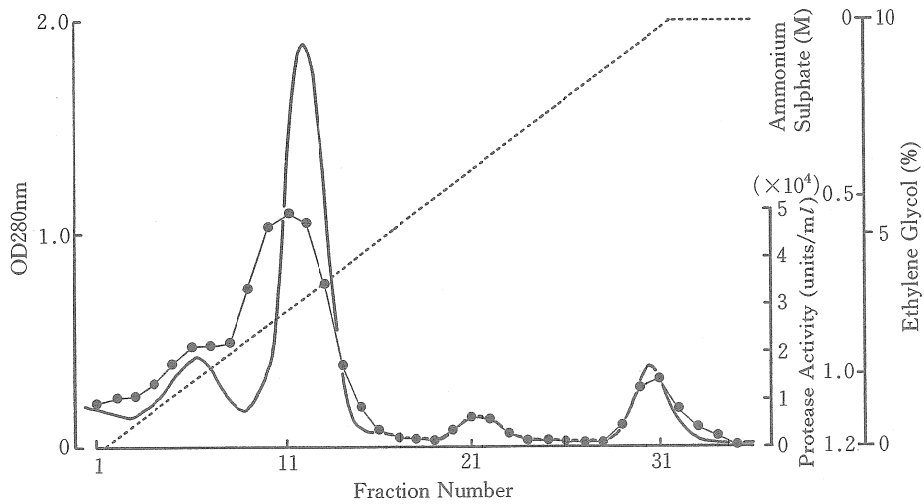


Fig. 2. Hydrophobic chromatograph profile of active fraction from Mono S on Phenyl-Superose, eluted with linear gradient of 0-10% ethylene glycol in 5mM citrate buffer (pH 5.0). Optical density at 280 nm, protease activity, and ammonium sulfate (ethylene glycol) concentration are shown as (—), (●—●), and (-----), respectively.

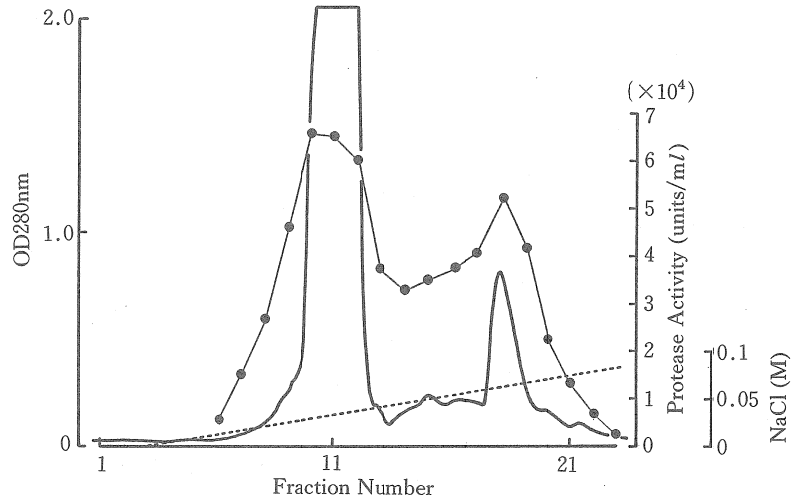


Fig. 3. Ion exchange chromatograph profile of active fraction from Phenyl-Superose on Mono S, eluted with linear gradient of 0-0.1M NaCl in 5mM citrate buffer containing 5% glycerol (pH 5.0). Optical density at 280 nm, protease activity, and NaCl concentration are shown as (—), (●—●), and (→-----), respectively.

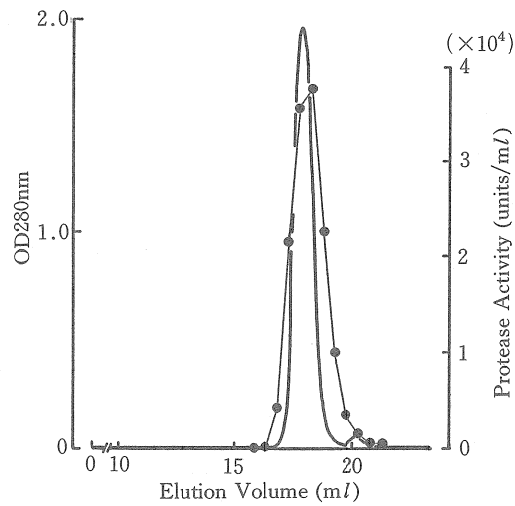


Fig. 4. Gel chromatograph profile of active fraction from Mono S on Superose 6, eluted with 20mM citrate buffer containing 5% glycerol and 0.2M NaCl (pH 5.0). Optical density at 280 nm and protease activity are shown as (—) and (●—●), respectively.

Table 2. Purification chart of protease from the culture fluid of *Lysobacter* sp. LB-1

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification factor (fold)	Recovery (%)
Culture fluid	5,000	4,500	$6.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^3$	1	100
Salting-out (ammonium sulfate)	74	260	$5.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^4$	15	84
Q Sepharose Fast Flow	65	75	$3.1 \times 10^6$	$4.1 \times 10^4$	32	52
Mono S (first)	48	59	$2.1 \times 10^6$	$3.6 \times 10^4$	28	35
Phenyl Superose	24	24	$9.1 \times 10^5$	$3.8 \times 10^4$	29	15
Mono S (second)	4	5.5	$2.4 \times 10^5$	$4.4 \times 10^4$	34	4.0
Superose 6	8	5.1	$2.4 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4$	36	4.0

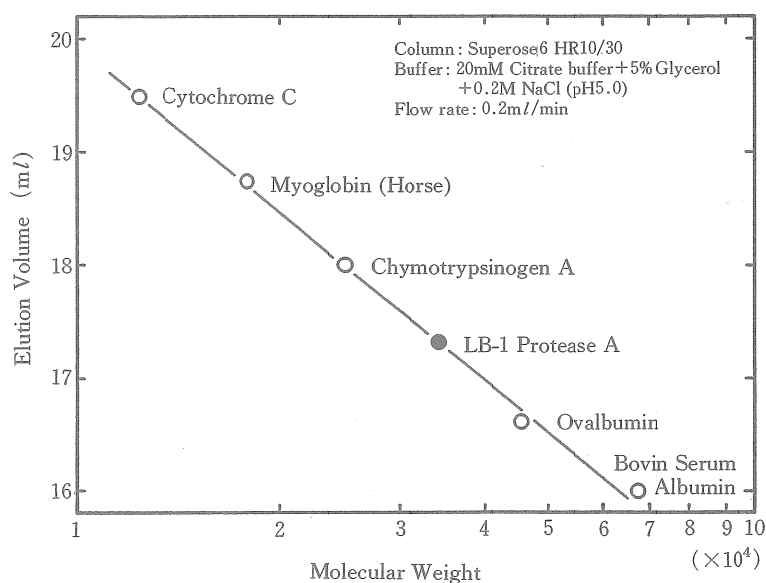


Fig. 5. Estimation of molecular weight of purified enzyme.

### 3.1.6 電気泳動

同酵素の精製度を確かめるために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果を Fig. 6 に示す。Rf 値0.06付近に単一のバンドが認められた。以下、同酵素を LB-1 protease A と仮称する。

### 3.2 精製プロテアーゼの性状

#### 3.2.1 溶藻活性の検討

LB-1 protease A が藍藻の溶解に関与するかどうかを確かめるために、SDS 溶液中で煮沸処理した *Anabaena cylindrica* 藻体を基質として溶藻活性を測定した結果を Fig. 7 に示す。LB-1 protease A を添加した場合に、730nm における吸光度が無添加の場合よりも120分間に0.35減少したことから、同酵素が藍藻溶解活性を有するこ

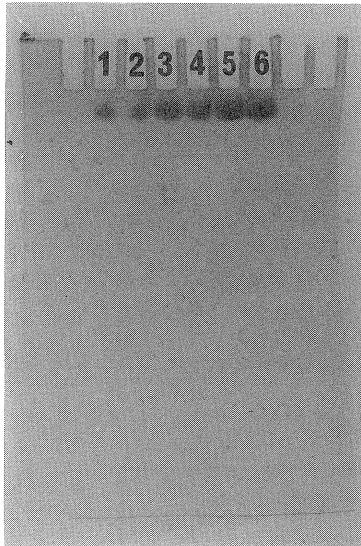


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzyme.  
Lane 1 and 2:  $2 \mu\text{l}$ , Lane 3 and 4:  $5 \mu\text{l}$ , Lane 5 and 6:  $10 \mu\text{l}$

とが確かめられた。

### 3.2.2 至適温度および至適 pH

LB-1 protease A の至適温度および至適 pH について検討した結果を Fig. 8 に示す。同酵素の至適温度は  $50 \sim 60^\circ\text{C}$  の間に、至適 pH は pH10~11 の間にあった。

### 3.2.3 プロテアーゼ阻害剤の効果の検討

LB-1 protease A に対するプロテアーゼ阻害剤の効果について検討した結果を Table 3 に示す。同酵素はセリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF によって強く阻害され、アンチパインによってもやや阻害されたが、カルボキシルプロテアーゼ阻害剤であるペプスタチン、チオールプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン、メタルプロテアーゼ阻害剤である EDTA およびフォスフォラミドンによっては阻害されなかったことから、セリンプロテアーゼであると推定された。

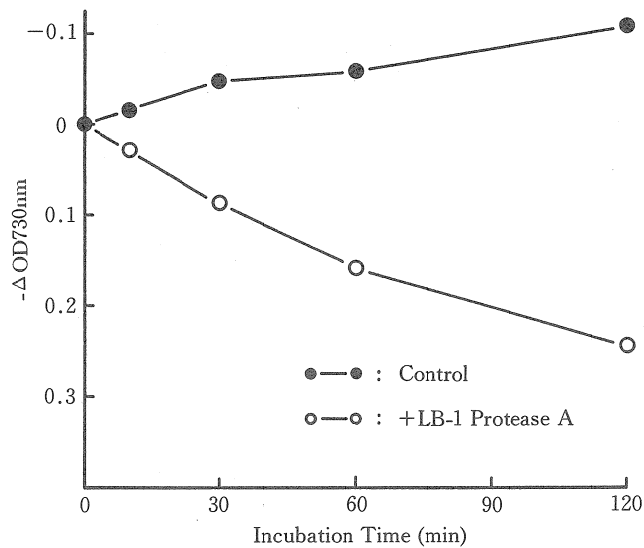


Fig. 7. Algal-lytic activity of purified enzyme against SDS boiled cell of *Anabaena cylindrica*.



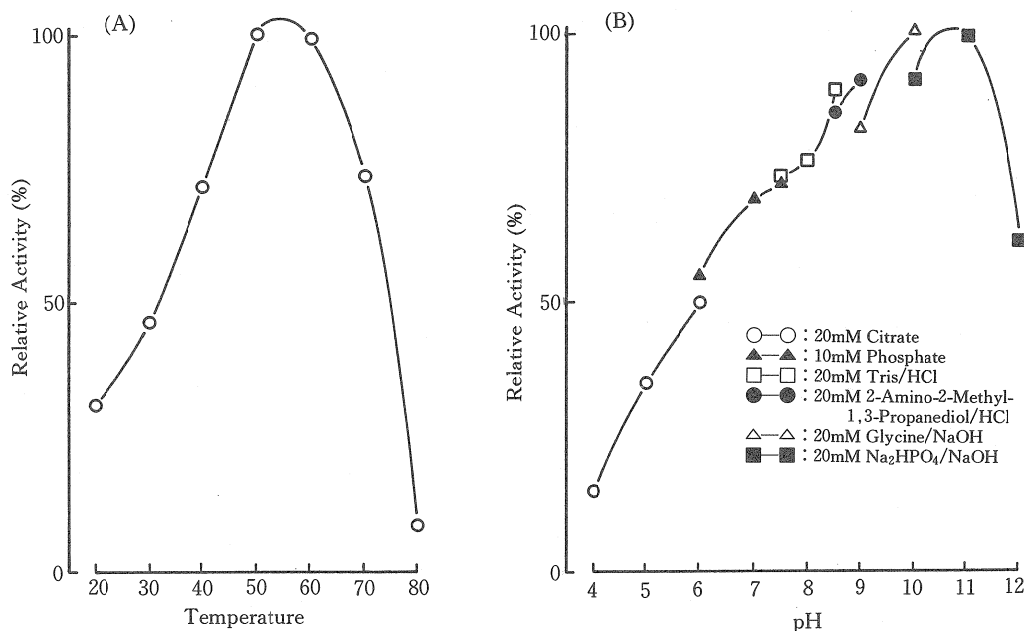


Fig. 8. Effects of temperature and pH. (A): Effect of temperature on the enzyme activity of purified enzyme. (B): Effect of pH on the enzyme activity of purified enzyme.

Table 3. Effect of inhibitors on the activity of purified enzyme

Inhibitor	Concentration	Relative activity (%)
None		100
EDTA * <sup>1</sup>	5mM	94
PMSF * <sup>2</sup>	5mM	32
Antipain	2 µg/ml	76
Pepstatin	2 µg/ml	101
Leupeptin	2 µg/ml	102
Phosphoramidon	2 µg/ml	113

\*<sup>1</sup>: Ethylenediaminetetraacetic acid.

\*<sup>2</sup>: Phenylmethylsulfonyl fluoride.

#### 4 考 察

本研究では、藍藻溶解細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株が培養上清中に放出したプロテアーゼについて、Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー、Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1 回目)、Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィー、Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2 回目) および Superose 6 ゲルろ過の順に精製操作を行ない、電気泳動的に単一のバンドを示すまで精製した。精製されたプロテアーゼ (LB-1 protease A) は SDS 溶液中で煮沸処理した藍藻の藻体を溶解する活性を有することから、同株の藍藻溶解能に関与する酵素であると考えられる。

LB-1 protease A の若干の性状を調べた結果、至適 pH について、極めてアルカリ側で活性が高いという特徴が認められた (Fig. 8)。藍藻溶解細菌は一般にアルカリ性の環境で増殖しやすいという報告がなされている<sup>13)</sup>。LB-1 株が

単離された琵琶湖南湖でも、藍藻がブルームを形成する夏期には pH が 8 以上、時には 10 付近まで達する場合があることから<sup>14)</sup>、この特徴は細菌の生活する環境と密接な関連を持つものと考えられる。

*Lysobacter* 属の細菌が産生する藍藻溶解酵素についてはこれまで報告がなされていないが、細菌溶解酵素についてはいくつかの報告がなされている。Ensign and Wolfe<sup>15,16)</sup> は、*Lysobacter enzymogenes* AL-1 株を 1% 酵母エキスを含む培地 (pH 7.0) で培養すると、2 種類の比較的分子量のプロテアーゼが培養上清中に認められることを報告した。この溶菌酵素は、塩化亜鉛による塩析、硫酸塩析、CM cellulose および DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーの操作により精製された。同酵素 (AL-1 protease) は、分子量 8,700、作用至適 pH 9.0 のセリンプロテアーゼであった。Whitaker ら<sup>17-19)</sup> は、*Lysobacter enzymogenes* を 1% カザミノ酸、0.1% グルコースおよび無機塩類を含む培地 (pH 7.1) で培養すると、カゼイン溶解活性を有するプロテアーゼが培養上清中に蓄積されることを報告した。これを Amberlite IR-45、IR-120 および CG-50 クロマトグラフィーにより、 $\alpha$ -酵素と  $\beta$ -酵素に分離精製した。 $\alpha$ -酵素は分子量 19,000 のセリンプロテアーゼで、カゼインに対する至適 pH は 8.5 であった。また、 $\beta$  酵素も分子量 19,000 のセリンプロテアーゼであった。

LB-1 protease A は、AL-1 protease および *Lysobacter enzymogenes*  $\alpha$ -、 $\beta$ -酵素と同じくセリンプロテアーゼであり、至適 pH はいずれもアルカリ側にあるという共通の特徴が認められた。一方、基質特異性に注目すると、LB-1 株はグラム陰性菌である *Escherichia coli* を溶解できない<sup>3)</sup> 点で他の 2 株と共通していたが、両株が溶解できる *Micrococcus lysodeikticus* を溶解できない<sup>3)</sup>、すなわちリゾチーム活性を持たない点で異なっていた。このことから、LB-1 protease A は、これらとは異なる作用機作を持つものと考えられる。LB-1 株の宿主特異性は比較的狭く、糸状体を形成する藍藻をよく溶解するが、その他の藍藻、緑藻および細菌については溶解できない傾向を示している<sup>3)</sup>。このような狭い宿主特異性は、溶解酵素の基質特異性や作用機作に由来するとも考えられることから、今後酵素の性状についてさらに検討する必要があると思われる。

本研究では、精製の各段階においてプロテアーゼ活性が複数の画分に分かれたが、最も活性の高い画分を追跡して精製を試みた。しかしながら、得られた LB-1 protease A の藍藻溶解活性は、著者らが同じく LB-1 株の培養上清から粗精製したプロテアーゼ<sup>11)</sup>と比較して藍藻溶解活性がや

や低かった。今回精製を行なわなかった画分にも、藍藻の溶解に関与するプロテアーゼが存在している可能性が高い。溶藻作用は、これら複数の酵素の相乗作用によって効率的に行なわれるものと想像される。今後、他の画分に存在する酵素についても精製を試み、その作用機作を解明することが必要と思われる。

## 参考文献

- 1) T. Kikuchi, T. Miura, K. Harimaya, H. Yano, T. Arimoto, Y. Masada, and T. Inoue: *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2342-2343 (1973).
- 2) 柳 哲雄・遠藤拓郎・西島敏隆・畑 幸彦・門谷茂・岡市友利: 赤潮発生の物理・化学環境, “赤潮の科学” (岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 1987, pp. 149-210.
- 3) A. Mitsutani, A. Uchida, and Y. Ishida: *Bull. Japan Soc. Microb. Ecol.*, **2**, 21-28 (1987).
- 4) R. S. Safferaman and M. E. Morris: *Appl. Microbiol.*, **10**, 289-292 (1962).
- 5) H. M. Canter: in “Taxonomy and Biology of Blue-Green Algae” (ed. by T. V. Desikachary), University of Madras, 1972, pp. 145-158.
- 6) M. J. Daft, J. Begg, and W. D. P. Stewart: *New Phytol.*, **69**, 1029-1035 (1970).
- 7) Y. Yamamoto: *Jap. J. Limnol.*, **39**, 9-14 (1978).
- 8) M. J. Daft, S. B. McCord, and W. D. P. Stewart: *Freshwat. Biol.*, **5**, 577-596 (1975).
- 9) J. R. Stewart and R. M. Brown: *Arch. Mikrobiol.*, **80**, 176-190 (1971).
- 10) M. Shilo: *J. Bacteriol.*, **104**, 453-461 (1970).
- 11) 満谷 淳・吉田憲正・武居 薫・内田有恒・石田祐三郎: 昭和63年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 47.
- 12) J. Charney and R. M. Tomarelli: *J. Biol. Chem.*, **171**, 501-505 (1947).
- 13) M. J. Daft and W. D. P. Stewart: *New Phytol.*, **70**, 819-829 (1971).
- 14) 満谷 淳: 未発表
- 15) J. C. Ensign and R. S. Wolfe: *J. Bacteriol.*, **90**, 395-402 (1965).
- 16) J. C. Ensign and R. S. Wolfe: *J. Bacteriol.*, **91**, 524-534 (1966).

- 17) D. R. Whitaker, F. D. Cook, and D. C. Gillespie: *Can. J. Biochem.*, 43, 1927-1934 (1965). (1965).
- 18) D. R. Whitaker: *Can. J. Biochem.*, 43, 1935-1954
- 19) D. R. Whitaker, L. Jurasek, and C. Roy: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 173-180 (1966).