

コンポストより分離した耐酸性微生物が産生する
カルボキシシルプロテアーゼの酵素特性と
機能に関する研究

学位論文内容の要旨

微生物を利用した有機性廃棄物の堆肥化（コンポスト化）は、省資源的な有機性廃棄物の処理法であるばかりでなく、発酵処理物を堆肥として土壤に還元することができ、有機性廃棄物の再利用を可能にした。コンポスト過程に関与する大部分の微生物は、酸性環境下ではその増殖活性が低下する。このためコンポスト化過程における pH の低下は、コンポスト反応を阻害する。本研究の最終的な目的は、コンポスト化過程における生物学的な pH 制御技術の確立により、安定したコンポスト化過程を実現することにある。このことは、コンポスト化過程の管理制御を容易にするのみならず、コンポスト製品の品質向上に寄与することになる。

コンポスト化過程において、pH を低下させる要因は、有機酸ことに酢酸の蓄積であることが明らかにされている。その一方で pH を増加させる要因は、タンパク質分解によって発生するアンモニア等のアルカリ物質の産生である。そこでタンパク質分解過程の第1段階で働くキーエンザイムとしてカルボキシシルプロテアーゼ (CP) の調節に着目した。すなわち耐酸性微生物の働きにより、酸性環境下におけるタンパク質の資化を促し、代謝産物により生物学的に pH を調整するという着想を得た。

本論文は、コンポストから分離した耐酸性微生物が産生する CP に関するものであり、耐酸性タンパク質資化性微生物の分離、CP の精製および酵素学的諸性質、CP MB8 酵素一次構造および基質特異性の解析、さらに CP 産生微生物のコンポスト環境中の挙動解析について、実験結果を示し、論究したものである。

(1) 耐酸性タンパク質資化性微生物の分離

コンポストを分離源として、耐酸性タンパク質資化性微生物の探索を行い、4株のグラム陰性桿菌（系統番号 MB2, MB7, MB8, MB11）を分離した。16S rDNA の相同性および細菌学的性状により、MB2, MB7, MB11 株は、*Burkholderia* 属の一種であると同定された。MB8 株は、*Proteobacteria* class の新属新種であると同定された。分離株はいずれもカゼインを唯一の窒素源とする酸性培地 (pH 4.5) 中で良く生育し、CP を菌体外に産生した。培地 pH は、分離菌株の生育にともない、急速に上昇し、5日間の培養後では全ての分離株において pH 6.0 を越えた。このことはタンパク質の一連の資化過程を経て、最終的に脱アミノ化反応によりアンモニアを生じることにより、培地環境の pH を上昇させたも

のと推測した。この結果は、本分離菌株がコンポスト酸性環境下におけるタンパク質分解に寄与することで分解産物により pH を改善する機能を有することを示していた。

(2) CP の精製および酵素学的諸性質

MB8 株および MB11 株由来の CP (CP MB8, CP MB11) を精製しその酵素学的性質を明らかにした。CP MB8 および CP MB11 は、2-3 ステップのカラム操作により、電気泳動的に均一な酵素標品として精製した。分子量は 61,000 (CP MB8), 36,000 (CP MB11), 至適 pH は 3.5 (CP MB8), 3.7 (CP MB11), 至適温度は 55°C であった。阻害剤 pepstatin, DAN, および EPNP に対して非感受性を示したが、pepstatin 非感受性 CP の特異的阻害剤である tyrostatin の影響を検討した結果、tyrostatin では作用濃度依存的に酵素活性が阻害された。CP MB8, CP MB11 に対する I_{50} は、 2.5×10^{-6} M (CP MB8), 1.8×10^{-6} M (CP MB11) と算出した。以上の結果より本酵素 (CP MB8, CP MB11) が Pepstatin 非感受性 CP (EC 3.4.23.33) の一種であると結論した。しかし CP MB8 の分子量は、既知 CP とは著しく異なり一次構造上の差異を示唆していた。

(3) CP MB8 酵素一次構造および基質特異性の解析

N 末端アミノ酸配列および部分アミノ酸配列を決定し、CP MB8, CP MB11 が pepstatin 非感受性 CP の一種であることを酵素一次構造からも裏付けた。また部分アミノ酸配列をプローブとしてクローニングした CP MB8 遺伝子断片の塩基配列より CP MB8 成熟酵素は、558 残基のアミノ酸からなり、分子量は 57,871 と推定した。CP MB8 は *Pseudomonas* CP (43.4%) および *Xanthomonas* CP (40.6%) と高い相同性を示した。CP MB8 の C 末端側に存在する 204 アミノ酸残基からなる C-領域 (355-558) は、PCP および XCP の成熟酵素には、存在しない構造であり、この C-領域の存在が、CP MB8 が PCP および XCP に比べ著しく大きい分子量を示した要因であることを示した。

酸化インシュリン B 鎖を基質として、CP MB8 の基質特異性を検討した結果、本酵素はエンド型の CP であり、切断部位 (-P₁-P₁'-) の認識は厳密なものでなく、比較的広い基質特異性をもつことを示した。P₁ が疎水性アミノ酸であることが多く、P₁' は疎水性アミノ酸あるいは中性アミノ酸であるといった原核生物由来の CP として一般的な基質特異性を示していた。

(4) コンポスト化過程における微生物相の変動解析

本 CP 産生微生物は、コンポストを分離源として単離されたものであり、実際のコンポスト化過程において何らかの機能を担っていると推測される。そこで小型生ゴミ処理機を使用した実験系において、分離菌株に特異的な形質である CP 遺伝子を検出することで、コンポスト中での挙動を解析した。C/N 比の高い有機物のコンポスト化では、有機酸の蓄積による発酵阻害が生じやすいことが知られている。本実験においても、実験開始 5 日後に急激な酸性化 (pH 4.28 - 5.04) による発酵阻害が認められこの阻害期は 18 日後まで継続した。この発酵阻害期においても、CP 活性が検出され、EC および水可溶性 TOC の増加が認められ、コンポスト反応阻害期においてもなお有機物の可溶化が進行していることを示していた。またこの発酵阻害期において、pepstatin 非感受性 CP 遺伝子が検出され、pepstatin 非感受性 CP 産生菌の存在が示された。この結果は、コンポスト中の CP 活性の変化、および DGGE (DNA 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) による微生物相の変動解析の結果と符合し、酸性化したコンポスト環境中に存在する CP が、pepstatin 非感受性 CP 産生菌に由来するものであることを強く示唆していた。16S rRNA 遺伝子の DGGE パターンは、コンポスト過程における pH 変動と符合して大きく変化していた。発酵阻害期において存在するバクテ

リアの 16S rRNA 遺伝子は、それぞれ *Burkholderia multivorans* および *Frateuria aurantio* との間に高い相同性を示し、発酵阻害期における優占種が、*Burkholderia* 属の一種であること、および *Frateuria aurantio* 様の酢酸菌であることを示唆していた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 守
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 寺 澤 實
副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

コンポストより分離した耐酸性微生物が産生する カルボキシシルプロテアーゼの酵素特性と 機能に関する研究

本論文は、序論と総合考察を含めて6章で構成され、図 48、表 10、参考文献 116 を含む 127 頁の邦文である。別に参考論文 2 編が添えられている。微生物を利用した有機性廃棄物の堆肥化（コンポスト化）に関与する微生物の増殖活性は、酸性環境下で低下する。このためコンポスト化過程における pH の低下は、コンポスト化反応を阻害する。コンポスト化過程において、pH を低下させる要因は、有機酸の蓄積であり、pH を増加させる要因は、タンパク質分解によって発生するアンモニアの産生である。そこでタンパク質分解過程の第 1 段階で働くキーエンザイムとしてカルボキシシルプロテアーゼ (CP) の調節に着目した。本論文は、コンポストから分離した耐酸性微生物が産生する CP に関するものであり、耐酸性タンパク質資化性微生物の分離、CP の精製および酵素学的諸性質、CP 酵素一次構造および基質特異性の解析、さらに CP 産生微生物のコンポスト環境中の挙動解析について、実験結果を示し、論究したものである。

(1) コンポストを分離源として、耐酸性タンパク質資化性微生物 *Burkholderia* sp. (MB2, MB7, MB11), *Proteobacteria* novosp. (MB8) を分離した。分離株はいずれも酸性培地中で CP を産生した。培地 pH は、分離菌株の生育にともない、急速に上昇し、5 日間の培養後では pH 6.0 を越えた。このことはタンパク質の一連の資化過程を経て、最終的に脱アミノ化反応によりアンモニアを生じることにより、培地環境の pH を上昇させたものと推測され、本分離菌株がコンポスト酸性環境下におけるタンパク質分解により pH を改善する機能

を有することを示していた。

(2) MB8 株および MB11 株由来の CP (CP MB8, CP MB11) を精製しその酵素学的性質を明らかにした。精製酵素の分子量は 61,000 (CP MB8), 36,000 (CP MB11), 至適 pH は 3.5 (CP MB8), 3.7 (CP MB11), 至適温度は 55°C であった。阻害剤 pepstatin, DAN, および EPNP に対して非感受性を示したが, tyrostatin では作用濃度依存的に酵素活性が阻害された。以上の結果より本酵素 (CP MB8, CP MB11) が Pepstatin 非感受性 CP (EC 3.4.23.33) の一種であると結論した。

(3) 部分アミノ酸配列をプローブとしてクローニングした CP MB8 遺伝子断片の塩基配列より CP MB8 成熟酵素は, 558 残基のアミノ酸からなり, 分子量は 57,871 と推定した。CP MB8 は *Pseudomonas* CP (43.4%) および *Xanthomonas* CP (40.6%) と高い相同性を示した。CP MB8 の C 末端側に存在する 204 アミノ酸残基からなる C-領域は, PCP および XCP の成熟酵素には, 存在しない構造であり, この C-領域の存在が, CP MB8 が PCP および XCP に比べ著しく大きい分子量を示した要因であることを示した。

(4) CP 産生微生物のコンポスト化過程における機能について小型生ゴミ処理機を使用した実験系において検討した。C/N 比の高い有機物のコンポスト化では, 有機酸の蓄積による発酵阻害が生じやすいことが知られている。本実験においても, 実験開始直後に急激な酸性化による発酵阻害が認められた。この発酵阻害期において, pepstatin 非感受性 CP 遺伝子が検出され, pepstatin 非感受性 CP 産生菌の存在が示された。この結果は, コンポスト中の CP 活性の変化, および DGGE (DNA 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) による微生物相の変動解析の結果と符合し, 酸性化したコンポスト環境中に存在する CP が, pepstatin 非感受性 CP 産生菌に由来するものであり, 発酵阻害期におけるタンパク質分解に関与していることを強く示唆していた。バクテリア 16S rRNA 遺伝子の DGGE 解析により発酵阻害期における優占種が, *Burkholderia* 属の一種であること, および MB8 株近縁種ないしは酢酸菌 (*Frateruria aurantio*) 近縁種であることを示した。

以上の結果は, コンポストの反応過程における酸性化と回復の現象を解析し, 酸性タンパク質分解酵素の特性と役割について解明したものであり, 学術的にも応用の観点からも高く評価される。よって審査員一同は, 竹花稔彦が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。