

博士（農 学） 任 淑 坤（レン シュクン）

学 位 論 文 題 名

Studies on Cadmium-Releasing Protease Produced by *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11

（*Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 株による
カドミウム遊離プロテアーゼに関する研究）

学位論文内容の要旨

環境汚染は、世界の中で最も注目されている問題の一つである。中でも、金属汚染は重大な環境問題であり、特に海洋生物に影響を与える。金属汚染は生物組織の変異を引き起こし、海洋食物鎖に乗って、最終的に、人類の健康を脅かす。

日本は世界の中で、最も水産物が豊富であり、特に北海道では、ホタテガイの漁業生産が数十万トン、五百億円あまりに達し、北海道水産業にとって主要な地位を占めている。しかし、一方では生産量の増大に伴って、貝毒問題以外にも水産加工の際に発生する残渣とりわけウロなど軟体部の処理という新たな問題が生じている。

道内で排出されるウロなどの軟体部の量は年間 8～9 万トンと推定され、殆どが陸上で埋立処分されている。オホーツク海や噴火湾沿岸では、埋立処分も悪臭が発生する事や、ホタテガイ中腸線に蓄積されているカドミウムによる環境汚染が懸念されている。

一方で、ホタテガイ加工残渣が高タンパク質であることから、飼肥料や調味料として有効利用する研究が始まっている。しかし、ホタテウロのタンパク質は、カドミウムと強く結合しているため、カドミウムを除去するためには、その結合を分解する事が課題となっている。

市販のプロテアーゼによる分解を試みた結果、ホタテのウロを分解しカドミウムを遊離することが分かった。しかし、より効果的かつ安価にホタテのウロを処理することが求められている。

以上のような背景のもとで、未利用資源利用のためにホタテのウロを効果的に分解するプロテアーゼの探索を行った。

ホタテウロのタンパク質と強く結合しているカドミウムを遊離するために、北海道内の土壌より、プロテアーゼを分泌する約百種の菌株を単離した。そのうち、23-0-11 株は最もカドミウムを遊離させる能力が高いと期待された。本菌はウロを含んだ培地の中でプロテアーゼを生産するが、LB などの培地では生産できないことから、本酵素は誘導酵素だと考えている。この株はグラム陽性、好気性のコリネ型菌で、16S rDNA の配列解析の結果に基づき *Arthrobacter*

nicotinovorans と同定された。それに従いこの菌株を *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 と名づけた。

本菌が培地中に分泌したプロテアーゼを精製することを試みた。その結果、DEAE-Toyopearl 650M と CM-Toyopearl 650M の二つの陰と陽イオン交換クロマトグラフィーによって、単一タンパク質まで、精製できた。本酵素は SDS-PAGE による解析の結果から、相対分子量は 27,000 Da であった。酵素の精製収率は 41.4% であり、25.4 倍の精製率の向上が見られた。しかし、その N 末端から 30 個のアミノ酸配列と部分的中央末端のアミノ酸配列を分析した結果、本酵素と相同性をもつタンパク質は、データベースからは見つからず、新規のプロテアーゼではないかと考えている。

本酵素の至適 pH は 7.0 であり、至適温度は 50℃ あった。また、 Ca^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} などの金属イオン (10mM) の存在下では活性が高まり、 Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} の存在下では活性が阻害されることが分かった。さらに、本酵素は、プロテアーゼの阻害剤の中でも、特にセリンプロテアーゼの阻害剤である Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) によってよく阻害されることから、セリン中性プロテアーゼである可能性が示唆された。

本酵素のカドミウム遊離活性は、市販されている酵素 (endopeptidase PC10) と比べ、その活性は四倍近く高い結果が得られた。この結果より、ホタテのウロからカドミウムを遊離するバイオプロセスが出来ることが確かめられた。*A. nicotinovorans* 23-0-11 株が生産した酵素を用いて、ホタテのウロからカドミウムを液体の培地の中に遊離させ、その後、カドミウムを吸収する *Xanthomonas* sp. UR No.2 株を使って、遊離したカドミウムを吸収させる。さらに、カドミウムを取り除いたウロの粗タンパク質は乾燥させ、飼料にすることができる。

本酵素を用いて、工業的にホタテウロを処理するには、簡便に本酵素を大量に生産する必要があることから、本酵素遺伝子の遺伝子クローニングを試みた。精製酵素標品からのアミノ酸配列を元に合成したオリゴヌクレオチドプライマーを用い、*A. nicotinovorans* 23-0-11 株のゲノム DNA より本酵素遺伝子のスクリーニングを行い、大腸菌中でセリンプロテアーゼ遺伝子の大量発現系を構築し、*A. nicotinovorans* 23-0-11 株以上の酵素生産能を得る事を、現在試みている。

本研究によって、本酵素を用いて、ホタテのウロからカドミウムを遊離することが出来た。他の海産物、例えばイカ、蝦、蟹、魚などの廃棄物にもカドミウムが含まれている。それらの処理にも応用的可能性があると考えられる。それに、それらの海産物の廃棄物にはカドミウムに限らず、他の重金属、鉛などもたくさん含まれている。それらの重金属の処理も期待されている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Studies on Cadmium-Releasing Protease Produced by *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11

(*Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 株による
カドミウム遊離プロテアーゼに関する研究)

本論文は、4章からなり、図 20、表 15、文献 80 を含む総頁数 112 の英文論文である。別に参考論文 2 編が付されている。

日本は世界の中で、最も水産物が豊富であり、特に北海道では、ホタテガイの養殖生産が数十万トン、五百億円あまりに達し、北海道水産業にとって主要な地位を占めている。しかし、一方では生産量の増大に伴って、貝毒問題以外にも水産加工の際に発生する残渣、とりわけウロなど軟体部の処理という新たな問題が生じている。

道内で排出されるウロなどの軟体部の量は年間 8～9 万トンと推定され、殆どが陸上で埋立処分されている。オホーツク海や噴火湾沿岸では、埋立処分も悪臭が発生する事や、ホタテガイ中腸線に蓄積されているカドミウムによる環境汚染が懸念されている。

一方で、ホタテガイ加工残渣が高タンパク質である事から、飼肥料や調味料として有効利用する研究が始まっている。しかし、ホタテウロのタンパク質は、カドミウムと強く結合しているため、カドミウムを除去するためには、その結合を分解する事が課題となっている。

市販のプロテアーゼによる分解を試みた結果、ホタテのウロを分解しカドミウムを遊離することが分かった。しかし、より効果的かつ安価にホタテのウロを処理することが求められている。

以上のような背景のもとで、未利用資源利用のためにホタテのウロを効果的に分解するプロテアーゼの探索を行った。

1. カドミウムを遊離する微生物の単離および同定

ホタテウロのタンパク質と強く結合しているカドミウムを遊離するために、北海道内の土壌より、プロテアーゼを分泌する約百種の菌株を単離した。そのうち、23-0-11 株は最もカドミウムを遊離させる能力が高いと期待された。本菌はウロを含んだ培地の中で

プロテアーゼを生産するが、LB などの培地では生産できないことから、本酵素は誘導酵素だと考えている。この株はグラム陽性、好気性のコリネ型菌で、16S rDNA の配列解析の結果に基づき *Arthrobacter nicotinovorans* と同定された。それに従いこの菌株を *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 と名づけた。

2. *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 株によるカドミウム遊離プロテアーゼの精製

本菌が培地中に分泌したプロテアーゼを精製することを試みた。その結果、DEAE-Toyopearl 650M と CM-Toyopearl 650M の二つの陰と陽イオン交換クロマトグラフィーによって、単一タンパク質まで、精製できた。本酵素は SDS-PAGE による解析の結果から、相対分子量は 27kDa であった。酵素の精製収率は 41.4% であり、25.4 倍の精製率の向上が見られた。しかし、その N 末端から 30 個のアミノ酸配列と部分的中央末端のアミノ酸配列を分析した結果、本酵素と相同性をもつタンパク質は、データベースからは見つからず、新規のプロテアーゼではないかと考えている。

3. 精製したプロテアーゼの性質

本酵素の至適 pH は 7.0 であり、至適温度は 50℃ あった。また、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} などの金属イオン(10mM)の存在下では活性が高まり、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} の存在下では活性が阻害されることが分かった。さらに、本酵素は、プロテアーゼの阻害剤の中でも、特にセリンプロテアーゼの阻害剤である Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) によってよく阻害されることから、セリン中性プロテアーゼである可能性が示唆された。

本酵素のカドミウム遊離活性は、市販されている酵素(endopeptidase PC10)と比べ、その活性は四倍近く高い結果が得られた。この結果より、ホタテのウロからカドミウムを遊離するバイオプロセスが出来ることが確かめられた。*A. nicotinovorans* 23-0-11 株が生産した酵素を用いて、ホタテのウロからカドミウムを液体の培地の中に遊離させ、その後、カドミウムを吸収する *Xanthomonas* sp. UR No.2 株を使って、遊離したカドミウムを吸収させる。さらに、カドミウムを取り除いたウロの粗タンパク質は乾燥させ、飼料にすることができる。

4. カドミウム遊離プロテアーゼの遺伝子のクローニング

本酵素を用いて、工業的にホタテウロを処理するには、簡便に本酵素を大量に生産する必要があることから、本酵素遺伝子の遺伝子クローニングを試みた。精製酵素標品からのアミノ酸配列を元に合成したオリゴヌクレオチドプライマーを用い、*A. nicotinovorans* 23-0-11 株のゲノム DNA より本酵素遺伝子のスクリーニングを行い、大腸菌中でセリンプロテアーゼ遺伝子の大量発現系を構築し、*A. nicotinovorans* 23-0-11 株以上の酵素生産能を得る事を、現在試みている。

本研究によって、本酵素を用いて、ホタテのウロからカドミウムを遊離することが出来た。他の海産物、例えばイカ、蝦、蟹、魚などの廃棄物にもカドミウムが含まれている。それらの処理にも応用的可能性があると考えられる。それに、それらの海産物の廃棄物にはカドミウムに限らず、他の重金属、鉛などもたくさん含まれている。それらの

重金属の処理も期待されている。

よって審査員一同は、任 淑坤（レン シュケン）が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。