

遺伝子組み替え枯草菌による耐熱性プロテアーゼ 生産用培地に関する基礎的研究

上村芳三・村山敬一*・久保幹*・甲斐建一*・幡手泰雄
(受理 平成元年5月31日)

INVESTIGATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR PROTEASE PRODUCTION BY *BACILLUS SUBTILIS* MT-2/pMK1

Yoshimitsu UEMURA, Keiichi MURAYAMA, Motoki KUBO, Kenichi KAI
and Yasuo HATATE

A cultivation study of *Bacillus subtilis* MT-2/pMK1, which produced a highly thermostable neutral protease, was carried out to establish the production technology of the protease. The effect of medium composition on the growth and the protease production of the strain were investigated. Glucose was recommended as the carbon and energy sources for the strain, while, on the other hand, the metabolic intermediates might cause an enzyme repression. The dissolved oxygen in the broth might be one of the significant factors. Calcium did not show the significant effect on the growth and the protease production in the present case. It was suggested that the carbon source, amino acid, and vitamins and minerals were essential for the growth and the protease production.

緒 言

微生物を利用した有用物質の生産あるいはプロセスは、古くは、醸造に始まり、現在、農業、食品、医薬品、排水処理、エネルギー及び鉱物資源回収など、広い分野に応用がひろがりつつある。また、従来は、天然菌、変異を施した菌を利用していたものが、最近の遺伝子組み替え技術の出現により遺伝子組み替え菌も利用できるようになり、その技術の多様化を促している。遺伝子組み替えの宿主としては、従来、大腸菌 (*Escherichia coli*) がよく用いられてきたが、最近、以下のような理由から枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が注目され始めている。¹⁾

- (1) 毒素を生産しないこと。
- (2) 大腸菌のリポ多糖のような発熱物質を生じないこと。
- (3) ペプチド分泌能があることから有用物質の分離精製が容易であること。

微生物によって生産される有用物質の代表的なものの一つとしてプロテアーゼが挙げられる。近年、東ソー(株)の技術陣ら³⁾によって、好熱菌の一種 (*Bacillus stearothermophilus* MK232) が、耐熱性に優れた中性プロテアーゼを生産することが見いだされた。この耐熱性中性プロテアーゼは、ペプチド合成反応用触媒などとして有用であることから、さらにプロテアーゼ生産性に優れた菌株をつくり出すため、今中、久保²⁾によって、*Bacillus subtilis* を宿主とした遺伝子のクローニングが行われた。その結果、*Bacillus stearothermophilus* MK232 を上回るプロテアーゼ生産能を持つ *Bacillus subtilis* MT-2/pMK1 が得られた。

本研究においては、遺伝子組み替え枯草菌 *Bacillus subtilis* MT-2/pMK1 による耐熱性中性プロテアーゼ生産技術を確立するための第1段階として、*Bacillus subtilis* MT-2/pMK1 のフラスコ培養を行い、各種培地成分が、枯草菌の増殖特性並びにプロテアーゼ生産能力に及ぼす影響を検討した。

*：東ソー株式会社

1. 実験

合計24 Runの遺伝子組み替え枯草菌 *Bacillus subtilis* MT-2/pMK1 培養実験を行った。以下、それらにつき培地組成及び培養法について説明する。

1.1 供試菌株

Bacillus subtilis MT-2/pMK1

1.2 培地組成

実験に使用した培地組成(水1リットルに対するグラム数)及び培養条件をそれぞれ表1及び表2に示す。ペプトン, 酵母エキス及びカザミノ酸は, Difco Laboratory社製のものを, その他の薬品としては, 化学用試薬特級を用いた。

表2に示すように, 実験は, Run 1~7, Run 8~17, Run 18~24の3回に分けて行った。

Run 1~7

Run 1は, 炭素源としてグルコースを, 窒素源として硫酸アンモニウムを選んだ実験である。Run 2では, 炭素源及び窒素源としてグルタミン酸ナトリウム(モノ)を選んだ。Run 3及びRun 4は, それらに対する酵母エキスの添加効果を確認しようとした実験である。Run 5では, 炭素源及び窒素源としてカザミノ酸を選んだ。Run 6は, L培地, Run 7は, L培地+グルコースである。

Run 8~17

Run 8は, L培地, Run 9は, L培地の往復振盪培養である。Run 10とRun 11は, グルコースとグリセロールの効果の比較のために行った。Run 12は, カルシウムの添加効果を確認しようとした実験である。Run 13及びRun 14は, それぞれ酵母エキス及びペプトンの増量効果を確認しようとした実験である。Run 15は, ペプトン+無機塩類, Run 16は, それから硫酸アンモニウムを除いたものである。Run 17は再現性確認(Run 8と同じ)のための実験である。

Run 18~24

Run 18及びRun 19は, 何れもL培地であるが, 前者はRun 1~17において使用されたものであり, 後者は, 標準L培地である。Run 20は, L培地のペプトン及び酵母エキスを2倍にしたものである。Run 21は, さらにそれにカゼインを加えたものである。Run 22は, F3倍地と呼ばれる天然培地である。この培地は, *Bacillus subtilis* MT-2/pMK1に対する遺伝子供与株である *Bacillus stearothermophilus* MK232

の良好な培地である。Run 23は, 炭素源として, グルコースを, 要求性アミノ酸として, トリプトファン及びロイシンを, 窒素源として硫酸アンモニウムを使用したものである。Run 24は, 炭素源及び窒素源としてカザミノ酸に, カザミノ酸に含まれない要求性アミノ酸であるロイシンを加えたものである。

1.3 培養実験手順

培養実験は, 試験官による前培養とそれに続くフラスコ培養により行い, フラスコ培養終了後, 培地のOD₆₆₀及び培地上清の酵素活性を測定した。試験管による前培養は, カナマイシンを5 µg/mlを使用して, 振盪恒温槽中37°Cで21~24時間(表2)行った。培養実験には, 容量500mlのバッフル付き三角フラスコを使用し, 表1に示す各種培地100ml中に, 前培養液1mlを植菌して開始した。37°Cに保ったロータリー振盪式のインキュベータ中, 160rpmで16~21時間(表2)培養を行った。ただし, Run 9のみについては, 往復振盪培養を行った。

1.4 分析法

培養終了後, 分光光度計により培養液のOD₆₆₀を, pHメーターにより培養液のpHを測定した。OD₆₆₀の測定に関しては, 吸光度の実測値が0.1前後となるよう生理食塩水で希釈を行った。酵素活性は, 培養終了後の培養液上清(15000rpmで5min遠心分離)を試料としてカゼイン消化法(基質:ハマルステン氏法カゼイン)により測定した。

2. 実験結果及び考察

表3, 表4及び表5に実験結果を示す。

Run 1, 2, 3, 4及び5より, グルコース+硫酸アンモニウム(Run 1), グルタミン酸ナトリウム(Run 2)あるいはカザミノ酸(Run 5)を炭素及び窒素源とした場合, 増殖, 酵素生産ともほとんど起こらず, 酵母エキスを加えると(Run 3及び4), 増殖, 酵素生産にかなりの向上が見られる。*Bacillus subtilis* MT-2/pMK1の増殖及び酵素生産には, ビタミン, アミノ酸, ミネラルの存在が有効であることが示唆される。Run 6及び7の結果より, L培地にグルコースを加えても増殖速度は変わらないが, 酵素生産が大幅に減少していることがわかる。即ち, グルコースを培地に加えることにより酵素抑制が起こっており, 直接の抑制因子は, グルコースの解糖による代謝

Table 1 Media compositions (g per liter water)

Run No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Wheat flour																						30			
Glucose	10		10				5			5													10		
Glycerol										5															
Defatted soybean																						15			
Peptone						5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	5	5	10	20	20				
Casein																					4	4			
Yeast extract			1	1		5	5	5	5	5	5	5	10	5											
Casamino acid					10																			10	
Sodium glutamate				10																					
L-Tryptophan																							0.1	0.1	
L-Leucine																							0.1		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2				2										2								2		
KH ₂ PO ₄	1	1	1	1	1										1	1						1.5	1	1	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1	1	1	1	1										1	1							1	1	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2										0.2	0.2							0.5	0.2	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1						0.2				0.1	0.1							0.2	0.1	0.1
NaCl						3	3	3	3	3	3	3	3	3			3	3	3	5	5				

Medium pH was adjusted to 7.0 with NaOH(aq.) before autoclave (121°C x 15min).
After sterilization, kanamycin was added (5 µg/ml).

Table 2 Experimental conditions

Run No.	Pre-culture in test-tube at 37°C (*1)	Culture in 500ml baffled flask at 37°C (*2)
1~7	24	16
8~17	21	21
18~24	23	19

*1 5ml of L broth containing 5 μ g-kanamycin/ml was used.

*2 1ml of pre-cultured broth was added to 100ml of medium (Table 1) in each flask.
A rotary shaker was used at 160rpm except for Run 9 (reciprocal 104rpm).

Table 4 Experimental results (2)

	Growth (OD ₆₆₀ [-])	Protease activity [U/ml]	Activity/ Growth [U/ml]	Broth pH after cultivation
8	3.53	1380	391	8.77
9	3.60	1640	456	8.78
10	2.92	0	0	5.11
11	2.32	0	0	5.00
12	3.27	1280	391	8.77
13	4.75	1720	362	9.00
14	4.47	2260	506	8.93
15	1.90	630	332	8.38
16	2.25	490	218	8.28
17	3.34	1400	419	—

産物である有機酸による pH 低下の可能性が高い。直接分析による有機酸生成の確認は行わなかったが、Run 7に限らず、グルコースを使用した培地 (Run 3, 10及び23) において、培養終了後の液 pH が5~6と低いことから間接的にその生成が示唆される。また、L培地での最終 pH が8.24であるのに対し、L培地+グルコースの最終 pH が5.26であることから、*Bacillus subtilis* MT-2/pMK1 は、グルコースをエネルギー源あるいは炭素源として優先的に資化する特性を持っていると考えられる。

Run 8及び9より、ロータリー式の振盪培養 (Run 8) と往復式の振盪培養 (Run 9) では、増殖に差異は無いが、酵素生産は、往復式はロータリー式の1.2倍となっていることがわかる。このような差は、培

Table 3 Experimental results (1)

	Growth (OD ₆₆₀ [-])	Protease activity [U/ml]	Activity/ Growth [U/ml]	Broth pH after cultivation
1	0.70	1.1	2	6.13
2	0.305	40.2	132	6.71
3	1.32	24.0	18	5.98
4	1.06	94.3	89	7.67
5	0.52	17.9	34	6.86
6	2.88	586	203	8.24
7	2.50	16.7	7	5.26

Table 5 Experimental results (3)

	Growth (OD ₆₆₀ [-])	Protease activity [U/ml]	Activity/ Growth [U/ml]	Broth pH after cultivation
18	2.32	1990	858	8.68
19	3.72	1940	522	8.66
20	7.74	2670	345	8.52
21	7.22	2190	303	8.44
22	—	760	—	5.45
23	0.11	97	882	6.42
24	0.34	105	309	7.40

地中の溶存酸素が振盪方式により異なるためと考えられる。Run 10及び11より、グリセロールもグルコースと同じく酵素抑制を引き起こすことがわかる。グルコースとグリセロールは、何れも解糖経路においてグリセルアルデヒド-3-リン酸以降は同じ経路をたどるので、これ以降の代謝産物 (特に前述したように有機酸) が直接の抑制因子となっている可能性が極めて高い。Run 12より、塩化カルシウム添加の効果は、今回の実験では、あまり認められなかった。Run 13及び14より、酵母エキスの増量は、酵素生産にほとんど効果を示さないのに対し、ペプトンの増量は、酵素生産をかなり向上させることがわかる。しかしながら、Run 15及び16より酵母エキス抜きペプトン+無機塩培地では、増殖及び酵素生産とも不良であるので、酵母エキス中のビタミン、ミネラルも重要な役割を果たしていると考えられる。Run 17の結果は、Run 8の結果とよく一致していることから、実験の再現性は良好である。

Run 19及び20より、L培地で酵母エキス及びペプトンを同時に2倍に増やすと、OD₆₆₀ 2.1倍、酵素活性1.4倍となり、菌体増殖及び酵素生産に対してかなりの効果があることがわかる。また、Run 21より、カゼイン添加の効果は全く無い。Run 22の結果は、*Bacillus stearothermophilus* MK232の良好な培地であるF3培地は、*Bacillus subtilis* MT-2/pMK1に対しては少なくとも酵素生産については効果が無いことを示している。F3培地は小麦粉を懸濁状態で含有しているので、OD₆₆₀の測定は行わなかった。Run 23及び24は、炭素源+窒素源+要求性アミノ酸を別々の方法で満たした培地による実験の結果であるが、増殖、酵素生産とも極めて不良である。これらの培地においては、L培地に比べ、ビタミン及びミネラルが不足しており、ビタミン及びミネラルの役割の重要性を示す結果であるとも言える。

結 言

Bacillus subtilis MT-2/pMK1によるプロテアーゼ生産を目的としたフラスコ培養による培地の検討を行った。その結果、以下のような知見を得た。

(1) グルコースは、非常に資化され易い炭素及びエネルギー源である。しかし、その代謝産物であ

る有機酸により酵素抑制を引き起こしている可能性が高い。

- (2) 振盪様式により酵素生産量が異なることから、溶存酸素が重要な因子であることが推察される。
- (3) カルシウムの添加は、菌体増殖あるいは酵素生産に対して効果が認められなかった。
- (4) 遺伝子供給株である *Bacillus stearothermophilus* MK232の良好な培地(F3)は、*Bacillus subtilis* MT-2/pMK1に対しては有効で無いことが判明した。
- (5) 炭素源及びビタミン、アミノ酸、ミネラルをバランス良く含んだ(L培地の如く)培地が菌体増殖及び酵素生産に欠かせないものであることがわかった。

Literature cited

- 1) Imanaka, T. : BIO INDUSTRY, 4, 17 (1987).
- 2) Kubo, M. and T. Imanaka : Journal of General Microbiology, 134, 1883 (1988).
- 3) Kubo, M., K. Murayama, K. Seto and T. Imanaka : Journal of Fermentation Technology, 66, 13 (1988).