

ミミズ由来酵素とその腸内細菌由来酵素に関する研究： 安定かつ高活性なセリンプロテアーゼなどの酵素類の応用利 用に関して

中島伸佳*

要旨 東洋諸国を中心に漢方薬として用いられ、タンパク質資源としても貴重なミミズ (Earthworm) は、極めて安定で強力なプロテアーゼを生産しており、その触媒機能として強力な血栓溶解能や、難分解性タンパク質などの加水分解作用が確認された。遺伝子構造が異なる本酵素のアイソザイム 6 種類を単離・精製し、それらの遺伝子のクローン化を行うと共に、タンパク質構造と触媒機能を詳細に解明した。ミミズプロテアーゼは有機溶媒にも耐性であり、常温においては自己消化による失活を伴わないアルカリセリンプロテアーゼであった。また、ミミズ腸内細菌の一群である放線菌由来の繊維素分解酵素類や酸化還元酵素類の酵素科学的性質や触媒機能も併せて精査した。

キーワード：ミミズ、放線菌、タンパク質分解酵素、繊維素分解酵素、酸化還元酵素

はじめに

世界中のいたるところで生息し、「生態系における分解者」でもあり、また「地龍」という名の漢方薬あるいは保健薬として中国などの東洋諸国を中心に古くから服用されているミミズ (Earthworm) は、「貧毛類」と称される環形動物のなかまである。このミミズは、極めて安定で高活性なプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) を生産している。ヨーロッパ縞ミミズ (*Lumbricus rubellus*) 由来のプロテアーゼは、それぞれが異なった遺伝子構

造 (塩基配列) を有する 6 種類の「アイソザイム (Isozyme A、B、C、D、E、及び F)」(図 1) から構成される「アルカリセリンプロテアーゼ」であり、基質特異性 (反応特性) も多様性に富み、それぞれの分子量は 23 から 30 kDa、等電点 (pI) は 3.4 から 4.8 の、アスパラギン酸などの構成アミノ酸に富む酸性の「モノマータンパク質」であった。なお、他の種属のミミズ由来のプロテアーゼのアイソザイムも、*L. rubellus* のそれらとほぼ同様の構造 (種類) と機能を有していると考えられる¹⁻⁹⁾。

本稿では、ミミズプロテアーゼの酵素科学的特性、安定性、遺伝子のクローン化と高発現化、タンパク質構造や遺伝子構造と触媒機能、それらの触媒機能の物質合成・変換への応用について、さらに、ミミズ腸内細菌 (放線菌) 由来の繊維素分解酵素や酸化還元酵素類についての酵素科学的性質や触媒機能に関する研究成果を報告する。

1. ミミズプロテアーゼの酵素化学的特性

ミミズプロテアーゼは、広い pH 条件下において、きわめて安定であり、65℃ 以上の加熱によって急激に促進される「自己消化」に伴う失活が生じな

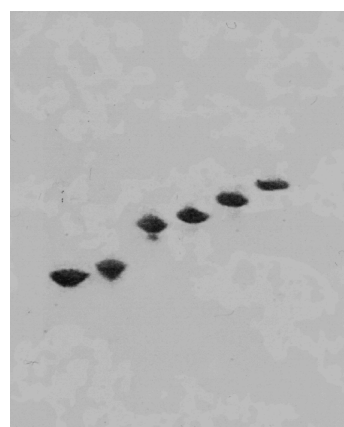


図 1 ミミズプロテアーゼの電気泳動ゲル写真

6 種類の精製ミミズプロテアーゼ、
A: アイソザイム A,
B: アイソザイム B,
C: アイソザイム C,
D: アイソザイム D,
E: アイソザイム E,
F: アイソザイム F.

A B C D E F

* 岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

ければ、室温下の溶液状態では少なくとも10数年間以上は活性を保持し（図2）、また60℃以下であれば、酸性およびアルカリ性条件下でも長期に渡って安定なセリンプロテアーゼである⁹⁾。しかも、本プロテアーゼは各種の有機溶媒存在下においても安定であり、ヘキサンやトルエンなどに対しても強い耐性を有していた（図3）。さらに、本酵素は各種の界面活性剤や高濃度の塩類にも耐性を示した^{5,7)}。

本酵素はフィブリン（血栓）のみならず、コラーゲンやエラスチンなどにも作用し、ペプチド類、エステル化合物や「生分解プラスチック」などの加水分解も触媒することができる⁵⁾。フィブリンに対する血栓溶解活性（Table 1）は、各アイソザイムの中で、「アイソザイム A、及び B」が最も活性が強く、続いて「アイソザイム C、D、E、そして F」の順に弱くなったが、各アイソザイムのペプチド（クロモザイム基質）に対する基質特異性は大きく異なっていた。特に、「アイソザイム C」は、タンパク質やエステル化合物の加水分解のみならず、中性脂肪（トリオレインなど）の脂肪酸とグリセロールへの加水分解も触媒することが明らかにされた¹²⁾。

2. ミミズプロテアーゼの安定性と立体構造

上述したようにミミズプロテアーゼは、高濃度の有機溶媒や塩類にも耐性であり非常に安定な酵素である。本酵素の「安定化機構」を明らかにするために、「アイソザイム A および B」において65℃以上の加熱によって促進される「自己消化」の際の、本酵素タンパク質内部の初発の切断部位が、144番目のアルギニンのカルボキシル基側であることが特定された⁴⁾。また後述するように、高次構造の解析により、ミミズプロテアーゼは「哺乳動物由来のトリプシン」などの活性中心（セリン、アスパラギン酸、およびヒスチジンのアミノ酸残基からなる触媒部位：catalytic triad）やサブサイト（subsite）などに相当するアミノ酸配列は良く保存されている典型的なアルカリセリンプロテアーゼであったが、上述したように基質特異性は、各アイソザイム間で異なっており、さらには、本酵素の自己消化は、トリプシンなどの「自己消化領域（autolysis loop）」と構造的に対応する部位では生じない（本領域内に自己消化サイトが存在せず、しかも144番目のアルギニンはその領域内には位置しない）ことや、本酵素が「beta-構造」に富んでいることなどが明らかになっ

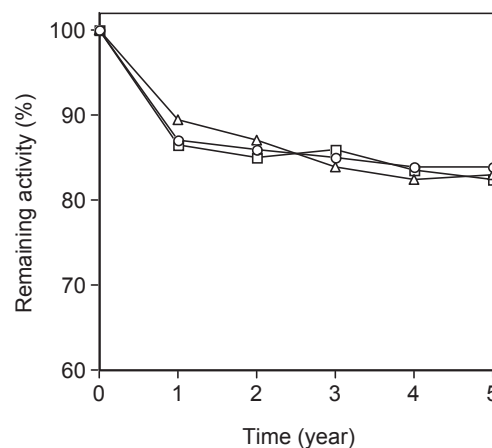


図2 ミミズプロテアーゼの安定性

室温条件下、10mM Tris-HCl buffer (pH7.0) 中で放置。△：1mg/ml のミミズプロテアーゼアイソザイム A、□：アイソザイム C、○：アイソザイム E。

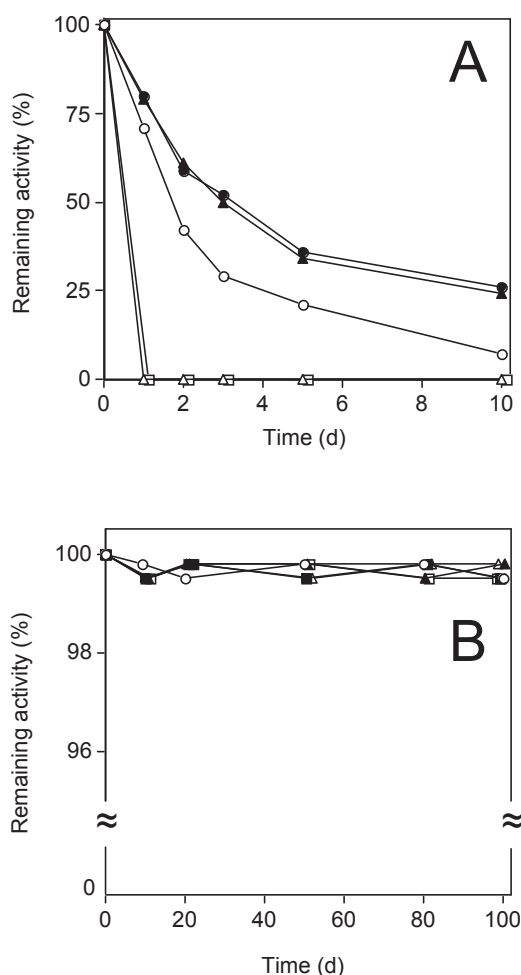


図3 ミミズプロテアーゼの有機溶媒に対する耐性

室温条件下、1mg/ml のミミズプロテアーゼアイソザイム A、及びトリプシン（ブタ）を50%有機溶媒水溶液、もしくは有機溶媒100%中で放置。A: トリプシン（ブタ）、B: アイソザイム A、●：2-プロパノール、▲：アセトン、△：トルエン、□：ヘキサン、○：対象（buffer のみ）。

Table 1. Substrate specificity of the earthworm proteases

Substrates	Isozyme A	Isozyme B	Isozyme C	Isozyme D	Isozyme E	Isozyme F
Fibrin (CU/mg) ^a	204	243	22	5.6	6.1	3.0
H-D-Phe-Pip-Arg- <i>p</i> NA (%) ^b	100	100	33	14	10	25
pyr-Glu-Gly-Arg- <i>p</i> NA (%) ^b	93	75	67	0	0	0
H-D-Ile-Pro-Arg- <i>p</i> NA (%) ^b	20	40	0	100	100	25
H-D-Val-Leu-Arg- <i>p</i> NA (%) ^b	27	58	0	21	23	100
H-D-Val-Leu-Lys- <i>p</i> NA (%) ^b	14	39	0	0	0	0
Bz-L-Arg- <i>p</i> NA (%) ^b	2	3	0	0	0	0
Bz-L-Tyr- <i>p</i> NA (%) ^b	0	0	0	0	0	0
MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val- <i>p</i> NA (%) ^b	0	0	100	0	0	0
Suc-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> NA (%) ^b	0	0	0	0	0	0

^a The enzyme activity was expressed as casein unit (CU/mg of protein) with human plasmin as a standard.

^b The relative substrate specificity (%) for the chromogenic substrates was determined spectrophotometrically.

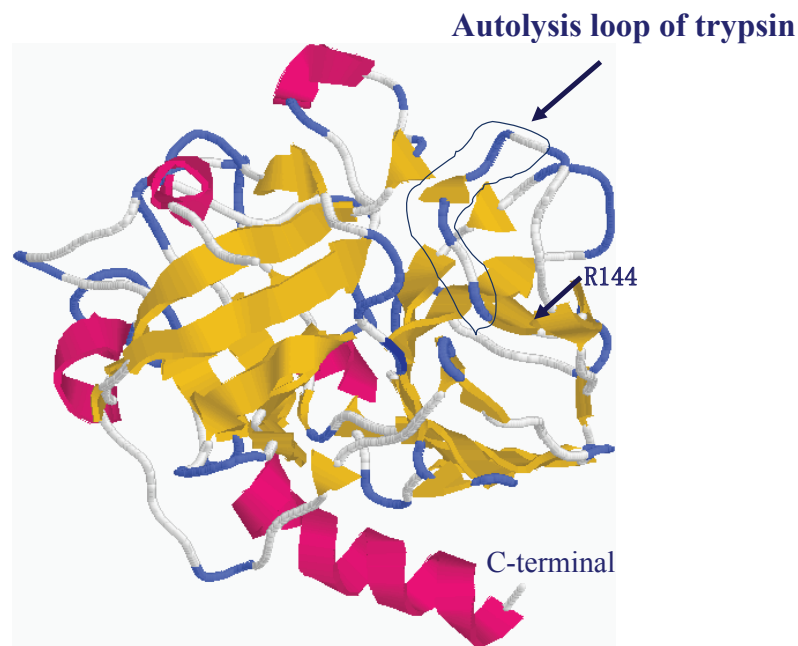


図4 ミミズプロテアーゼの高次構造

「線囲み」の部分がトリプシンの自己消化ループに相当する領域（切断部位は、アイソザイム A には存在しない K のカルボキシ側）。「矢印」で示す R-144 のカルボキシ側がミミズプロテアーゼアイソザイム A の初発の自己消化サイト。

た（図4）。従って、これらのことが本酵素の安定性を裏付ける理由のひとつであると考えられる^{6,9)}。

3. ミミズプロテアーゼの構造と機能

高活性で安定な「アイソザイム A および B」の構造遺伝子を、高発現ベクターシステムを用いて酵

母細胞にクローン化し、菌体外酵素としてプロテアーゼ活性を高発現させる量産法が、杉本 学（岡山大学）や著者らにより確立された。また同時に、「アイソザイム A および B」の全塩基配列（図5）と全アミノ酸配列（図6）が解明された。各遺伝子は、数個のアミノ酸からなる比較的、短いシグナル

A		
GTCTACTTCTGCTCTTCGATCGCTGAGCGTGGGCTTTGCCCAACCACTGCTGCTACCCCGTGTCAATGCGGTGTCAGCCAGTA	90	
TTGATGCTGCTGGGACATGGAATCTCTCCCGGAAGATTGTCGGAGAAATGAAGCCAGACATACGAGTTCCATGGCAGGTGTCGT	180	
M E L P P G K I V G G I E A R P Y E F P W Q V S V	18	
(-1) (+1)		
CCGAGGAAGTCTTCTGATTCCCATTTCTGCGGAGGTACATCAACGATGCTGGGTTGCTGCGGTGCTCACTGATGACGAGGAGA	270	
R R K S D S H F C G G S I I N D R W V V C A A H C M Q G E	48	
GAGCCTGCTGCTGCTCTCAATTGCTGCGGACGACATAGCAGCGCTGCGAGTACAGTACGATCATGATGTTGATAGCATCTT	360	
S P A L V S L V V G E H D S S A A S T V R Q T H D V D S I F	78	
CGTCAACGAAATACGATCCCGTACACTAGAAAACGAGCTTCTGTCATCAAGACAGTATGCTATCACCTTCGACATCAACGTTGG	450	
V N E N Y D P R T L E N D V S V I K T A I A I T F D I N V G	108	
ACCACTCTGCTCCAGATCCGCTAACGACTACGTCTACCGTAAGAGCGAGTGTCCGATGCGGAATCAATTCAGGTGGAATCTG	540	
P I C A P D P A N D Y V Y R K S Q C S G W G T I N S G G I C	138	
CTGTCCCGCAGTTTGGGATATGTTACATGAACATCAACACCAACGCTTCTGCGACGCGCTACACATCGGACATCTACGAGA	630	
C P A V L R Y V T L N I T T N A F C D A V Y T S D T I Y D D	168	
TATGATCTGCGGACAGACACATCGGATGACGACAGAGACTCTCGGACGCTGACTCCGCGGCGCTCTGAGCGTCAAGGATGCGAC	720	
M I C A T D N T G M T D R D S C Q G D S G G P L S V K D G I F	198	
CGAATCTTCAGTCTGGTGGCATTTGCTCTGGGAAATGTTGGCTCTGGCTATCCAGAGTTTACTCCGCGTGGGATTTATCG	810	
G I F S L G G I V S W G I G C A S G Y P G V Y S R V G F H A	228	
TGGATGATACCGACAGATCAACAAACATACCGAGATGCGCAGTCAACTATAACGAGCTTATTAACCTCAGTTAAGCTGCT	900	
G W I T D T I T N N *	238	
CATGCAGAACATGACCTTTTCATCGCTATAGGTCCACTAAACACAGATGATGATAGTTAAAGATCGTGGTGACACGA	990	
AATAAATCTATCTACTGGG	1011	
B		
GTCTACTTCTGCTCTTCGATCGCTGAGCGTGGGCTTTGCCCAACCACTGCTGCTACCCCGTGTCAATGCGGTGTCAGCCAGTA	90	
CTCAGATGCTGCTGACATGGAATCTCTCCCGGAACAAATTTGTCGGAGAAATGAAGCCAGACATACGAGTTCCATGGCAGGTGTC	180	
M E L P P G T K I V G G I E A R P Y E F P W Q V S	17	
(-1) (+1)		
CGTCCGAGGATCTTCGATTCGATTTCTGCGGAGGTAGATCATCAACGATGCTGGGTTGCTGCGGTGCTCACTGATGACGAGG	270	
V R K S D S H F C G G S I I N D R W V V C A A H C M Q G	47	
AGAGCCCGCTCTGCTTTCATTTGCTGCTGGTGGACAGACAGAGTGCAGCGAGTACAGTACGTCAGACTCATGACGTTGATAGAT	360	
E A P A L V S L V V G E H D R S A A S T V R Q T H D V D S I	77	
CTTCTCCAGGAGTACAAACGAAATACCTAGAGACAGCTTTCTGTCATCAAGACATCTGTTGCCATCACTTCGACATCAACGT	450	
F V H E D Y N A N T L E N D V S V I K T S V A I T F D I N V	107	
TGGTCAATCTGCGCCAGATCGGCTAACGACTACGTCTACCGTAAGAGCAGTGTTCGGATGGGGAATCAATTCAGGTGGAAT	540	
G P I C A P D P A N D Y V Y R K S Q C S G W G T I N S G G I	137	
CTGCTGCCAACGTTCTGCGATACGTGACGCTGAATGTCACAAACCAATTTCTGCGAAGATGTATACCCACTAAATTCATCTACGA	630	
C P N V L R Y V T L N V T T N Q F C E D V Y P L N S I Y D	167	
CGATATGATTGCGGCTGGACAAACATCGGGGTAAACAGAGACTCTGCGAGGCTGACTCCGCGGCGCTCTGAGGTCAGGATGG	720	
D M I C A S D N T G G N D R D S C Q G D S G G P L S V K D G	197	
CAGTGAATCTTCAGCTGATGTTGATTTGCTCTGGGAAATGTTGCGCTTCTGGCTATCCAGGAGTCTACTCCGCGTGGATTCCA	810	
S G I F S L I G I V S W G I G C A S G Y P G V Y S R V G F H	227	
TGCTGATGATACCGAGTATCAACAAACATCAACGAGATTTCCAGTGCATATAACGAGTCTTACCATCAACGAGAC	900	
A A W I T D I I T N N *	238	
ACATTAATTAATTAATGATTAACATAAATAAATCTCTCTACTCACAGATCGTTGTAGAACAAATGT	973	

図5 ミミズプロテアーゼの全塩基配列

A: ミミズプロテアーゼアイソザイム A, B: アイソザイム B。

ペプチドを含む 245 アミノ酸をコードする ORF を含む 1011bp、及び 246 アミノ酸をコードする ORF を含む 973bp で構成されていた⁶⁾。また、ミミズプロテアーゼは、「プレプロ配列」を含む構造で翻訳され、プロセッシングを受けて活性化されるが、そのシグナルペプチド（活性化ペプチド）も、他の生物由来の類似のプロテアーゼと比較して、そのペプチド鎖が短いという特徴を有していた^{6,9)}。

次に、「アイソザイム C」についてはペプチドシーケンス（全アミノ酸配列分析）により、242 個のアミノ酸からなる全一次構造が解明された¹⁰⁾。

また、「アイソザイム A および C」の beta- アミロイド 1-40 やインシュリン B 鎖に対する、それぞ

	1	10	20	30	40	50	60
A	I VGGI EARPYEFPWQVSVRRKSSDSHFCCGSI I NDRWVCAAHCMQGESPALVSLVVEH						
B	I VGGI EARPYEFPWQVSVRRKSSDSHFCCGSI I NDRWVCAAHCMQGESPALVSLVVEH						
BT	I VGGYTCGANTVPYQVSL---NSGYHFCGSLI NSQWVSAAHCMQKSGI QVRL---GED	20	30	40	50	60	70
		70	80	90	100	110	120
A	DSSAASTVRQTHDVDSI FVNENYDPRITLNI VSVI KTAI AI TFDI NVGPI CAPDPANDYV						
B	DRSAASTVRQTHDVDSI FVHEDYNANTLNI VSVI KTSVAI TFDI NVGPI CAPDPANDYV						
BT	NI NVVEGNEQFI SAKSI VHPSYNSNTLNII MLI KLKSAASLNSRVASI SLP-TSCASA	80	90	100	110	120	130
		130	140	150	160	170	180
A	YRKSQCSCGWGTI NSGGI CCPAVLRYVTLNI TTNAFCDAVYTSDDI YDDMI CATDNTGMD						
B	YRKSQCSCGWGTI NSGGI CCPNVLRYVTLNVTNQFCEDVYPLNSI YDDMI CASDNTGMD						
BT	GTQCLI SGWNTKSSGTSYDVLKCLKAPI LSDSSCKSAYPGQ-ITSNMFCAYLEG--G	140	150	160	170	180	
		190	200	210	220	230	238
A	HSQCGLSGGPLSVKDGSGI FSLGGI VSWG I GCASGY- PGVYSRVGFHAGWI TDTI TNN						
B	HSQCGLSGGPLSVKDGSGI FSLGI VSWG I GCASGY- PGVYSRVGFHAAWI TDI I TNN						
BT	HSQCGLSGGPVCSG-----KLQGI VSWGSCAQKNKPGVYTKVCNYSVSI KQTI ASN	190	200	210	220	230	245

図6 ミミズプロテアーゼの全一次構造（アミノ酸配列）

A: ミミズプロテアーゼアイソザイム A, B: アイソザイム B, BT: トリプシン（ウシ）。「囲み部分」の H, D（左から 2 つ目）と S が触媒残基。「囲み部分」の D（3 つ目）が基質結合残基（primary substrate determinant）。「スターマーク」がサブサイト（subsite）。「三角印」が自己消化サイト。

れの切断サイトの特異性（cleavage specificity）も解析され（図 7）、他のセリンプロテアーゼと比べて、本酵素は幅広い基質特異性を示すことが明らかになった⁴⁾。

さらに、トリプシンやキモトリプシンの両者の触媒機能を有する「アイソザイム A」と、エラスターゼとその構造と機能が類似している「アイソザイム C」の、それぞれの「基質結合部位（substrate binding pocket）」の分子構造も詳細に解析された（図 8）^{6,9)}。

4. ミミズプロテアーゼの触媒機能の物質合成・変換への応用

本プロテアーゼ機能の有用物質合成や変換への応用利用の具体例として、「実際にラットの大静脈中に生じさせた血栓のミミズプロテアーゼによる溶解」、「ヒト血清アルブミン断片を結合させ抗原性が低く血中安定性の高い化学修飾ミミズプロテアーゼの創造」、並びに「不活性高分子担体にミミズプロテアーゼを結合させ、連続的にフィブリンを分解することができる固定化酵素バイオリアクターの構

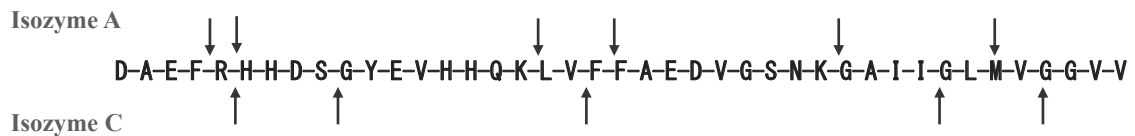
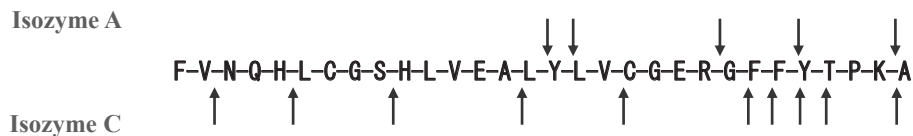
β-amyloid 1-40**oxidized insulin B-chain**

図7 ミミズプロテアーゼの切断サイトの特異性

「矢印」がアミロイド 1-40 とインシュリン B 鎖に対する、ミミズプロテアーゼアイソザイム A、とアイソザイム C のそれぞれの切断サイト。

	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
BT	IVGGYTCGANTVPYQVSL	---	N	---	SGYHFCGGSLINSQWVVSAA	ICYKSGIQVRL	---	G	EDNINVVEGNEQFISASKSIVHPSYNS	---NTLN
A	IVGGIEARPYEFPWQVSVRRKS	---	SDSHFCGGSI	INDRWVVCAA	ICMQGESPALVSLVVG	---	EHDSSAASTVRQTHDVSIFVNENYDP	---	RTLE	89
C	VIGGTNASPGFEPWQLSQQRQS	---	GSWSHSCGASLLSSTSALSAS	ICVDGVL	PNNIRVIAG	---	LWQQSDTSGT	---	QTANVDSYTMHENYAGTASY	91
EL	VVGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTL	---	IRQNWVMTAA	ICVDREL	TFRVVGEH	---	NLNQNDGT	---	E-QYVGQKIVVHPYWNDDVAAG	91
	110	120	130	140	150	160	170	180		
BT	NDIIMLIKLSAASLNSRVASISLP	---	TSC	---	ASAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPDVLKCLKAPILSDSSCKSAYP	---	GQ	---	ITSNMFCAGYLEG	---
A	NDVSVIKTAIAITFDINVGPICAPDPAN	---	DYVYRKSCQCSGWGTINSGGICCPAVLRYVTNLNITNAFCDAVYT	---	SDTIYDDMICATDNTGMT		179			
C	NDIAILHLATSISLGGNIQAAPANNNDYAGTTCVISGWGRTD	---	GTNNLPDILQKSSIPVITTAQCTAAMVGVGGANIWDNHICVQDPAGNT		184					
EL	YDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILANNPCYITGWGLTR	---	TNGQLAQTLLQAYLPTVDYAISSSSSY	---	WGSTVKNSMVCAGG	---	DGVR		181	
	190	200	210	220	230	240	245			
BT	GKDS	CGQDS	GGPVVCSGK	---	LQGI	VS	WGS	---	GCAQKNKPGVYTKVCNYSWIKQTIASN	
A	DRDS	CGQDS	GGPLSVKDGS	GI	SLGGI	VS	WGI	---	GCASGY	PGVYSRVGFHAGWITDTITNN 238
C	---	GACNGD	SGGPLNCPDGGTR	---	VVGVT	SWVSSGLGRCLPDYPSVYTRVSAYL	---	LGWIGD	NSR	---
EL	---	SGCQGD	SGGPLHCLVNGQYA	---	VHGVTS	FVS	---	RLGCNVTRKPTVFTRVSAYISWINNVIASN		240

図8 ミミズプロテアーゼの触媒残基、及び基質結合部位の構造の比較

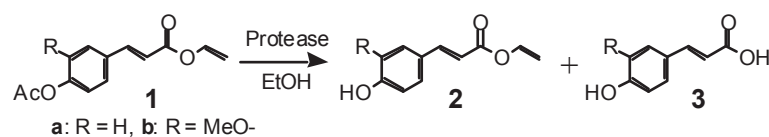
BT: トリプシン (ウシ)、A: ミミズプロテアーゼアイソザイム A、C: アイソザイム C、EL: エラスターゼ (ブタ)。「囲み部分」が触媒残基 (H, D, S)、「スターマーク」が基質結合残基 (primary substrate determinant)、及びサブサイト (subsite)、「三角印」が基質結合ポケット (substrate binding pocket) の入り口部分の残基。

築」などに関する研究が著者らにより実施された³⁾。

続いて、本酵素の加水分解作用により「生ミミズ」から調製が可能な「ミミズ自己消化エキス」の味覚や成分組成が「市販の加塩大豆醤油」のそれらと類似していること (ミミズエキスの塩分含量は極めて低いことを除いて) が実証され、そのエキスの抗酸化作用や血圧降下作用などの保健機能、さらには微生物の培養に用いる「ペプトンの代用品」とし

での効果などを実証した⁵⁾。

ミミズプロテアーゼは、プロテアーゼとしての触媒作用に限らず、本酵素が示すエステラーゼ活性やリパーゼ活性の応用も大いに期待できると考えられるが、本酵素を利用した有用機能性物質の合成法の一例として、有機合成の原料に用いられるアセチル p- クマール酸ビニルのアセチル基の選択的な脱離方法 (ビニルエステル部分を加水分解しない変換法)

Table 2. Enzymatic regioselective deacylation of **1** in EtOH^a

Protease	1a		1b	
	2a (%) ^b	3a (%) ^c	2b (%) ^b	3b (%) ^c
Isozyme C	55	0	48	0

^a Incubated in EtOH at 37°C for 48 h^b Isolated yield^c The isolated yield of the by-product (also hydrolysis of vinyl ester moiety)

が、ミミズプロテアーゼを用いる「アルコリシス法」として報告されている (Table 2)¹⁰⁾。

また、須貝 威 (慶応義塾大学) らは、ミミズプロテアーゼを用いた「加水分解反応による光学活性物質合成」への応用について研究を行った。すなわち、アミノ酸のひとつであるプロリンの合成前駆体として有名な N-ベンジルオキシカルバモイルプロリンメチルエステルの速度論的光学分割を行った結果、「アイソザイム A」は S 体の N-ベンジルオキシカルバモイルプロリンメチルエステルの「エステル結合部分」を選択的に加水分解し、「アイソザイム C」は R 体のメチルエステルを選択的に分解するという立体選択性を示すことが明らかになった⁸⁾。

ところで、近年、人口の増加や嗜好性の多様化により様々な食糧増産が行われてきた結果、家庭や食品工場などから多量の「有機性廃棄物」が排出され、その焼却処理などに伴う環境汚染が社会問題となっているが、21 世紀においては、「化石資源」を燃焼させる非持続的経済構造を改め、農畜水産物や食品廃棄物、あるいは家畜排泄物などの有機性資源を中心とした「バイオマス」を再利用し、持続的な資源循環 (リサイクル) 型経済社会構造を確立することが求められている。

そのため、著者らは、ミミズプロテアーゼと、下記に示すミミズとの共生細菌由来の繊維素分解酵素などを共役的に用いて「有機性バイオマス廃棄物」の分解を進めることで、それらの再資源化を可能にし、環境に優しく効率的な循環型バイオマス分解シ

ステム (土壌への生物的還元 of 効率化と焼却などに伴う環境への負荷の軽減化) の構築を計画している。

5. ミミズ腸内細菌由来の繊維素分解酵素や酸化還元酵素の触媒機能の物質合成・変換への応用

ミミズは、安定かつ高活性なアルカリセリンプロテアーゼを産生すると共に、強力なアミラーゼ活性やリパーゼ活性も有している。ところが、「アイソザイム C」を中心に中性脂肪の加水分解反応を触媒するという事実を上述したが、不思議なことに「いわゆるリパーゼ」と呼ばれている「酵素タンパク質」は産生していないようである。また、ミミズも動物であるが故に、セルラーゼやキシラナーゼなどの「繊維素分解酵素 (多糖類分解酵素)」も消化酵素としてほとんど分泌していないようである。

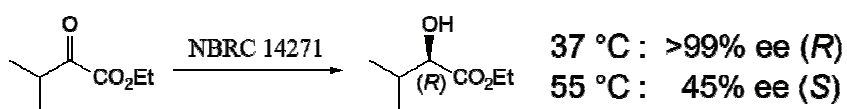
そこで、石原浩二 (岡山理科大学) や著者らにより、ミミズやその共生細菌の一群である放線菌から、基質に対する立体選択性が異なる有能な「ケトエステル還元酵素」などの酸化還元酵素類の未知の酵素遺伝子群を新たに探索する方法の開発に関する研究を行ってきたが¹⁴⁻¹⁷⁾、上述したように有機性資源や食品廃棄物などを中心とした「バイオマス」を再利用する持続的な循環型経済社会構造の確立を目指し、ミミズプロテアーゼなどのミミズ由来酵素類と繊維素分解酵素類、あるいは酸化還元酵素類を同時に反応させることが可能な「複合酵素バイオリアクター」を構築すること目的として、いわゆるミミズの腸内細菌 (新鮮なミミズ糞から単離された微生物



図9 単離した放線菌の一例（スラント培養）

Screening

27 strains \Rightarrow *S. thermocyaneoviolaceus* NBRC 14271



Reaction Mechanism

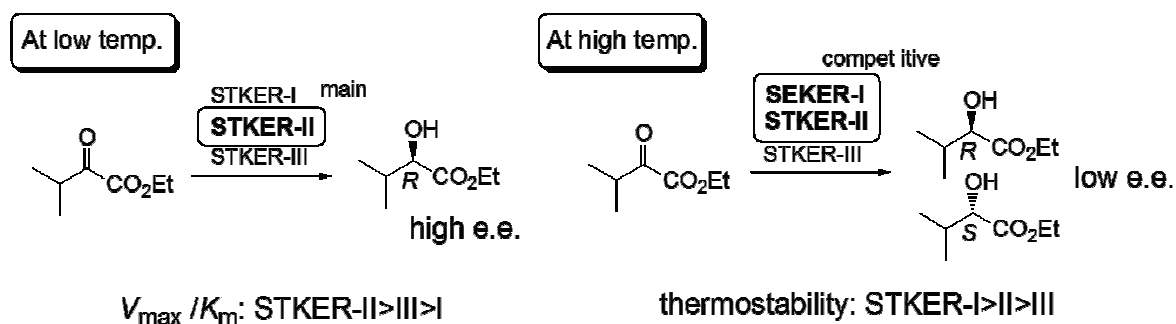


図 10 放線菌由来のケトエステル還元酵素を用いた酵素的不斉合成反応の一例

物)と考えられる放線菌群由来のセルラーゼやキシランナーゼなどの繊維素分解酵素類に関する研究も併せて実施した。

すなわち、「放線菌保存用培地 Bn-2 培地」に生育させた単離後の放線菌株の写真をその一例として図 9 に示すように、新鮮な「ミミズ糞」から、合計 50 株程度の放線菌を選択的に単離した^{14,15,17)}。簡易同定の結果、それらの放線菌群 (Streptomycete) は、Streptomyces 属などに分類される菌株がほとんどであった。それらの中から、「放線菌用培地 (P-MIM 培地)」^{14,15)} にキシランを 1% 程度添加して培養した際に、キシラン (Sigma 製: シラカバ、あるいはブナ由来) をキシロースやキシロビオースなどに分解する誘導型のキシラン分解酵素を分泌する 4 株程度の Streptomyces 属などの放線菌をスクリーニングした。

一方、セルロース分解活性は、「放線菌培養用培地 P-MIM 培地」に結晶性セルロース (ナカライテスク製) を添加した培地上での生育 (静地培養) に伴うセルロースの分解 (ルゴール液によるセルロリシスの検出) を、上述したミミズ糞由来の放線菌株から比較的、普遍的に見いだすことが可能であったが、高活性な誘導型セルロース分解酵素活性そのものを確認できる放線菌株は容易に確認できなかったため、まず硫酸アンモニウムと無機塩類を主成分とした「化学合成培地」に、唯一の炭素源として 1% 程度の結晶性セルロースを加えた限定培地を調製して、そこに生育可能な放線菌のセレクションを行い、さらに、キシラン分解の場合と同様に、培養液中での誘導型セルロース分解酵素群の分泌性の有無を確認し、最終的には、結晶性セルロースを還元糖などに分解する誘導型セルロース分解酵素を分泌している 4 菌株程度のミミズ糞由来の Streptomyces 属などの放線菌を見い出した。なお、これらの放線菌による結晶性セルロースの分解とキシランの分解を行い得る放線菌群は重複している傾向にあった。セルロースやキシランなどの植物繊維素の分解には、真菌類などを含めた多様な微生物の多種の酵素反応系が複合的に、あるいは、それらの beta-1,4-グルコシド結合の解裂にはラジカル反応も係わっている可能性も考えられる (preliminary results)。

さらに著者らは、図 10 にその一例を示すように、ミミズ由来や各種の放線菌由来のケトエステル還元酵素 (様々な構造を有するケトエステルを合成

基質として、有用な光学活性ヒドロキシエステルへの立体選択的還元反応を触媒する NAD(P)H-依存性酸化還元酵素) などの酵素科学に関する詳細な研究を行い、複数の放線菌から、基質: ケトエステルに対して立体特異性 (選択性) が異なる「少なくとも 4 種類以上」の同酵素遺伝子群の存在を確認し、それらの触媒機能について、PCR 法を駆使して、ゲノム情報科学的アプローチとタンパク化学的アプローチの両面から詳しく精査した^{14-15, 17)}。それらの酵素には、遺伝子レベルでは、ハイポセチカルな酵素タンパク質も存在したが、生成物として S-体のヒドロキシエステルを与える還元酵素タンパク質のひとつは、タンパク質レベルとその遺伝子レベルの両者において、多くの放線菌に共通して存在していることが確認された。

なお、ミミズ由来のケトエステル還元酵素 (酸化還元酵素) は比較的、不安定であったが¹⁶⁾、本稿では、放線菌由来の「ケトエステル還元酵素」に関する詳細な構造と機能、並びに酵素科学的特性や触媒機能については紙面の都合上、他の総説 (下記の参考文献参考) などに記載を譲る。

6. おわりに

本稿で述べたミミズ由来のセリンプロテアーゼは元々、日本国内では、美原 恒 (宮崎医大名誉教授) らにより血栓症治療を目的として、1970 ~ 1980 年代に医学的な見地から盛んに研究が進められた経緯がある。また、中国や韓国などの研究者を中心に本酵素の血栓症治療への応用が検討されていたようである⁹⁾。さらに、栗本慎一郎 元衆議院議員 (元東京農業大学教授) の手による「脳梗塞・糖尿病を救うミミズの酵素 (たちばな出版, 2001)」や、渡辺引之著「ミミズ: 嫌われものはたらきもの (東海大学出版会)」など、ミミズそのものに関する書籍も多数出版されている。

また、上述したように、ミミズプロテアーゼや繊維素分解酵素、あるいは酸化還元酵素などの構造と機能の解明に関する研究に基づき、特に、ミミズプロテアーゼは難分解性タンパク質や中性脂肪を含むエステル化合物などを効率良く分解することが明らかにされ、有用機能性物質の合成や有機性廃棄物 (バイオマス) の分解や再利用などへの応用を始めとして、それらの有効性が示された。

さらに、ミミズプロテアーゼ遺伝子の高発現ベク

ターを用いた微生物などへのクローン化と高発現化法も確立され、酵素製剤としての本酵素の効率的な生産が可能となった⁹⁾。従って、この環形動物由来の安定で多機能な「アルカリセリンプロテアーゼ」や、その腸内細菌として単離された放線菌群由来の「繊維素分解酵素類」や「酸化還元酵素類」の触媒機能の物質合成・変換、並びに有機性資源（バイオマス）のリサイクルなどへの、資源循環型社会の構築を目指した、さらなる応用利用が期待されるところである。

参考文献

- 1) N. Nakajima, *et. al.*, Characterization of Potent Fibrinolytic Enzymes in Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1726-1730 (1993)
- 2) 中島伸佳ら、ミミズの酵素液によるタンパク質の加水分解、化学と教育、42, 841-843 (1994)
- 3) N. Nakajima, K. Ishihara, *et. al.*, Chemical Modification of Earthworm Fibrinolytic Enzyme with Human Serum Albumin Fragments and Characterization of the Protease as a Therapeutic Enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 293-300 (1996)
- 4) N. Nakajima, K. Ishihara, *et. al.*, Further Characterization of Earthworm Serine Proteases: Cleavage Specificity against Peptide Substrates and on Autolysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 2031-2033 (1999)
- 5) N. Nakajima, K. Ishihara, M. Sugimoto *et. al.*, Stable Earthworm Serine Proteases: Application of the Protease Function and Usefulness of the Earthworm Autolysate. *J. Biotechnol. Bioeng.*, 90, 174-179 (2000)
- 6) M. Sugimoto and N. Nakajima, Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of cDNA Encoding Serine Protease with Fibrinolytic Activity from Earthworm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1575-1580 (2001)
- 7) N. Nakajima, K. Ishihara, *et. al.*, Further Stabilization of Earthworm Serine Protease by Chemical Modification and Immobilization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2739-2742 (2002)
- 8) M. Kurokawa, N. Nakajima, T. Sugai, *et. al.*, Enzyme-catalyzed Enantiomeric Resolution of *N*-Boc-proline as the Key-step in an Expeditious Route toward RAMP. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 1323-1333 (2003)
- 9) N. Nakajima, K. Ishihara, *et. al.*, Earthworm-Serine Protease: Characterization, Molecular Cloning, and Application of the Catalytic Functions. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 23, 191-212 (2003)
- 10) M. Sugimoto, N. Nakajima, *et. al.*, Structure and Function of an Isozyme of Earthworm Proteases as a New Biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 23, 405-410 (2003)
- 11) N. Nakajima, K. Ishihara, *et. al.*, Earthworm Fibrinolytic Enzyme (CLAN PA(S)-S1A, No. 540), pp.1689 -1691, *In Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd. Edn., vol. 2, edited by A. J. Barrett, *et. al.*, Elsevier Ltd. (2004)
- 12) N. Nakajima, K. Ishihara, *et. al.*, An Isozyme of Earthworm Serine Proteases Acts on Hydrolysis of Triacylglycerol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2009-2011 (2005)
- 13) 中島伸佳、「物質合成の設計図にブレークスルーを：酵素触媒の活躍と未来」：有機溶媒に耐性で常温においては自己消化による失活を伴わないミミズプロテアーゼの触媒機能の物質合成・変換への応用、*BIO INDUSTRY*, 23(4), (株) CMC 出版, pp. 28-36, (2006)
- 14) K. Ishihara, H. Yamaguchi, N. Nakajima, *et al.*, Stereoselective Reduction of Keto esters: Thermophilic bacteria and Micro algae as New Biocatalysts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 23, 171-190 (2003)
- 15) K. Ishihara, N. Nakajima, N. Esaki, *et. al.*, A Novel Zinc-containing *alpha*-Keto ester Reductase from Actinomycete: An Approach Based on Protein Chemistry and Bioinformatics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 2120-2127 (2004)
- 16) K. Ishihara and N. Nakajima, Stereoselective Reduction of Reduction of Carbonyl Compounds Using Cell-free Extract of Earthworm, *Lumbricus rubellus*, as a Novel Biocatalyst. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 3077-3080 (2006)
- 17) K. Ishihara, C. Kato, N. Nakajima, *et.*

al., Stereoselective Reduction of Carbonyl Compounds with Actinomycete: Purification and Characterization of Three *alfa*-Keto ester Reductase from *Streptomyces avermitilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 3249-3257 (2008)

Study on the enzymes which related to earthworm

NOBUYOSHI NAKAJIMA*

**Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111
Kuboki, Soja, Okayama 719-1197, Japan*

Abstract An earthworm, *Lumbricus rubellus*, produces alkaline-serine proteases that are greater than trypsins in their activity and stability. The proteases which were purified from the earthworm were composed of six isozyme proteins. Each isozyme consisted of a single polypeptide chain which was derived from the different genes. The enzymes had activity and were stable at below 60 °C over a wide range of pH 2 ~11 and were strongly resistant to organic solvents and detergents. Moreover, they retain full activity for long years (over 10-years) without any loss of the activity at room temperature. They acted on various proteins such as elastin as well as fibrin, and some peptides such as beta-amyloid 1-40 and solubilized actual fibrin clots of whole blood in a rat's vena cava. They also catalyzed the hydrolysis of various esters. Isozyme C catalyzed also the hydrolysis of triacylglycerol. No other lipase proteins were found in the earthworm cells. The isozyme C might act on the hydrolysis of triacylglycerol as well as the protein decomposition. The proteases contributed to the production of the "earthworm autolysate". The extracts of the autolysate could be used as a "peptone substitute" in media for the efficient growth of microorganisms. The cDNAs encoding the proteases were cloned and sequenced. They showed similarity to mammalian serine proteases and conserved the catalytic amino acid residues, however, neither arginine nor lysine residues were present in the autolysis region. The gene encoding the native form of an isozyme protein was expressed in *Pichia pastoris* to produce the active protease in the culture medium. Although earthworm possessed also the potent amylase and lipase activities as well as protease activity, none of the fiber degrading enzyme activities such as cellulase and xylanase were determined. So, enzymological characterization of the fiber degrading enzymes and oxid-reductases such as stereoselective keto ester reductase of Actinomycete strains isolated from the fresh feces of the earthworm was investigated to develop the enzyme reactor system for decomposing biomass.

Keyword : Earthworm, Actinomycete, Protease, Fiber degrading enzyme, Oxidoreductase