



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サケ科魚類せつそう病原菌Aeromonas salmonicidaの産生する病因物質の検討-I : A. salmonicida Ar-4 (EFDL)の産生するプロテアーゼの精製
Author(s)	田島, 研一; TAJIMA, Kenichi; 高橋, 恒人 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 34(2), 104-110
Issue Date	1983-06
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23818">https://hdl.handle.net/2115/23818</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	34(2)_P104-110.pdf



サケ科魚類せっそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の  
産生する病因物質の検討-I

*A. salmonicida*, Ar-4 (EFDL) の産生するプロテアーゼの精製

田島 研一\*・高橋 恒人\*\*  
絵面 良男\*・木村 喬久\*

Studies on the Virulent Factors Produced by *Aeromonas salmonicida*, a Causative Agent of Furunculosis in Salmonidae-I

Purification of the extracellular protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL)

Kenichi TAJIMA\*, Tsuneto TAKAHASHI\*\*, Yoshio EZURA\*  
and Takahisa KIMURA\*

Abstract

In the present paper we conducted the purification of the extracellular protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) as a virulent factor of this pathogen.

The experimental results can be summarized as follows:

1. *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) protease has been purified 173 fold in 11.3% yield.
2. The purified protease was almost homogeneous by electrophoresis on polyacrylamide gel.

結 言

せっそう病は *Aeromonas salmonicida* 感染に起因するサケ科魚類の古くから知られ、かつ最も広範囲な研究がなされてきた代表的な細菌性疾病である<sup>1)-6)</sup>。しかし、本病の発病機序に関連して病因物質についての研究は比較的少なく、エンドトキシン<sup>6)</sup>、白血球溶解因子<sup>7)</sup>、起病因子としてのプロテアーゼ<sup>8)</sup>、赤血球溶解因子<sup>9)</sup>等の報告をみるにすぎない。ところで、せっそう病の最も特徴的な症状は皮下筋肉組織が融解し、血液等を含む膿瘍病巣、いわゆる癰 (Furuncle) の形成であり、本病名もこれに由来している。ところで、本病の原因菌である *A. salmonicida* の大多数の菌株は、菌体外にプロテアーゼおよびリパーゼを産生することが知られており、前述の病巣形成にこれらの酵素が関与していることが推察されるが、リパーゼについてはサケ科魚類に対して毒性がないとの報告<sup>9)</sup>がある。また、*Pseudomonas fluorescens* 近縁菌のプロテアーゼがニジマス (*Salmo gairdneri*) に対して癰様病巣を形成するとの報告<sup>10)</sup>等があることから、著者らは、*A. salmonicida* の産生する菌体外プロテ

\* 北海道大学水産学部微生物学講座  
(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

\*\* 持田製薬株式会社  
(Mochida Pharmaceutical Co, Ltd.)

アーゼに着目し、本菌の病原性との関連性についての検討を試みた。先ず本報では、当講座保存の *A. salmonicida* 菌株中でプロテアーゼ産生能の高い菌株を選び、その産生するプロテアーゼの精製を試みたので、その結果について報告する。

## 実験方法

1. 供試菌ならびに培養法 供試菌として予め予備実験で多数の教室保存 *A. salmonicida* 菌株の中からカゼイン分解活性の最も強かった Ar-4 (EFDL) 株を選出して用いた。また培養は、同様に予備実験で検討した供試菌のプロテアーゼ産生の最適培地、すなわち酵母エキス 0.7%、バクトカシトン 1.0%、食塩 0.2% の組成の培地を 500ml 容坂口フラスコに 300ml 分注したものをを用い、20°C、27 時間振盪培養を行った。

2. プロテアーゼ活性測定法 プロテアーゼ活性は 2% カゼイン加トリス塩酸緩衝液 (pH 8.8) を基質溶液としてプロテアーゼ精製過程における各段階の酵素液を 30°C で 20 分間反応させた後、Anson-萩原の方法<sup>11)</sup>に基づいて測定した。すなわち 2% カゼイン加緩衝液 1ml と被検液 1ml を混和して 30°C で反応させた後、0.4M 三塩化酢酸 (TCA) 溶液 2ml を加えて十分混和して反応を停止させ、その後 30°C、20 分間保持して未反応の蛋白質を十分沈澱させた後、濾過した。その濾液 1ml を取り、これに 0.4M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 5ml を加え、さらに 1N フェノール試薬 1ml を加えて激しく混和後、30°C で 20 分間保持して発色を完成させ、660nm で比色した。なお対照には被検液に 0.4M TCA 溶液を加えて十分混和した後に基質溶液を加え、以後前述と同様の操作を行ったものを用いた。またプロテアーゼ活性 1 単位を反応時間 1 分間に 660nm における吸光値を 0.001 増加させる活性とし、活性単位は蛋白質 1mg 当りに換算した値として表わした。

3. 蛋白質濃度測定法 蛋白質濃度の測定は Schacterle and Pollack の方法<sup>2)</sup>に基づいて行った。すなわち被検液 1ml とアルカリ性硫酸銅溶液 1ml を十分混和した後、室温で正確に 10 分間静置した。その後 1/9N フェノール試薬溶液 4ml を加えて激しく混合し、直ちに 55°C の恒温槽で正確に 5 分間保持した後、流水で 1 分間冷却して直ちに 650nm における吸光度を測定し、予め牛血漿アルブミンを用いて同様の操作を行って作製した検量線から蛋白質濃度を測定した。対照としては 0.2M トリス-0.1N 塩酸緩衝液 (pH 7.8) を用い、前述と同様の操作を行った。

4. 精製法 プロテアーゼの精製は Fig. 1 に示すごとくほぼ Shieh and MacLean の方法<sup>13)</sup>に準拠して行った。手順は次の通りである。

1) 供試菌 Ar-4 (EFDL) 株を 1. で述べた要領で振盪培養後、培養液を 9,000×g (5°C) で 20 分間遠心分離し、その上清に 2 倍量の冷アセトンを攪拌しながら少量ずつ加えた。この混合液を 0°C に 15 分間静置後、20,000×g (5°C) で 15 分間遠心分離し、得られた沈澱を冷 0.2M トリス-0.1N 塩酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し同緩衝液に対して 16 時間透析 (0°C) した。

2) 1) によって得られた蛋白溶液に対して粉末硫酸を加えて 85% 飽和とした後、4°C に 30 分間静置後、20,000×g (5°C) で 20 分間遠心分離し、沈澱を集めて前述の冷緩衝液に溶解し、同緩衝液に対して 16 時間透析 (0°C) した。

3) 2) で得られた蛋白溶液を凍結乾燥により濃縮し、これを 2.7×46.3cm の DEAE-セルロースカラムに展開した。なおカラムは予め前述の緩衝液で平衡化したものを用いた。また溶出液として NaCl を 0M から約 0.5M まで連続的に増加させる linear gradient により溶出を行った。溶出速度は 5ml/12min とした。溶出終了後、各フラクションについてプロテアーゼ活性および蛋白質量を測定し、プロテアーゼ活性フラクションを集めて同緩衝液に対して 16 時間透析 (0°C) した。

4) 3) で得られたプロテアーゼ活性フラクションを凍結乾燥により濃縮し、これを前述と同じ大きさの DEAE-セファデックス A-50 カラムに展開した。なおカラムは予め前述の緩衝液で平衡化したものを用い、同緩衝液で NaCl linear gradient により溶出を行った。溶出速度は 5ml/20min とし

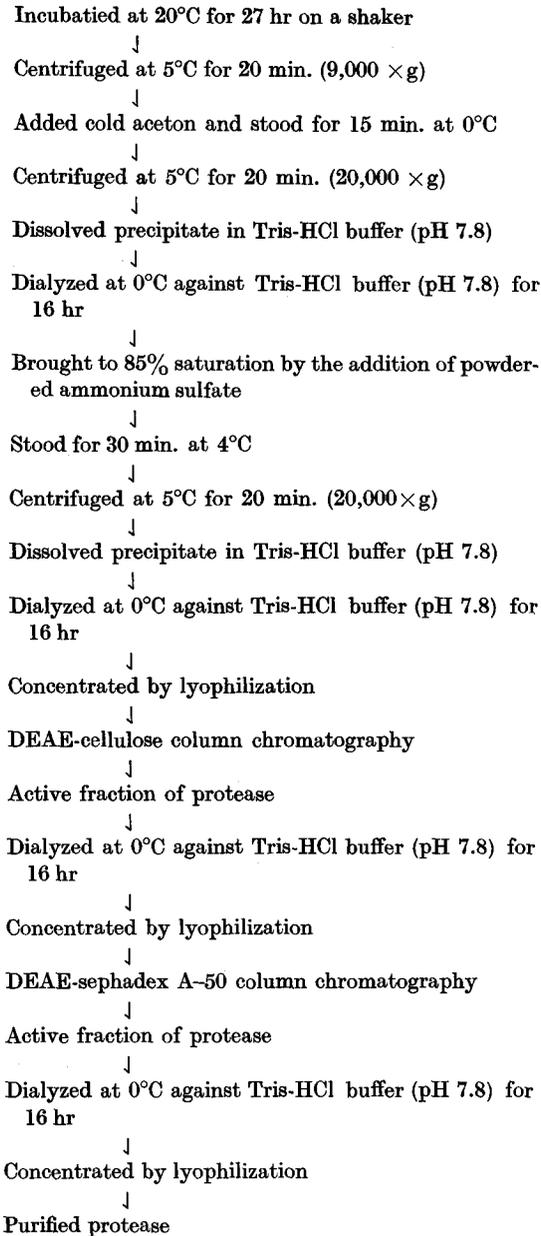


Fig. 1. Procedure for purification of protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL).

た。溶出終了後、各フラクションについてプロテアーゼ活性および蛋白量を測定し、プロテアーゼ活性フラクションを集めさせて同緩衝液に対して16時間透析(0°C)し、これを凍結乾燥により濃縮したものを精製プロテアーゼとした。

5. ディスク電気泳動による均一性の検定 精製過程の各段階におけるプロテアーゼの精製度を調べるために、ディスク電気泳動を行った。ディスク電気泳動は電気泳動実験法<sup>14)</sup>に従い、アクリルアミドゲル (5×90mm ガラス管) に試料を添加し、1.5mA の定電流を通して室温で3時間展開後、アミドブラック 10B で染色し、7% 酢酸溶液で脱色した。

結 果

1. プロテアーゼの精製 供試菌 Ar-4 (EFDL) 株の産生するプロテアーゼの精製は、前述の Fig. 1 に示した方法で行った。各精製段階における精製の度を Table 1 に示した。すなわち前述の供試菌培養上清から精製の各段階におけるプロテアーゼの精製比 (比活性の増加率) は、アセトン沈澱画分で32倍、硫酸沈澱画分で101倍と上昇した。この硫酸沈澱画分を DEAE-セルロースカラムに展開した場合の溶出図を Fig. 2 に示した。同図にみられるごとく、蛋白質のピークが大小2つの画分に出現したが、プロテアーゼ活性ピークは食塩濃度が0.1M 付近から溶出し始める画分のみで、前述の2つの蛋白質のピークのうち高いピークの画分と一致した。なお食塩濃度0.3M 以上では蛋白質およびプロテアーゼ活性のピークは全く溶出してこなかった。このプロテアーゼ活性ピークのフラクションを集め、前述の方法で脱塩・濃縮したプロテアーゼ酵素液の精製比は172倍であった。さらにこれを DEAE-セファデックス A-50 カラムに展開した場合の溶出図を Fig. 3 に示した。その結果、プロテアーゼ活性ピークおよび蛋白質ピークがそれぞれ1つずつみられ、両者の溶出位置は一致した。このプロテアーゼ活性画分は、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの場合と同様、食塩濃度が0.1M 付近から溶出し始めるものであった。なお他にプロテアーゼ活性画分あるいは蛋白質画分の溶出がみられなかったことから、この段階でかなりプロテアーゼの純度が高まったものと考え、精製を終了した。プロテアーゼ活性ピークのフラクションを集め、前述の方法で脱塩・濃縮したプロテアーゼ酵素液の比活性は3,290 units/mg で、精製比は173倍となり、収量は11.3% であった。

2. 精製プロテアーゼの均一性の検定 1. によって得られたプロテアーゼの均一性について、方法の項で記載したディスク電気泳動によるプロテアーゼの泳動像により検討した。精製各段階のプロテアーゼ試料のディスク電気泳動パターンは Fig. 4 に示した。アセトン沈澱画分では蛋白質のバンドは3本みられた。しかし、硫酸沈澱画分ではアセトン沈澱画分で見られた易動度の大きいバンドが消失

Table 1. Purification of prorease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL)

Fraction	Volume (ml)	Activity*	Total units** ( $\times 10^3$ )	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Relative purification
Supernatant of culture medium	5,000	0.18	900.0	46,000	19	100	1
Aceton precipitation	131.4	3.45	453.3	746	608	50.4	32
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	7.3	40.50	295.7	154	1920	32.9	101
DEAE-cellulose column chromatography	49.0	4.00	196.0	60	3267	21.8	172
DEAE-sephadex A-50 column chromatography	5.1	20.00	102.0	31	3290	11.3	173

\*: expressed as 660 nm O.D. min.<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>

\*\* : a unit of protease activity was defined as that amount which yielded 0.001 O.D. at 660 nm unit of change per minute under the conditions mentioned in the paper.

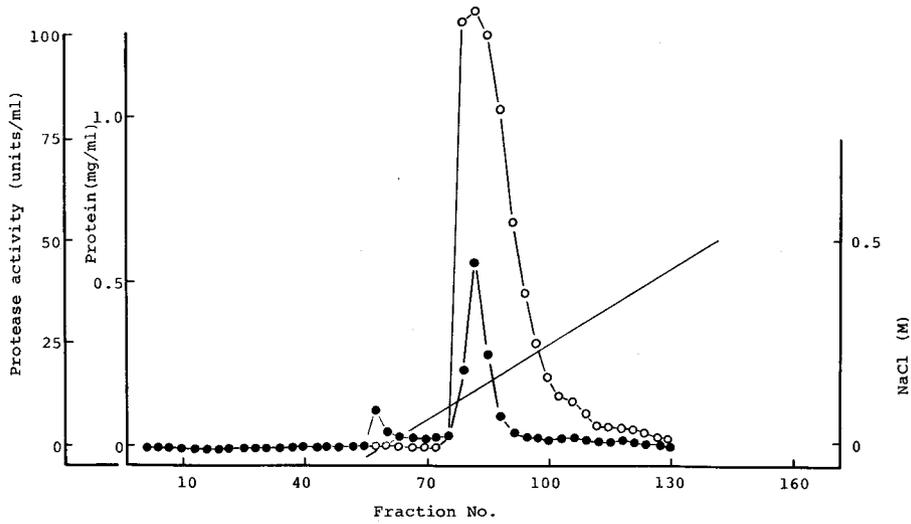


Fig. 2. Fractionation of protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) on DEAE-cellulose column  
 —○— protease activity      —●— protein

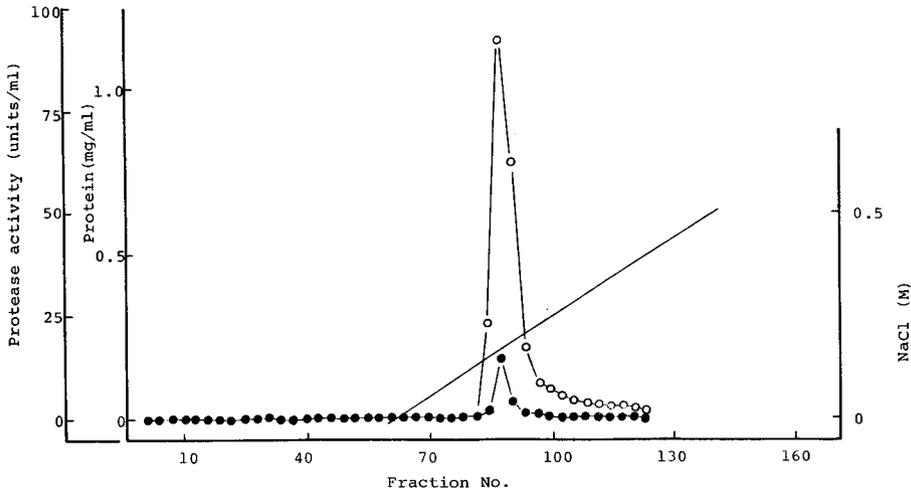


Fig. 3. Fractionation of protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) on DEAE-sephadex A-50 column  
 —○— protease activity      —●— protein

し、バンドは2本となった。さらに DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび DEAE-セファデックス A-50 カラムクロマトグラフィーと精製が進むにつれ、最も易動度の小さい主バンドはそのまま残り、中等度の易動度を示すバンドは最終の DEAE-セファデックス A-50 カラム展開後もかすかに残った。

以上の結果から最も易動度が小さく、最終精製までそのまま存在したバンドがプロテアーゼに相当するものであると考えられた。供試菌のプロテアーゼは、DEAE-セファデックスカラムの溶出図からは活性ピークと蛋白質ピーク共に一致する一つのピークのみとして検出されたが、本画分はディスク電気泳動による検討結果から、わずかながら異質の蛋白質が混合しているものと考えられる。しかし前述の Fig. 4 の 4 に示した電気泳動に供試した試料の量は蛋白質量として 60  $\mu\text{g}$  であったがこの量を 40  $\mu\text{g}$  に減じた場合にはまったく他のバンドは検出されなかった。供試した蛋白質染色試薬のアミドブラック 10B の染色限界蛋白質量は経験的に 5  $\mu\text{g}$  であることから、最終精製プロテアーゼ画分における夾雑蛋白質の含量は 5  $\mu\text{g}/40 \mu\text{g}$  から 5  $\mu\text{g}/60 \mu\text{g}$ 、すなわち 12.5% から 8.3% 程度と概算された。

#### 考 察

供試菌 Ar-4 (EFDL) 株の産生するプロテアーゼの精製を行い、ほぼ均一と思われるプロテアーゼ画分を得ることができた。しかし、ディスク電気泳動による均一性の検定を行ったところ、本プロテアーゼの純度はほぼ 90% 前後と考えられた。この段階の精製度合は比活性 3,290 units/mg、精製比は 173 倍、収量は 11.3% であった。ところで Shieh and MacLean<sup>13)</sup> も同様に *A. salmonicida* の産生するプロテアーゼの精製を行い、最終的に比活性 1,750 units/mg、精製比 500 倍、収量 28% で、ディスク電気泳動的にも均一な精製プロテアーゼを得ている。本研究とは供試菌株、供試培地および培養方法が異なることから直接比較できないものの、本研究で得られた精製プロテアーゼは前述の Shieh and MacLean<sup>13)</sup> のそれと比べ、比活性で約 1.9 倍、精製比で約 2/5 であり、ほぼ同程度の精製プロテアーゼを得たと考えられる。なお電気泳動で確認された微量の夾雑蛋白質についても、本プロテアーゼ画分の精製純度が 90% 前後であることから、以後の酵素化学的検討に十分供試し得るものと考えられ、また供試菌のプロテアーゼの病原因子としての検討には、ここで得られた精製プロテアーゼ画分を用いて十分目的を達し得るものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Herman, R.L. (1968). Fish furunculosis. 1952-1966. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **97**, 221-230.
- 2) Mawdesley-Thomas, L.E. (1969). Furunculosis in the goldfish *Carassius auratus* (L.). *J. Fish Biol.* **1**, 19-23.
- 3) Snieszko, S.F. (1969). Fish furunculosis. *FDL*. (U.S. Dept. Interior) No. 17, 1-4.
- 4) McCarthy, D.H. (1975). Fish furunculosis. *J. Inst. Fish. Mgmt.* **6**, 13-18.

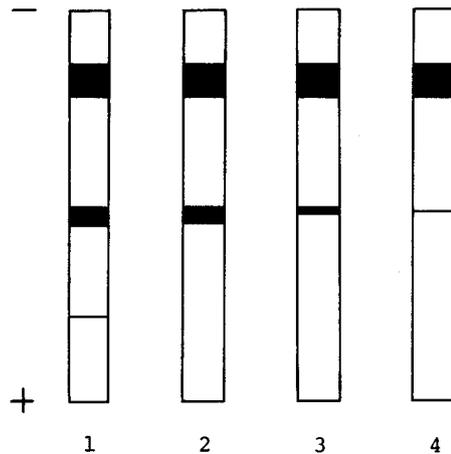


Fig. 4 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) at different stages of purification (see Fig. 1)  
 1. protease obtained after precipitation with acetone  
 2. protease preparation after precipitation with ammonium sulfate  
 3. protease preparation after chromatography on DEAE-cellulose  
 4. Protease preparation after chromatography on DEAE-sephadex A-50

- 5) Ferguson, H.W. and D.H. McCarthy (1978). Histopathology of furunculosis in brown trout *Salmo trutta* L., *J. Fish Diseases* 1, 165-174.
- 6) Paterson, W.D. and J.L. Fryer (1974). Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* endotoxin. *J. Fish. Res. Board Can.* 31, 1743-1749.
- 7) Fuller, D.W., K.S. Pilcher and J.L. Fryer (1977). A leukocytolytic factor isolated from cultures of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Res. Board Can.* 34, 1118-1125.
- 8) 坂井勝信 (1977). サケ科魚類セッコウ病における *Aeromonas salmonicida* の起病因子—菌体外プロテアーゼ, 北海道立水産孵化場研究報告, 第 32 号, 61-89.
- 9) 野村節三・斉藤博司・横山真樹・佐藤敏行 (1979). セッコウ病原菌 *Aeromonas salmonicida* の溶血毒素 I. 溶血毒素の産生条件と部分精製, 昭和 54 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 56.
- 10) Li, M.F. and C. Flemming (1967). A proteolytic pseudomonad from skin lesions of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Characteristics of the pathogenic effects and the extracellular proteinase. *Can. J. Microbiol.* 13, 405-416.
- 11) 萩原文二 (1953). 蛋白質分解酵素, 標準生化学実験, 625 p. 文光堂. 東京
- 12) Schacterle, G.R. and R.L. Pollack (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* 51, 654-655.
- 13) Shieh, H.S. and J.R. MacLean (1975). Purification and properties of an extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*. *Int. J. Biochem.* 6, 653-656.
- 14) 電気泳動学会 (1971). 電気泳動実験法 (第 4 版). 443 p. 文光堂. 東京