

理化学研究所

ニュース

July 1971

No. 34

“Pronase” -St. griseus K-1 菌の蛋白分解酵素-

科学研究所時代、当研究室でストレプトマイシンの抽出精製の研究を行っていた折、同抗生物質生産菌の一種 *St. griseus* K-1 菌の培養液中に蛋白分解酵素が生産されている事が、柳田主任研究員及び奥貫阪大教授により見つけられ、この酵素の研究が始まった。培養液中に生産されている酵素量とその酵素の性質が検討された結果、当時微生物起源蛋白分解酵素として市販され始めていた *Bacillus subtilis* の酵素量に匹敵する量が生産されている事、且放線菌のこの蛋白分解酵素は、動物及び微生物起源の何れの蛋白分解酵素より遙かに高い加水分解限度、即ち蛋白質をより低分子のペプチド更にアミノ酸にまで細かく加水分解する事が認められた。我々はこの放線菌蛋白分解酵素を“Pronase”と命名した。

その後この蛋白分解酵素の工業化は科研化学株式会社において実施され、国内を始めとして広く海外でも市販され現在に至っている。Pronase の工業化に併って、この酵素を利用して消化剤（7E）や消炎剤（エンピナス）が開発され、医薬としての酵素製剤繁栄の開拓的役割をはたすと共に、一方 Pronase は生化学の基礎研究部門でも多くの研究者により広く利用され、1960年代に入り、Chemical Abstracts の biochemistry の部門で Pronase の項目が作られる迄に発展した。

Pronase は初期の単一であらゆる基質特異性を包含するプロテアーゼであるという見解は誤りで、数種の蛋白分解酵素の混合物である事を我々は確証した⁽¹⁾。Pronase の酵素組成が明らかにされる迄の過程は、その分離精製に携った者のみが知る実に多難で労力を使う

地味なクロマトの連続であった。分析された結果はそれぞれ特異性を異にする4種の中性プロティナーゼ（中性 pH 付近で基質を加水分解し、EDTA 等の金属錯塩形成試薬により阻害され、分子内に SS 結合を持たない金属酵素）、3種のアルカリ性プロティナーゼ（DFP（後述）により阻害され分子内に SS 結合が存在するセリン酵素）、3種のアミノペプチダーゼ（基質ペプチドのアミノ末端より順次加水分解する金属必須酵素）とカルボキシピプチダーゼ（基質ペプチドのカルボキシル末端より順次加水分解する金属必須酵素）より成る事が明らかにされたのである。尚アイソザイムを含めると、現在ではこの数を更に上回る。

動物や微生物起源の蛋白分解酵素の研究は膨大な数にのぼるが、実にこの Pronase 程に多種多様のプロテアーゼより成るものが且つて見出された事がない。この点が Pronase の特徴でもあり又基質蛋白に対し、何れの蛋白分解酵素製剤よりも高い加水分解限度を示した理由である。単離された各酵素については、とてもこの短い紙面では述べる事が不可能なので目下研究中でもあり且広く世界的に注目されている Pronase 中のアルカリ性プロティナーゼの2種だけに焦点を絞り、動物のアルカリ性プロティナーゼと比較しながら“酵素の進化”について若干でも触れられればと思う。

動物起源の代表的なアルカリ性プロティナーゼに、トリプシンとキモトリプシンがある。両酵素の特異性の違いはトリプシンは蛋白中の塩基性アミノ酸のカルボキシル側ペプチド結合のみを加水分解し、一方キモトリプシン

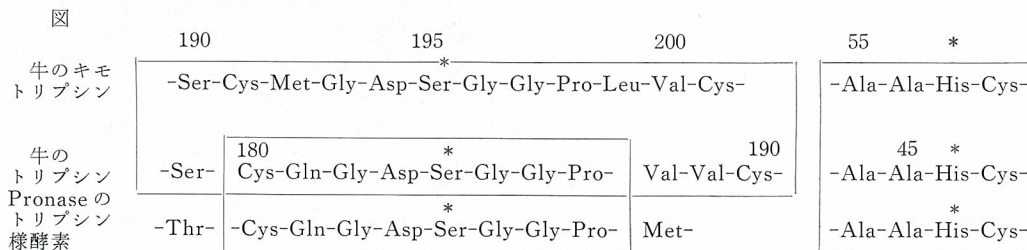
は芳香族アミノ酸とロイシンのカルボキシ側ペプチド結合を選択的に加水分解する。基質特異性は異なる両酵素も一次構造を比較すると驚く程類似しており、又共にDFP（ジイソプロピルフルオロリン酸）で阻害される。この阻害はそれぞれの酵素中にある約30残基近いセリンの中の特定の1個のセリン水酸基のアルコリリン酸化によるものであり、この活性セリン周辺のアミノ酸配列は、両酵素について下図の通りで枠で囲んだ如く広範な残基の同一性がみられる。高度な相同が両酵素のいまひとつの触媒基であるヒスチジン残基周辺とこれに近接して電荷リレー系をつくっているといわれる特定アスパラギン酸周辺にも見られる。

さて微生物起源の蛋白分解酵素の中にも DFP により阻害されるセリン-プロテアーゼの1群があるが、これらの中で、上記のトリプシンやキモトリプシンに相当する基質特異性をもつ酵素は且つて見出され単離された事はなく、我々が Pronase 中より単離したのが始めてである。Pronase 中の3種のアルカリ性プロテイナーゼの中の1つがトリプシンと残りの中の1つがキモトリプシンと同一の基質特異性を持ち、且微生物起源のセリン-プロテイナーゼの殆んどが分子中に SS 結合を持たないのに反し、両酵素はトリプシンやキモトリプシンと同様その分子中にそれぞれ3ヶの SS 結合が存在する事を見出した。この結果は、蛋白質一次構造研究者を刺激し、一次構造研究の好適な材料となった。我々の報告をもとにして早くもアメリカやカナダでは Pronase 中のこのトリプシン様酵素の一次元構造の一部を発表している²⁾。下図に触媒活性に必須なアミノ酸周辺の残基配列を、動物トリプシンとキモトリプシンのそれらと並べて紹介する。Pronase のトリプシン様酵素の分子量は19,600なので、図に示したのは一部に過ぎないが、触媒能を担った重要な部分である。これより明らかな如く DFP によりアルキルリン酸化される活性セリン周辺の8残基連続の相同は、20種類のアミノ酸の無作為な組合せでは殆ど実現が考えられず、この部分は蛋白分解酵素としての触媒能を発現する為の共通部である事が解る。又もう1つの触媒基である活性ヒスチジンを含めて、立体構造維持に関与する SS 結合の位置も驚く程良く似ている。

上述の如く我々は Pronase よりトリプシンとキモトリプシンに相当する酵素の存在を見出したが、それ迄は陸上動物を始め、硬骨魚類、更に下等な軟骨魚類に迄は

両酵素の存在が判明していた。そして、トリプシンとキモトリプシンの間では、一次構造上の相同が、分子の全アミノ酸残基の40%にも及ぶことから、共通な祖先蛋白質があって、それからそれぞれ異なる基質特異性発現に関する分岐があって進化したものと考えられている。従って分岐の古さは、軟骨魚類の進化が、哺乳類の出現に先立つ事2億年程なので、トリプシンとキモトリプシンの特異性発現の分岐は、この年代と考えられていた。しかし、遙かに下等な放線菌のトリプシンとキモトリプシンの存在が、Pronase より証明され、分子のレベルでの解析を異にする酵素間の相同を示している。現代の知識をもって未だ解明されない両酵素の特異性部位の分岐は、2億年の古さどころか10億年いやもっと前に、既に蛋白構造上に組み込まれていた事になる。酵素分子のレベルでは、高等な動物も下等な細菌もない様に思われて来る。ここでは触れなかったが、Pronase 中には、微生物特有と考えられる蛋白分解酵素も又同時に存在するのである。酵素の存在発見→単離精製→1次構造決定→3次元構造解明という研究の流れは、「進化」への分子解剖学的アプローチに通じる。特に酵素は、共通な触媒部位構造と、酵素ごとに異なった基質特異性発現部位をもつので、両者の組合せは、進化の仕組みを解明するのに好適な材料となり、微生物の蛋白分解酵素も比較生化学上重要性を増す事になる。分子レベルでの微生物源蛋白分解酵素の研究は始まったばかりである。最後に Pronase という酵素の誕生により数々の興味ある新しい知見が、多くの研究者により蓄積されて来たとし、今後更に広く学問分野に寄与するに違いない。

- 1) Y. NARAHASHI, and M. YANAGITA, J. Biochem., **62**, 633 (1967).
- Y. NARAHASHI, K. SHIBUYA, and M. YANAGITA, J. Biochem., **64**, 427 (1968).
- Y. NARAHASHI, and J. FUKUNAGA, J. Biochem., **66**, 743 (1968).
- Y. NARAHASHI, "Methods in Enzymology", Vol. IX, "Proteolytic enzymes" Ed. by G.E. Perlmann and L. Lorand, p. 651, Academic Press (1970).
- 2) M.O.J. OLSON, N. NAGABHUSHAN, M. DZWINIEN, L.B. SMILLIE, and D.R. WHITAKER, Nature, **228**, 438 (1970).



(高分子化学研究室・研究員・奈良橋快子)

ターボ分子ポンプ

沿革 気体の密度が小さくなり、気体分子の平均自由行程が気体がいっている容器の大きさよりもはるかに大きくなり、気体分子どうしの衝突頻度が気体分子と容器の壁面との衝突頻度に比べて非常に少なくなった状態を自由分子流状態とよんでいる。図1のような固定壁と動く平板で囲まれた空間に分子流状態の気体が存在しているとすれば、気体分子は平板に衝突して反射されるとき、速度 V が加わって左から右へ分子の流れを生じ、ある圧力差 Δp で平衡に達する。この現象は Molecular Drag あるいは気体の外部摩擦による輸送現象といわれる。

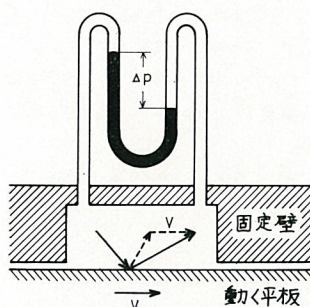


図 1

W. Gaede は1913年に、外部摩擦を利用した真空ポンプを発明し、“Die Molekularluftpumpe”と題する論文を発表している。これが分子ポンプの起源である。その後、F. Holweck や M. Siegbahn により、Gaede の分子ポンプを改良した少し異なった形式のものがつくられ、高真空ポンプとして大きな注目をあびたが、排気速度の大きいものをつくるのが困難なため、あまり利用さ

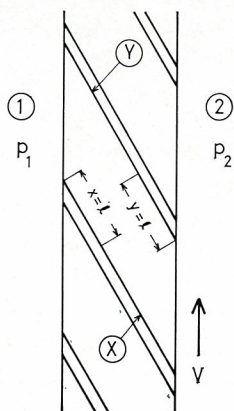


図 2

れず、拡散ポンプの発達にともない、次第に姿を消していった。しかし、1956年になってW. Beckerが高速回転翼車をもった分子ポンプすなわちターボ分子ポンプを発明し、排気速度が大きく、超高真空が得られることを示してから再び注目されはじめ、今日、二、三のターボ分子ポンプが商品化されており、わが国においても開発を望む声が高まってきた。

排気機構 ターボ分子ポンプの翼車のモデルとして図2のような翼列を考えると、翼の対称性により、⑤面の $x=l$ の位置に飛んでくる分子のうち②へ通り抜ける確率と、⑥面の $y=l$ の位置に飛んでくる分子のうち①へ通り抜ける確率は等しい。翼列が静止しているときは①から x の位置に飛んでくる分子数と②から y の位置に飛んでくる分子数が等しいので、①から②へ通り抜ける分子数と②から①へ通り抜ける分子数とは等しい。いま翼列が速度 V で矢印の方向に動きだしたとすれば、①から x の位置に飛んでくる分子数は②から y の位置に飛んでくる分子数より多くなる。したがって①から②へ通り抜ける分子数の方が②から①へ通り抜ける分子数より多くなり、①から②へ気体分子がはこばれ、しだいに①と②の間に圧力差を生じ、①における圧力 p_1 と②における圧力 p_2 の比 p_2/p_1 がある値で平衡する。この圧力比は翼の幾何学的形状、翼の速度 V と最大確率熱運動速度 a (室温空気ではほぼ 400 m/sec) との比 V/a によって決まり、一般に翼速度比が大きいかほど高い圧力比が得られる。熱運動速度は分子量の平方根に逆比例しているから、同一翼速度に対しては分子量の小さい気体より、分子量の大きい気体の方が大きい圧力比が得られる。室温空気の場合、翼速度 $V=200\text{m/sec}$ 程度で、 p_2/p_1 はせいぜい 1.5~2 であるから、このような翼によって 10^{-9} ~ 10^{-10} Torr というような超高真空を得るには数十枚を重ねあわせて使うことになる。

特長 圧力比は上に述べたように軽い分子に対しては小さく、重い分子に対しては大きいので、吸込み側では油蒸気のような高分子ガスの分圧を小さくすることができ、たとえ吐出し側に油蒸気が充満していても逆流することなく、いわゆるきれいな真空が得られる。またこの性質を積極的に利用することにより、たとえば核融合反応装置のガス純化をすることもできる。一方排気速度は気体の種類によらずほぼ等しく、不活性ガスに対しても、イオンポンプのように排気速度が低下するようなことはない。また拡散ポンプとは異なり、作動流体を用いないので、到達圧力は材料からの放出ガスと漏れのみ

よって決まり、材料の選択、処理を適切にすれば、比較的容易に超高真空を得ることができる。また 10^{-8} Torr から到達圧力の近くまで一定の排気速度をもっている。なお自由分子流状態からはずれた 10^{-1} Torr 程度の高い圧力から作動することもできる。このように超高真空から低真空までの広い圧力範囲にわたって大きい排気速度をもつ真空ポンプは他に類をみない。さらに電動機のスイッチをいれるだけで数分間のうちに作動するという操作の手軽さと、数千時間ごとに回転翼軸受の潤滑油を交換するだけで半永久的に使用できるという保守の容易さも実用上大きな利点である。

国産第一号機の試作 これまでターボ分子ポンプの排気機構は十分解明されていなかったが、われわれの研究室では数年間にわたり、排気機構について研究を行なってきて設計基礎となる理論を確立した。この研究成果にもとづき、大阪真空機器製作所の協力を得てターボ分子ポンプを試作した。試作機の構造の概略は図3に示す通りで、動翼①(直径

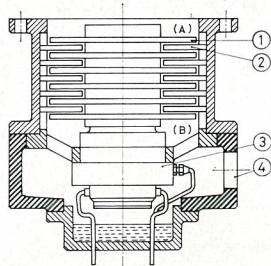


図3

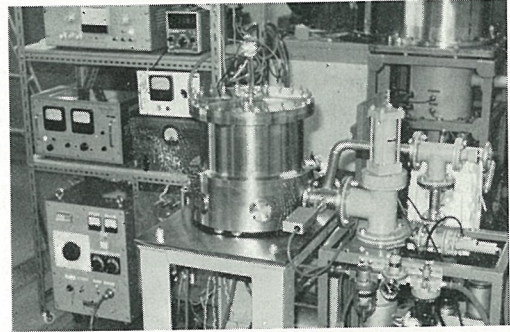


図 4

300 mm) と静翼②が今互に配置され、動翼を高周波誘導電動機③により、最高 12,000 rpm で回転させて吸込み側(A)から吐出し側(B)へ排気を行なう。補助ポンプとしては油拡散ポンプと油回転ポンプあるいは油回転ポンプのみを用い、フランジ④につなぐ。到達圧力は 5×10^{-9} Torr、排気速度は 670 l/sec である。全体の構成写真を図4に示す。写真中央はターボ分子ポンプ本体で、左の棚には真空計等が載っており、その下には高周波誘導電動機用電源が見える。本体の右側は補助ポンプにつながれている。

(機械計測研究室主任研究員 谷口 修、
研究員 沢田 雅)

テクノロジー・アセスメント



「裸者と死者」で知られているアメリカのノーマン・メイラーは全地球を征服している20世期のテクノロジー文化の災厄から人類を最後に解放する役は自分たち小説家が担わねばならないのだといっている。解放役を小説家に

またねばならないかどうかは差し置いて、つい先程までは人類に莫大な恩恵をもたらしたと信じられていたテクノロジーの発展が、にわか文化の破壊者であるとまで非難され始めている。環境破壊、事故の増大さらには人間疎外、社会的緊張という現象が技術発展に帰因している部分が少なくない。人類は自然を支配するために技術を用いてきたが、今や人類は技術に支配されつつある。このような認識を背景に1967年ごろからアメリカではテ

クノロジー・アセスメント (Technology Assessment) の必要性が提唱され始め、わが国でも昨年以來同様な観点から警告が発せられている。今後国内での意識の高揚と対策の検討が進められるはずであるが、この考えの趣くところ、テクノロジーの源泉であるサイエンスについてのアセスメントが必要であり、さらには創造活動自身についても外部社会からの方向づけを一そう受けねばならないという一部識者の指摘がある。しかしアセスメントを理念としてならいざ知らず、実行面で一気にそこまで発展させることは極めて困難であり、当面実行可能な限界があるはずである。テクノロジー・アセスメント自身の費用効果分析がその限界を与えてくれるかも知れない。この限界外のアセスメントはサイエンティスト自身にその責任が負わされている。

(企画部長 山本剛男)