

Title	高活性低温プロテアーゼの探索と特性評価
Author(s)	山村, 昌平
Citation	
Issue Date	1999-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2602
Rights	
Description	Supervisor:民谷 栄一, 材料科学研究科, 修士

高活性低温プロテアーゼの探索と特性評価

山村 昌平 (民谷研究室)

【目的】

低温環境に適応した低温菌は、低温域で高い活性を持つ酵素を産生することが知られている。すでに当研究室において、低温プロテアーゼが単離されているが、低温酵素の低温適応機構は解明されておらず、温度不安定性や低温での高活性に関する十分な知見も得られていない。そこで本研究では、低温でさらに活性の高いプロテアーゼを探索することにより、低温適応機構を考察した。

【実験】

寒冷地の土壌から 4 °C で低温菌のスクリーニングを行い、培養後、寒天培地上にタンパク質変性剤であるトリクロロ酢酸を噴霧することによって、菌体周囲のハロを確認し、プロテアーゼを菌体外に産生している菌株をスクリーニングした。そして、これらの菌株を 4 °C で液体培養し、基質としてアゾカゼインを用いて、プロテアーゼ活性を測定した。そのうち、最も高いプロテアーゼ活性を示した菌体である 3A08 株を選択し、菌体の同定を行い、温度特性などを調べた。また、ジャーファーメンターを用いて大量培養を行い、菌体外に産生されたプロテアーゼを限外濾過、ゲル濾過等により精製した。精製されたプロテアーゼについて、分子量、等電点、温度特性、pH 特性、阻害剤による影響などの特性を調べた。

【結果および考察】

スクリーニングの結果、4 °C の培養条件下において、低温菌と考えられる菌体が 950 株得られ、そのうちハロの確認によりプロテアーゼ活性を示した菌は 165 株であった。そして、最も高いプロテアーゼ活性を示した 3A08 株について研究を進めた。3A08 株は、グラム陰性の桿菌で極鞭毛をもち、*Pseudomonas* 属であることがわかった。また、至適増殖温度が 10 °C であり、0 °C の寒天培地上でも増殖することが確認されたことから、3A08 は低温菌であることがわかった。菌体外に産生されたプロテアーゼは、温度による増殖に伴って活性の増大が見られ、15 °C の培養条件下で、最も高いプロテアーゼ活性を示した。大量培養後、精製されたプロテアーゼは、分子量が約 50 kDa であり、等電点は 6.5 であることが確認され、pH 5~6.5 において高活性を示した。また、最大活性温度は 40 °C であり、常温酵素に比べて低温側にシフトしており、低温域で高いプロテアーゼ活性を示し、温度不安定性であることも確認された。これらの結果から、この酵素は低温酵素であることがわかった。さらに、低温域における比活性が既往の低温プロテアーゼの 3 倍以上であり、従来にない高活性低温プロテアーゼが得られた。また、EDTA、1,10-phenanthroline によって活性が阻害されたことから、金属プロテアーゼであることが示唆された。

発表状況：

日本化学会第 3 回バイオテクノロジー部会（平成 10 年 9 月）、日本化学会北陸支部大会（平成 10 年 11 月）、1999 年度日本農芸化学会（発表予定）（平成 11 年 3 月）

keywords

低温菌、低温活性プロテアーゼ、*Pseudomonas* sp.