

好冷性細菌の生化学的研究

高澤俊英

教養課程・化学教室

1. 目的

生物は地球の平均的な環境のもとで進化してきたが、微生物は地球上のいたるところで環境条件に適応していることが知られている。したがって一部の微生物は、異常環境のもとで生育している。このような異常環境微生物の研究は、環境適応や進化の観点から生命現象の新しいアプローチとして高い関心を集めている。しかし、異常環境として注目されているのは、高温、高圧、極端な溶媒環境などで、低温環境における好冷菌の研究は活発とはいえない。そこで我々は、生物の低温環境への適応の機構を解明する目的で、好冷菌として、雪腐病菌を選び、今回ペクチン分解酵素の検索及び精製を行った。

2. 方法

粗抽出液の調製

5°Cで約2カ月培養したフラスコに抽出用緩衝液(10 mM NaOAc pH 4.5)を加え、4°Cで攪拌しながら一夜抽出した。次にこの抽出懸濁液を遠心分離し上清をmembrane filterでろ過し、この濾液を粗抽出液とした。

ペクチン分解酵素の分離

① Bio-Gel P-6 DG カラムによる脱塩

得られた粗抽出液を10 mM NaOAc pH 4.5で平衡化したカラム(ϕ 2.6×91.5 cm : 486 ml bed)に1回のクロマトグラフィー当たり200 mlずつ供した。

② ステップワイズ溶出法によるCM-トヨパール650 M カラムクロマトグラフィー

Bio-Gel p-6 DG カラムクロマトグラフィーより得られた活性画分を10 mM NaOAc pH 4.5で平衡化したCM-トヨパール650 M カラム(ϕ 2.6×35.7 cm : 190 ml bed)にかけ、その後同緩衝液でカラムを溶出し、次にカラムを10 mM NaOAc pH 4.5/50 mM NaClで溶出し、最後にカラムを10 mM NaOAc pH 4.5/100 mM NaClで溶出した。

③ CM-トヨパール650 M リニアグラジェント溶出法カラムクロマトグラフィー

ステップワイズ溶出法で得られた活性画分を10 mM NaOAc pH 4.5に透析後、その透析サンプルを同緩衝液で平衡化したCM-トヨパール650 M (ϕ 1×17 cm : 13 ml bed)に吸着させ、同緩衝液でカラムを洗浄後10 mM NaOAc pH 4.5/50 mM NaClで更に洗浄した。次に10 mM NaOAc pH 4.5/50 mM NaCl 100 mlと10 mM NaOAc pH 4.5/100 mM NaCl 100 mlとによる直線濃度勾

配溶出を行った。

④ sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィー

リニアグラジェント溶出法で得られた活性画分を 10 mM NaOAc pH 4.5 に透析後, CM-トヨパール 650 M ミニカラム (φ 1×8 cm : 6 ml bed) にかき, 10 mM NaOAc pH 4.5/200 mM NaCl で溶出することによって濃縮した。これを 10 mM NaOAc pH 4.5/50 mM NaCl で平衡化した sephacryl S-200 カラム (φ 1.6×65.8 cm : 132 ml bed) にかけた。

⑤ Mono S-FPLC

sephacryl S-200 活性画分を CM トヨパール 650 M ミニカラムで濃縮後, 10 mM NaOAc pH 4.5/100 mM NaCl に透析した。これを同緩衝液で平衡化した Mono S (φ 0.5×5 cm) にかき, 10 mM NaOAc pH 4.5/100 mM NaCl と 10 mM NaOAc pH 4.5/200 mM NaCl とによる直線濃度勾配溶出を行った。

3. 結果と考察

ペクチン分解酵素の精製過程を Table. 1 に示した。

Table 1. Summary of purification

Fraction	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Yield of activity (%)	Specific activity (units/mg)	Purification
Crude extract	900	454.2	176.5	100	0.388	1
Bio-Gel P-6DG	1,160	319.8	137.0	77.6	0.428	1.1
CM-Toyoparl (stepwise) Pool 4	156.3	16.5	84.1	47.6	5.10	13.1
CM-Toyoparl (gradient) Pool 4-2	52.8	6.6	80.8	45.8	12.2	31.4
Sephacryl S-200 Pool 4-2-2	19.7	2.2	63.5	36.0	28.9	74.5
Mono S Pool 4-2-2-2	14.6	1.4	48.7	27.6	34.8	89.7

酵素活性は, ステップワイズ溶出法による CM-トヨパールクロマトグラフィーにおいて, 10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.5/50 mM NaCl により溶出された Pool 2 及び Pool 3, 更に 10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.5/100 mM NaCl で溶出された Pool 4 に存在したが活性主画分は Pool 4 であった (Fig. 1)。

Fig. 1 の左縦軸は 280 nm における吸光度 (実線), 右縦軸は活性 (点線) を表す。

今回は主画分 Pool 4 からペクチン分解酵素を単離・精製した。Pool 4-2-2-2 は, 最終的に 27.6% の

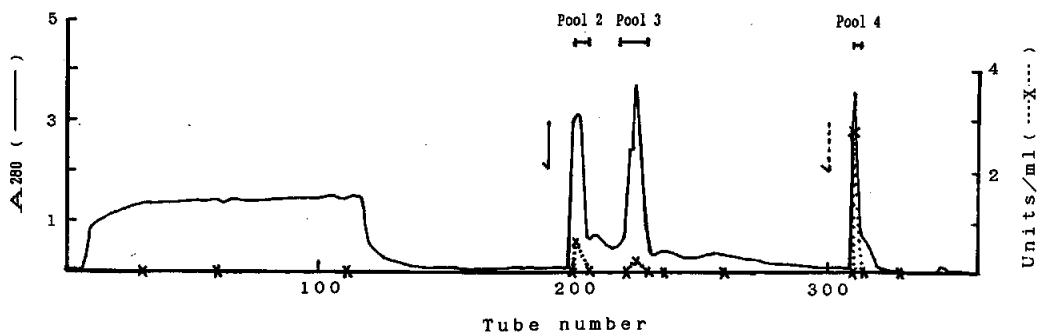


Fig. 1

高い活性収率で粗抽出液から約 90 倍に精製できた。この標品は pH 9.5 ゲル電気泳動で単一バンドを与え、さらに SDS 存在下でのゲル電気泳動でも単一バンド (分子量: 39,000) を与えた。等電点は等電点ゲル電気泳動から p 17.5 と決定した。今後は Pool 2 及び Pool 3 から酵素を単離・精製し、これらアイソザイムの性質をしらべ、低温環境への適応機構とどのように関連しているかを明らかにしたい。