

D307

Bacillus amyloliquefaciens を用いた酵素生産のプロテオーム解析

(北見工大)○(学)尾崎実織・(学)山口大輔・(正)多田清志・(正)菅野 亨・(正)堀内淳一*

1. 緒言

Bacillus amyloliquefaciens を用いた α -アミラーゼ生産を効率的に行うためには、カタボライト抑制の解除及びセルサイクルに関する培養状態をタンパク質レベルで解析することが有効と考えられる。本研究では、細胞内の発現タンパク質を二次元電気泳動及び TOF-MS を用いて網羅的に解析し、培養フェーズと酵素生産性との関係を検討した。

2. 実験方法

2-1 培養方法 菌株は *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC-23350) を使用した。本菌株は、グルコース枯渇に伴いカタボライト抑制が解除され、 α -アミラーゼを生産する。5 L ジャーファーマンターに α -アミラーゼ生産用基本培地 3 L を入れ、37℃、pH 7.0、好気条件下で流加培養を行った。グルコース流加は、培養液中のグルコース濃度が 300-500 mg/L に達した時、1.0 g-Glc/L・h の供給速度で行った。培養中、対数増殖期及び α -アミラーゼ生産期でサンプリングを行い、二次元電気泳動の解析に用いた。

2-2 二次元電気泳動 (2DE) 二次元電気泳動装置として Multiphor II (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を用いた。種々の培養フェーズにおける菌体サンプルからタンパク質を抽出し、一次元目で等電点の違い、二次元目で分子量の違いによって分離した。2DE で分離したタンパク質スポットは銀染色および CBB 染色で可視化し、2DE マップを作成した。

2-3 タンパク質の同定 2DE マップの画像解析を行い、ペプチドマスフィンガープリンティング法により作成した *B. subtilis* のデータベース (<http://microbial.biologie.uni-greifswald.de/>) を利用した。また、データベースに存在しないタンパク質の同定は、2DE マップのスポットを切り取り、酵素消化を行った後、TOF-MS (BRUKER DALTONIC 社 Ultraflex III) を用いて行った。

3. 結果および考察

Fig.1 に *B. amyloliquefaciens* を用いた典型的な流加培養の経時変化を示す。その結果、培養開始 4 h までは対数増殖期、培養開始 4 h 以降は α -アミラーゼ生産期という二つの培養フェーズが存在することがわかった。これは、グルコースが枯渇するとカタボライト抑制が解除され、 α -アミラーゼ生産が開始するためである。また、グルコース枯渇とともに胞子形成サイクルが進行し、培養後期では α -アミラーゼ生産が停止した。このことから、 α -アミラーゼ生産を効率的に行うにはカタボライト抑制の解除とセルサイクルの進行が重要である。そこで、これらの培養フェーズの挙動を細胞内の発現タン

パク質の観点から検討するために 2DE を用い、その結果を Fig.2 に示した。これは種々の培養フェーズの 2DE マップを作成し、データベースから同定したタンパク質を表記した図である。その結果、解糖系の酵素 (Gap, Pfk, Tpi, Pgm, PykA)、TCA サイクルの酵素 (CitA)、 σ 因子 (SigA, B, G, X, Z) およびストレスタンパク質 (GsiB) が同定された。しかしながら、2DE マップからスポットとして検出された 35 個のタンパク質はデータベースになく、未同定のままである。よって、詳細な培養フェーズと酵素生産性との関係を検討するために、未同定のタンパク質スポットを TOF-MS を用いて同定する予定である。

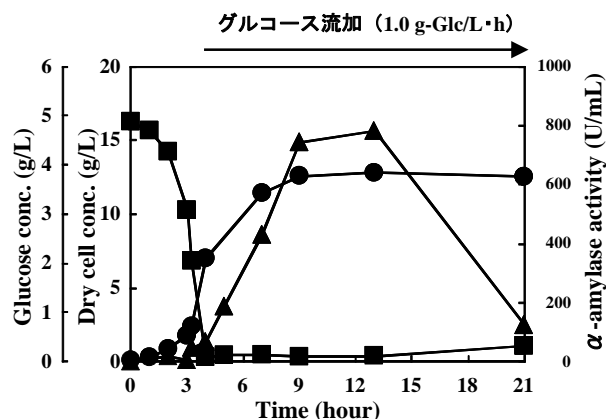


Fig.1 *B. amyloliquefaciens* を用いた流加培養の経時変化
シンボル: ●, 菌体濃度; ■, グルコース濃度; ▲, α -アミラーゼ活性

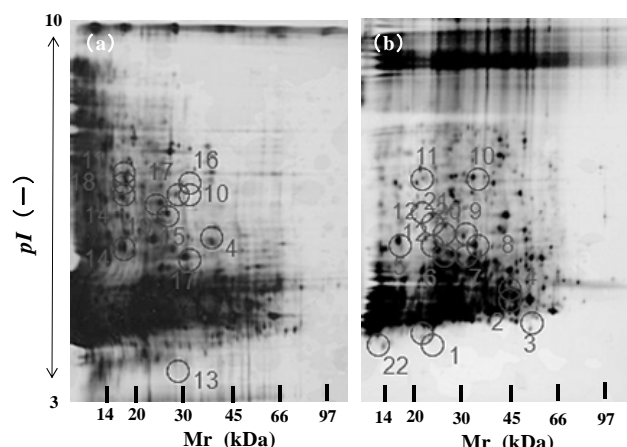


Fig.2 種々の培養フェーズにおける 2DE マップ

(a) 対数増殖期、(b) α -アミラーゼ生産期

解糖系:16.GapB, 19.Pfk, 1.Tpi, 2.Pgm, 3.PykA TCA:10.CitA
PP 経路:14.YwjH, 4.YpjJ, 12.YwjH σ 因子:13.SigA, 18.SigZ,
6.SigG, 11.SigX, SigB 胞子形成:17.YrbA, 8.YrbA, SpooA
ストレス:5.GsiB, 22.CspB

*Tel : 0157-26-9415 Fax : 0157-24-7719

E-mail : horiucju@mail.kitami-it.ac.jp