

130 好熱性細菌における宿主・ベクター系の利用 (第26報)

Bacillus stearothermophilus 中性プロテアーゼにおけるプレ・プロ構造の役割
(阪大・工・醸造) ○高木昌宏 今中忠行 合葉修一

(1. 目的) Bacillus stearothermophilus 中性プロテアーゼ構造遺伝子(npT)は、548アミノ酸残基のポリペプチドをコードしており、そのC末端側の319アミノ酸残基の領域が成熟タンパクとして菌体外へ分泌されている。¹⁾ N末端側のプレ・プロ構造中のプロ領域内に欠失及び挿入変異を導入すると、菌の生育及びプロテアーゼ生産性が悪くなることが判った。²⁾ 本研究では、このプロ領域が成熟領域の蛋白分解能を抑制しているか否か、更にプロ領域内の変異導入後のプロセシングに関して調べることを目的とした。

(2. 方法) プロ領域内に変異をもつプラスミド並びに野生型プラスミドを *in vitro* で転写翻訳させ、産物であるプレ・プロ・プロテアーゼの蛋白分解能をカゼイン加水分解活性により測定した。また、ペニシリナーゼ分泌ベクターを用いてプロ領域を約半分欠失した組換えプラスミドを作製し、プロテアーゼ生産性を調べた。更に欠失変異プラスミド保持株を培養しプロテアーゼを精製後、野生型のものと分子量及び比活性を比較した。

(3. 結果) *In vitro* 翻訳産物は野生型、変異型ともに蛋白分解能を有しておりました。ペニシリナーゼ分泌ベクターを利用した欠失変異プラスミド保持株と良好なプロテアーゼ生産性を示したことから、プロ構造は成熟領域の活性を抑制する機能を有していないと考えられる。またプロ領域内に33アミノ酸欠失をもつプラスミド保持株が生産するプロテアーゼを精製したところ野生型酵素(MW38579)に比し、大小2種のタンパク(MW55,000及び25,000)が検出され野生型と異なるプロセシングを受けていると考えられた。

1) Takagi, M. et al.: J. Bacteriol. 163 824-831 (1985) 2) 高木昌宏: 昭和61年度農芸化学会大会(京都)要旨集 P. 10.

Role of Pre-pro structure of Neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus.
Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka, and Shuichi Aiba (Department of Fermentation Technology,
Faculty of Engineering, Osaka University, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565)

131 好熱性細菌における宿主・ベクター系の利用 (第27報)

好熱性細菌由来耐熱性プロテアーゼのクローニング
(阪大・工・醸造) ○久保 幹 高木昌宏 今中忠行 合葉修一

1. 目的. 好熱性細菌は一般に比増殖速度が大きく、熱に対してのみならず各種の化学薬品に対しても安定で、長期間の使用にも比較的治性低下が少く、などの利点を有し工業的利用価値が高いと考えられる。また Bacillus 属細菌は菌体外に多数の酵素を分泌するという特徴も有している。本研究ではその耐熱性機構を解明する為、好熱性細菌由来で2種の耐熱性の異なる耐熱性プロテアーゼ構造遺伝子を枯草菌を宿主としてクローニングすることを試みた。

2. 方法. DNA感受体として耐熱性プロテアーゼ生産菌 Bacillus stearothermophilus NCA1503 及び B. stearothermophilus MK-222 を用いた。宿主菌としては B. subtilis HT-2(Npr)、ベクタープラスミドとして pTB53 (Km^r, Tc^r) を用い、ショットガン法によりクローニングを試みた。形質転換はコンピテンセル法を用い、プロテアーゼのプレートテストでは1%カゼインを含む寒天培地上でコロニー形成後、その周辺に生じるハロの有無により検定した。酵素活性の測定はカゼイン消化法により定量化した。

3. 結果. pTB53 の PstI site に2種の耐熱性プロテアーゼのクローニングを行った。その結果、NCA1503株からは1株、MK-222株からは6株のハロを形成する形質転換体が得られた。これらの組換えプラスミドを調べたところそれぞれ3.3md、及び5.5mdのDNA断片が挿入された。形質転換株の生産する酵素は65℃、15分の熱処理後にも活性を有していることから2種の耐熱性プロテアーゼ構造遺伝子がクローニングされているものと思われる。組換えプラスミドの小型化の結果も併せて報告する。

Molecular Cloning of Thermostable Protease from Bacillus stearothermophilus
Motoki Kubo, Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka, and Shuichi Aiba (Department of Fermentation
Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565)