

52 酵素および酵素工学

219

高度好熱性嫌気性細菌由来の耐熱性セルラーゼの精製とその性質

(名大・工)

○曾田裕行・本多裕之・飯島信司・小林 猛

1) 緒言 我々が先に温泉土壤中より単離した高度好熱性嫌気性細菌NA10株(IFO 14436)は75℃に至適生育温度を持つグラム陰性細菌である。また、NA10株は多種のセルラーゼを生産して、セルロースを分解する能力を有する。既に我々は、そのうち数種のセルラーゼ遺伝子が大腸菌にクローン化している¹⁾。今回、このNA10株が生産する耐熱性セルラーゼ(β -グルカナナーゼI)を精製して、その性質を調べたので報告する。

2) 実験方法 NA10株の培養上清を濃縮し、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過を行なってSDS-PAGEで単一の β -グルカナナーゼIの精製標品を得た。また、 β -グルカナナーゼ、セロビオヒドロラーゼ活性の測定には、それぞれカルボキシメチルセルロース(CMC)、p-ニトロフェニル- β -D-セロビオシド(PNPC)を基質として用いた。

3) 結果 精製された β -グルカナナーゼIの最終比活性は、2.45(U/mg-protein)であった。またCMCに対する至適反応温度は約85℃にあり、80℃、3時間の処理後も約80%の残存活性を維持する耐熱性の酵素であることがわかった。また分子量は、165,000(Sephacryl S-300HR)、185,000(SDS-PAGE)であった。SDS-PAGEの結果からは、 β -グルカナナーゼIは、NA10株が菌体外に分泌するセルラーゼのなかでは、最も大量に存在するものの一つであることもわかった。さらにSDS-PAGEに引き続いて、フクシン-過ヨウ素酸法により糖染色を施したところ、 β -グルカナナーゼIは糖タンパク質であることがわかった。

参考文献 1) Honda, et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 480 (1987)

Purification and characterization of a thermostable cellulase from an extreme anaerobic thermophile

Hiroyuki Sota, Hiroyuki Honda, Shinji Iijima and Takeshi Kobayashi
Dept. of Chemical Engineering, Nagoya University

220

Clostridium josuiのカルボキシメチルセルラーゼ(CMCase)の精製

(名古屋製酪¹⁾、TISTR²⁾、名大農³⁾ 藤野槌美¹⁾、○ジラボン・スクマバシ²⁾、
佐々木卓治³⁾、大宮邦雄³⁾、清水祥一³⁾

1. 目的: 結晶性セルロース(アビセル)を分解利用し、エタノールと酢酸を生成できる微好温性嫌気性細菌をコンポストより単離した¹⁾。本菌の諸性質を調べたところクロストリジウムに属する新種と断定し、*Clostridium josui*と命名した。本菌は、アビセルの他にボールミルで磨砕した純粋セルロース(BMC)、粉末にした稲わらやホテイアオイ等を分解し、強いセルラーゼ活性を有することが判明した。しかし、そのセルラーゼの特性については、全く不明である。そこで、今回は、本菌のカルボキシメチルセルロース分解酵素(CMCase)を精製し、その性質を検討した。

2. 方法および結果: *C. josui*をセロビオースを主炭素源とするイーストエキス含有培地に培養したところ、45℃、pH 6.8の嫌気条件で最大増殖速度0.22 h⁻¹を得た。この条件下では、4.5 g/LのアビセルおよびBMCは2~3日で分解された。BMCがほぼ分解された培養3日後に上清を分離し、1000倍容のリン酸緩衝液(pH 7.5、0.01 M)に透析した後、DEAE Bio-Gel Aに吸着させ、その後6 M尿素含有の上記緩衝液で平衡化した。6 M尿素存在下でNaCl濃度を直線的に増加し、蛋白を溶出した。その結果CMCaseは0.23 M NaClで溶出された。この活性画分をMono Qカラムに吸着させ、上記と同様の条件で溶出したところ、0.05 M NaCl画分にCMCase活性が検出された。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動でこの活性画分が単一の蛋白成分にまで精製されていることを確認した。比活性は68倍に上がっていた。精製CMCaseの分子量は約45kdで、至適のpHおよび温度は6.8および60℃であった。本酵素のN末端アミノ酸配列はTyr-Asp-Ala-Ser-Leu-Lys-Pro-Asn-Leu-Gln-Ile-Pro-Gln-Lys-Asn-Ile-Pro-Asn-Asn-Aspであった。

1) J. Sukhumavasi et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 38 (2), 179-182 (1988).

Purification of Carboxymethyl Cellulase (CMCase) from *Clostridium josui*
Tsuchiyoshi Fujino¹⁾, Jiraporn Sukhumavasi²⁾, Takuji Sasaki³⁾, Kunio Ohmiya³⁾ and Shoichi Shimizu³⁾
(Nagoya Seiraku Co¹⁾, TISTR²⁾, Nagoya University School of Agriculture³⁾)