

P17-11 : Native二次元電気泳動を用いた活性な亜酸化窒素還元酵素の検出方法の検討

横山 和平,藤田 大介¹,藤本 博子¹

¹山口大・農

農耕地は亜酸化窒素 (N_2O) の主要な排出

源のひとつとして考えられており

、亜酸化窒素還元酵素 (N_2OR) を持つ土壤脱窒菌による N_2O への還

元がいくつか

の研究で試みられている。

しかしながら、実際に土壤中で活性な N_2O

OR を発現している

脱窒菌群の特定には至っていない。

土壤から活性状態の N_2O

OR タンパク質が分離できれば、実際に活性な N_2O

OR を発現し

ている脱窒菌群を特定

することが可能である。本研究では、Nativeな

N_2O

OR の

二次元電気

泳動条件について検討

したので、途上であるが、その一部を報告す

る。材料及び方法：ペリプラズム画分を分子量分画後、粗タンパク質溶液をNative PAGEし活

性染色した。市販の一次元目用等電点ゲルの組成から、チオ尿素を除いたものを自作した。フ

ラスコに生土壤をとり、牛糞堆肥を5t/haの割合で混合して、嫌気条件で脱窒菌を集積した。こ

の土壤から間接法により菌体を集め破碎した。分子量10万以上の画分をNative二次元電気泳動

／活性染色に供した。結果及び考察：

用いた条件では、一次元目の等電点電気泳動ゲル中で等電点沈殿が起こり、特に高pH側に等電

点を

持つタン

パク質の二次元目N

ativeゲルへの移行が不十分だった。活

性染色をしても N_2O OR のスポットは得られなかった。 N_2O 還元活性を集積した土壤からのNative

PAGEゲルをCBB染色

しても明瞭なタンパク質バンドが得られな

かった。謝辞：

この研究は、文部省科学研究費24658063の支援を受けて行った。二次元電気泳動について、

アトー株式会社製品情報グループ 石田由加氏から多くの助言を頂いた。

keywords: 亜酸化窒素還元酵素, 活性染色, Native PAGE, 二次元電気泳動, 土壤