

## EDTA によるプロテアーゼ活性の抑制について

岡村 貴司

### 1. 研究目的

現在、実用化に向けたアユ冷水病ワクチンが試作されているが、試作ワクチンを長期に保存すると濁度が低下する。濁度が低下する原因として冷水病菌が産生するタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）がワクチンに含まれる抗原（冷水病菌）を分解している可能性が考えられ、それによりワクチンの効果が低減する可能性がある。

このため、EDTA を添加した場合のプロテアーゼの活性抑制効果を確認した。

### 2. 研究方法

プロテアーゼ活性の測定は、前頁と同様の方法により 420nm の吸光度 (O.D.<sub>420</sub>) を測定することにより行った。また、合わせて菌数の測定も行った。各時間において O.D.<sub>420</sub> および菌数の測定後に、EDTA を添加した。

Ca および EDTA の添加区には、それぞれの濃度を 1mM に調製した。

### 3. 研究結果

培養 72 時間後における対照区 (Ca および EDTA 無添加) の O.D.<sub>420</sub> は 0.061 であり、72 時間後まで上昇した (図 1)。しかし、EDTA を培養開始直後に添加した区 (EDTA 0h 区) では培養 48 時間後が最大値の 0.009 であり、プロテアーゼの活性が抑制されていた (図 1)。

対照的に Ca を添加した区では O.D.<sub>420</sub> が 0.130 まで上昇し、プロテアーゼの活性が高くなった (図 1)。

菌数は、対照区および Ca 添加区で培養 24 時間後に  $10^9$ CFU/ml 以上となり、72 時間後でも  $10^8$ CFU/ml 以上であった (図 2)。EDTA 0h 区では、24 時間後には冷水病菌が全く観察されなくなった (図 2)。

EDTA を培養開始直後、24 時間後、48 時間後に添加した場合では、添加後に O.D.<sub>420</sub> が増加することはなかった (図 1)。また、菌数は添加後に減少しており、EDTA により冷水病菌の増殖が抑制されていた (図 2)。

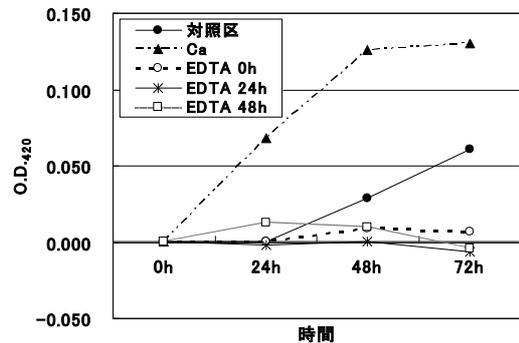


図 1. Ca および EDTA 添加区と無添加区における O.D.<sub>420</sub> の時間変化

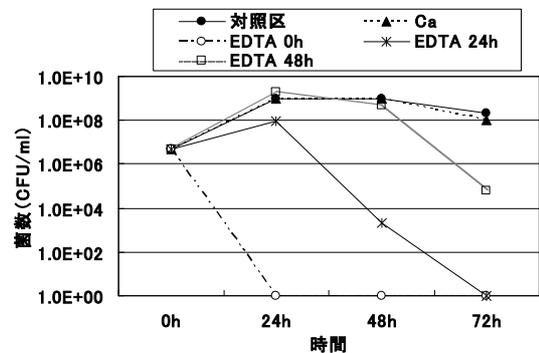


図 2. Ca および EDTA 添加区と無添加区における菌数の時間変化

### 4. 研究成果

EDTA のプロテアーゼ活性抑制効果により、試作ワクチンの濁度の低下を抑制できる可能性がある。

その他、EDTA のプロテアーゼ活性の阻害効果、冷水病菌の増殖抑制効果を利用して冷水病の被害の軽減が図れる可能性がある。