

酵素サイクリング法に利用するための脱水素酵素生産微生物の探索

バイオ科 飯塚千佳世 高木啓詞 太田俊也

Screening of the dehydrogenase producing microbes which are suitable for enzyme cycling method

Chikayo IIZUKA, Hiroshi TAKAGI and Toshiya OHTA

Keywords : Dehydrogenase, enzyme cycling method, screening.

キーワード：脱水素酵素、酵素サイクリング法、スクリーニング。

1 はじめに

伊藤らが開発した新規な酵素基質を用いた酵素サイクリング法¹⁻²⁾の実用化に向けては、酵素サイクリング反応に使用する脱水素酵素の精製度向上が望まれている。ここでは目的酵素を生産する微生物を自然界から探索した結果を報告する。

2 方法

2.1 試験試料

静岡県内の土壌、静岡県内で生産または流通された国産野菜に付着した土壌、静岡県内に自生または植栽された植物を試料とした。

2.2 試験方法

太田ら³⁾、三浦ら⁴⁾の方法を参考に、田代の無機基本培地に酵母エキス0.01^{w/v}%、グルコース0.1^{w/v}%、乳酸ナトリウム0.01^{v/v}%、コール酸ナトリウムを0.1^{w/v}%となるよう添加した培養液に試料を投入し、28℃で振とう培養した。培養液の一部を寒天培地に塗付し、28℃で静置培養して得たコロニーを単離した。単離した菌株は個々に培養し、4℃、2,000×gで15分間遠心分離後、上清を除去した沈殿物（菌体）につき凍結融解を2回繰り返した。再び遠心分離して得た上清を検

液とし、秋葉⁵⁾らの方法に準じて、酵素活性を測定した。すなわち、酵素基質にコール酸、補酵素に酸化型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）を用い、これに活性を有する酵素液を加えると生成する還元型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）の増加に伴う340 nmの吸光度上昇の様子を経時的に測定した。

また、選抜した陽性株については、16S rRNA遺伝子解析を実施したうえで属種を推定した。

続いて、分離株の基質利用能を判断するため、アンドロステロンについても基質利用能を確認した。

3 結果および考察

約1,200株について調査し選抜した結果、陽性株は5株に集約された。これらの16S rRNA遺伝子解析を実施したところ、それぞれ *Comamonas* 属、*Pseudomonas*属、*Paenibacillus*属、*Microbacterium*属、*Stenotrophomonas* 属と推定された。

また、基質利用能は、表に示したとおりであった。今後は、これらの産生する酵素の性能評価を行い、遺伝子工学的手法を取り入れ、サイクリング反応に利用する酵素の最適化を図る。

表 スクリーニング株の基質反応性

スクリーニング株の推定属名	基質への反応性	
	コール酸	アンドロステロン
<i>Comamonas</i> 属	○	○
<i>Pseudomonas</i> 属	○	○
<i>Paenibacillus</i> 属	○	△
<i>Microbacterium</i> 属	○	○
<i>Stenotrophomonas</i> 属	△	△

○：基質反応性が十分である △：基質反応性が他の株と比較して弱い

【ノート】

4 まとめ

自然界からのスクリーニングにより、サイクリング法に利用するための候補となる脱水素酵素生産株を5株獲得した。

今後は、これらの産生する酵素の性能評価を行い、サイクリング法に利用する酵素の最適化を図る。

参考文献

- 1) 伊藤悦朗：タンパク質および核酸の超高感度測定法．特許第5500985号、WO2008117816 A1、（優先日 2007.3.28）
- 2) 伊藤悦朗：タンパク質および核酸の超高感度測

定法.およびキット、並びに新規な酵素基質．特許第5265816号、WO2012128338 A1、（優先日 2011.3.23）

- 3) 太田俊也 他：アルキルフェノールを分解する微生物の探索と環境浄化技術への応用ーノニルフェノールを分解する微生物の単離ー，静岡県沼津工業技術センター研究報告，第8号，9-14（2000）
- 4) 三浦佳苗 他：3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの製造法およびこれに用いる微生物．特許番号第3251689号（2001.11.16）
- 5) 秋葉哲典 他：胆汁酸測定用試薬．特願昭60-290098（1985.12.23）