

Title	新規低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼのスクリーニングと特性の評価
Author(s)	山村, 晃
Citation	
Issue Date	1999-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	author
URL	http://hdl.handle.net/10119/2069
Rights	
Description	Supervisor:横山 憲二, 材料科学研究科, 博士

新規低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの
スクリーニングと特性の評価

北陸先端科学技術大学院大学

山 村 晃

新規低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼのスクリーニングと特性の評価

【概要】

酵素は反応選択性の優れた生体触媒であり、その構造と機能に関して数多くの研究がなされている。こうした酵素はすでに約2,700種類知られており、反応形式によって6種類に分類されている。一般に酵素は、中性、常温、常圧で効率的に反応を触媒するが、最近では、高温、低温、酸性、アルカリ性、有機溶媒などの特殊環境条件下で作用する酵素の研究が注目されている。一方、酵素の応用分野としては、酵素の特異反応性を利用した有用物質の合成、難分解性物質の分解、およびバイオセンサーなどの分析分野への応用が展開されている。本研究では、新規な酸化還元酵素を見出し、この特性を研究すると共にその応用についても検討する。特に全く研究が行われていない低温微生物由来のL-グルタミン酸酸化還元酵素を対象とし、新規な酵素を探索する。

本研究では、新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼを獲得するため、低温細菌を136株単離し、この中で最も高い活性を有する菌株を、酸化還元色素であるNBTとL-グルタミン酸を用いた活性染色によってスクリーニングした。低温細菌は、低温域で生育しているサケやカニの内臓などから単離した。スクリーニングの結果、単離した細菌の中で最も活性が高かったL101菌株を選択した。L101株は、鮭の内臓から単離された細菌で、15°Cを最適増殖温度に持つ低温細菌であった。この細菌は、生化学特性などがVibrionaceae科のAeromonas属に非常に類似しているが、系統樹作成による遺伝距離はVibrionaceae科と非常に離れており、オキシダーゼ陰性のEnterobacteriaceae科に近いという、新属新種の細菌であることがわかった。

次に、L101菌株が有するL-グルタミン酸酸化還元酵素を精製した。L101株は、15°Cで培養した時が、本酵素の生産に一番良いことが明らかになった。この酵素は、細菌を超音波で破碎し、各種クロマトグラフィによって、70倍に精製され、Native-PAGEと等電点電気泳動的に単一にまで精製できた。精製された酵素の分子量は約110kDaであり、約34kDaと約76kDaの分子量の異なる2つのサブユニットによって酵素分子が形成される新規のL-グルタミン酸酸化還元酵素であることが明らかになった。また、この新規のL-グルタミン酸酸化還元酵素は、最大活性を示す温度が55°Cで活性化エネルギーもウシ肝臓由来のGLDHに比べて約60%の活性化エネルギーで反応を触媒する低温活性酵素であった。また、pH8.5で最も高い反応が得られ、pH6~11の間で安定に存在した。基質特異性はL-グルタミン酸が選択的に反応しL-アスパラギン酸、L-グルタミンともそれぞれ15%、10%反応した。電子受容体に、酸素、NAD⁺、NADP⁺を使用せず、シトクロムcや酸化還元色素を利用するアクセプター型のデヒドロゲナーゼであった。この酵素の示差吸収スペクトル(還元体-酸化体のスペクトル)には、556、524、418nmに極大が存在しており、これは、ヘムb及びヘムcの α -、 β -、 γ -バンドに相当するピークであることが考えられ、酵素にヘムb及びヘムcが含有されている可能性が見いだされた。また、この酵素のアルカリ性ピリジンフェロヘモクロムの α -バンドが556nmにあることから、このヘムはヘムbであることが同定された。また、発光分光分析(ICP)によって、本酵素中に含有される鉄の量は、酵素1分子あたり、1つの鉄を含有していることがわかった。示差スペクトル及びピリジンヘモクロムのスペクトルの結果と共に考えると、この酵素には1つのヘムbを含有していることを示唆している。

最後に、この新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼを用いてバイオセンサーを構築した。本酵素を用いたバイオセンサーは、低温(5°C)においてもL-グルタミン酸に対して触媒電流が流れた。

目次

項

第1章 緒論	1
1.1 緒言	2
1.2 酵素の補酵素およびアクセプター型デヒドロゲナーゼについて	2
1.2.1 ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD ⁺)、ニコチンアデニンジヌクレオチド フォスフェート(NADP ⁺)	5
1.2.2 フラビンモノヌクレオチド(FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)	5
1.2.3 ヘム	11
1.3 L-グルタミン酸酸化還元酵素	11
1.3.1 L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)	11
1.3.2 グルタミン酸オキシダーゼ	15
1.4 低温適応生物と低温活性酵素	16
1.4.1 低温適応生物	16
1.4.2 低温活性酵素	17
1.5 酵素のバイオセンサーへの応用	18
1.6 本研究の意義と目的	23
第2章 L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する低温細菌のスクリーニングと菌 体同定	24
2.1 緒言	25
2.2 実験方法	26
2.2.1 試薬および機器	26
2.2.2 低温細菌の単離	28
2.2.3 GLDHのスクリーニング	29
(1) 細菌の培養および粗酵素液の獲得	29
(2) GLDHの活性染色	32
(3) GLDH活性の測定	32
2.2.4 低温細菌L101株の形状及び生化学的特性の評価	34
(1) コロニーの形状	34
(2) グラム染色	34
(3) 運動性の確認	34
(4) 鞭毛染色	35
(5) 細菌の走査型電子顕微鏡写真	35
(6) O/Fテスト	35
(7) 硝酸塩の還元	36
(a) 亜硝酸塩の生成	36
(b) 脱窒化反応	36
(8) Voges-Proskauer(V-P)反応とメチルレッド試験	36
(a) V-P反応	37
(b) メチルレッド試験	37

(9) 最適生育条件.....	37
(10) 菌体内酵素.....	38
(a) オキシダーゼ.....	38
(b) カタラーゼ.....	38
(c) アルカリ・酸性ホスファターゼ.....	38
(d) ウレアーゼ.....	39
(e) β -ガラクトシダーゼ.....	39
(f) アルギニンジヒドロラーゼ.....	39
(g) リジンデカルボキシラーゼ.....	39
(h) オルニチンデカルボキシラーゼ.....	40
(11) 菌体外酵素.....	40
(a) リパーゼ(Tween分解酵素).....	40
(b) アミラーゼ.....	40
(c) プロテアーゼ.....	41
(d) ゼラチナーゼ.....	41
(e) DNase.....	41
(12) 炭素源の資化.....	41
(a) クエン酸の資化.....	42
(b) 糖類の資化.....	42
(13) ナトリウムイオンの要求性.....	42
(14) <i>Vibrio</i> 属細菌の抗生物質耐性.....	42
(15) 選択培地上の生育.....	43
(a) TCBS寒天培地.....	43
(b) マッコンキー寒天培地.....	43
(16) 生成物.....	44
(a) 硫化水素生成.....	44
(b) インドール生成.....	44
(c) 糖からのガス生成.....	44
2.2.5 低温細菌L101株の遺伝子による分析.....	44
(1) G+C含有率.....	45
(a) 遺伝子の抽出方法.....	45
(b) RNaseおよびDNase処理.....	46
(c) HPLCによるG+C含有率の決定法.....	46
(2) 16S rDNA配列による系統樹作成.....	47
(a) PCRによる16S rDNAの増幅.....	47
(b) 16S rDNA塩基配列の決定.....	49
(c) 相同性比較と系統樹の作成法.....	50
2.3 実験結果.....	51
2.3.1 低温細菌の単離.....	51
2.3.2 GLDHのスクリーニング.....	51
(1) GLDHの活性染色.....	51
(2) GLDH活性の測定.....	53

2.3.3	低温細菌L101株の形状及び生化学的特性の評価.....	53
(1)	コロニーの形状.....	53
(2)	グラム染色.....	53
(3)	運動性の確認.....	53
(4)	鞭毛染色.....	53
(5)	細菌の走査型電子顕微鏡写真.....	55
(6)	O/Fテスト.....	55
(7)	硝酸塩の還元.....	55
	(a) 亜硝酸塩の生成.....	55
	(b) 脱窒化反応.....	55
(8)	Voges-Proskauer(V-P)反応とメチルレッド試験.....	59
	(a) V-P反応.....	59
	(b) メチルレッド試験.....	59
(9)	最適生育条件.....	59
(10)	菌体内酵素.....	59
	(a) オキシダーゼ.....	59
	(b) カタラーゼ.....	59
	(c) アルカリ・酸性ホスファターゼ.....	63
	(d) ウレアーゼ.....	63
	(e) β -ガラクトシダーゼ.....	63
	(f) アルギニンジハイドロラーゼ.....	63
	(g) リジンデカルボキシラーゼ.....	63
	(h) オルニチンデカルボキシラーゼ.....	64
(11)	菌体外酵素.....	64
	(a) リパーゼ(Tween分解酵素).....	64
	(b) アミラーゼ活性.....	64
	(c) プロテアーゼ活性.....	64
	(d) ゼラチナーゼ活性.....	67
	(e) DNase活性.....	67
(12)	炭素源の資化.....	67
	(a) クエン酸の資化.....	67
	(b) 糖類の資化.....	67
(13)	ナトリウムイオンの要求性.....	69
(14)	<i>Vibrio</i> 属細菌の抗生物質耐性.....	69
(15)	選択培地上の生育.....	69
	(a) TCBS寒天培地.....	69
	(b) マッコンキー寒天培地.....	69
(16)	生成物.....	70
	(a) 硫化水素生成.....	70
	(b) インドール生成.....	70
	(c) 糖からのガス生成.....	70
2.3.4	低温細菌L101株の遺伝子による分析.....	70

(1) G+C含有率.....	70
(2) 16S rDNA配列による系統樹作成.....	70
(a) 16S rDNA塩基配列.....	70
(b) 相同性と系統樹.....	73
2.4 考察.....	73
2.5 結言.....	80

第3章 低温細菌L101株の培養条件の検討とL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの精製

.....	82
3.1 緒言.....	83
3.2 実験方法.....	83
3.2.1 試薬および機器.....	83
3.2.2 GLDHの生産のための低温細菌L101株の最適培養条件の検討.....	84
3.2.3 GLDHの精製と精製度の確認.....	85
(1) GLDHの精製.....	85
(a) 細菌の大量培養.....	85
(b) 粗酵素液.....	85
(c) DEAE-Sephadexクロマトグラフィー.....	86
(d) 硫酸アンモニウム分画.....	86
(e) ゲル濾過クロマトグラフィー.....	87
(f) Q-Sephadexクロマトグラフィー.....	87
(g) CM-Sephadexクロマトグラフィー.....	87
(h) Phenyl-Sephadexクロマトグラフィー.....	88
(2) 酵素精製度の確認および酵素の分子量の推定.....	88
(a) Native-PAGE.....	89
(b) SDS-PAGE.....	89
(c) 等電点電気泳動.....	89
(d) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の決定.....	90
3.3 実験結果及び考察.....	90
3.3.1 GLDHの生産のための低温細菌L101株の最適培養条件の検討.....	90
3.3.2 GLDHの精製と精製度の確認.....	90
(1) GLDHの精製.....	92
(a) 粗酵素液.....	92
(b) DEAE-Sephadexクロマトグラフィー.....	92
(c) 硫酸アンモニウム分画.....	92
(d) ゲル濾過クロマトグラフィー.....	92
(e) Q-Sephadexクロマトグラフィー.....	96
(f) CM-Sephadexクロマトグラフィー.....	96
(g) Phenyl-Sephadexクロマトグラフィー.....	96
(h) 精製のまとめ.....	96
(2) 酵素の精製度の確認および分子量の推定.....	98

(a)	Native-PAGE.....	98
(b)	SDS-PAGE.....	98
(c)	等電点電気泳動.....	98
(d)	ゲル濾過クロマトグラフィー.....	102
3.4	結言.....	102
第4章	L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特性評価.....	105
4.1	緒言.....	106
4.2	実験方法.....	106
4.2.1	試薬および機器.....	106
4.2.2	酵素活性の温度依存性と熱安定性と活性化エネルギー.....	107
4.2.3	酵素活性のpH依存性とpH安定性.....	108
4.2.4	基質特異性.....	108
4.2.5	電子受容体との反応性.....	108
4.2.6	阻害剤.....	109
4.2.7	酵素の速度論的解析.....	111
4.2.8	生成物の確認.....	111
(1)	アンモニアの生成.....	112
(2)	2-オキシグルタル酸の生成.....	112
(3)	過酸化水素.....	112
4.3.9	補欠分子団の確認.....	112
(1)	活性染色.....	112
(2)	酸化体と還元体の可視・紫外吸収スペクトル、差スペクトル.....	113
(3)	ピリジンヘモクロム.....	113
(4)	発光分光分析(ICP)による鉄の確認.....	113
4.3	実験結果及び考察.....	113
4.3.1	酵素活性の温度依存性と熱安定性と活性化エネルギー.....	113
4.3.2	酵素活性のpH依存性とpH安定性.....	116
4.3.3	基質特異性.....	116
4.3.4	電子受容体との反応性.....	116
4.3.5	阻害剤.....	119
4.3.6	酵素の速度論的解析.....	122
4.3.7	生成物の確認.....	122
(1)	アンモニア.....	122
(2)	2-オキシグルタル酸.....	122
(3)	過酸化水素.....	125
4.3.8	補欠分子団の確認.....	125
(1)	活性染色.....	125
(2)	酸化体と還元体の可視・紫外吸収スペクトル、差スペクトル.....	125
(3)	ピリジンヘモクロムのスペクトル.....	128
(4)	発光分光分析(ICP)による鉄の確認.....	128
4.4	結言.....	129

第5章 L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼのセンサーへの応用.....	130
5.1 緒言.....	131
5.2 実験方法.....	131
5.2.1 試薬および機器.....	131
5.2.2 基質、酵素、電子メディエーター均一系での電気化学的特性.....	131
(1) 電子メディエーターの反応特性.....	132
(2) pH依存性.....	132
(3) 温度依存性.....	132
5.2.3 酵素、電子メディエーター固定化電極の電気化学的特性.....	132
(1) 固定化方法.....	132
(2) L-グルタミン酸濃度の依存性.....	133
5.3 実験結果と考察.....	133
5.3.1 基質、酵素、メディエーター均一系での電気化学的特性.....	133
(1) 電子メディエーターの反応性.....	133
(2) pH依存性.....	133
(3) 温度依存性.....	137
5.3.2 酵素、電子メディエーター固定化電極の電気化学的特性.....	137
5.4 結言.....	137
第6章 結論.....	141
参考文献.....	144

謝辞

1.1 概要

酵素は反応速度の優れた生体触媒であり、その構造と機能に関して数多くの研究がなされている。こうした酵素はすでに約2,000種類知られており、反応形式によって6種類に分類されている。一般に酵素は、中性、室温、水の中で過半数的に反応を触媒するが、第1章は、酸性、塩基性、アモフィ性、有機溶媒などの特殊環境条件下で作用する酵素の研究が注目されている。一方、酵素の応用分野としては、酵素の特異反応性を利用した有用物質の合成、難分解性物質の分解、およびバイオセンサーなどの分析分野への応用が展開されている。

第1章

緒論

は、新規の酸化還元酵素を見出し、その特性を研究すると共にその応用についても検討する。特に全く研究が行われていない脱色微生物由来のシグルタミン酸酸化還元酵素を対象とし、新規な酵素を探索する。またこの酸化還元酵素はバイオセンサーの生体分子としての応用も期待でき、これに関する検討を行う。

第2章では、1.1節で酵素に含まれる補酵素およびアクセプター型とヒドロゲナーゼについて、1.3節で本研究の中心であるシグルタミン酸酸化還元酵素について、1.4節でこの研究で発見した脱色活性酵素について、1.5節で最終目的であるシグルタミン酸センサーについて、1.6節でこの研究の意義について述べることにする。

1.2 酵素の補酵素およびアクセプター型とヒドロゲナーゼについて

酵素には、タンパク質を成分の他に熱に比較的安定な有機化合物、補酵素を有するものがある。酸化還元酵素でよく補酵素になるものは、NADH、NADP⁺、FMN、FAD、ヘムなどである。これらの補酵素は、活性中心に存在するアミノ酸残基と協力しあい、酸化還元反応を触媒している。また、これらの補酵素は、特有の可視紫外吸収を持つものが多く、Table 1-1に補酵素の一覧を示す。また、現在までに報告されているアミノ酸関連の酸化還元酵素の補酵素についてTable 1-2に示す。

1.1 緒言

酵素は反応選択性の優れた生体触媒であり、その構造と機能に関して数多くの研究がなされている。こうした酵素はすでに約2,700種類知られており、反応形式によって6種類に分類されている。一般に酵素は、中性、常温、常圧で効率的に反応を触媒するが、最近では、高温、低温、酸性、アルカリ性、有機溶媒などの特殊環境条件下で作用する酵素の研究が注目されている。一方、酵素の応用分野としては、酵素の特異反応性を利用した有用物質の合成、難分解性物質の分解、およびバイオセンサーなどの分析分野への応用が展開されている。

本研究では、新規な酸化還元酵素を見出し、この特性を研究すると共にその応用についても検討する。特に全く研究が行われていない低温微生物由来のL-グルタミン酸酸化還元酵素を対象とし、新規な酵素を探索する。またこの酸化還元酵素はバイオセンサーの生体素子としての応用も期待でき、これに関する検討も行う。

緒言では、1.2節で酵素に含まれる補酵素およびアクセプター型デヒドロゲナーゼについて、1.3節で本研究の研究の中心であるL-グルタミン酸酸化還元酵素について、1.4節でこの研究で着目した低温活性酵素について、1.5節で最終目的であるグルタミン酸センサーについて、1.6節でこの研究の意義について述べることにする。

1.2 酵素の補酵素およびアクセプター型デヒドロゲナーゼについて

酵素には、タンパク質主成分の他に熱に比較的安定な有機化合物、補酵素を有するものが存在する。酸化還元酵素でよく補酵素になるものは、 NAD^+ 、 NADP^+ 、FMN、FAD、ヘムなどである。これらの補酵素は、活性中心に存在するアミノ酸残基と協力しあい、酸化還元反応を触媒している。また、これらの補酵素は、特有の可視紫外吸光を持つ物が多い。Table 1-1に補酵素の一欄を示す。また、現在までに報告されているアミノ酸関連の酸化還元酵素の補酵素についてTable 1-2に示す。

Table 1-1 補欠分子族 (補酵素) と酵素との結合特性

基本骨格	補欠分子族 (補酵素)	λ_{Max} (nm)	結合様式*1
ポリフィリン	ヘム a	(還元型) 439, 600	n.c.
	ヘム b	(還元型) 429, 532, 563	n.c.
	ヘム c	(還元型) 415, 521, 550	c.チオエーテル結合
	ヘム c_I	(還元型) 418, 524, 554	c.チオエーテル結合
リボフラビン	FMN	(酸化型) 266, 373, 445	n.c.結合は強い
	FAD	(酸化型) 263, 375, 450	n.c.結合は強い
ニコチン酸	NAD (補酵素I)	(還元型) 259, 358 (酸化型) 259	n.c.
	NADP (補酵素II)	(還元型) 259, 339 (酸化型) 259	n.c.
キノン	PQQ(ピロキノリンキノン)	(還元型) 354 (酸化型) 362	n.c.
	TOPA (3,4,6-トリヒドロキシフェニルアラニン)		c.
金属イオン	Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Mo ⁶⁺ など モリブデンコファクター	- -	n.c. n.c.

* 1 c.:共有結合型、n.c.:非共有結合型

Table 1-2 アミノ酸関連の酸化還元酵素

Enzyme	EC	MW	Cofactor
D-Amino-acid dehydrogenase	1.4.99.1	?	flavin, cytochrome
L-Amino-acid dehydrogenase	1.4.1.5	?	NAD
D-Amino-acid oxidase	1.4.3.3	40kDa	FAD
L-Amino-acid oxidase	1.4.3.2	88.9kDa(rat) or 130kDa(snake)	FMN or 2 FAD
L-Alanine dehydrogenase	1.4.1.1	230kDa (6 subunits)	NAD
D-Aspartate oxidase	1.4.3.1	?	FAD
L-Cystine reductase	1.6.4.1	?	NADH
Glycine dehydrogenase	1.4.1.10	?	NAD
Glycine-cytochrome c reductase	1.4.2.1	?	cytochrome c
D-Proline reductase	1.4.1.6	327kDa (10 subunits)	NADH
L-Serine dehydrogenase	1.4.1.7	?	NAD
L-Valine dehydrogenase	1.4.1.8	80kDa	NADP
L-Leucine dehydrogenase	1.4.1.9	245kDa (6 subunits)	NAD
L-Lysine dehydrogenase	1.4.1.15	?	NAD
L-Lysine oxidase	1.4.3.14	116kDa (2 subunits)	2 FAD
L-Glutamate dehydrogenase	1.4.1.2	120~480kDa (4 subunits)	NAD
	1.4.1.3	250~330kDa (6 subunits)	NAD or NADP
	1.4.1.4	120~410kDa (6 subunits)	NADP
Glutamate synthase	1.4.1.13	800kDa (4 subunits)	32 Fe, 32 S, 8 flavin, NADPH
	1.4.1.14	220kDa	FMN, NADH
D-glutamate oxidase	1.4.3.7	?	FAD
L-glutamate oxidase	1.4.3.11	?	FAD

この酵素が有する補酵素の種類および、これを取り巻くタンパク質の環境によって、酸素およびNAD(P)⁺などと電子授受せず、シトクロムc、キノン類、酸化還元色素とのみ反応するアクセプター型のデヒドロゲナーゼとなることがある。現在までにアクセプター型のデヒドロゲナーゼとして、フラビン系の補酵素を持つ物[1,2]、ヘムを含有している物[2,3]、キノンを含んでいる物[4]などが報告されている。

1.2.1 ニコチンアミド アデニンジヌクレオチド (NAD⁺)、ニコチンアデニンジヌクレオチドフォスフェート (NADP⁺)

NAD⁺、NADP⁺は、Fig.1-1に示す構造を持つ生体酸化還元の重要な補酵素で、非常に多くの酵素の補酵素として働き、多種類の生体物質の脱水素による不飽和化および不飽和結合の還元に関与する。NAD⁺、NADP⁺の関与する酸化還元反応では、2つの水素が移動するが、補酵素と基質の間で受け渡しされるのは、補酵素のピリジン基のヒドリドイオン(H⁻)で、もう1つは溶媒のH⁺が関与するものと考えられている。NAD⁺、NADP⁺は、Fig.1-2に見られるように、還元型になると340nmに強い吸収が現れる。

1.2.2 フラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)

FMN、FADは、Fig.1-3に示す構造を有している。FMN、FADのどちらか、または両者を含むタンパク質(フラビンタンパク質)は、生体内酸化還元系(デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)、オキシダーゼ(酸化酵素)、オキシゲナーゼ(酸素添加酵素)、レダクターゼ(還元酵素))や、ミトコンドリア、ミクロソームなどで水素および電子の伝達などに関与している。フラビン類は酸化状態で黄色を呈し、可視部ならびに近紫外部に特徴的なスペクトルを示す (Fig.1-4)。フラビン補酵素は、Fig.1-5に示すように酸化型(フラボキノン)、半還元型(

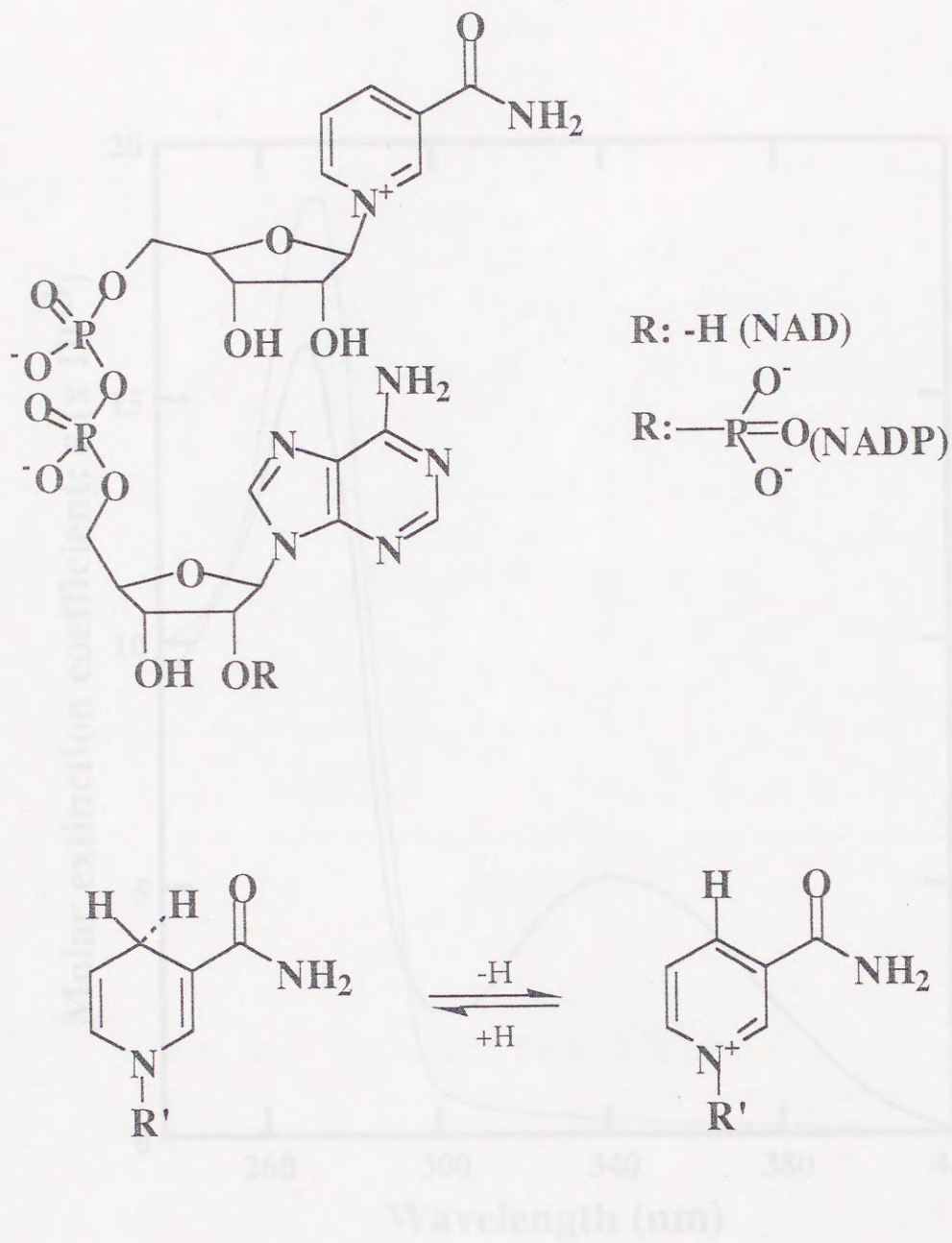


Fig. 1-1 Structure of NAD⁺ or NADP⁺.

Fig. 1-2 Absorption spectra of NAD(P)⁺ (—) and NAD(P)H (---).

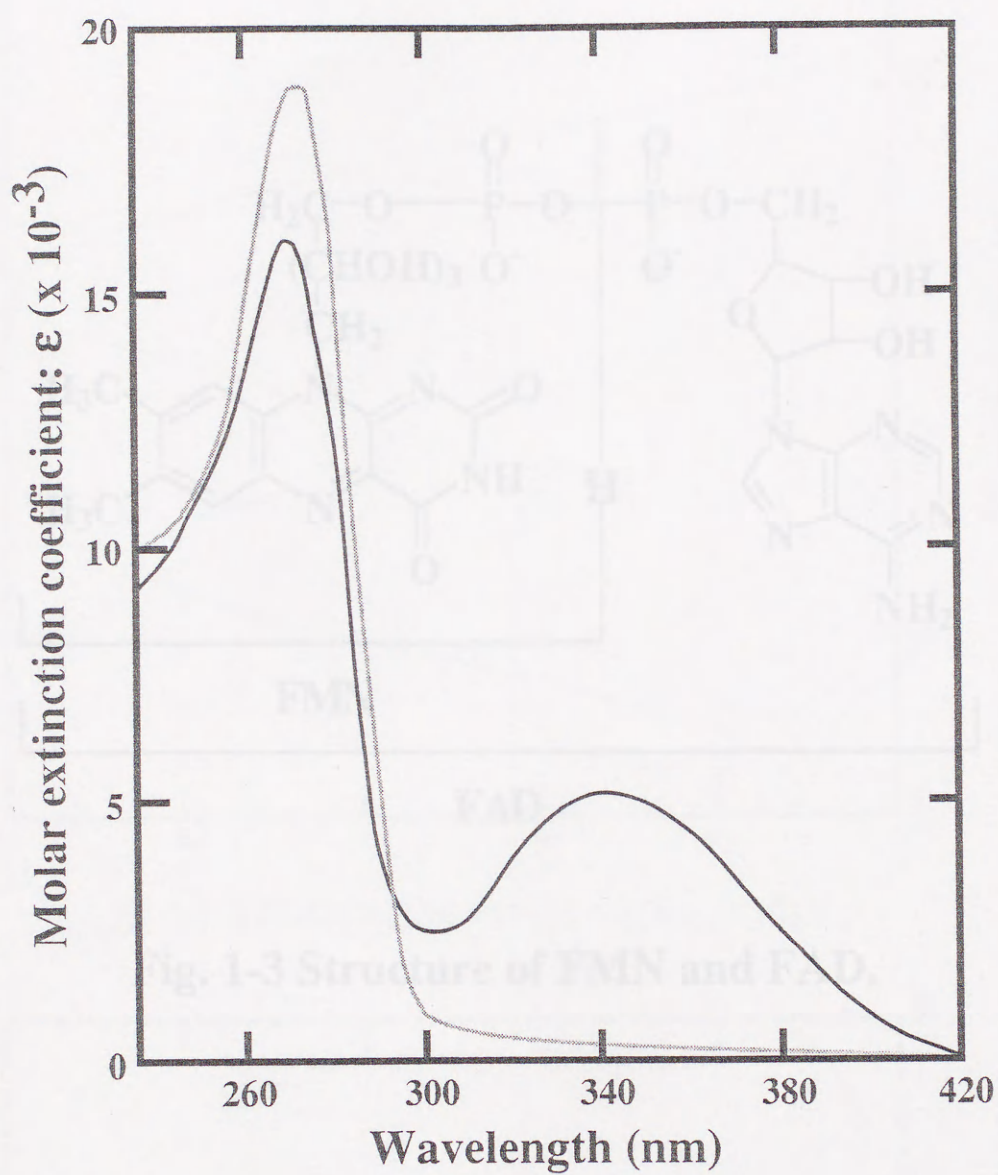


Fig. 1-2 Absorption spectra of NAD(P)⁺ (—) and NAD(P)H (---).

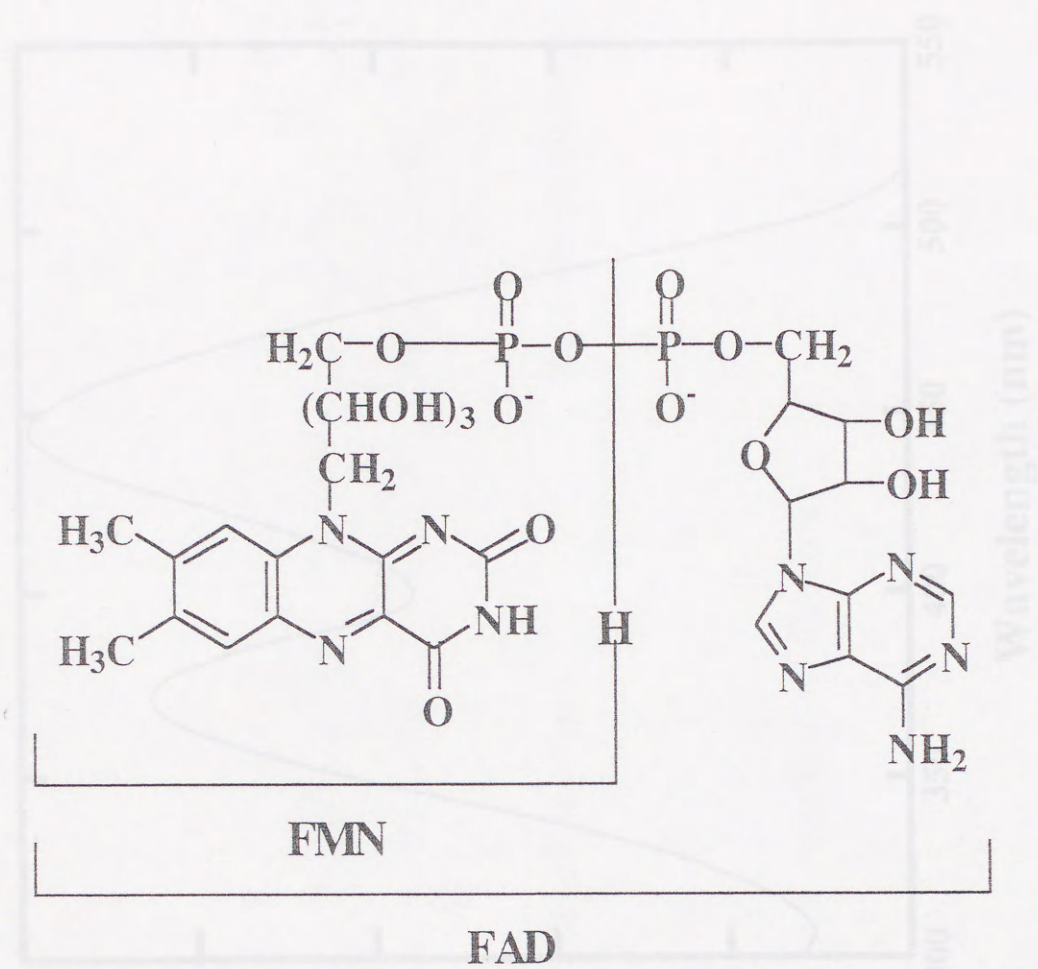


Fig. 1-3 Structure of FMN and FAD.

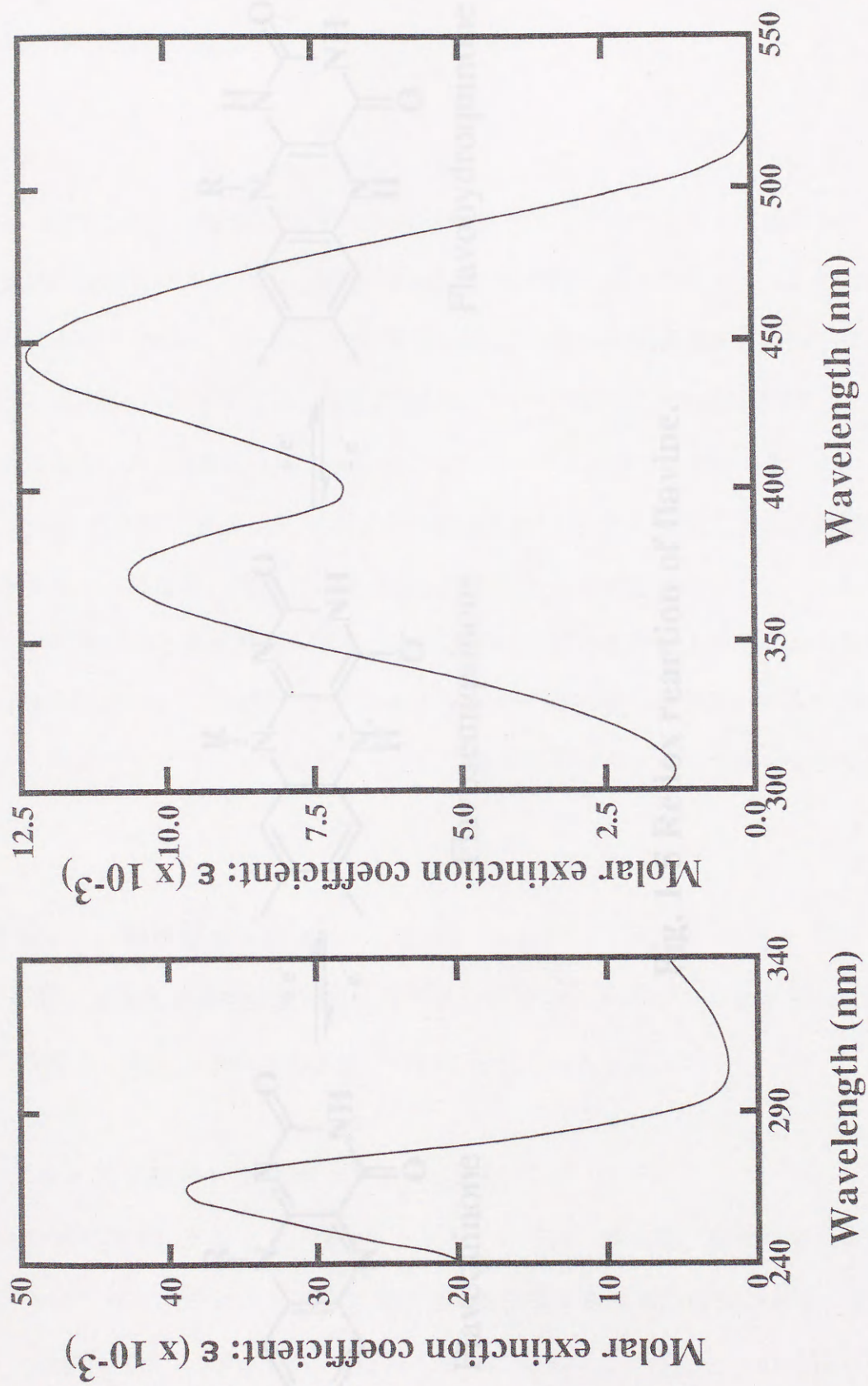


Fig. 1-4 Absorption spectrum of FAD.

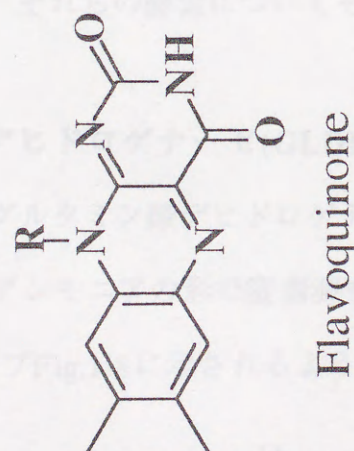
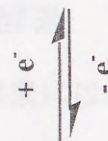
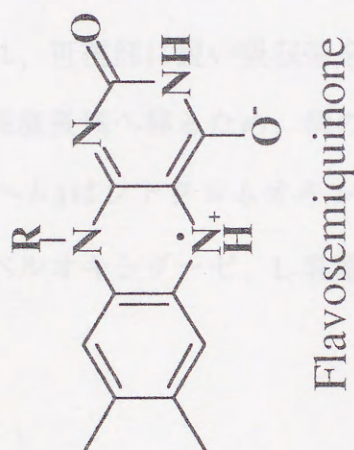
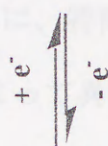
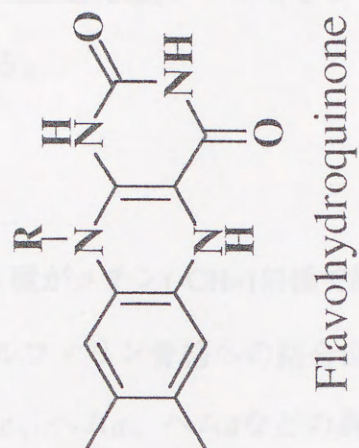


Fig. 1-5 Redox reaction of flavine.

フラボセミキノン)および完全還元型(フラボヒドロキノン)の3種類の酸化還元状態を有し、物質の酸化還元を触媒する。

1.2.3 ヘム

ヘムは4個のピロール環がメチン(-CH=)架橋で結合したポルフィリンの鉄錯体をいう。天然には側鎖の種類とポルフィリン骨格への結合位置が異なるいくつかのヘムが存在し、プロトヘム(ヘムb)、ヘムc、ヘムa、ヘムdなどの典型的なヘムが存在する(Fig.1-6)。還元型Fe(II)ヘムの吸収スペクトルには、特徴的な3つのピーク α 、 β 、 γ (Soret)帯があり、 α ピークの波長は還元型ヘムの種類によって異なり、これでヘムを区別する(Fig.1-7)[1-3]。また、これらのヘムのピリジンおよびイミダゾール誘導体が上下から配位したFe(II)錯体は、フェロヘモクロムと呼ばれ、可視部に鋭い吸収帯を持ち、その位置はポルフィリン側鎖の電子吸引性が増加すると長波長側へ移るため、個の吸収帯の位置によってヘムの種類が同定できる(Fig.1-7)[5-7]。ヘムaはシトクロムオキシダーゼの補欠分子族、ヘムbはP-450、カタラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、L-乳酸デヒドロゲナーゼの補欠分子族などが知られている。

1.3 L-グルタミン酸酸化還元酵素

L-グルタミン酸酸化還元酵素には、大きく分けてデヒドロゲナーゼとオキシダーゼの両方が存在する。次に、それらの酵素についてそれぞれ述べる。

1.3.1 L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)

NAD(P)⁺依存型のL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼは、微生物、高等生物を問わずその存在が知られており、アンモニアの形で窒素源を供給する重要な酵素である。また、L-グルタミン酸は代謝マップFig.1-8に示されるように他のアミノ酸などへの原料となり、

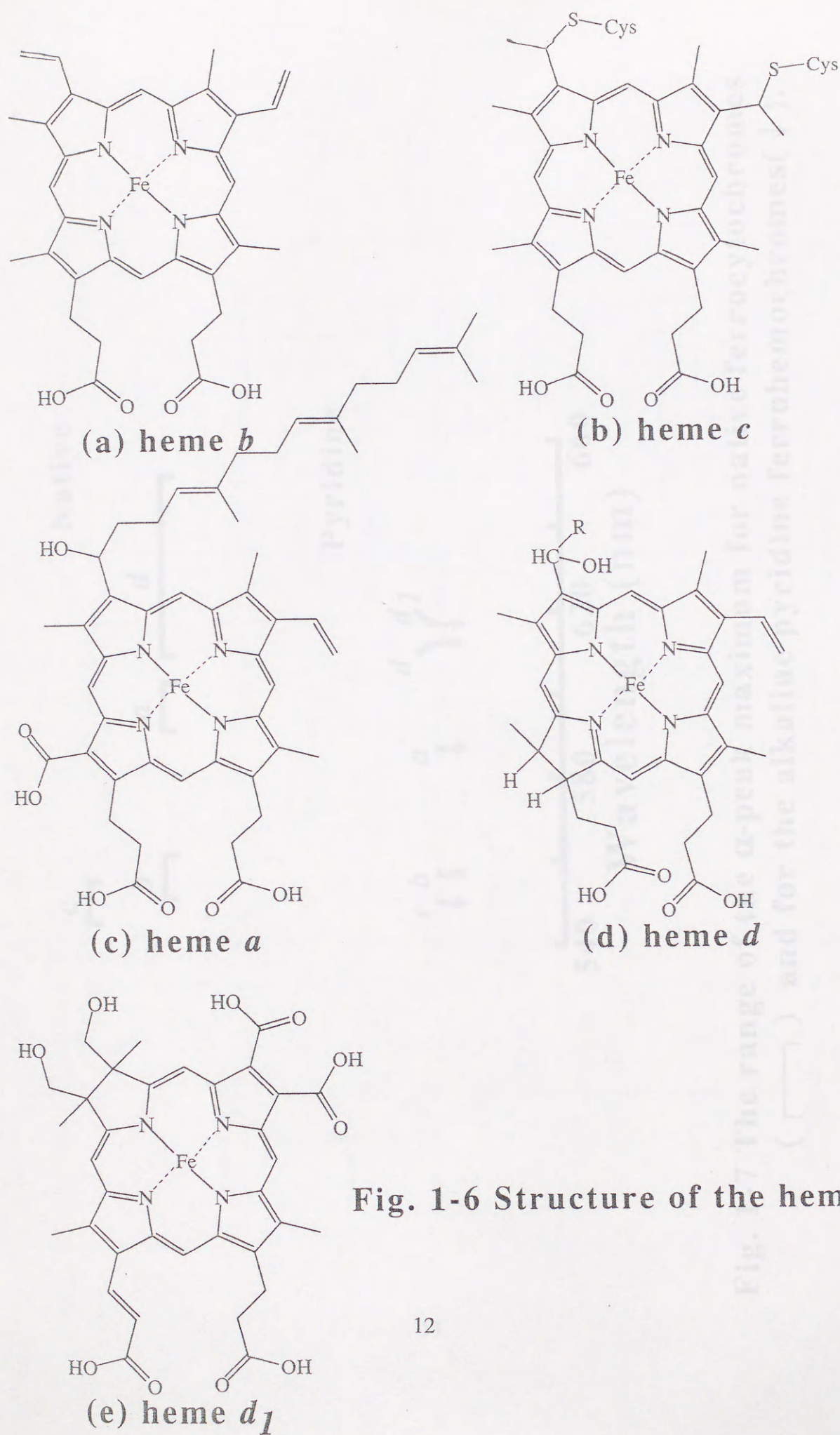


Fig. 1-6 Structure of the hemes.

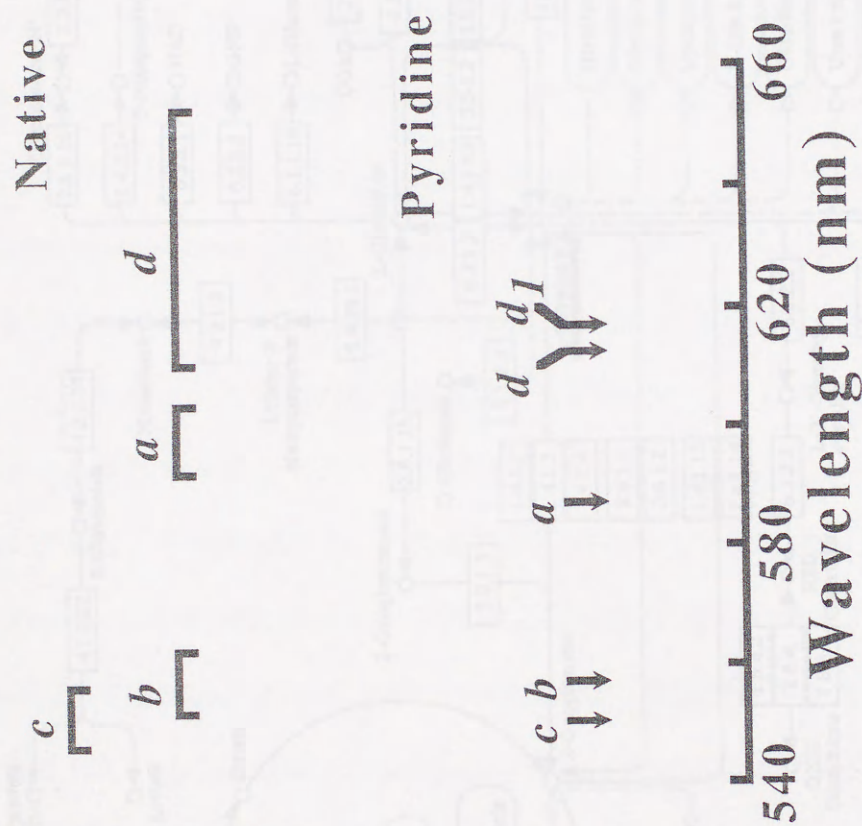


Fig. 1-7 The range of the α -peak maximum for native ferrocytochromes (---) and for the alkaline pyridine ferrohemochromes ($\downarrow$).

Fig. 1-8 Glutamate metabolism.

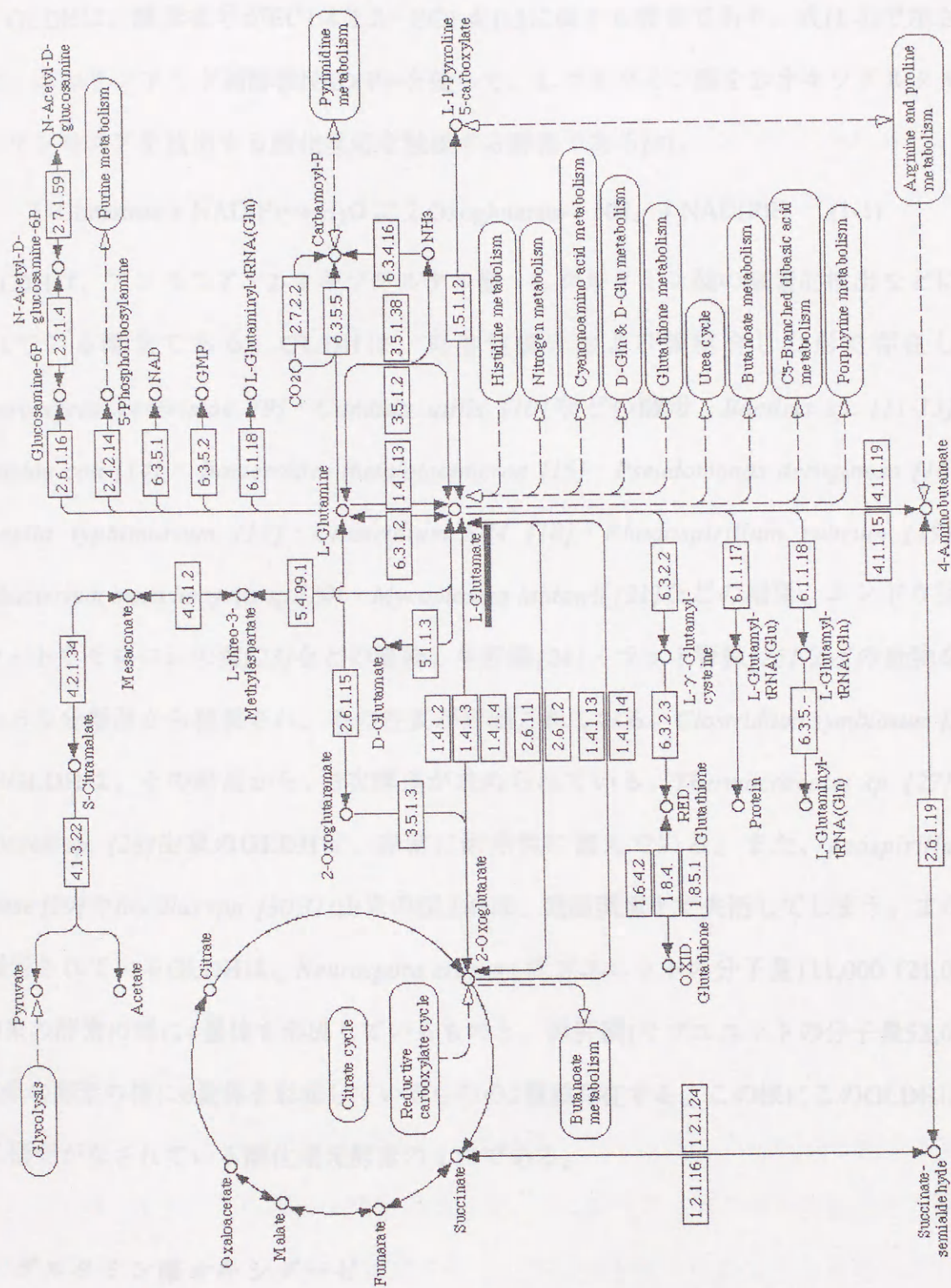
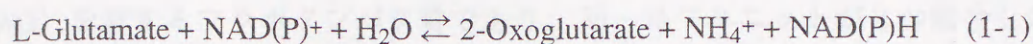


Fig. 1-8 Glutamate metabolism.

クエン酸サイクルから、L-グルタミン酸を合成する重要な働きをする酵素であることがわかる。GLDHは、酵素番号がEC1.4.1.2~EC1.4.1.3に属する酵素であり、式(1-1)で示される様に、ニコチンアミド補酵素NAD(P)+を使って、L-グルタミン酸を2-オキソグルタル酸まで、アンモニアを放出する酸化反応を触媒する酵素である[8]。

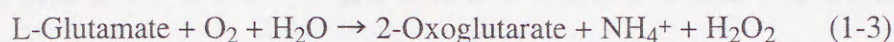
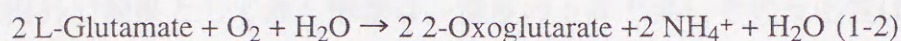


このGLDHは、アンモニア・2-オキソグルタル酸・L-グルタミン酸の酵素的検出などに応用されている酵素である。GLDHは、可溶性成分および膜結合した形で存在し、*Saccharomyces cerevisiae* [9]・*Candida utilis* [10]などの酵母、*Bacillus sp.* [11-13]・*Escherichia coli* [14]・*Bacteroides thetaiotaomicron* [15]・*Pseudomonas aeruginosa* [16]・*Salmonella typhimurium* [17]・*Clostridium SB4* [18]・*Rhodospirillum rubrum* [19]・*Cyanobacterium synechocystis sp.*[20]・*Mycoplasma laidawii* [21]などの細菌、エンドウ豆の根[22]・トウモロコシの葉[23]などの植物、牛肝臓[24]・ラット腎臓[25]などの動物などいろいろな分離源から精製され、その性質が評価されている。*Clostridium symbiosum* [26]由来のGLDHは、その結晶から、3次構造が求められている。*Thermococcales sp.* [27]や*Pyrococcus sp.* [28]由来のGLDHは、非常に耐熱性に富んでいる。また、*Azospirillum brasilense* [29]や*Bacillus spp.* [30,31]由来のGLDHは、低温環境下で失活してしまう。また、現在報告されているGLDHは、*Neurospora crassa* (サブユニットの分子量111,000 121,000) [32]由来の酵素の様に4量体を形成しているものと、豚肝臓(サブユニットの分子量52,000) [33]由来の酵素の様に6量体を形成しているものの2種類存在する。この様にこのGLDHは、非常に研究がなされている酸化還元酵素の1つである。

1.3.2 グルタミン酸オキシダーゼ

L-グルタミン酸オキシダーゼ (GLOX) は、酵素番号がEC1.4.3.11に属する酵素で、

式(1-2)、式(1-3)の様に、分子酸素を利用してL-グルタミン酸を酸化する酵素で、過酸化水素を発生しない酵素[34]とグラム陽性菌*Streptomyces endus*由来の酵素のように過酸化水素を発生する酵素[35]の二種類が存在する。そして、このGLOXには、一つのサブユニット当たり到一个のフラビンモノヌクレオチド (FMN) およびフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を有するフラボタンパク質であり、同一サブユニットが2つ結合した構造を有している。



また、D-グルタミン酸オキシダーゼは、酵素番号がEC1.4.3.7で、補酵素にFADを有する酵素であり、式(1-3)と同様な反応を触媒する[36]。

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、L-グルタミン酸オキシダーゼで報告されている反応に使用される補酵素は、前者がNAD(P)⁺、後者がFADのみである。これ以外の補酵素を持つ酸化還元酵素は知られていない。

1.4 低温適応生物と低温活性酵素

この節では、本研究で単離した低温適合生物とそれが有する低温活性酵素について述べる。

1.4.1 低温適応生物

低温適応生物 (好冷生物や低温生物) は、低温 (20°C以下) を好んで生育する生物であり、20°C以上でも生育可能な生物を低温生物、20°C以上で生育できない生物を好冷生物と分類している [37-39]。この低温適合生物は、北極・南極を始めとする極部、高山や深海などが考えられ、非常に多くの範囲にわたって存在する。また、低温適合生物に該当

する物には、細菌、担子菌、糸状菌、魚類などが含まれる。低温適合生物は、常温および高温で最適に生育する生物と比べて、特殊な代謝システムやタンパク質の発現システム、低温で安定で活性が高い酵素・細胞膜・細胞壁などを有している事が期待できる[34-36]。そして、cold-shockタンパク質[40]や凍結防止剤[41]の研究も行われてきている。

1.4.2 低温活性酵素

生体内外で触媒として働く酵素は、温度の上昇と共にその反応性は高くなる。しかし、酵素を構成しているタンパク質が熱によって変性してしまうため、高温になると酵素は失活してしまう。従って、酵素の温度特性には、極大値が存在する。この極大反応速度を示す温度の高い順から、好熱性酵素、中温性酵素、低温活性酵素に分類されている。好熱性酵素は、その構造の安定性から、数多くの研究がなされており、中温性酵素との比較によって、プロリン含有率が高いことや、ジスルフィド結合によって多量体形成が崩れにくいなどの多くの知見が得られており、プロリン含有率を増加させたり、多量体形成部分にシステインを導入するなど、中温性酵素のアミノ酸配列をコードしている遺伝子を直接変異させることで、好熱性酵素に変異する試みもなされている[42,43]。

それに対して、低温活性酵素は、低温適合生物が生産する酵素であり、非常に研究例が少ないのが現状である。低温活性酵素の研究は、1970年代から、分離精製が行われており、近年、污水处理、バイオセンサー、発酵、食品加工などの工業プロセスや酵素入り洗剤などに応用する目的でプロテアーゼ[44-48]・リパーゼ[49,50]・ α -アミラーゼ[51,52]・ β -ガラクトシダーゼ[53]などの菌体外加水分解酵素や、トリオセフォスフェートイソメラーゼ[54]といくつかのデヒドロゲナーゼ[55-60]が報告されているが、まだその研究例は極めて少ない。当研究室においても、*Flavobacterium balustinum*由来の新規の低温活性セリンプロテアーゼを単離し、洗剤に応用する試みが行われている[43]。特に、酸化還元酵素などの菌体内酵素の報告は少なく、石井らによるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ[55-

57]、Lindsayらによるヒスチジノールデヒドロゲナーゼ[58]、ZuberらによるNAD(P)⁺依存型L-乳酸デヒドロゲナーゼ[59,60]や、などのアフィニティークロマトグラフィーにより比較的簡単に精製できるデヒドロゲナーゼについてのみが報告されており、オキシダーゼなどの精製の難しい酵素の報告は皆無である(Table 1-3)。

低温活性酵素は、好熱性酵素や中温性酵素と比べて、最適温度がより低温側にあり、低い活性化エネルギーで反応を触媒する効率的な触媒であるため、非常に興味ある研究対象となっている[38]。また、耐熱性が低いという欠点を持っている[34]。現在までに報告されている低温活性酵素の研究は、そのほとんどがアミノ酸の一次構造を他の酵素と比較したものと[44,50,51,53,54,56,59,60]、既に知られている中温性酵素の結晶のX線構造解析により得られた3次構造を元に、低温活性酵素の3次元構造をコンピュータによって、その一次配列の相同性から推察し、3次元構造の差異を調べたものが多い[47]。低温活性酵素で実際に結晶化され、そのX線構造解析によりその3次元構造が決定されたのは、 α -アミラーゼ[52]の報告のみである。以上の低温活性酵素と他の酵素との比較の結果により、低温活性酵素は、酵素の自由度が他の酵素に比べて非常に高いこと、側鎖の小さな疎水性アミノ酸残基から側鎖の大きい疎水性アミノ酸残基への置換が起こっていること、 α ヘリックスと β シート間のループが中温性酵素よりも長いなどがあげられている。しかしながら、これらの研究報告例は極めて少なく、低温活性酵素の普遍的な特徴は得られていない。特に、酵素の種類によって、低温で効率的に反応を触媒する機構などが異なっていることが多いため、様々な低温活性酵素を用いた研究が必要とされている。

そこで、本研究においては、今まで報告されていない低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特性を調べた。この低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼは、さらに低温活性酵素の反応機構などを解明する一つの素材となることが期待できる。

1.5 酵素のバイオセンサーへの応用

Table 1-3 低温活性酸化還元酵素

酵素	補酵素	研究者
イソクエン酸デヒドロゲナーゼ	NAD(P) ⁺	Ishii ら
ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ	NAD(P) ⁺	Linsay ら
L-乳酸デヒドロゲナーゼ	NAD(P) ⁺	Zuber ら

酵素・抗体・イオンチャンネル・生体膜などの、生体機能性分子を用いた研究が、化学物質の検出や化学物質の定量などに用いられ、より好感度で簡便な分析を実現している。その中で酵素は、化学反応を触媒する生体機能分子であり、化学物質の情報を、その化学反応によって光・電気信号・呈色などの情報に変換する変換分子として利用されており、今やなくてはならない存在となっている。酵素が利用されている分野は、大きく分けて2つある。1つは、この酵素を抗体や遺伝子に結合させ、特定のタンパク質や遺伝子を検出するもので、この酵素としては、ペルオキシダーゼとアルカリフォスファターゼがよく用いられる。もう1つは、酵素自身の基質特異性を利用して、化学物質を直接検出するものである。我々は、後者の化学物質、本研究においては、L-グルタミン酸を検出するセンサーの構築を目指した。

グルタミン酸センサーは、食品工業、バイオリアクター、医療分野でグルタミン酸濃度をモニターするために必要とされている。現在までに、L-グルタミン酸オキシダーゼ[61-63]、L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ[64]、グルタミン酸レセプターイオンチャンネルタンパク質[65]を利用したグルタミン酸センサーが、報告されている。しかしながら、これらのセンサーは、低温環境下で測定することができない。さらに、L-グルタミン酸オキシダーゼを用いたセンサーでは、脱気しなければならないし、L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼを用いたセンサーでは、外部からNAD(P)⁺のような補酵素を加えなければならない。ここで、もし、酸素及びNAD(P)⁺に対して反応性を持たず、フェロセンなどの電子受容体に反応するL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼが存在するれば、新規のセンサーが構築できる。

現在報告されているフェロセンを電子受容体とした酵素電極をTable 1-4に示す。使用されている酵素はオキシダーゼ、あるいは、アクセプター型のデヒドロゲナーゼのみである[73]。基質、酵素、フェロセン、電極の酸化還元の様式図をFig.1-9に示す。

Table 1-4 Performance of some biosensors on ferrocene-modified electrodes

Substrate	Enzyme	Immobilization	Range (mM)	Linearity (mM)	Response time (sec to 95%)	Half-life in continuous use at 30°C (hr)	Ref.
Glucose	Glucose oxidase (EC 1.1.3.4)	Covalent	<0.1 to 70	0 to 30	60 to 90	24 to >600*2	66
Glucose	Glucose dehydrogenase (pyrroloquinolinequinone) (EC 1.1.99.17)	Covalent	<0.25 to 4.0*1	0 to 4	<30	36	67
Methanol	Alcohol dehydrogenase (acceptor) (EC 1.1.99.8)	Entrapped	1×10^{-3} to 0.2	0 to 0.1	<20	1.5	68
Carbon monoxide	Carbon monoxide dehydrogenase (EC 1.2.99.2)	Entrapped	$<2 \times 10^{-5}$ to $>7 \times 10^{-2}$	0 to 0.068	<10	~6	69
L-Lactate	L-Lactate oxidase	Covalent	1 to 4	0 to 1	75	~10	70
Amino acid	L-Amino-acid oxidase (EC 1.4.3.2)	Entrapped	<1 to 15	0 to 4	120	18	71
Glycolate	(S)-2-Hydroxy-acid oxidase (EC 1.1.3.15)	Entrapped	<1 to 20	0 to 7	180	3	71
Galactose	Galactose oxidase (EC 1.1.3.9)	Entrapped	<1 to 40	0 to 20	180	~1.5	71
NADH	Dihydrolipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	Covalent	0.1 to 3	0 to 1	60	ND*3	72

*1 Up to 20 mM using glutaraldehyde immobilization. *2 Unpublished results. *3ND, Not determined.

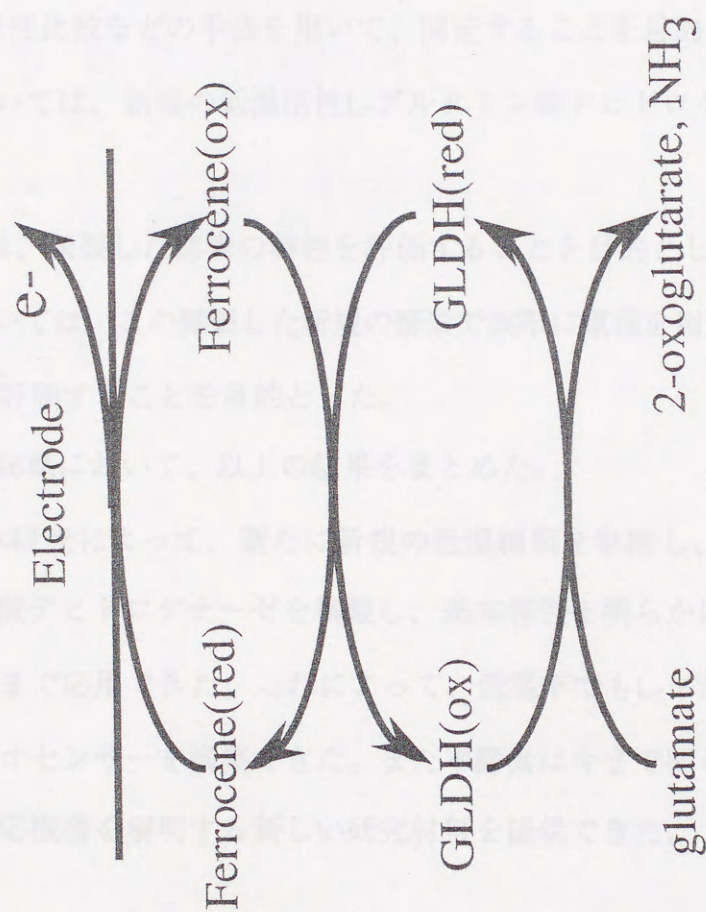


Fig. 1-9 Schematic diagram of the electrochemical reaction involving ferrocene, glutamate dehydrogenase (GLDH), and glutamate.

1.6 本研究の意義と目的

本研究では、新規に低温環境中から分離してきた低温細菌から、L-グルタミン酸酸化還元酵素活性が低温で高い細菌L101株をスクリーニングした。この細菌が有するL-グルタミン酸酸化還元酵素を、カラムクロマトグラフィなどで精製し、その特性を評価した。この精製した酵素は、新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼであることが判明したため、この酵素について研究を深めたのが本研究である。

第2章においては、そのスクリーニングした低温細菌L101株の形状、生化学的特性、16S rRNAの相同性比較などの手法を用いて、同定することを目的とした。

第3章においては、新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼを単一にまで精製を行い。

第4章においては、精製した酵素の特性を評価することを目的とした。

第5章においては、この精製した新規の酵素で実際に電極を用いたセンサーを構築し、そのセンサーを評価することを目的とした。

そして、第6章において、以上の結果をまとめた。

この様に本研究によって、新たに新規の低温細菌を単離し、これより新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼを精製し、基本特性を明らかにした。さらに実際にバイオセンサーにまで応用できた。これによって、低温下でもL-グルタミン酸濃度が測定できる新規のバイオセンサーを構築できた。また本酵素は今まで明らかになっていない、低温活性酵素の反応機構を解明する新しい研究材料を提供できた。

第2章

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性 を有する低温細菌のスクリーニングと 菌体同定

2.1 緒言

本章では、新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)を探索するため、低温環境に生息する生物である鮭・蟹の内臓、および、石川県尾口村白山一里野スキー場の土壌から低温細菌を分離し、その中から、最もGLDH活性の高い菌株L101株をスクリーニングし、この低温細菌L101株を同定したことについて述べる。

スクリーニングは、様々な分離源から単離してきた細菌の中から、最も活性の高い、反応効率の高い酵素を有する細菌を選択する重要な操作である。本研究では、新規の低温活性L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼをスクリーニングするために、活性染色法を用い、通常NAD(P)⁺依存の酵素を染色するために必要なNAD(P)⁺もしくはフェナジンメソスルフェイトなどを添加せず、NBTと直接電子授受する酵素を選択した。また、低温活性酵素を得るため活性染色は10°Cにて行った。

このようなスクリーニングによって、新規の酵素を含有する細菌がどのような細菌なのかを調べるため、次に細菌の同定を行った。同定は、分離した細菌が、いかなる種類に属するかを定めることである。同定の作業には、学名のついた標本と比較するという最も単純な生物的手段から、定められた方法に従って実験し、数多くのデータを集めてこれを整理し、信頼される分類体系に示された分類標準にそれらのデータを合わせてみて、異同を明らかにし、総合判断を下すという複雑な手段まで、様々なものが含まれるが、最終目的として命名規約に基づく学名の選定を行うことである。細菌の場合、その学名は、属名＋種形容語の2名法で表される。現在、細菌は主として細胞形態、培養所見、生理的性質で分類されているが、その細部については各々の属で異なり、ある属ではおおまかに、ある属では細かく分類されている。そして、同定のための指標となる性質の重要度なども属によって異なってくる。

細菌はおおまかに、細胞の形態とグラム染色によって属まで分類され、属はさらに生理的性質により種にまで細分されているのが普通である。したがって、まず、細胞形態

を光学顕微鏡や電子顕微鏡によって観察し、その形状・鞭毛の有無・運動性・コロニー形状・孢子の有無・グラム染色などを、第一に行う。また、酸素に対する態度によってもおおまかに分類されていることから、これを次に調べる必要がある。一方、種を分類する指標となっている生理的性質はそれぞれの属で異なっているので、まず同定すべき菌株が形態的にどの属に属しているか決めた後、その属を種に分ける特徴となっている生理的性質を調べるのが得策である。また、細菌が有するDNAのG+C含有率や、16SリボゾームDNA全配列の相同性比較、16SリボゾームDNAの分子進化速度の推定による系統樹の作成により、細菌の同定を確かなものにする。

2.2 実験方法

ここでは、まず2.2.1節で使用した試薬および機器を示し、2.2.2節で低温細菌を単離し、2.2.3節でスクリーニングしてGLDH活性の最も高い細菌を選択し、2.2.4節でその細菌を同定した方法について述べる。

2.2.1 試薬および機器

和光純薬工業社製のアセトン、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(トリス)、D-アミグダリン、n-アミルアルコール、L-アラビノース、亜硫酸ナトリウム、L-アルギニン塩酸塩、イノシット、イソプロパノール、エタノール、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩酸、オスミウム酸、L-オルニチン塩酸塩、過酸化水素、クエン酸、クエン酸三ナトリウム、クエン酸鉄、クリスタルバイオレット、グリシン、D-グルコース、L-グルタミン酸ナトリウム、グルタルアルデヒド、クレゾールレッド、コハク酸、コール酸ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、L-システイン、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル-2Hテトラゾリウム塩化物)](ニト

ロブルーテトラゾリウム;NBT)、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、スクロース、スルファニル酸、D-ソルビトール、タンニン酸、チオ硫酸ナトリウム、チモールブルー、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)、N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン(TMPD)、Tween20(ラウリル酸エステル)、Tween80(オレイン酸エステル)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、トルエン、 α -ナフチルアミン、 α -ナフトール、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム、ニュートラルレッド、ピリドキサル、フェノール、フェノールレッド、フクシン、プロモクレゾールパープル、プロモチモールブルー、プロモフェノールブルー、D-マンニトール、ミョウバン、メチルレッド、D-メリビオース、ヨウ素、ヨウ化カリウム、ラクトース、L-ラムノース、L-リジン塩酸塩、硫酸亜鉛、硫酸(II)鉄、硫酸マグネシウム7水和物、流動パラフィン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素アンモニウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二水素ナトリウムは特級を、血清アルブミン、DNA(鮭精子由来)は生化学用を、可溶デンプンは1級試薬を、オリーブ油、カゼインナトリウムは試薬(化学用)寒天、ポリペプトンは細菌培養用を、アクリルアミドとN,N'-メチレンビス(アクリルアミド)-HGは電気泳動用を用いた。過硫酸アンモニウムはインターナショナルバイオテクノロジー社製を用いた。遺伝子分子量マーカー(λ DNA Hind III Digest)、タンパク質分析キットはBiolad社製を用いた。ウシ胆汁末、酵母抽出物、ゼラチン、胆汁酸塩、トリプトン、ペプトンはDifco社製、肉抽出物はOxoid社製を用いた。2,4-ジアミノ-6,7-ジイソプロピルプテリジン(O/129)、RNase(DNase-free)はSigma社製を用いた。NucleaseP1、核酸(A, C, G, T)等モル標準物はヤマサ醤油社製を用いた。グラム染色キット(フェイバー・GセットF)は純正化学社製、アピ20はBIO M'ERIEUX S.A.社製を用いた。水は全て、イオン交換-蒸留水を用いた。セントリコン30とセントリコン100はAmicon Grace社製を用いた。Taq DyeTM Terminator Cycle Sequencing KitはPERKINNELMER社製を用いた。

装置は、蒸留水製造にヤマト社製Autostill WG220、超純水製造にMILLIPORE社製MILLI-Q Labo、細菌の培養に日立社製のインキュベーターCR41、タイテック社トリプルシェーカーNR-80、WATER BATH SHAKER PERSONAL Lt-10F、WATER BATH SHAKER PERSONAL PERSONAL-11、THERMO MINDER SJ-10、THERMO MINDER DX 10を用いた。保冷库にNIHON FREEZER社製BIO FREEZER GS-5203A、pHメーターに電気化学計測社製pH/イオンメーターHPH-110、遠心分離機にベックマン社J2-MCとトミー社MRX-125、電気泳動装置にマリソル社製MP-7352、分光光度計にはベックマン社DU640分光光度計、超音波破碎機にヒートシステム社製アストラソン超音波細胞破碎機XL2020型、オートクレーブにはトミー社SD-310、クリーンベンチに日立クリーンベンチ無菌実験台・CCV型、顕微鏡にNikon社製OPTIPHOT-2とSMZ-U 200M1:10、臨界点乾燥機に日立社製HCP-2、スパッタコーターに日立社製E-1030、走査型電子顕微鏡に日立社製S-4500を用いた。HPLCは、紫外可視検出器に東ソー社製UV-8020、逆相カラムに半井化学社製COSMOSIL-5C18を用いた。回転加熱式真空乾燥機にSavant社製SC110 Speed Vac、PCRにPERKINELMER社製Gene Amp PCR System 9600を用いた。DNAシーケンサーにApplied Biosystems社製373A DNA Sequencerを用いた。

2.2.2 低温細菌の単離

低温細菌は、石川県手取川下流で捕獲されたサケ(*Oncorhynchus keta*)の内臓、金沢市近江町市場のカニ(*Chionoecetes opilio*)の内臓、石川県尾口村一里野高原の土壌、石川県能美郡辰口町北陸先端科学技術大学院大学教職員寄宿舍近くの活性汚泥から分離した。分離培地は、基本培地成分として1.0%ポリペプトン、2.5%酵母抽出物、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、0.1%硫酸マグネシウム7水和物、1.5%寒天とし、この基本培地に炭素源として0.5%可溶デンプンを加えたアミラーゼ誘導培地(A培地)、0.5%オリーブ油を加え

たりパーゼ誘導培地(L培地)、0.5%カゼインナトリウムを加えたプロテアーゼ誘導培地(P培地)を1N水酸化ナトリウムによってpH7.0に調整したものを、オートクレーブにより滅菌した後、クリーンベンチの中で15mlずつシャーレ上に分注した物を用いた(Table 2-1)。このシャーレのそれぞれの寒天培地上に、細菌分離源を生理食塩水(0.5%)で懸濁した原液を生理食塩水で10、100、1000、10000倍に希釈した溶液を均一に散布し、10°Cで培養し、2、3日後に生じたコロニーを一つずつ別の寒天培地上に白金耳で塗布した。この操作を3回繰り返して、完全に単一の菌株を獲得した(Fig. 2-1)。単離した低温細菌は、肉汁寒天培地(1.0%肉抽出物、1.0%ポリペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%D-グルコース、0.1%硫酸マグネシウム、1.5%寒天、pH7.2)に1ヶ月毎に植え継ぎを行って菌体を維持した。また、低温細菌を寒天を除いた肉汁培地中で濁度1.0となるまで培養し、この培養液の20%のグリセロールを添加し、-20°Cにて菌株を保存した。

2.2.3 GLDHのスクリーニング

GLDH活性の最も高い低温細菌の菌株をスクリーニングするため、まず、酵素の活性染色を行い、その後、活性染色された菌株について、実際にGLDH活性を測定した。

(1) 細菌の培養および粗酵素液の獲得

細菌中のGLDHをスクリーニングするため、細菌を15ml容試験管に3ml肉汁培地に植菌し、10°C、72時間、150rpmで回転往復振盪し、好氣的に培養した。この細菌を10分間、10,000xg、4°Cで遠心分離し、生理食塩水(0.85%)で2回洗浄し、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)200μlに懸濁させ、氷水中で冷却しながら超音波破碎を5分間、10秒on-10秒offでかけて細菌破碎液を得た。この細菌破碎液を10分間、10,000xg、4°Cで遠心分離した上清を粗酵素液とした。

Table 2-1 Isolation mediums for psychrophilic bacteria

	Medium for amylase (A medium)	Medium for lipase (L medium)	Medium for protease (P medium)
Polypepton (g)	10	10	10
Yeast extract (g)	25	25	25
NaCl (g)	5	5	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g)	1	1	1
Agar (g)	15	15	15
Water (ml)	1,000	1,000	1,000
Soluble starch (g)	5	-	-
Olive oil (g)	-	5	-
Casein sodium (g)	-	-	5
pH	7.0	7.0	7.0

Fig. 2-1 Isolation of cold-adapted microorganisms.

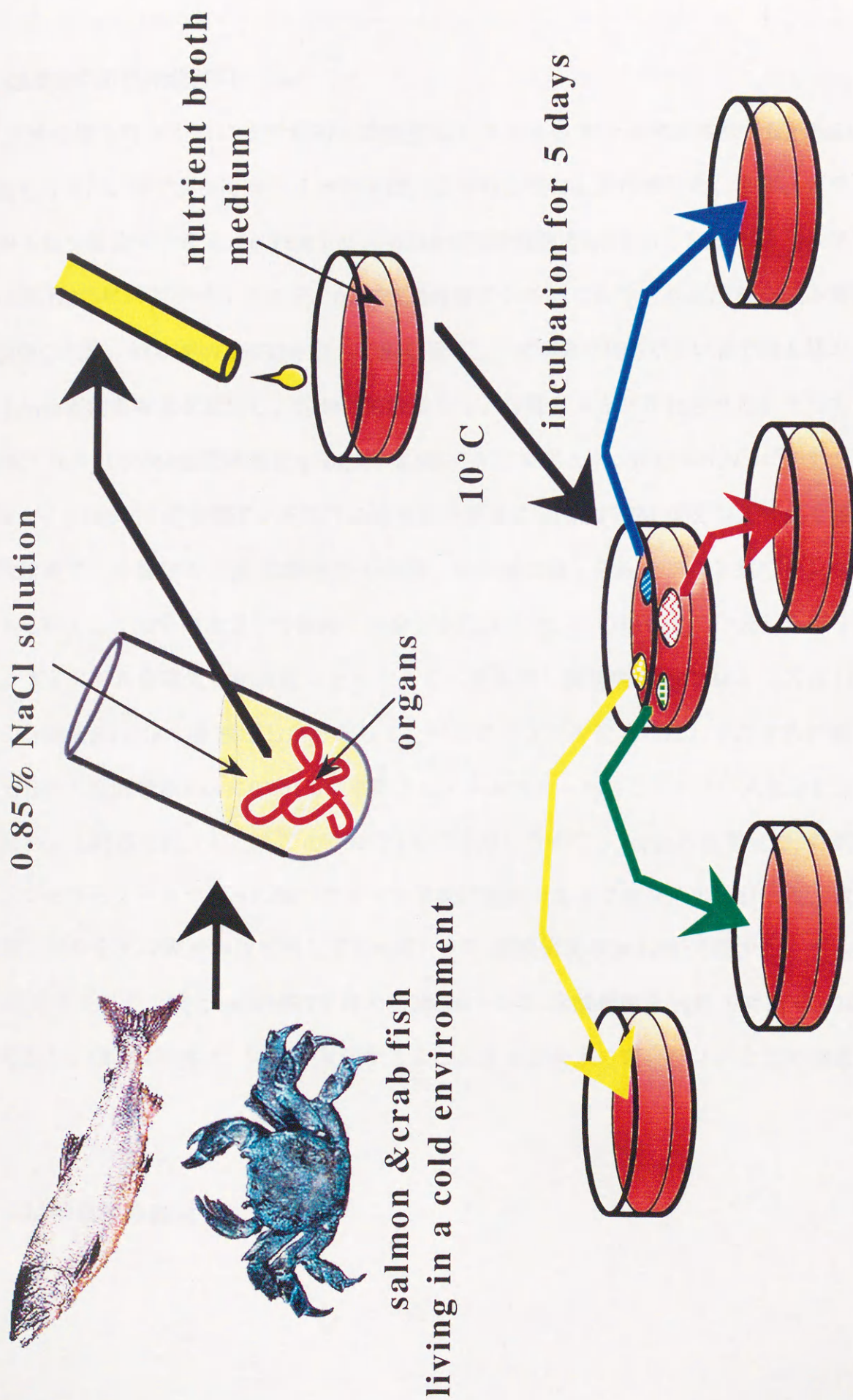


Fig. 2-1 Isolation of cold-adapted microorganisms.

(2) GLDHの活性染色[74]

活性染色を行うためにまず最初に非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native-PAGE)を行った。ポリアクリルアミドゲルは、以下のようにして作成した。まず、ガラス製のゲル板を組立て、そこに0.38Mトリス-0.060M塩酸緩衝液(pH8.9)、7.5%アクリルアミド、0.2% N,N'-ビスアクリルアミド、0.005%過硫酸アンモニウムを含む水溶液を減圧濾過して脱気した後、0.0005%TEMEDを加えて良く攪拌し、ゲル板の70%ぐらいまで流し込み、その上5mm程度蒸留水を重層し、約40分間放置して、分離ゲルをゲル化させた。そして、0.063Mトリス-0.060M塩酸緩衝液(pH6.8)、2.5%アクリルアミド、0.63%N,N'-ビスアクリルアミド、0.00375%過硫酸アンモニウムを含む水溶液に0.001%TEMEDを加えて良く攪拌した水溶液で、分離ゲル上面を2回洗浄した後、ゲル板に流し込みテフロン製のサンプルコームを挿入し、30分間放置して濃縮ゲルをゲル化させた。この様にして作成したポリアクリルアミドゲルを電気泳動装置にセットして、陽極側と陰極側に0.025Mトリス-0.19Mグリシン緩衝液(pH8.3)を満たした。そして、ゲルのサンプル注入穴に、それぞれの菌体からえられた粗酵素液30 μ lに0.001%ブロモフェノールブルー10 μ lとスクロース8mgを加えた試料を、注射器で注入した。このゲルを5°Cに冷却しながら、30mAの定電流で5時間程度、ブロモフェノールブルーの青い帯がゲル下端に到達するまで電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをゲル板から取り外して20mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)で洗浄し、ゲルを100mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含んだ20mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)で10°C、24時間染色した。GLDH活性は、NBTが還元することによるゲル上の青いバンドとして検出される。

(3) GLDH活性の測定

GLDHの活性染色で染色された菌株について、その酵素活性を測定した。それぞれの細菌の粗酵素液を分画分子量50kDaのセントリコンの上部に注入し、30分間、10,000xg、4°Cで遠心分離した後、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を添加し、再び同条件で遠心分離する事によって粗酵素液を洗浄し、粗酵素液に含まれる余分な基質を除去した。そして、得られたそれぞれの試料について、GLDH活性を測定した。

GLDH活性は酵素溶液0.1ml、1mM NBTと100mM L-グルタミン酸を含んだ20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0) 0.1ml、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0) 0.9mlを混合し、酸化還元反応を起こさせ、この溶液を光路長1cmのガラス製のキュベットに入れ、NBTの還元体であるホルマザンの極大吸収波長である530nmの吸光度変化を温度調節機能付き吸光度計によって、20°Cで、2分間測定することで式(2-1)のように、ランベルト・ベールの法則に従って計算できる。

$$EA[\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}] = \frac{V_{\text{mix}}[\mu\text{l}]\cdot\Delta A[\text{min}^{-1}]}{\epsilon[\mu\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]\cdot l[\text{cm}]\cdot V_{\text{enz}}[\text{ml}]} \quad (2-1)$$

ここで、EAは粗酵素液1ml当たりの酵素活性、 V_{mix} は反応混合液の容積(1,000 μl)、 ΔA は1分間当たりの吸光度変化量、 ϵ はNBTの還元体のホルマザンの530nmでのモル吸光係数(36,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、 l はセルの光路長(1cm)、 V_{enz} は反応混合液中に添加した粗酵素液の容積(0.1ml)である。また、粗酵素液の比活性を決定するため、それぞれのタンパク質濃度をブラッド法[75]に基づくタンパク質分析キットを用い、牛血清アルブミンを標準タンパク質として定量した。比活性は、式(2-2)計算できる。

$$SA[\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{protein}^{-1}] = \frac{EA[\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}]}{PC[\text{mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{ml}^{-1}]} \quad (2-2)$$

ここで、SAは比活性、PCはタンパク質濃度、1U=1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ を示す。

2.2.4 低温細菌L101株の形状及び生化学的特性の評価

本研究室で単離された低温細菌の中で、最も GLDH活性の高いL101株の同定を行った。

(1) コロニーの形状[76]

コロニーの形、表面、周縁、色、大きさを調べるため、菌体を肉汁寒天培地上で約1週間、10°Cで培養し、肉眼及び低倍率の顕微鏡で観察した。コロニーの大きさは、ノギスによって測定した。

(2) グラム染色

単一コロニーから白金耳で細菌を少量とり、スライドガラス上に落とした1滴の水に点を打つようにして細菌をスライドガラス上に置き、風乾し、軽くガスバーナーの炎であぶることで固定した。この細菌試料をグラム染色キットを用いて、以下のようにグラム染色を行った。固定化試料にビクトリアブルー含有染色液を滴下し約1分間染色した後、蒸留水にて穏やかに洗浄し十分水を切った。次に脱色液を注ぎ、ビクトリアブルーが溶け出さなくなるまで脱色し、蒸留水で洗浄した。そして最後に、フクシン含有染色液を検体上に十分に滴下し約1分間染色し、蒸留水で洗浄し十分水を切り、乾燥した後、顕微鏡で観察した。グラム陽性菌は、青色に染色され、グラム陰性菌は赤色に染色される。

(3) 運動性の確認

肉汁寒天培地上で3日間、10°Cで培養したコロニーから、白金耳で細菌を取り、生理食塩水を1滴滴下したスライドガラスに植菌し、カバーガラスを被せ顕微鏡で観察した。細菌の運動性を確認した。

(4) 鞭毛染色

スライドグラスに1滴の水を落とし、それが広がったら白金耳の先に細菌をとり、水に点を打つ様な要領でごく少量の菌を置き自然乾燥した。これに染色液(飽和ミヨウバン水溶液2ml、5%フェノール水溶液5ml、20%タンニン酸水溶液2ml、11%フクシンエタノール溶液1mlを加え濾過した物)で2分30秒間染色し、水洗浄し、これを顕微鏡で観察した。

(5) 細菌の走査型電子顕微鏡写真

単離した低温細菌L101株を、72時間、10℃、肉汁培地中で培養した後、培養液を15分間、10,000xg、4℃で遠心分離して集菌し、生理食塩水を加えさらに15分間、10,000xg、4℃で遠心分離することで菌体を洗浄した。洗浄した細菌は、2.5%グルタルアルデヒドと2%オスミウム酸で固定化し、50、70、90、95、100%エタノールで3回ずつ洗浄する事で脱水し、臨界点乾燥機で乾燥した。固定化された細菌に、スパッタコーター中で白金を批覆し、走査型電子顕微鏡写真を撮影した。

(6) O/Fテスト [77]

この細菌が、糖(グルコース)を好氣的もしくは嫌氣的条件で酸にまで分解できるかを調べた。2本の15ml容試験管に1%グルコース、0.2%トリプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.03%リン酸水素二カリウム、0.008%ブロモチモールブルー、0.2%寒天を含むpH7.1の半流動培地を注入し、両方に細菌をが穿刺植菌した。2本の内1本に滅菌した流動パラフィンでシールして培養した。この2本を1週間、10℃で培養して培地の色の変化を観察した。黄色に変色する物は、酸が生成していることを示している。流動パラフィンでシールしていない培地だけ黄色に変色しているものは、Oxidationと言い、両方の培地が黄色に変色するものは、Fermentationと言う。

(7) 硝酸塩の還元

細菌の中には、硝酸塩を亜硝酸に、さらに窒素ガスのようなガス状窒素化合物にまで還元するものがある。硝酸塩が何処まで還元されるかを、以下の方法で検出した。(a)では亜硝酸塩、(b)では窒素ガスへの還元を検出した。

(a) 亜硝酸塩の生成[78]

0.1%硝酸カリウムを含む肉汁培地とコハク酸-硝酸塩培地(1%コハク酸、0.1%リン酸水素二カリウム、0.1%硝酸ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム7水和物、0.02%塩化カリウム、微量の硫酸鉄、pH7.2)で細菌を10°Cで数日間培養した。これに、第1液(スルファニル酸8gを5N酢酸水溶液1,000mlに溶解したもの)、第2液(α -ナフチルアミン5gを5N酢酸水溶液1,000mlに溶解したもの)を数滴ずつ加え、赤色に変色すれば、亜硝酸にまで還元していることを示している。

(b) 脱窒化反応[79]

肉汁培地および1%硝酸ナトリウム肉汁培地をそれぞれ2本ずつ作り、それぞれに細菌を植菌した後、肉汁培地および1%硝酸ナトリウム肉汁培地それぞれ1本を、滅菌した流動パラフィンで覆い、10°Cで64時間培養した。そして、培養後の濁度及びガスの生成を観察し、流動パラフィンでシールした1%硝酸ナトリウム肉汁培地の生育をそれぞれの対照と比較した。

(8) Voges-Proskauer(V-P)反応とメチルレッド試験

この2つの反応は腸内細菌の同定に重要な性質である。ここでは、(a)でV-P反応、

(b)でメチルレッド試験について述べた。

(a) V-P反応[76]

メチルレッド-V-P培地(0.5%グルコース、0.7%ペプトン、0.5%リン酸水素二カリウム、pH7.5)に、細菌を植菌し、10°Cで20時間培養した。この培養液1mlを別の試験管に取り、5% α -ナフトールアルコール溶液0.6mlと40%水酸化カリウム水溶液0.2mlを加えてよく振盪した。4時間以内に、ルビー色の発色が見られたらV-P反応陽性とした。

(b) メチルレッド試験[76]

メチルレッド-V-P培地に、細菌を植菌し、10°Cで60時間培養した。培養液にメチルレッド液(メチルレッド0.1gを300mlのエチルアルコールに溶解した後、蒸留水を加えて500mlとしたもの)を2,3滴加えた。赤変すれば陽性、黄色あるいはオレンジ色の時は陰性とした。

(9) 最適生育条件

細菌の増殖へのpH、温度、塩化ナトリウム濃度の影響を調べた。細菌の前培養は、肉汁培地(pH7、0.5%塩化ナトリウム)、10°Cで濁度(660nm)が0.6になるまで行った。各々の条件の培地5mlに対して、0.5mlの前培養の培養液を植菌した。増殖は、濁度を40時間後に測定することでその有無を確認した。pHの影響は、肉汁培地のpHを1N塩酸あるいは、1N水酸化ナトリウムでpH2~12に調節し、10°Cで培養した。温度の影響は肉汁培地(pH7、0.5%塩化ナトリウム)を5~30°Cで培養した。塩化ナトリウム濃度の影響は、肉汁培地(pH7)に、0~10%の塩化ナトリウムを添加して、10°Cで培養した。

(10) 菌体内酵素

(a) オキシダーゼ[76]

濾紙に1% N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン塩酸塩水溶液を2,3滴浸み込ませ、ここに肉汁寒天培地上で培養した細菌を白金耳で塗りつけた。10秒以内に青色に発色した時、オキシダーゼ陽性と判断した。

(b) カタラーゼ[76]

肉汁寒天培地上で培養した細菌を白金耳で取り、3%過酸化水素を垂らしたペトリ皿に入れた。酸素の気泡が生成した時、カタラーゼ陽性と判断した。

(c) アルカリ・酸性ホスファターゼ[80]

(i) 酸性ホスファターゼ

0.85%塩化ナトリウムに細菌を懸濁し、この細菌懸濁液0.3mlを別の試験管に入れ、0.01M p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含有する0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.8) 0.3mlを加えた。これを、37°Cで6時間放置して、0.04Mグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.5)0.3mlを添加した。液が黄色になった時、酸性ホスファターゼ陽性と判断した。

(ii) アルカリホスファターゼ

(i)と同じ細菌懸濁液0.3mlを別の試験管に入れ、0.01M p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含有する0.1Mグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.5)0.3mlを加えた。これを、37°Cで6時間放置した。液が黄色になった時、アルカリホスファターゼ陽性と判断した。

(d) ウレアーゼ[76]

ウレアーゼの検出は、クリステンセンの尿素培地(0.1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.2%リン酸二水素カリウム、0.0012%フェノールレッド、0.1%グルコース、1.5%寒天、pH6.8)を用いた。ただし、尿素は加熱滅菌できないので濾過滅菌して、培地に加えた。これをシャーレに注入して、ゲル化させて、細菌を塗布した。10°Cで3日間培養し、コロニーの周りが生成するアンモニアのために赤くなっていた時、ウレアーゼ陽性と判断した。

(e) β -ガラクトシダーゼ[81]

TSI(triple sugar iron)寒天培地(0.4%肉抽出物、1.5%ペプトン、1%ラクトース、1%スクロース、0.1%グルコース、0.5%塩化ナトリウム、0.008%チオ硫酸ナトリウム、0.04%亜硫酸ナトリウム、0.02%硫酸鉄、0.002%フェノールレッド、1.5%寒天、pH7.5)上で、18時間、10°Cで培養し、0.85%塩化ナトリウム水溶液0.25mlに細菌を懸濁した。この懸濁液にトルエンを1滴加え、37°Cで5分間放置し、ONPG試験試薬(0.4%o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド含有0.25Mリン酸緩衝液(pH7))0.25ml加えた。37°Cで24時間放置し、黄色となった時、 β -ガラクトシダーゼ陽性と判断した。

(f) アルギニンジヒドロラーゼ[82]

ターンレイ半流動アルギニン培地(0.1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.03%リン酸水素二ナトリウム、0.001%フェノールレッド、1%L-アルギニン塩酸塩、0.3%寒天、pH7.2)に細菌を植菌した。黄色から赤色に変色したら、アルギニンジヒドロラーゼ陽性と判断した。

(g) リジンデカルボキシラーゼ[83]

モーラーの基礎培地(0.5%ペプトン、0.5%肉抽出物、0.05%グルコース、0.001%ブロモクレゾールパープル、0.0005%クレゾールレッド、0.0005%ピリドキサール、1.5%寒天)に1%L-リジン塩酸塩を添加して、pH6に調整し、滅菌して試験管に注入して斜面培地に固めた。これに細菌を植菌し、この培地の上に滅菌した流動パラフィンを充填した。これを4日間、10°Cで培養し、濃紫色に変化した時、リジナルカルボキシラーゼ陽性と判断した。

(h) オルニチンデカルボキシラーゼ[83]

リジンデカルボキシラーゼのL-リジン塩酸塩の代わりにL-オルニチン塩酸塩を加えた物を用意して、同条件で培養を行い、色の変化を観察した。濃紫色になった時、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性と判断した。

(11) 菌体外酵素

(a) リパーゼ(Tween分解酵素)[84]

0.5%肉抽出物、1%ペプトン、0.1%塩化ナトリウム、0.01%塩化カルシウム 1 水和物、1.5%寒天、pH7を含む培地に、1%Tween20(ラウリル酸エステル)あるいは1%Tween80(オレイン酸エステル)を添加した培地を用意した。この培地上に細菌を植菌し、7日間、10°Cで培養した。リパーゼがこれらのエステルを分解により生成する脂肪酸と培地中のカルシウムが結合した塩の結晶がコロニーの周りにできた時、リパーゼ陽性と判断した。

(b) アミラーゼ[85]

肉汁寒天培地(1%肉抽出物、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%硫酸マグネシウム7水和物、1.5%寒天、pH7.2)に0.2%可溶デンプンを加えた培地を準備し、これに細菌を植菌して、2週間、10°Cで培養した。これに、ヨウ素-ヨウ化カリウム水溶液(0.13%ヨウ

素、0.36%ヨウ化カリウム)を霧吹きで吹き付けた。コロニーの周りにヨウ素で青紫に染色されないハロができれば、アミラーゼ陽性と判断した。

(c) プロテアーゼ[76]

肉汁寒天培地に1%カゼインナトリウムを添加した培地を準備し、これに細菌を植菌して1週間、10°Cで培養した。これに、10%塩酸を霧吹きで吹き付けた。コロニーの周りのカゼインが分解されて、塩酸によりカゼインが白沈せず、透明なハロが形成されれば、プロテアーゼ陽性と判断した。

(d) ゼラチナーゼ[76]

肉汁培地に12%ゼラチンを添加した培地を試験管に注入し高層に固め、細菌を白金耳で穿刺した。これを、4日間、10°Cで培養した。ゼラチンが分解し、液状となった時、ゼラチナーゼ陽性と判断した。

(e) DNase[76]

2%トリプトーズ、0.2%鮭精子由来のDNA、0.5%塩化ナトリウム、2%寒天、pH7.2を含む培地を準備し、細菌を植菌した。これを、1週間、10°Cで培養した。これに、10%塩酸を霧吹きで吹き付けた。コロニーの周りのDNAが分解されて、塩酸によりDNAが白沈せず、透明なハロが形成されれば、DNase陽性と判断した。

(12) 炭素源の資化

細菌の種類によっては、利用する炭素源の種類によって、分類されている事がある。ここでは、クエン酸及び糖類の資化について検討した。

(a) クエン酸の資化[76]

シモンのクエン酸寒天培地(0.2%クエン酸ナトリウム、0.5%塩化ナトリウム、0.02%硫酸マグネシウム、0.1%リン酸二水素アンモニウム、0.1%リン酸水素二カリウム、0.008%ブロモチモールブルー、1.5%寒天、pH6.9)を準備し、細菌を植菌して、1週間、10で培養した。クエン酸を資化する事で、培地がアルカリ性になり、青色を呈する様になった時、クエン酸を資化すると判断した。

(b) 糖類の資化[77]

O/Fテストの時に用いた培地で、1%グルコースを用いる代わりにD-マンニトール、イノシット、D-ソルビトール、L-ラムノース、スクロース、D-メリビオース、D-アミグダリン、L-アラビノースをそれぞれ1%加えた培地をそれぞれ作製した。これに、細菌を植菌して、36時間、10°Cで培養した。糖を資化して酸を放出するため、培地が酸性になり、黄色を呈する様になった時、その糖を資化すると判断した。

(13) ナトリウムイオンの要求性

*Vibrio*属(コレラは除く)はナトリウムイオンがなければ増殖しない。ここでは、1%ペプトン水を用いて、細菌の増殖の有無を調べた。増殖が見られればナトリウムイオンの要求性はないと判断した。

(14) *Vibrio*属細菌の抗生物質耐性[76]

生理食塩水(0.85%)に高濃度で細菌を懸濁して、この懸濁液を肉汁寒天培地上に均一にまくことで植菌した。*Vibrio*属細菌の抗生物質である2,4-ジアミノ-6,7-ジイソプロピルプテリジン(O/129) 0.1gを100mlアセトンに溶解した液を直径8mmの濾紙に滴下し、乾燥し

たものを、細菌を植菌した寒天培地上に置いた。1週間、10°Cで培養して、濾紙の周りに細菌の増殖が見られれば、この抗生物質に耐性があると判断した。

(15) 選択培地上の生育

本研究では、2つの選択培地における細菌の増殖を観察した。

(a) TCBS寒天培地[86]

thiosulfate citrate bile salts sucrose(TCBS)寒天培地(0.5%酵母抽出液、1%ペプトン、2%スクロース、1%チオ硫酸ナトリウム、1%クエン酸ナトリウム、0.5%ウシ胆汁末、0.3%コール酸ナトリウム、1%塩化ナトリウム、0.1%クエン酸鉄、0.004%プロモチモールブルー、0.004%チモールブルー、1.5%寒天、pH8.5、滅菌不可)を作製し、細菌を植菌して、細菌を植菌して、2週間、10°Cで培養し、この培地上の細菌の増殖と、色の変化を観察した。TCBS寒天培地は、コレラ菌、腸炎ビブリオ菌用の選択性分離培地であり、*Vibrio*属細菌以外の増殖を阻止する。コレラ菌は黄色、腸炎ビブリオ菌は無色のコロニーをつくる。

(b) マッコンキー寒天培地[87]

マッコンキー寒天培地(2%ペプトン、1%ラクトース、0.15%胆汁酸塩、0.5%塩化ナトリウム、0.003%ニュートラルレッド、0.0001%クリスタルバイオレット、1.4%寒天、pH7.2、滅菌不要)を作製し、細菌を植菌して、2週間、10°Cで培養し、この培地上の細菌の増殖と、色の変化を観察した。マッコンキー寒天培地は、グラム陽性菌の増殖を阻止し、大腸菌の増殖を阻害し、*Proteus*属細菌の遊走を阻止し、ラクトース非分解菌群(*Salmonella*属、*Shigella*属細菌など)は無色透明のコロニーを作る。

(16) 生成物

細菌が生産する物質によっても、種が分類されているものもある。

(a) 硫化水素生成[76]

TSI寒天培地とグリグラー寒天培地(0.3%肉抽出物、0.3%酵母抽出物、2%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、1%ラクトース、0.1%グルコース、0.03%クエン酸鉄アンモニウム、0.03%チオ硫酸ナトリウム、1.2%寒天、0.05%L-システイン、0.0024%フェノールレッド、pH7.4)を斜面培地に固め、細菌を穿刺培養により、1週間、10°Cで培養した。培地が黒色(硫化鉄)となれば、硫化水素を生成していると判断した。

(b) インドール生成[76]

0.1%L-トリプトファンを添加した、1%ペプトン水に細菌を植菌し、60時間、10°Cで培養した。この培養液にコバックス試薬(p-ジメチルアミノベンズアルデヒド3gをn-アミルアルコール75mlと濃塩酸25mlに溶解した物)を2ml添加し、良く混ぜあわせ、静置した。有機層(上層)が赤くなった時、インドールを生成していると判断した。

(c) 糖からのガス生成[88]

1%グルコース添加の肉汁寒天培地を滅菌し、40°C程度まで温度が低下したときに、細菌を生理食塩水に懸濁した懸濁液を加え、良くかき混ぜた後、高層に試験管中で固め、1週間、10°Cで培養した。ガスが発生して寒天が壊れたら、糖からガスが生成していると判断した。

2.2.5 低温細菌L101株の遺伝子による分析

ここでは、細菌の遺伝子を抽出し、(1)ではG+C含有率、(2)では16S rDNAの遺伝子配列によって系統樹を作製し、細菌の分類を行った。

(1) G+C含有率

DNAは、四つの塩基、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)で構成されているが、このG+C含有率は細菌の属によって、おおよその範囲が決められている。ここでは、以下の方法で、この細菌のG+C含有率を決定した。

(a) 遺伝子の抽出方法[89]

まず、この細菌を100ml容三角フラスコに肉汁培地20mlを入れ、3日間、10°Cで前培養し、これを500ml容三角フラスコに肉汁培地250mlを入れ、3日間、10°Cで本培養し、15分間、4°C、10,000xgで細菌を集菌した。この集菌した細菌をSaline-EDTA溶液(0.15M塩化ナトリウム、0.1Mエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、pH8)を注ぎ、15分間、4°C、10,000xgで細菌を集菌する事で洗浄した。洗浄した細菌2gをSaline-EDTA溶液5mlに懸濁し、-20°Cで凍結した後、Tris-SDS溶液(1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.1Mトリス-塩酸緩衝液、pH9)15mlを加え、60°Cで8分間、かき混ぜながら融解した。この溶液を100ml容共栓付き三角フラスコに移して氷冷し、等量の水飽和フェノール(60°Cで融解したフェノールに約25%の水を加えた物)を加えて、15分間良く混合した。これを遠心管に入れ、20分間、4°C、10,000xgで遠心分離して、上層の水溶液を慎重に、300ml容ビーカーに移した。十分に氷冷してから2倍量の冷エタノールを加え、沈殿してくる繊維状のDNAをガラス棒で巻き取った。DNAを巻き取ったガラス棒を10mlの70%、80%、90%エタノールで順次洗浄し不純物を取り除き、十分に風乾した。乾燥したDNAは、1/10xSSC(0.015M塩化ナトリウム、1.5mMクエン酸三ナトリウム)に浸し、4°Cで一昼夜放置して溶解した。

(b) RNaseおよびDNase処理

溶解したDNAからガラス棒を引き抜き、1,000units/mlのRNase(DNase free)50 μ lを加えた後、37°Cで2時間反応させ、十分に氷冷した。ここに1/5量の水飽和フェノールを加え、15分間十分に混合した後、20分間、4°C、10,000xgで遠心分離して、上層の水溶液を慎重に、300ml容ビーカーに移した。十分に氷冷してから2倍量の冷エタノールを加えて、沈殿するDNAをガラス棒で巻き取り、70%、80%、90%エタノールで洗浄し、風乾した。乾燥したDNAを再び1/10xSSCに溶解し、RNaseと同条件で反応させ、フェノールで処理して、上層を遠心分離した後、300ml容ビーカーに移した。十分に氷冷してから60%量の冷イソプロパノールを加え、沈殿するDNAをガラス棒で巻き取り、70%、80%、90%エタノールで洗浄して風乾し、1/10xSSCに溶解した。

このRNase処理したDNA溶液の260nmの吸光度が0.7~1.0になるように希釈した。この溶液100 μ lを1.5ml容ポリプロピレン製エッペンに取り、沸騰水中で10分間加熱し、これを氷水に入れることで急冷した。これにnucleaseP1溶液を希釈液(40mM酢酸ナトリウム、2mM硫酸亜鉛、pH5.3)で三倍に希釈した溶液を10 μ l加え、50°Cで1時間反応させた。この溶液をHPLCに注入した。

(c) HPLCによるG+C含有率の決定法[90]

DNAの各塩基の組成比を求めるため、HPLCにかけた。カラムはCOSMOSIL 5C18を用い、溶出溶媒として、0.2Mリン酸二水素アンモニウム水溶液を、流速1ml/minで流した。それぞれの塩基は、260nmの吸光度検出器で検出し、G:C:T:Aの組成比が1:1:1:1で含まれる標準液に基づいて、この細菌の有するG+C含有率を式(2-3)により計算した。

$$G + C \text{ [mol\%]} = \frac{(C_x/C_s) + (G_x/G_s)}{(A_x/A_s) + (C_x/C_s) + (G_x/G_s) + (T_x/T_s)} \quad (2-3)$$

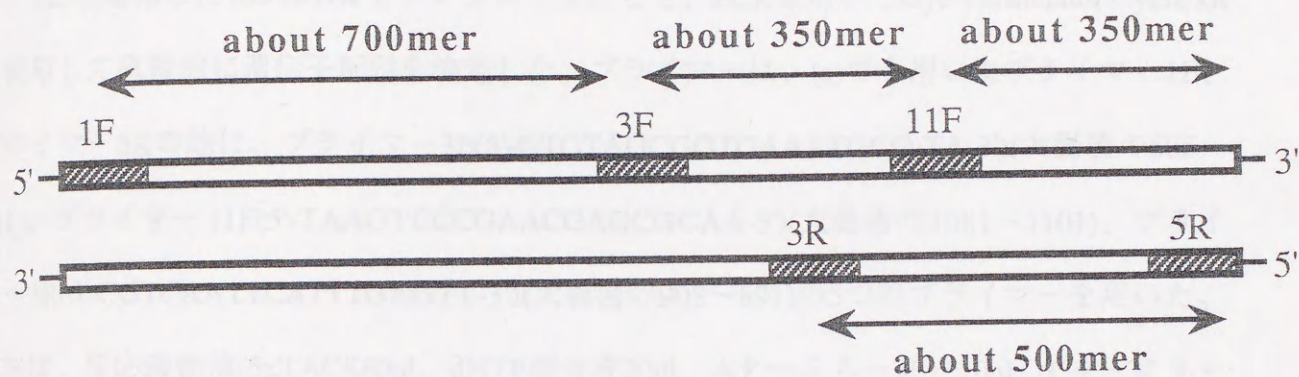
ここで、As、Cs、Gs、Tsは標準試料のピーク面積であり、Ax、Cx、Gx、Txは細菌から抽出したDNAの塩基のピーク面積である。各試料はそれぞれ3回測定し、平均および標準偏差などを計算した。

(2) 16S rDNA配列による系統樹作成

16S rDNAの塩基配列は、ほとんどの細菌で求められており、これに基づいた系統樹を作製し、細菌の同定に使用されている。本研究においてもその全塩基配列を決定し、系統樹を以下のように作製した。

(a) PCRによる16S rDNAの増幅

(1)(a) で抽出した全DNAをDNAテンプレートとして、polymerase chain reaction (PCR)を用いて16S rDNAを増幅した。PCRで使用するプライマーは、大腸菌に基づいて設計された(Fig.2-2)[91]ものの内、プライマー1F (5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3')(大腸菌の10～27)、プライマー5R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3')(大腸菌の1477～1459)を使用した。PCRは、10xPCR緩衝液10 μ l、dNTP 混合液8 μ l、プライマー1F 5 μ l、プライマー5R 5 μ l、滅菌水61.5 μ l、DNAテンプレート10 μ l、Recombinant Taq DNA Polymerase0.5 μ l をゆっくりピペティングにより良く混合し、PCR装置のヒートブロックにセットし、94 $^{\circ}$ Cで3分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで1分、55 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで1分30秒という加熱サイクルを25回繰り返した。最後に、72 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。16S rDNAが増幅が行われているのか確認するために、反応混合液の1 μ lをTBE緩衝液(10.8%トリス、5.5%ホウ酸、0.83%EDTA、pH8.3)溶液に1%アガロースを溶解加熱しゲル化したものに、泳動緩衝液としてTBE緩衝液を用い、定電圧100Vで15分泳動し、0.5 μ g/mlエチジウムブロマイドに60分間ゲルを浸して遺伝子を染色し、これに紫外線を照射してゲル写真を撮り、PCRが良好に行われている



Primer	Sequence
1F	5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3'
3F	5'-GTGTAGCGGTGAAATGCGTA-3'
11F	5'-TAAGTCCCGAACGAGCGCAA-3'
3R	5'-CGTCAATTCATTTGAGTT-3'
5R	5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'

Fig.2-2 Five primers for determination of 16S rDNA sequence.

を確認した。この反応混合液をセントリコン100を用い蒸留水によって洗浄して、未反応のプライマー1F、プライマー5Rを除去した。

(b) 16S rDNA塩基配列の決定

(a)で増幅した16S rRNAをテンプレートにして、PCRを用いたDye Terminator Cycle kitを使用して直接的に遺伝子配列を決定した。プライマーは、(a)でも用いたプライマー1F、プライマー5Rの他に、プライマー3F(5'-GTGTAGCGGTGAAATGCG TA-3')(大腸菌の685～701)、プライマー11F(5'-TAAGTCCCGAACGAGCGCAA-3')(大腸菌の1081～1101)、プライマー3R(5'-CGTCAATTCATTTGAGTT-3')(大腸菌の908～891)の5つのプライマーを用いた。PCRは、反応緩衝液(5xTACS80 μ l、dNTP混合液20 μ l、Aターミネーター10 μ l、Cターミネーター10 μ l、Gターミネーター10 μ l、Tターミネーター10 μ l、Ampli Taq 10 μ l) 7.5 μ l、DNAテンプレート6.0 μ l、5つのプライマーのうちの1つのプライマー3 μ l、超純水3.5 μ lをピペッティングにより良く混合し、PCR装置のヒートブロックにセットし、96°Cで3分間加熱し、96°Cで15秒、50°Cで1秒、60°Cで4分の加熱サイクルを25回繰り返した後、4°Cで保存した。

このPCR反応液20 μ lにフェノール-クロロホルム(1:1、1/24量のイソアミルアルコール添加)溶液100 μ l、超純水80 μ lを混合し、1分間、室温、12,000xgで遠心分離し、上層を取り、さらに等量のフェノール-クロロホルムを入れ混合し、同条件で遠心分離し上層を取り出した。この上層に、2M酢酸ナトリウム15 μ lと100%エタノール300 μ lを加え、15分間、室温、12,000xgで遠心分離しエタノール層を捨てた。これに70%エタノール250 μ lを加え、10分間、室温、12,000xgで遠心分離しエタノール層を捨てた。真空乾燥機を用いてエタノールを完全に除去した。これにサンプル緩衝液4 μ l混合し、90°Cで2分間加熱し、すぐに氷冷した。サンプル緩衝液は脱イオンホルムアミド(ホルムアミドを5%イオン交換樹脂で30分処理したもの) 50 μ lと色素ストック(50mMEDTA、ブルーデキストラン30mg/ml) 10 μ lを混合した物

を使用した。

シーケンサー用の6%アクリルアミドゲルは、尿素50g、アクリルアミド5.7g、ビスアクリルアミド0.3g、イオン交換樹脂2gを超純水50mlに溶解し、40°Cで攪拌しながら完全に溶解し、0.2 μ mのフィルターで吸引濾過して、余分なゴミなどを取り除いた後、10xTBE緩衝液10mlを添加し、全体量が100mlになるまで超純水を加え、これにさらに10%過硫酸アンモニウム水溶液500 μ lを加え良く攪拌した。この混合液の内、15mlを別のビーカーに移し、これにTEMED10 μ lを添加し良く混合した後、ゲル板に気泡が入らぬ様に速やかに注入した。ゲルが凝固したら、残りの混合液にTEMED50 μ lを添加し良く混合した後、ゲル板に流し込んだ。ゲルを3時間~1日放置する事で完全にゲル化させた後、シーケンサーにセットして、シャークコームをつけ、泳動緩衝液としてTBEを用いてあらかじめ予備泳動を30分行った後、試料をシャークコームの隙間に注入し、シーケンサーにかけ、DNA塩基配列を決定した。

(c) 相同性比較と系統樹の作成法

ほとんど全配列に近い16S rDNA遺伝子配列を、遺伝子データバンク(DDBJ、EMBL、GenBank)に登録し、アクセッション番号を取得した。この細菌の遺伝子と比較するために、 γ -Proteobacteriaの16S rDNA遺伝子配列をnational center biological industry(NCBI)から抽出し、国立遺伝学研究所のDNA Data Bank of Japan(DDBJ)のスーパーコンピューターに相同性[92]、遺伝的距離および系統樹の計算を行わせた。系統樹は、マルチプルアライメント(最大節約原理に元にした、遺伝子の挿入、欠失、置換ないし点突然変異などの変化量を最小化する配列群の進化経路を選択する物)[93]、近接結合(N-J)法[94]によって作製した。比較するために抽出した遺伝子の由来とそのアクセッションナンバーは次の通りである。
Actinobacillus lignieresii (M75068)、*Aeromonas schubertii* (X60416)、*Aranicola proteolyticus*

(U93263)、*Arsenophonus nasoniae* (M90801)、*Cardiobacterium hominis* (M35014)、*Chromobacterium violaceum* (M22510)、*Citrobacter freundii* (M59291)、*Eikenella corrodens* (M22512)、*Enterobacter* sp. (U39556)、*Erwinia amylovora* (X83265)、*Escherichia coli* (X80725)、*Ewingella americana* (X88848)、*Haemophilus aegyptius* (M75044)、*Hafnia alvei* (M59155)、*Gardnerella vaginalis* (M58744)、*Klebsiella pneumoniae* (X87276)、*Pasteurella multocida* (M59769)、*Photobacterium phosphoreum* (X74687)、*Photorhabdus luminescens* (D78005)、*Plesiomonas shigelloides* (M59159)、*Proteus vulgaris* (J01874)、*Rahnella aquatilis* (X79939)、*Salmonella* sp. (X80676)、*Serratia marcescens* (M59160)、*Shigella dysenteriae* (X96966)、*Streptobacillus moniliformis* (Z35305)、*Vibrio cholerae* (Z21856)、*Xenorhabdus nematophilus* (X82251)、*Yersinia pestis* (L37604)。

2.3 実験結果

2.3.1 低温細菌の単離

単離した菌株は、簡易的に4文字で命名した。1文字目は、細菌分離に用いた培地源を表し、サケならば1、一里野高原の土壌ならば2、カニならば3、活性汚泥ならば4とした。3文字目と4文字目は、同じ培地・分離源から得られた菌株に付けた整理番号で01～99の数字と定義した(Fig.2-3)。例えばA101は、A培地で増殖した分離源サケの内臓、整理番号1番の菌株であることを示している。

この低温細菌の単離によって、136株の低温細菌を単離する事ができた。

2.3.2 GLDHのスクリーニング

(1) GLDHの活性染色

分離した低温細菌136株について、その全てについて活性染色した。この活性染色に

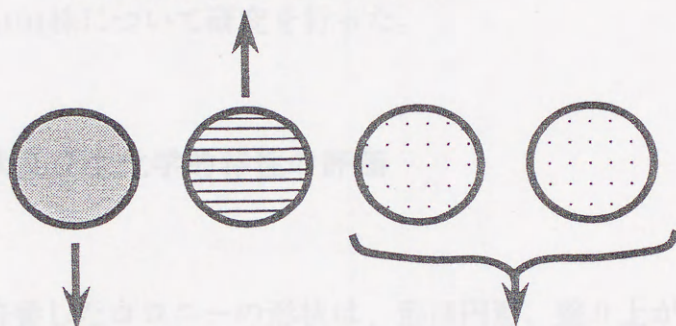
1: form salmon

2: from soil

3: from crab

4: from slime

Bacteria source



Medium

Isolated number

A: A medium

L: L medium

P: P medium

Fig.2-3 Isolation number of psychrophilic bacteria.

は、NAD⁺やNADP⁺を添加せず、NBTと基質L-グルタミン酸のみを用いたため、全細菌にL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性染色は見られなかった。この活性染色で強く染色された菌株は、L101、P105、L301、A105の4株であった。

(2) GLDH活性の測定

活性染色で強く染色された菌株L101、P105、L301、A105の正確な活性を測定した。それぞれの比活性をTable2-2に示す。この細菌の中で最もGLDH比活性が高い株は、101株であった。本研究では、このL101株について研究を行った。

2.3.3 低温細菌L101株の形状及び生化学的特性の評価

(1) コロニーの形状

肉汁寒天培地上で1週間培養したコロニーの形状は、形は円形、盛り上がり方はレンズ型で、滑らかに培地に接触、縁は波状、バターのようにべったりしていて、不透明で少し黄色であった。コロニーの大きさは、直径約5mmであった。

(2) グラム染色

低温細菌L101株は、グラム染色キットによる染色で、細胞壁が赤色に染められた。この結果、この細菌は、グラム陰性菌であることがわかった。

(3) 運動性の確認

顕微鏡で、この細菌の運動性を調べたところ、この細菌は活発に一方向に直進しており、進行方向に対して細菌後部を左右に振りながら前進していた。

(4) 鞭毛染色

Table 2-2 Specific activities of L-glutamate oxidation in crude extracts of isolated cold-active bacteria

Strain	Specific activity (unit/mg - protein)*
L 101	0.170
P 105	0.098
L 301	0.089
A 105	0.045

*Activity was measured at 20°C by the spectrophotometric method. One unit was defined as the amount of enzyme that reduced one micromole of nitroblue tetrazolium (NBT) per minute under the conditions of assay. Amount of total protein was determined by the method of Bradford (75).

この細菌の鞭毛染色写真をFig.2-4に示す。この細菌は、極鞭毛を有していることが示された。

(5) 細菌の走査型電子顕微鏡写真

この細菌の走査型電子顕微鏡写真をFig.2-5に示す。細菌は極が丸い桿菌で、直径約 $0.8\mu\text{m}$ 、長さ約 $2.0\mu\text{m}$ で、単一の菌体の物と2つ繋がって存在する物のどちらかであった。この細菌は、片方の極に長さ約 $1.1\mu\text{m}$ の1本の鞭毛を持つことがわかった。

(6) O/Fテスト

この細菌のO/Fテストの結果をFig.2-6に示す。この細菌は、好気条件、嫌気条件の両方でグルコースから酸を生産するので、Fermentationであった。

(7) 硝酸塩の還元

(a) 亜硝酸塩の生成

40時間後には、0.1%硝酸カリウム添加肉汁培地に亜硝酸が蓄積され、67時間後にはコハク酸硝酸塩培地に亜硝酸が蓄積された(Fig.2-7)。

(b) 脱窒化反応

20時間後、64時間後においても1%硝酸カリウム添加肉汁培地で、好気・嫌気条件共に、ガスの発生は観察できなかった。しかしながら、64時間後の肉汁培地よりも硝酸カリウムを添加した方が好気・嫌気条件共に濁度(増殖量)が高かった(Table2-3)。この細菌は、ガスは発生しないので、脱窒反応陰性と判断した。

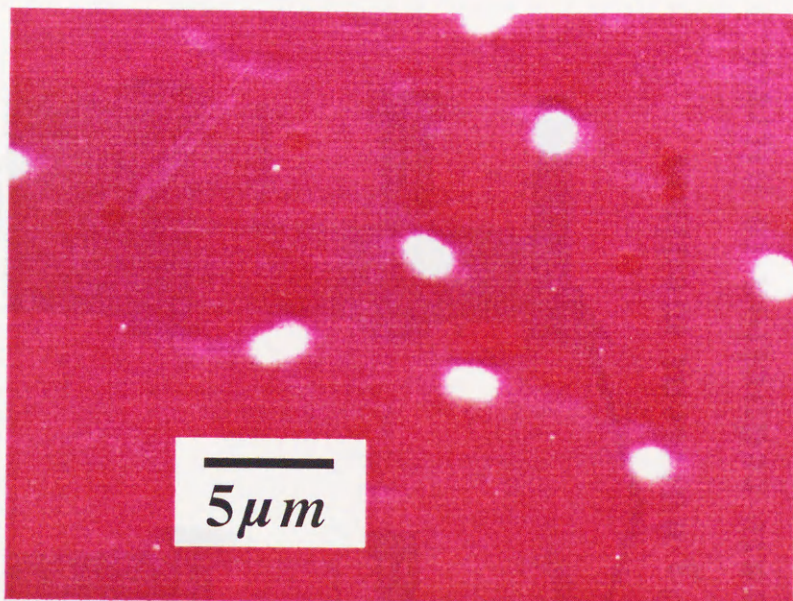


Fig. 2-4 Flagella staining.

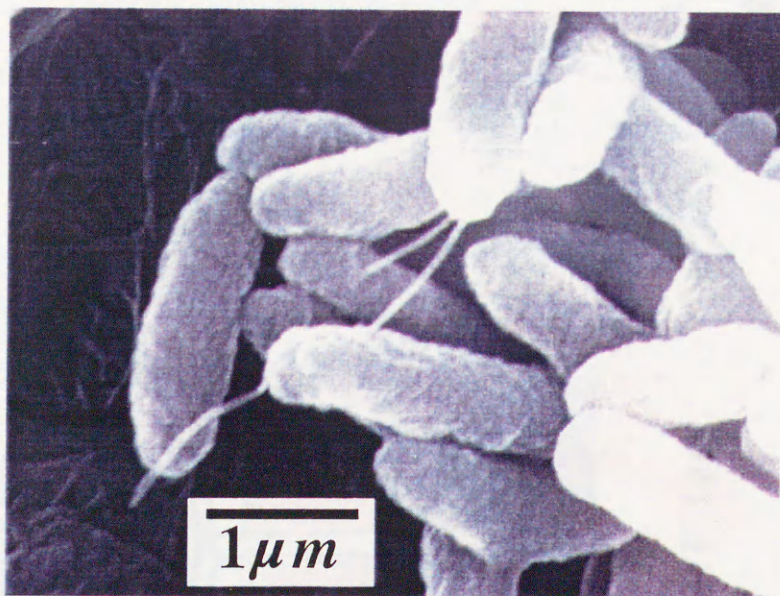


Fig. 2-5 Electron micrograph of strain L101.

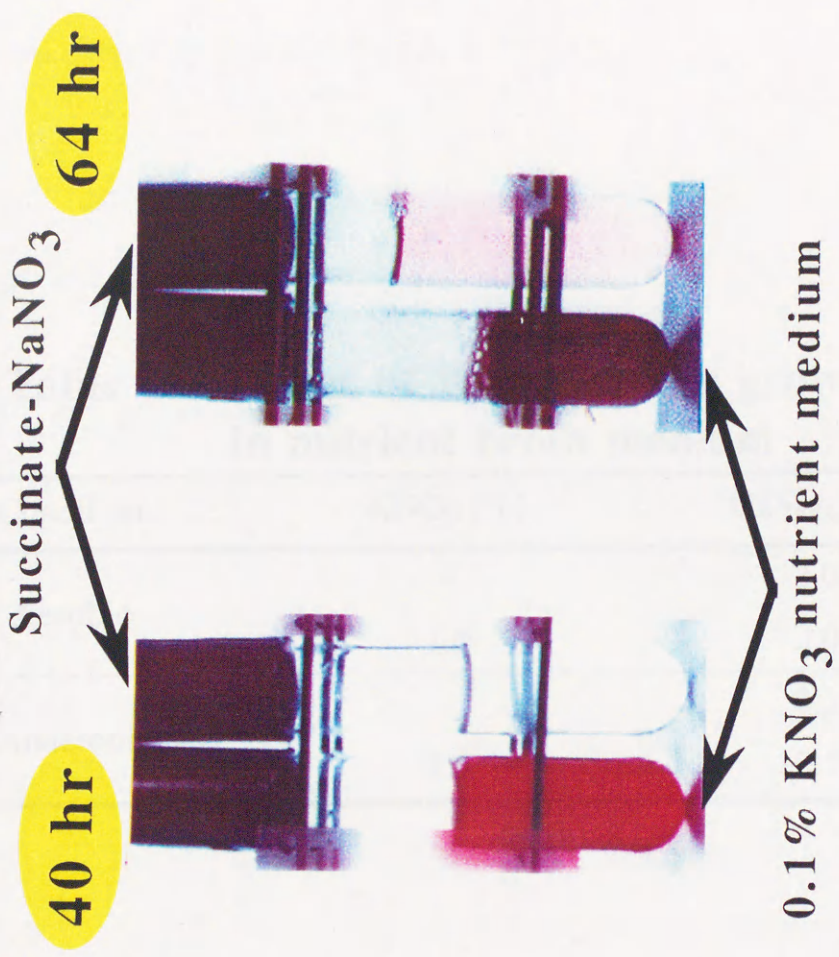


Fig. 2-7 Nitrate reduction to nitrite.

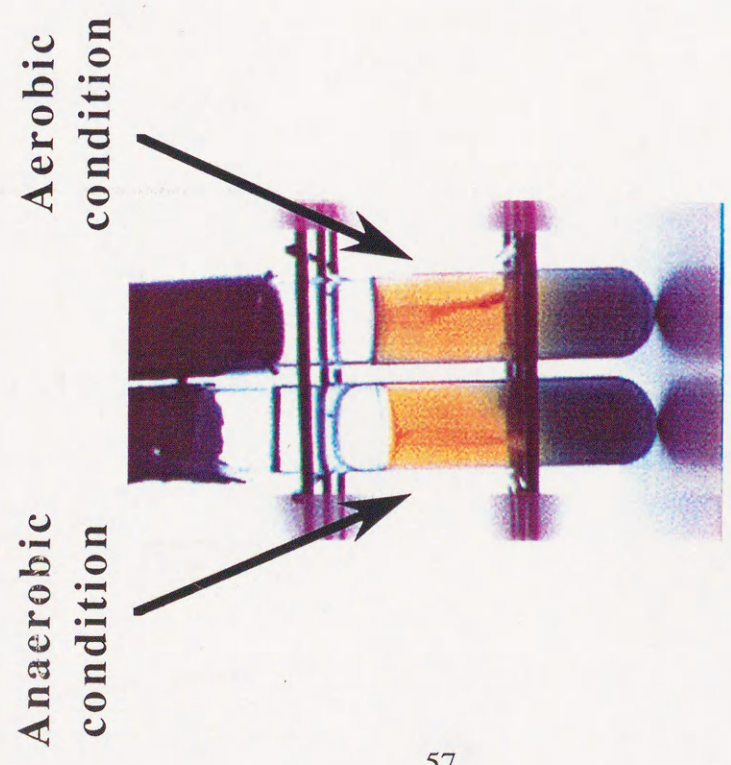


Fig. 2-6 O/F test.

Table 2-3 Effect of KNO₃ on the growth in nutrient broth medium

Condition	KNO ₃ [%]	OD _{660nm} [-]
Aerobic	-	2.03
	1.0	2.04
Anaerobic	-	0.37
	1.0	0.59

(8) Voges-Proskauer(V-P)反応とメチルレッド試験

(a) V-P反応

この細菌は、20時間後にV-P反応を調べた時、ルビー色の呈色が見られた(Fig.2-8(A))。従って、V-P反応陽性であった。

(b) メチルレッド試験

メチルレッド試験を20時間後と64時間後に行った(Fig.2-8(B))。64時間後においても、赤変せずオレンジ色のままだった。従って、メチルレッド試験は陰性であった。

(9) 最適生育条件

細菌の増殖に対する影響を肉汁培地にて調べた(Fig.2-9)。増殖量は、40時間後の濁度から植菌時の濁度を引いたもので表している。この細菌は、肉汁培地中で、5°C以下、35°C以上でpH4以下、pH10以上で、塩濃度1M(5.84%)以上で細菌が増殖しなくなった。また、この細菌は、最大増殖温度が15°C、最大増殖pHがpH7~8、最大増殖塩化ナトリウム濃度が0~0.3M(0~1.75%)であることがわかった。最大増殖温度が15°C以下にあるので、低温細菌であることがわかった。

(10) 菌体内酵素

(a) オキシダーゼ

細菌のオキシダーゼの試験結果をFig.2-10(A)に示す。細菌は10秒以内に青色に染色された。したがって、オキシダーゼ陽性であった。

(b) カタラーゼ

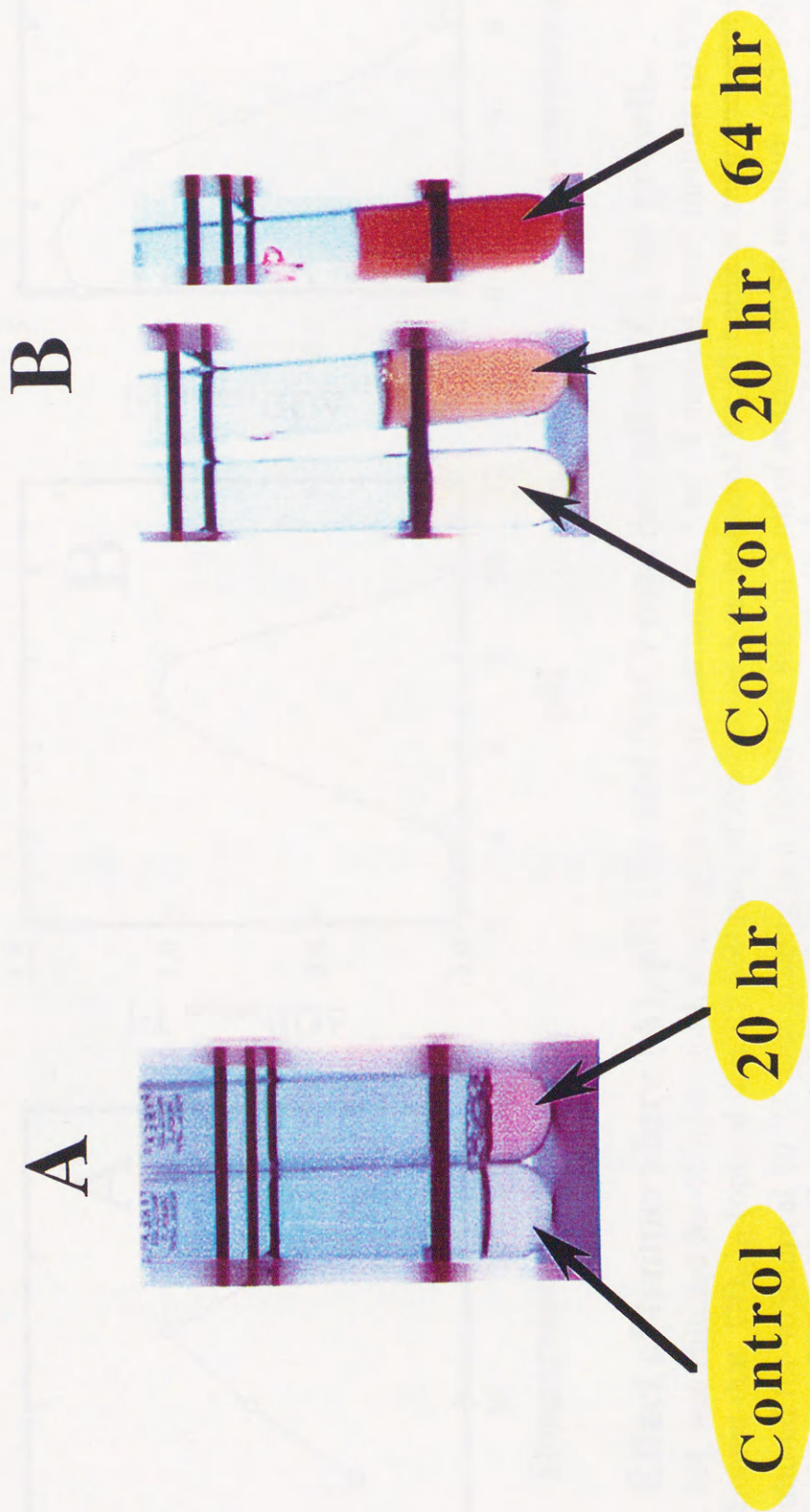


Fig. 2-8 V-P test (A) and methyl red test (B).

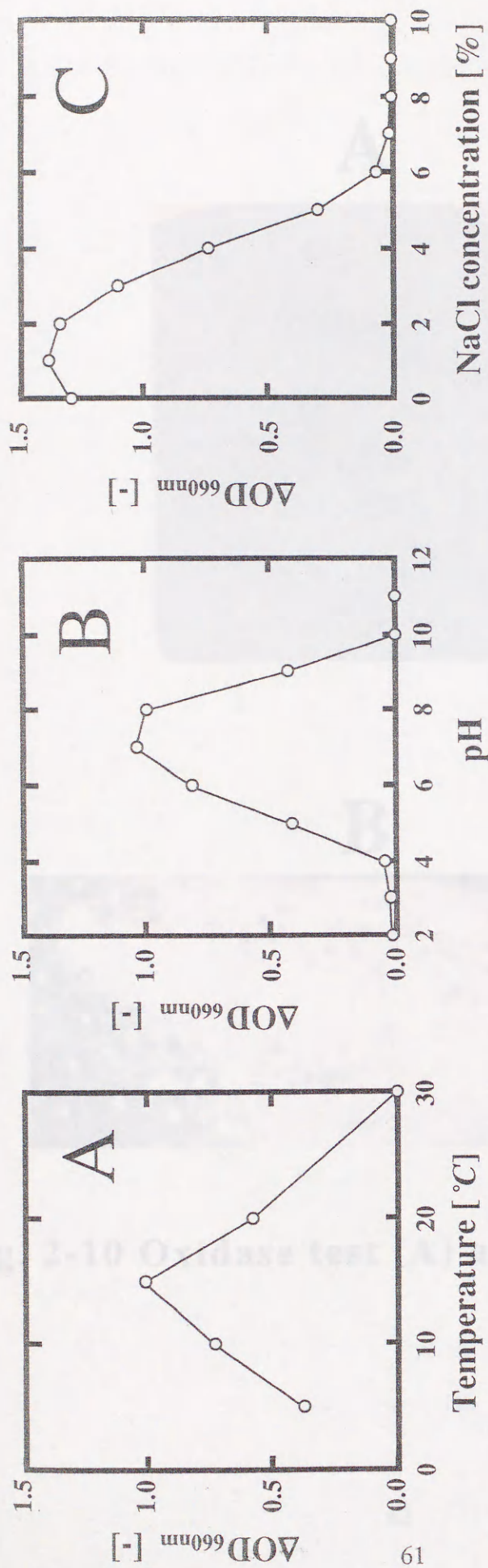
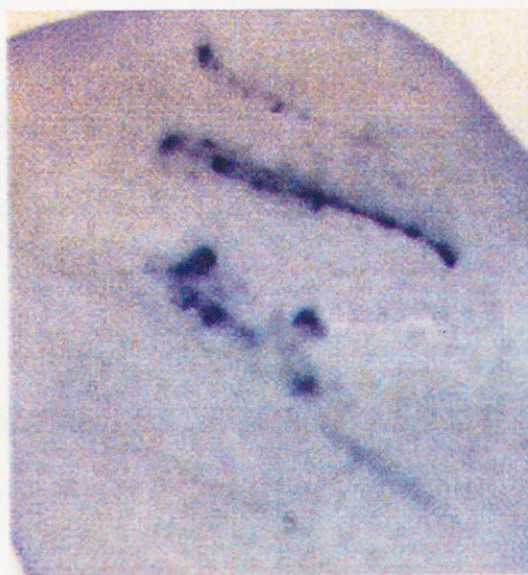


Fig. 2-9 Effect of temperature (A), pH (B) and NaCl concentration (C) on growth.

(A) Strain L101 was cultured for 40 hours with shaking in a 12-ml test tube in 5 ml of nutrient broth medium (0.5% NaCl, pH 7). ΔOD_{660} indicated that OD_{660} (optical density 660 nm) of the culture was increased for 40 hours at each temperature. (B) Strain L101 was cultured for 40 hours at $10^{\circ}C$ with shaking in a 12-ml test tube in 5 ml of nutrient broth medium (0.5% NaCl) adjusted pH by adding 1N NaOH or 1N H_2SO_4 . ΔOD_{660} indicated that OD_{660} (optical density 660 nm) of the culture was increased for 40 hours at each pH. (C) Strain L101 was cultured for 40 hours at $10^{\circ}C$ with shaking in a 12-ml test tube in 5 ml of nutrient broth medium (pH 7) adjusted NaCl concentration by adding solid NaCl. ΔOD_{660} indicated that OD_{660} (optical density 660 nm) of the culture was increased for 40 hours at each NaCl concentration.

A



B

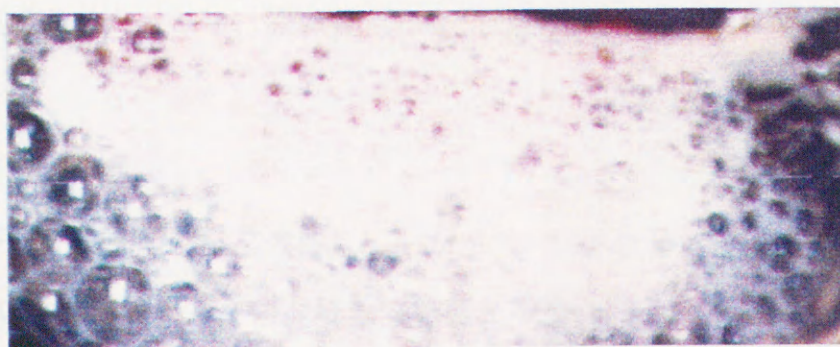


Fig. 2-10 Oxidase test (A) and catalase test (B).

過酸化水素水に、細菌を入れると激しく気泡が発生した(Fig.2-10(B))。従って、カタラーゼ陽性であった。

(c) アルカリ・酸性ホスファターゼ

アルカリ性・酸性条件の両方で、反応液が反応4時間で黄色に変化した。したがって、アルカリホスファターゼ・酸性ホスファターゼは共に陽性であった。

(d) ウレアーゼ

クリステンセンの尿素培地上で細菌を培養したところ、3日目からコロニーが肉眼で見え始めた。しかしながら、コロニーの周りは、赤く変化しなかった。したがって、ウレアーゼ陰性であった。

(e) β -ガラクトシダーゼ

細菌をTSI培地で培養した後、細菌を生理食塩水に懸濁し、ONPG試験試薬を加えて、37°Cで1日反応させたところ、液は黄色になった。したがって、 β -ガラクトシダーゼ陽性であった。

(f) アルギニンジヒドロラーゼ

ターンレイ半流動アルギニン培地で細菌を培養したところ、培地が黄色から赤色に変色したので、この細菌は、アルギニンジヒドロラーゼ陽性であった。

(g) リジンデカルボキシラーゼ

1%L-リジン塩酸塩添加モラー培地で嫌氣的に培養したところ、培地が濃紫色に変色した。したがって、リジンデカルボキシラーゼ陽性であった。

(h) オルニチンデカルボキシラーゼ

1%L-オルニチン塩酸塩添加モーラー培地で嫌氣的に培養したところ、培地が濃紫色に変色した。したがって、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性であった。

(11) 菌体外酵素

(a) リパーゼ(Tween分解酵素)

1%Tween20あるいは、1%Tween80添加の0.01%塩化カルシウムを含む肉汁寒天培地上で、細菌を培養した。Tween20とTween80の両方において、コロニーの周りに不透明なハロが形成され(Fig.2-11(A),(C))、これを顕微鏡で観察すると、結晶が観察できた(Fig.2-11(B),(D))。この結晶は、リパーゼによってTweenが分解生成された脂肪酸とカルシウムが結合した塩であると考えられる。したがって、この細菌は、リパーゼを菌体外に放出していた。

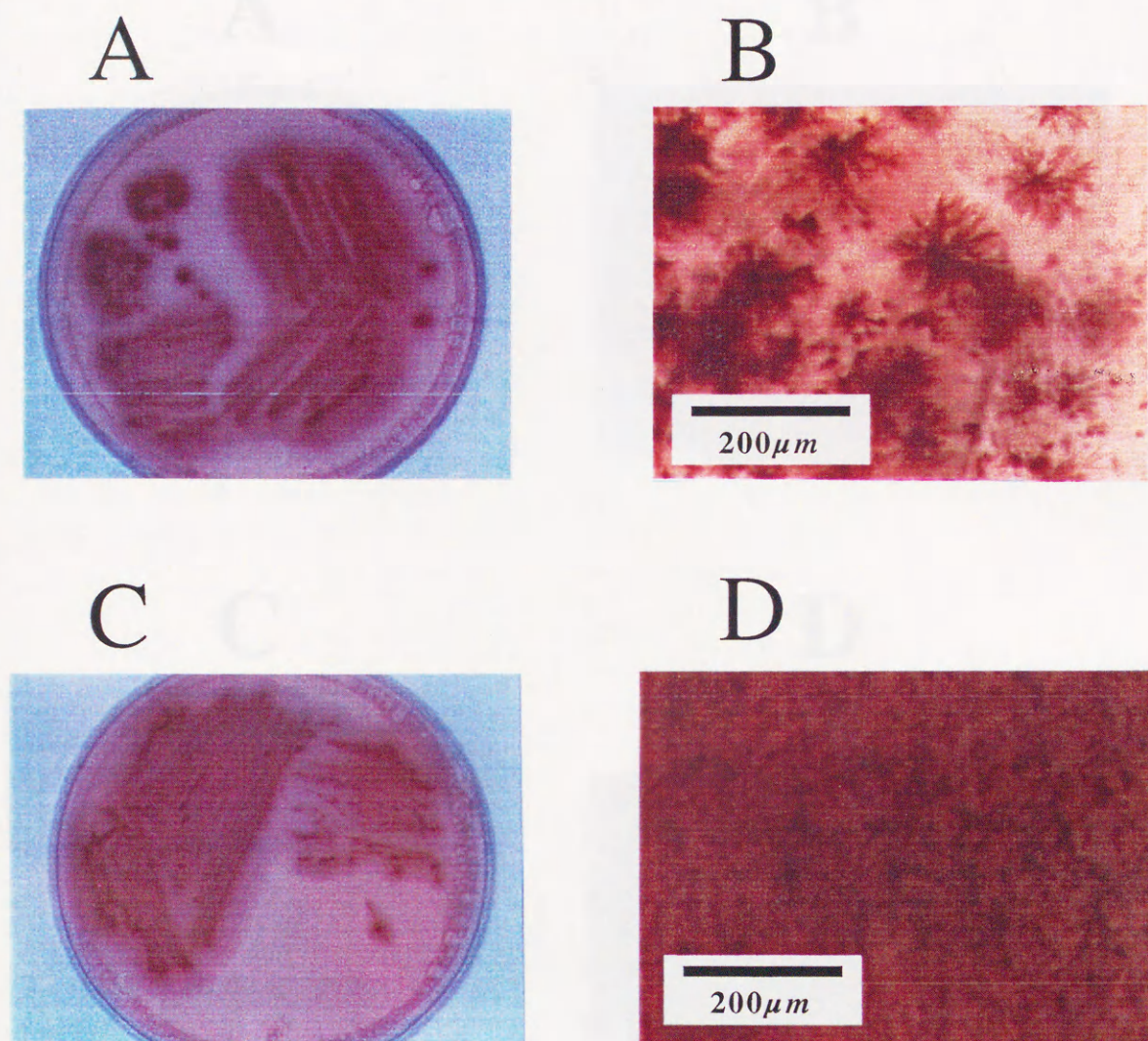
(b) アミラーゼ活性

0.2%可溶デンプンを含む肉汁寒天培地上で、細菌を10°Cで2週間培養し、ヨウ素-ヨウ化カリウム溶液をスプレーした。コロニーの周りも含めて青紫色に染色された(Fig.2-12(A))。したがって、この細菌は、アミラーゼを菌体外に放出しないことが分かった。

Fig. 2-11 Tween 20 hydrolysis (A, B) and
tween 80 hydrolysis (C, D).

(c) プロテアーゼ活性

1%カゼインナトリウム添加肉汁寒天培地上で、細菌を10°Cで1週間培養し、10%塩酸をスプレーした。コロニーの周りには、透明なハロが形成された(Fig.2-12(B))。したがって、この細菌は、プロテアーゼを菌体外に放出していた。



**Fig. 2-11 Tween 20 hydrolysis (A, B) and
tween 80 hydrolysis (C, D).**

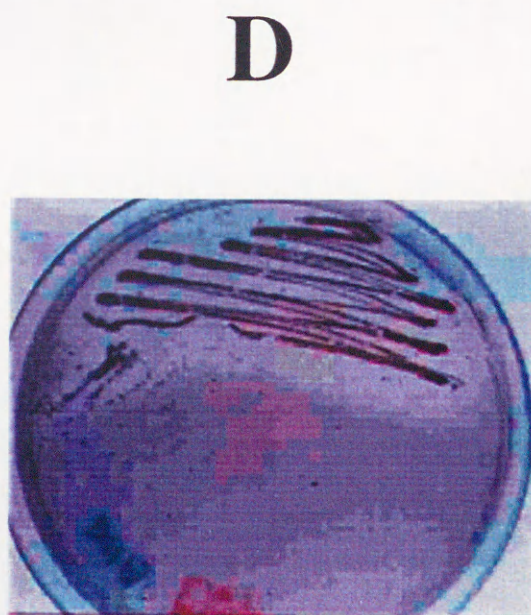
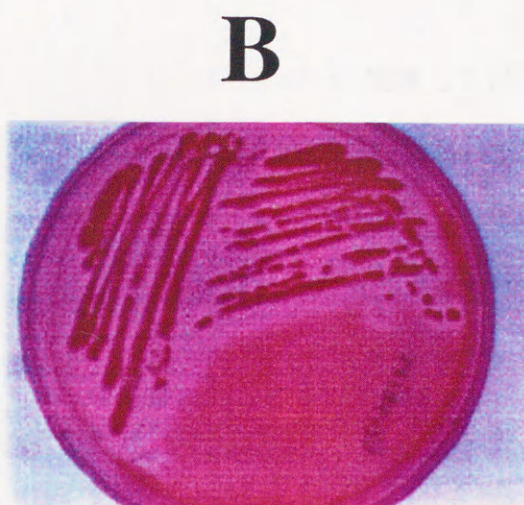
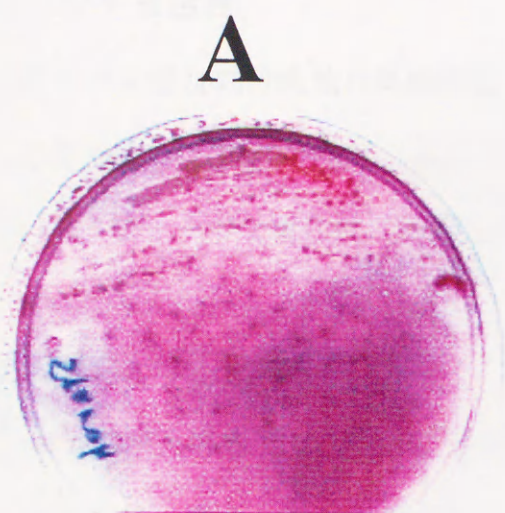


Fig. 2-12 Starch (A), casein (B), gelatin (C) and DNA hydrolysis (D).

(d) ゼラチナーゼ活性

12%ゼラチン添加肉汁培地に穿刺培養したところ、4日後ぐらいから植菌した周りから管状に液化し始めた(Fig.2-12(C))。さらに1ヶ月後には完全に液化した。したがって、この細菌は、ゼラチナーゼを菌体外に放出していた。

(e) DNase活性

DNA含有の寒天培地上で、細菌を10°Cで1週間培養し、10%塩酸をスプレーした。コロニーの周りには、透明なハロが形成された(Fig.2-12(D))。したがって、この細菌は、DNaseを菌体外に放出していた。

(12) 炭素源の資化

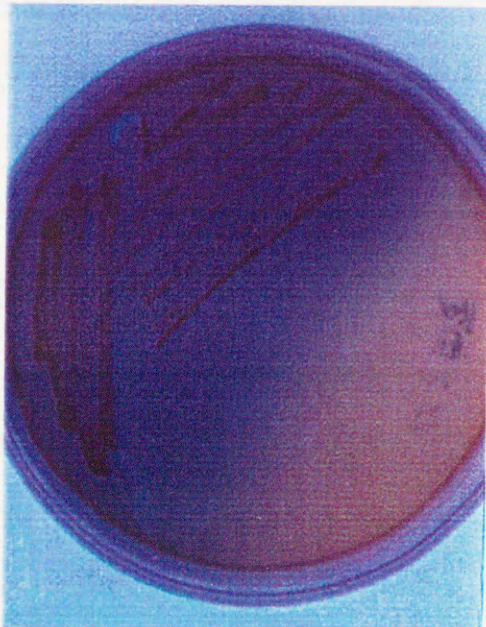
(a) クエン酸の資化

シモンのクエン酸寒天培地上で、細菌を10°Cで1週間培養した。コロニーの周辺が、青色に変色した(Fig.2-13(A))。これにより、この細菌がクエン酸を資化することが分かった。

(b) 糖類の資化

各種の糖類を1%添加し、これが酸にまで代謝されるか細菌を植菌してから36時間観測した。この細菌が資化できる糖は、D-グルコース、D-マンニトール、イノシット、D-ソルビトール、スクロース、D-アミグダリンであり、資化できない糖は、L-ラムノース、D-メリビオース、L-アラビノースであった。

A



B



Fig. 2-13 Citrate utilization (A) and growth on MacConkey agar (B).

(13) ナトリウムイオンの要求性

1%ペプトン水に細菌を植菌し、細菌が増殖するか確かめた。細菌は活発に増殖した。この結果からこの細菌は、ナトリウムイオンなしでも増殖できることが示され、ナトリウムイオン要求性がないことが示された。

(14) *Vibrio*属細菌の抗生物質耐性

*Vibrio*属の抗生物質であるO/129に対して耐性を有するかを、細菌を大量にまいたプレート上に、O/129を付けた濾紙を置くことで確認した。抗生物質を含有している濾紙の周りにおいても何の変化もなしに活発に細菌は増殖した。したがって、この細菌は、O/129に対して耐性を有しており、*Vibrio*属でないことがわかった。

(15) 選択培地上の生育

(a) TCBS寒天培地

*Vibrio*属の選択培地であるTCBS寒天培地に、細菌を植菌し10°Cで2週間培養した。しかしながら、この細菌のコロニーは見られなかった。また、低倍率の顕微鏡でも確認したが、増殖していなかった。したがって、この細菌は、*Vibrio*属の細菌でないことがわかった。

(b) マッコンキー寒天培地

マッコンキー寒天培地上に、細菌を植菌し10°Cで2週間培養した。コロニーの色は白色で不透明であった(Fig.2-13(B))。したがって、この細菌は、増殖することからグラム陰性の細菌で、無色透明のコロニーを作る*Salmonella*属、*Shigella*属の細菌でもなかった。

(16) 生成物

(a) 硫化水素生成

TSI寒天培地、クリグラー寒天培地においても、硫化鉄の黒い沈殿が生じなかった (Fig.2-14(A))。したがって、この細菌は、硫化水素を生産しないと判断した。

(b) インドール生成

0.1%L-トリプトファン添加1%ペプトン水で細菌を60時間、10°Cで培養し、コバックス試薬を添加して良くかき混ぜた。この細菌では、有機層の色が白いままであった。このことから、この細菌は、インドールを生産しないと判断した。

(c) 糖からのガス生成

1%グルコース添加寒天培地に高濃度の細菌を加えて固め、1週間、10°Cで培養した。Fig.2-14(B)の様に、ゲルが破壊され、気体が発生していることが明らかになった。脱窒反応のところでペプトンから気体が発生しないことが示されているので、これは、グルコース由来のガスであると考えられた。

2.3.4 低温細菌L101株の遺伝子による分析

(1) G+C含有率

この細菌のG+C含有率は、 51.9 ± 0.9 %であった。

(2) 16S rDNA配列による系統樹作成

(a) 16S rDNA塩基配列

この細菌の16S rDNAの塩基列配列をFig.2-15に示す。この遺伝子配列を書各遺伝子の

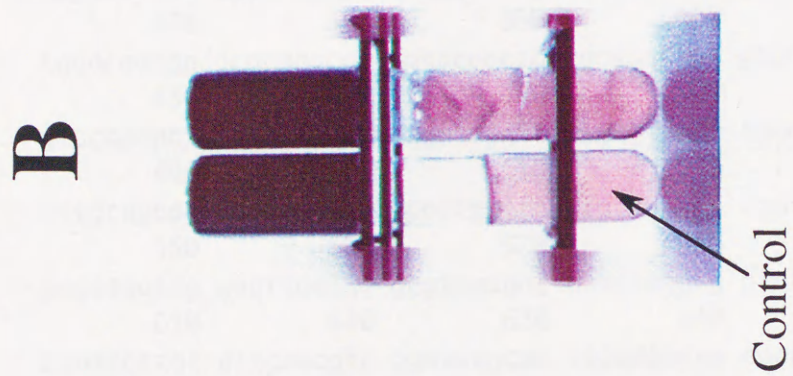
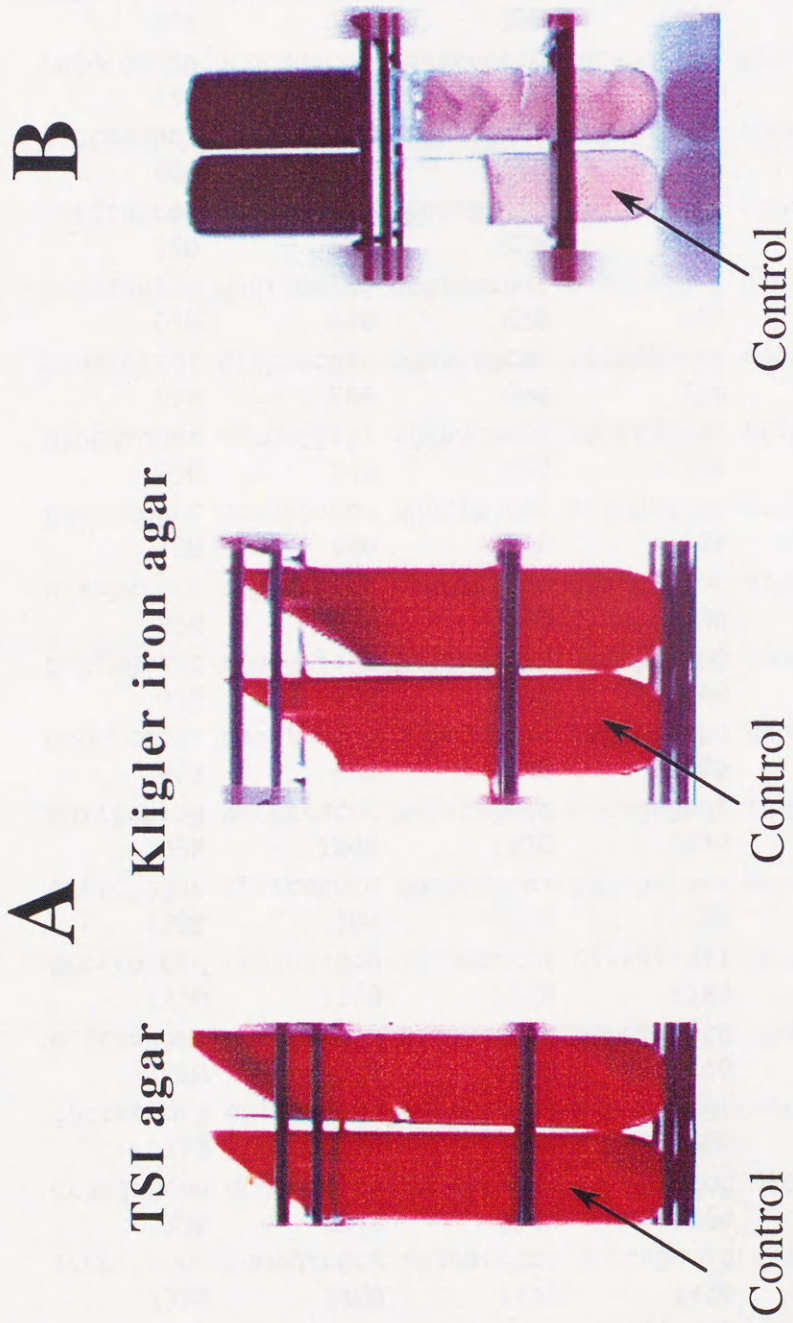


Fig. 2-14 Production of H_2S (A) and CO_2 (B).

10	20	30	40	50	60
agttttgatca	tggtctcagat	tgaacgctgg	cggcaggcct	aacacatgca	agtcgagcgg
70	80	90	100	110	120
tagcacagga	gcagcttgct	ctccgggtgc	acgagcggcg	gacgggtgag	taatgtctgg
130	140	150	160	170	180
gaaactgcct	gatggagggg	gataactact	ggaaacggta	gctaataccg	cataacgtct
190	200	210	220	230	240
tcggaccaa	gtgggggacc	ttcgggcctc	acgccatcct	atgtgcccag	atgggattag
250	260	270	280	290	300
ctcgtacgtg	gggtaatggc	tcacctaggc	cacgatccct	agctgggtctg	agaggatgac
310	320	330	340	350	360
cagccacact	ggaactgaga	cacgggtccag	actcctacgg	gaggcagcac	tggggaatat
370	380	390	400	410	420
tgcacaatgg	gcgcaagcct	gatgcagcca	tgccgcgtgt	gtgaagaaag	ccttcggggt
430	440	450	460	470	480
gtacagcact	ttcagcgaag	aagaaagggt	ctgtgttaat	agcacattgc	attgacgtta
490	500	510	520	530	540
cttgcagaag	aagaaccggc	caactccgtg	ccagcagccg	cgggtattacg	gaggggtgcaa
550	560	570	580	590	600
gcgttaatcg	gaattactgg	gcgtaaagcg	cacgcaggcg	gtatgttata	gtgagatgtg
610	620	630	640	650	660
atatcctcgc	gctgaacgtg	ggaactgcat	ttgaaaacgg	caagctagag	tcttgtagag
670	680	690	700	710	720
gggggtagaa	ttccagggtg	agcgggtgaa	tgcgtagaga	tctggaggaa	taccgggtggc
730	740	750	760	770	780
gaaggcggcc	ccctggacaa	agactgacgc	tcagggtgcga	aagcgtgggg	agcaaacagg
790	800	810	820	830	840
attagatacc	ctggtagtcc	acgctgtaaa	cgatgtcgac	ttggagggtg	tgcccttgag
850	860	870	880	890	900
gcgtggcttc	cggagctaac	gcgttaagtc	gaccgcctgg	ggagtacggc	cgcaaggtta
910	920	930	940	950	960
aaactcaaat	gaattgacgg	gggcccgcac	aagcgggtgga	gcatgtgggt	aaattcgaatg
970	980	990	1000	1010	1020
catcgcaag	aaccttacct	gctcttgaca	tccagagaat	tcgctagaga	tcgctgagtg
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ccttcgggaa	ctctcagaca	ggtgctgcat	ggctgtcgtc	agctcgtggt	gtgaaatggt
1090	1100	1110	1120	1130	1140
gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaaacctt	atcctttggt	gccagcacgt	aatgggtggga
1150	1160	1170	1180	1190	1200
actcaaagga	gactgccggg	gataaacggg	aggaagggtg	ggatgacgtc	aagtcacat
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ggcccttacg	agtagggcta	cacacgtgct	acaatggcgt	atacaaagag	aagcgaactc
1270	1280	1290	1300	1310	1320
gcgagagcaa	gcggacctca	taaagtacgt	cgtagtccgg	atcggagtct	gcaactggac
1330	1340	1350	1360	1370	1380
tccgtgaagt	cggaatcgct	agtaatcgta	gatcagaatg	ctacggtgaa	tacgttccccg
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ggccttgtag	acaccgccc	tcacaccatg	ggagtgggtt	gcaaaagaag	taggtagctt
1450	1460	1470	1480	1490	1500
aaccttcggg	agggcgctta	ccactttgtg	attcatgact	ggggtgaagt	cgtaacaagg

Fig. 2-15 16S rDNA sequence of strain L101.

データベースに登録し、アクセッションナンバーを取得した。アクセッションナンバーはAB009954であった。

(b) 相同性と系統樹

この細菌と他の γ -*Proteobacteria*の細菌の16S rDNAの相同性と遺伝的距離をTable 2-4に示す。もっとも相同性が高かった細菌は、*Aranicola proteolyticus*で相同性96%、遺伝距離2.9であった。次に相同性が高かった細菌は、*Hafnia alvei*で相同性95%、遺伝距離4.9であった。その他の細菌は相同性が93%以下であった。

16S rDNAの塩基配列に基づいて系統樹を作製した。Fig.2-16(A)は、マルチプルアライメントによる系統樹、Fig.2-16(B)は、近接結合(N-J)法による系統樹による系統樹を示している。

2.4 考察

低温細菌L101株は、グラム陰性、糖を嫌気状態で資化できる通性嫌気性菌であった。Table2-5は、この性質を有するグループを表にしているものである。この細菌は、運動性とオキシダーゼ活性、カタラーゼ活性を有していた。この性質に合う細菌は、*Vibrionaceae*科と*Chromobacterium*属の細菌であった。*Vibrionaceae*科には、*Aeromonas*、*Vibrio*、*Photobacterium*、*Plesiomonas*の4つの属が含まれている。また、一般に*Chromobacterium*属の細菌は、紫色のコロニーを形成するのが普通であるが例外として、白色のコロニーを有するものも存在する細菌である。本研究では、さらなる特性を調べ、属及び種の同定を行った。5種類の属とL101株の性質の比較をTable2-6に示す。L101株は、*Vibrio*属選択培地TCBS寒天培地上で生育が観察されず、*Vibrio*属の抗生物質O/129に対しても耐性を有していた。また、塩濃度が0%においても生育が確認できた。これらの性質に

Table 2-4 Percent similarity for 16S rDNA sequences from strain L101 and other members of gamma Proteobacteria (above the diagonal) and equally weight distances between the 16S rDNA sequences (below the diagonal)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1: L101																														
2: Streptococcus moniliformis	34.5																													
3: Gardnerella vaginalis	31.5	33.6																												
4: Eikenella corrodens	22.1	31.2	32.3																											
5: Chromobacterium violaceum	22.4	31.5	31.1	8.6																										
6: Cardiobacterium hominis	20.0	28.7	29.6	17.2	15.6																									
7: Aeromonas schubertii	11.1	31.1	28.4	19.2	19.5	16.4																								
8: Hafnia alvei	4.9	32.7	30.3	21.0	20.4	17.5	9.8																							
9: Aranicola proteolyticus	2.9	32.3	29.2	21.0	20.8	18.1	9.9	3.1																						
10: Xenorhabdus nematophilus	9.0	31.3	30.7	19.9	20.8	19.0	11.2	6.5	7.5																					
11: Photorhabdus luminescens	10.0	32.5	32.5	21.3	22.3	20.3	11.9	8.0	8.1	5.3																				
12: Proteus vulgaris	9.3	32.3	31.4	20.4	21.1	19.3	10.6	6.8	7.1	6.7	7.2																			
13: Haemophilus aegyptius	16.6	31.5	31.0	22.0	21.7	17.4	16.4	14.1	14.4	15.1	13.8	15.5																		
14: Pasteurella multocida	16.1	31.6	32.0	22.2	21.2	17.7	15.4	13.6	14.0	15.0	14.7	15.5	5.2																	
15: Actinobacillus lignieresii	15.4	31.4	31.2	21.4	21.0	17.2	13.6	12.6	13.3	13.8	14.1	13.1	7.2	6.7																
16: Arsenophonus nasoniae	11.8	32.2	32.2	20.0	21.3	18.4	12.2	9.0	9.7	8.7	8.5	7.8	12.0	13.1	11.0															
17: Ewingella americana	6.6	32.5	31.0	21.8	21.1	19.1	10.2	3.9	4.6	7.2	8.6	8.0	15.2	14.5	13.9	9.4														
18: Yersinia pestis	7.1	32.7	30.4	21.0	21.0	18.0	9.5	4.3	5.3	6.4	8.0	8.0	15.3	15.0	13.2	9.7	3.8													
19: Rahnella aquatilis	6.1	31.8	30.2	20.6	20.0	17.7	9.8	3.9	4.2	6.4	8.6	7.2	15.3	13.8	13.1	9.2	2.6	3.2												
20: Serratia marcescens	6.2	32.7	30.4	20.9	21.0	17.8	11.1	3.8	3.7	7.8	8.1	7.4	13.9	13.8	13.1	9.2	4.9	5.1	4.8											
21: Klebsiella pneumoniae	6.5	31.2	29.1	20.0	20.4	17.5	10.6	4.3	4.4	7.4	8.3	7.7	14.7	14.7	14.1	9.5	5.0	5.5	5.1	2.2										
22: Erwinia amylovora	7.0	31.9	29.0	20.1	20.9	17.7	10.0	5.4	4.9	6.5	8.8	8.2	15.6	15.2	13.8	9.8	7.1	6.7	6.4	5.3	3.7									
23: Salmonella sp.	9.2	31.8	30.3	21.4	20.9	17.9	11.2	6.5	7.0	8.4	9.6	9.1	15.3	15.0	14.3	10.5	7.1	7.5	6.9	4.9	3.6	5.4								
24: Escherichia coli	8.4	32.2	29.7	20.2	20.8	17.7	10.5	6.2	6.1	7.3	7.7	8.1	14.0	13.8	12.7	10.1	6.5	6.0	5.6	4.6	4.4	4.6	4.1							
25: Shigella dysenteriae	7.9	31.8	28.6	20.5	21.3	17.7	10.1	5.9	5.7	7.3	8.0	7.7	14.0	14.0	12.1	9.5	6.2	6.1	5.7	4.3	4.1	4.7	4.1	1.2						
26: Citrobacter freundii	6.8	31.5	29.7	21.7	20.7	17.4	11.1	3.9	4.5	7.2	8.3	8.4	14.4	13.8	13.8	9.6	5.4	5.6	5.6	2.7	2.4	4.1	3.3	3.7	3.3					
27: Enterobacter sp.	6.2	31.8	30.1	21.2	20.7	18.2	11.3	3.0	4.1	7.0	7.7	7.7	14.2	13.9	13.2	9.3	4.4	5.1	4.5	2.6	1.9	4.3	4.5	4.3	3.9	1.4				
28: Plesiomonas shigelloides	8.2	32.7	30.4	20.4	19.5	17.6	9.4	6.0	5.8	9.6	9.9	8.3	14.1	13.4	12.6	10.4	7.2	7.5	6.6	5.6	6.2	7.6	8.0	7.8	7.5	6.7	6.1			
29: Vibrio cholerae	11.4	30.4	30.5	20.8	20.5	17.3	11.3	9.3	9.8	12.2	12.4	11.1	15.7	16.4	14.1	11.8	10.2	9.7	9.7	9.3	9.7	10.4	10.9	10.5	9.8	9.3	9.1	10.1		
30: Photobacterium phosphoreum	11.2	30.8	31.0	22.0	21.0	17.9	10.5	9.5	9.5	11.2	11.9	11.1	16.3	15.4	13.9	11.2	9.7	10.3	9.9	10.4	10.3	11.2	10.6	10.9	10.3	9.4	10.0	9.2	8.2	

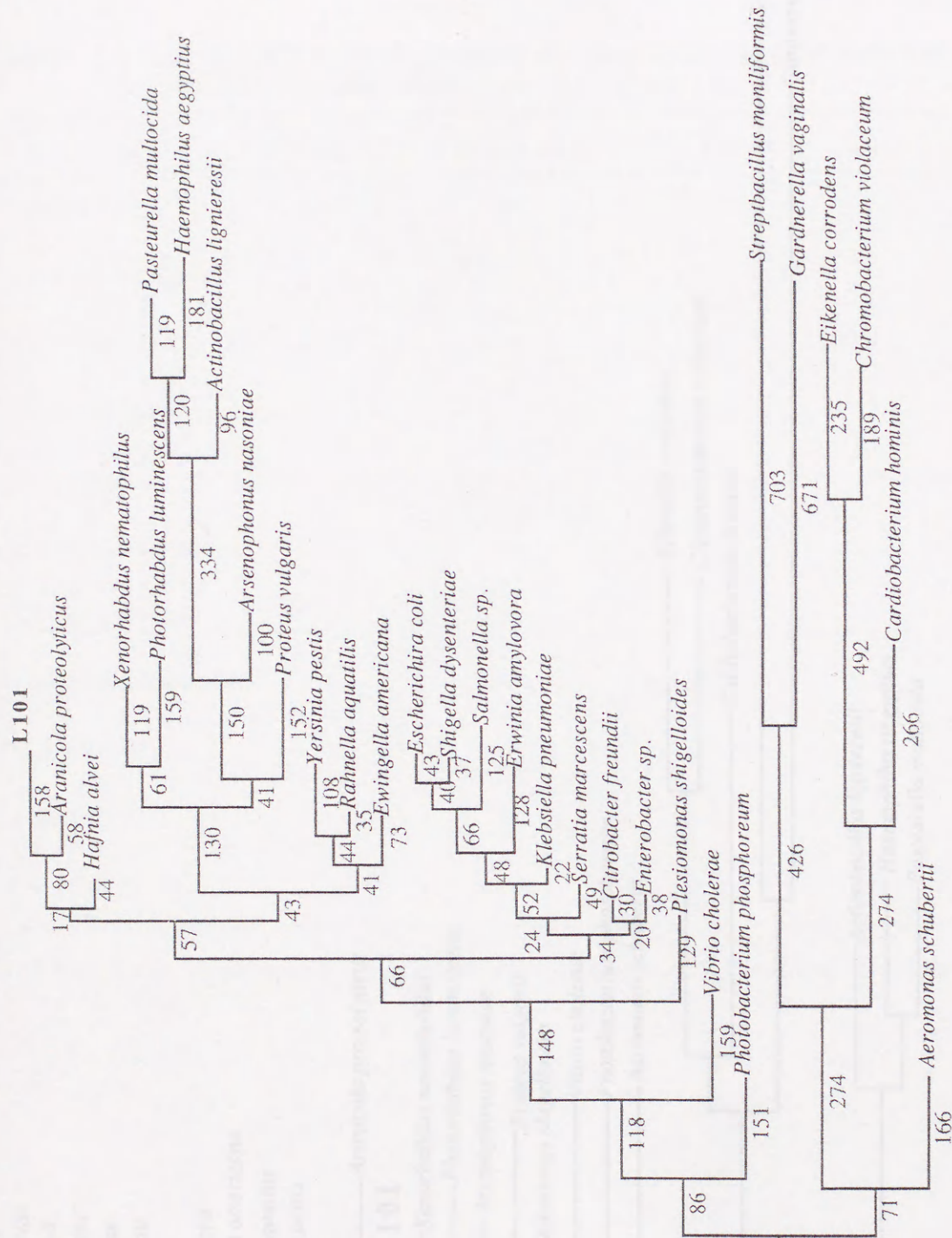


Fig. 2-16(A) Phylogenetic tree inferred from 16S rDNA sequences by multiple alignment.

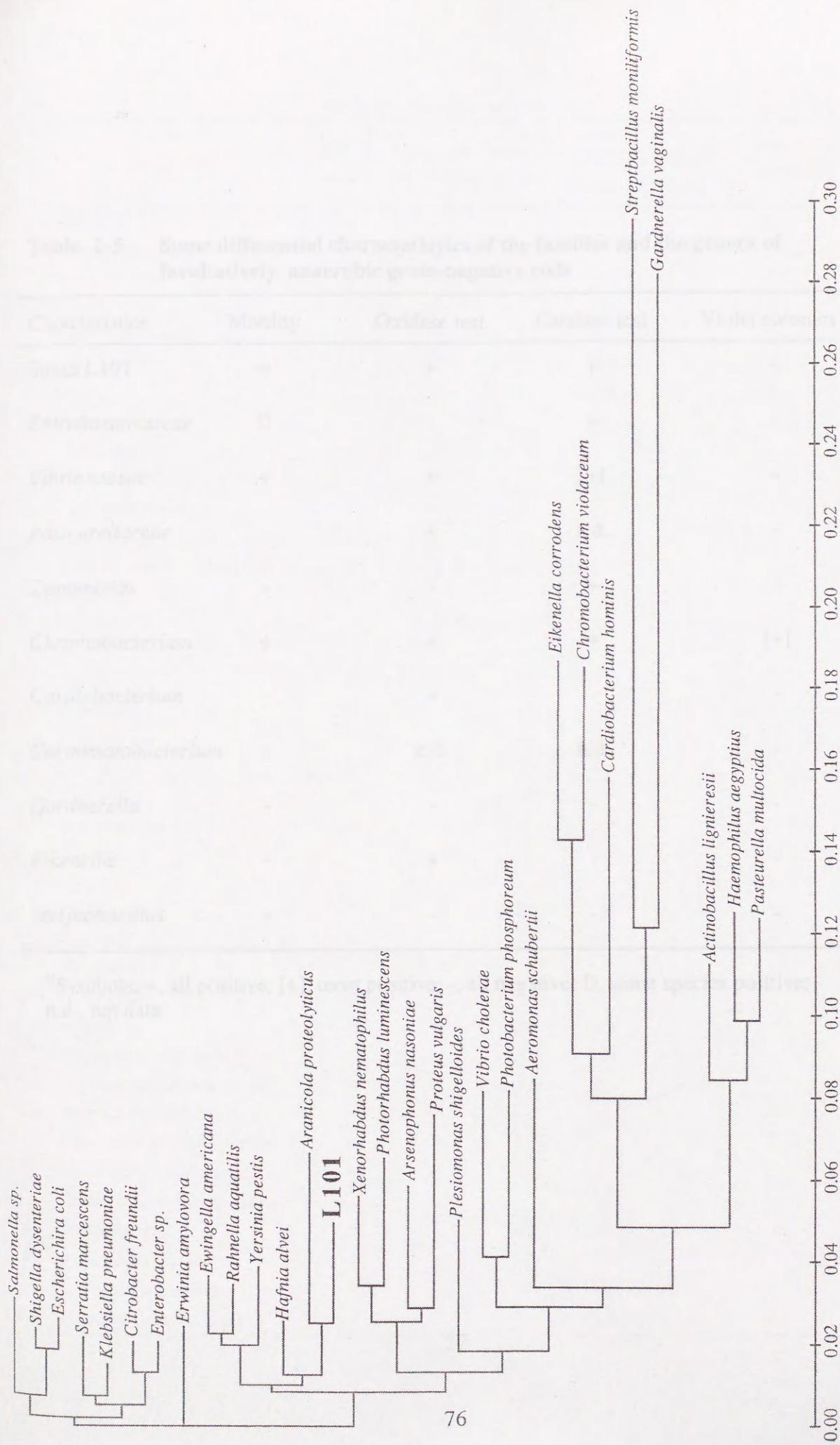


Fig. 2-16(B) Phylogenetic tree inferred from 16S rDNA sequences by N-J methods.

Table 2-5 Some differential characteristics of the families and the genera of facultatively anaerobic gram-negative rods

Characteristics	Motility	Oxidase test	Catalase test	Violet colonies
Strain L101	+	+	+	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	D	-	+	-
<i>Vibrionaceae</i>	+	+	[+]	-
<i>Pasteurellaceae</i>	-	+	n.d.	-
<i>Zymomonas</i>	-	-	+	-
<i>Chromobacterium</i>	+	+	+	[+]
<i>Cardiobacterium</i>	-	+	-	-
<i>Calymmatobacterium</i>	-	n.d.	n.d.	-
<i>Gardnerella</i>	-	-	-	-
<i>Eikenella</i>	-	+	-	-
<i>Streptobacillus</i>	-	-	-	-

^aSymbols: +, all positive; [+], most positive; -, all negative; D, some species positive; n.d., not data

TABLE 2-6 Strain characteristics^a

Characteristics	Strain L101	<i>Vibrionaceae</i>				<i>Chromo- bacterium</i>
		<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Photo- bacterium</i>	<i>Plesio- monas</i>	
Gram stain	-	-	-	-	-	-
Oxidation/Fermentation (O/F) test	F	F	F	F	F	F
Nitrate Reduction	+	+	[+]	+	+	+
Denitrification	-	-	-	-	-	n.d.
Voges-Proskauer Reaction	+	D	D	n.d.	-	-
Methyl Red Test	-	n.d.	n.d.	n.d.	V	n.d.
Motility	+	[+] ^d	+	[+]	+	+
Growth on;						
TCBS agar ^b	-	-	+	n.d.	-	-
Resistant to O/129 ^c	+	+	-	n.d.	-	+
MacConkey agar	+	+	+	n.d.	+	+
Simmons' citrate agar	+	D	[+]	n.d.	-	+
Peptone water without NaCl	+	+	[-] ^h	-	+	-
Utilization;						
D-glucose	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	[+]	[+] ⁱ	-	-	-
Inositol	+	-	[-]	n.d.	+	-
D-Sorbitol	+	-	[-]	n.d.	-	-
L-Rhamnose	-	-	- ^j	n.d.	-	-
Sucrose	+	[+]	D	-	-	[-]
D-Melibiose	-	-	- ^k	n.d.	-	-
D-Amygdaline	+	[+] ^e	- ^l	n.d.	-	-
L-Arabinose	-	[+] ^e	D	n.d.	-	-
Enzyme;						
Oxidase	+	+	[+]	D	+	+
Catalase	+	+	n.d.	n.d.	+	+
Phosphatase;						
Alkaline	+	+	[+]	n.d.	+	+
Acid	+	+	n.d.	n.d.	+	+
Lipase (tween 80 hydrolysis)	+	+	[+] ^m	D	-	+
Amylase (starch hydrolysis)	-	+	[+]	-	n.d.	-
Protease (casein hydrolysis)	+	+	[+]	n.d.	-	+
Gelatinase (gelatine hydrolysis)	+	+	[+]	D	-	+
DNase (DNA hydrolysis)	+	+	[+]	n.d.	n.d.	-
Urease (Christensen urea agar)	-	-	-	n.d.	-	-
β -galactosidase	+	[+] ^e	D	n.d.	+	-
Arginine dihydrolase	+	[+]	- ⁿ	-	+	+
Lysine decarboxylase	+	[-] ^f	+ ^o	n.d.	+	-
Ornithine decarboxylase	+	-	D	n.d.	+	-

Characteristics	Strain L101	Vibrionaceae			Chromo- bacterium
		<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Photo- bacterium</i>	<i>Plesio- monas</i>
Tryptophan deaminase	+	-	-	n.d.	-
Production;					
Hydrogen sulfide (cysteine)	-	D	-	n.d.	-
Indole	-	[+]g	+	n.d.	+
Gas (glucose)	+	D	- p	[-]q	-
Cultivation (Optimum);					
pH	5-10 (7)	n.d.	n.d.	n.d.	5.0-7.7 (7-8)
temperature, °C	5-30 (15)	5-41(22-28)	4-45	4-35	8-44(37)
NaCl concentration, M	0-1(0.1)	0-1	0.005-0.7	n.d.	n.d.
G+C content, mol%	51.9±0.9	57-63	38-51	40-44	51

^aSymbols: +, all positive; [+], most positive; -, all negative; [-], most negative; D, some species positive, some species negative; n.d., no data; V, variable.

^bTCBS agar, thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, grow only *Vibrio* sp.

^cO/129; 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine

^d*A. salmonicida* is nonmotile.

^e*A. salmonicida* is negative.

^f*A. salmonicida* is positive.

^g*A. salmonicida salmonicida* is negative.

^h*V. cholerae* is positive.

ⁱ*V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, and *V. marinus* are negative.

^j*V. natriegens* is positive.

^k*V. nigripulchritudo* is positive.

^l*V. vulnificus* is positive.

^m*V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, and *V. costicola* are negative for this trait.

ⁿ*V. metschnikovii* is positive.

^o*V. hollisae* is negative.

^p*V. fluvialis* II and *V. gazogenes* are positive.

^q*P. phosphoreum* is positive.

より、本細菌は、*Vibrio*属の細菌ではないことが分かった。また、*Plesiomonas*属の細菌は、O/129に対して耐性を持たないので、本細菌が属する属でないことが推察できる。*Photobacterium*属は、その名の通り発光する細菌であり、本細菌に発光が見られないことから、本細菌は、*Photobacterium*属に属する細菌でないことが考えられた。また、*Chromobacterium*属の細菌は、多くの点で本細菌と性質が類似していた。しかしながら、DNase、 β -ガラクトシダーゼ、リジンデカルボキシラーゼ、オリニチンデカルボキシラーゼなどを有しておらず、また、糖からのガスの発生が見られなかったことなどの違いが見られるため、本細菌は、*Chromobacterium*属の細菌ではないことが考えられる。*Aeromonas*属の細菌は、本細菌と非常に類似した性質を有していた。ほとんどの性質が一致していたので、本細菌は、*Aeromonas*属の細菌だと判断した。しかしながら、オルニチンデカルボキシラーゼ、アミラーゼの有無の違いやG+C含有率が本細菌の方が低いという、異なる点がいくつかは見られた。

一方、16S rDNA電子配列による系統樹作成を行ったFig.2-16によると、オキシダーゼ陰性の*Enterobacteriaceae*科に属する*Aranicola*属や*Haffnia*属に近いことが分かった。このことは本細菌が生化学的性質は、*Vibrionaceae*科に属するが、遺伝的には、*Enterobacteriaceae*科に属する新規の低温細菌であることを示していた。したがって、本細菌は、新属新種の細菌であると考えた。

2.5 結言

低温環境中から低温細菌を分離した結果136株の低温細菌を単離し、GLDH活性の高い細菌をL101株をスクリーニングした。L101株は、鮭の内臓から単離された細菌で、15°Cを最適増殖温度に持つ低温細菌であった。この細菌は、生化学特性などが*Vibrionaceae*科の*Aeromonas*属に非常に類似している物の、系統樹作成による遺伝距離は

*Vibrionaceae*科と非常に離れており、オキシダーゼ陰性の*Entrobacteriaceae*科に近いという、新属新種の細菌であることがわかった。本細菌は、非常に多くの菌体外酵素を分泌する有用な酵素源として利用できる細菌であり、本研究で研究するGLDH以外にも研究対象となる酵素がたくさんあると考えられる。

第3章

低温活性細菌 L101株の培養条件の検討 とL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの 精製

3.1. 概要

本報では、最も高いL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)活性を有する低温細菌(L101)から、効率的にGLDHを生産できる条件を決定し、本報で報告されていない事項のGLDHを産業規模的に単一にまで精製した過程について述べる。

第3章

酸化還元酵素の場合、酵素が固体外に抽出されず、液体内に存在している場合ほとんどである。この液体内部でも精製することは、操作コストが大きいこと、不安定な酵素が多いことから固体外抽出と比べて難しくなる。しかしながら、酸化還

低温活性細菌 L101株の培養 条件の検討 とL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの 精製

3.2. 実験方法

ここでは、3.2.1において使用した薬品及び装置などを述べ、3.2.2において低温細菌(L101)から効率的にL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)を生産する条件を決定し、3.2.3においてGLDHを単一にまで精製しその精製度を評価した事について述べる。

3.2.1. 試薬および装置

ここでの試薬および装置は、簡単にすに明記しなかったものについてここで述べる。試薬は、和光純薬工業社製の硫酸アンモニウムは特級特級品を、メアシル硫酸ナトリウム、硫酸銅(II)5水和物は特級試薬を用いた。イアミープリサントブルーR-250(CBB)は和光純薬工業社製の試薬を用いた。

3.1 緒言

本章では、最も高いL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)活性を有する低温細菌L101株から、効率よくGLDHを生産できる条件を検討し、今まで報告されていない新規のGLDHを電気泳動的に単一にまで精製した過程について述べた。

一般に酸化還元酵素の場合、酵素が菌体外に放出されず、菌体内に存在している場合がほとんどである。この菌体内酵素を精製することは、共存するタンパク質が多いことや、不安定な酵素が多いなどから菌体外酵素と比べて難しくなる。しかしながら、酸化還元酵素は、センサーなどに応用が可能な素材であるため精製する価値がある。酵素の精製は、酵素自体がタンパク質であるため、一般タンパク質に用いられている精製の方法が適用できる。すなわち、ゲル濾過・陽イオン交換・陰イオン交換・疎水性相互作用クロマトグラフィーなどや、硫酸アンモニウムによる塩析、電気泳動などである。また、酵素は、タンパク質の吸収波長である280nmに吸収を持ち、酵素活性を有するので、これらを指標にして精製を進めていった。

3.2 実験方法

ここでは、3.2.1において使用した薬品及び装置などを述べ、3.2.2において低温細菌L101株から効率的にL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)を生産する条件を決定し、3.2.3においてGLDHを単一にまで精製しその精製度を評価した事について述べた。

3.2.1 試薬および機器

ここでの試薬および機器は、前章までに明記しなかったものについてここで述べた。試薬は、和光純薬工業社製の硫酸アンモニウムは酵素精製用を、ドデシル硫酸ナトリウム、硫酸銅(II)5水和物は特級試薬を用いた。クマシーブリリアントブルーR-250 (CBB)はFluka社製を用いた。

液体クロマトグラフィーは、Pharmacia Biothech. 社製のGradiFrac™ Systemに、ポンプにHiLoad™ Pump P-50、UVモニターにMonitor UV-1、電気伝導度計にConductivity Monitor、記録計にRecorder REC 102を装備させたシステムで、以下のカラムを装着して精製を行った。カラムも全てPharmacia Biothech. 社製を購入した。DEAE-Sepharoseカラムは、INdEX 100 column (10x25cm)のガラス製のカラムにDEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biothech.)を当研究室で詰めたものを使用した。ゲル濾過のカラムはSuperdex 200 prep grade (2.6x60cm)を、Q-SepharoseカラムはQ-Sepharose (1.6x10cm)を、CM-SepharoseカラムはCM-Sepharose (1.6x2.5cm)を、Phenyl-SepharoseカラムはPhenyl-Sepharose (0.7x2.5cm)を用いた。限外濾過には、全てAmicon社製のものを用い、大容量の試料に対しては、加圧式のDiaflo ultrafilter PM30 をつけたAmicon stirred cell unit (model 8400) を使用し、微量の物には遠心重力を利用するcentricon 30を使用した。液体クロマトグラフィーの前処理用のフィルターは、ADVANTEC(TOYO)社製のCellulose Acetate 0.2 μ m (DISMIC-25cs)を用いた。電気泳動には、Pharmacia LKB Biothech.社製のPhastSystem™を用いた。PhastSystem™に使用するゲルおよびバッファストリップは、全てPharmacia Biothech.社製を用い、Native-PAGE用にPhastGel, Homogeneous 7.5とNative buffer strip、SDS-PAGE用にPhastGel Gradient 8-25とSDS buffer strip、等電点電気泳動用にPhastGel IEF 3-9を用いた。SDS-PAGE用の分子量マーカーにPharmacia Biothech.社製のLMWとHMW electro-phoresis calibration kits、等電点マーカーにPharmacia Biothech.社製のIsoelectric focusing calibration, Broad pI kit、ゲル濾過用の分子量マーカーにLMW and HMW Gel filtration calibration kitsを用いた。

3.2.2 GLDHの生産のための低温細菌L101株の最適培養条件の検討

ここでは、肉汁培地中で最適にGLDHを生産するための温度の検討を行った。前培養は、肉汁培地20mlの入った100ml容の三角フラスコに、肉汁寒天培地上のコロニーを白金

耳によって植菌し、培地の660nmの濁度が1.0になるまで10°Cで振盪培養した物を使用した。この前培養液を1mlずつ肉汁培地20mlの入った100ml容三角フラスコに植菌し、5、10、15、20°Cの各温度で3本ずつ培養し、細菌の増殖を培養液の660nmの濁度で測定し、GLDH活性は2.2.3(3)の活性測定法に従った。

3.2.3 GLDHの精製と精製度の確認

3.2.2で決定したGLDH生産温度で低温細菌L101株を大量に培養して、GLDHを生産し、各種クロマトグラフィを用いて精製して、各種電気泳動を用いて精製度確認すると共に、GLDHの分子量も決定した。

(1) GLDHの精製

酵素の精製は、以下の手順にて行った。全ての操作は4°Cにて行った。

(a) 細菌の大量培養

低温細菌L101株の前培養は、肉汁培地20mlの入った100ml容三角フラスコ3本に細菌を肉汁寒天培地のつのコロニーから、白金耳によって植菌した物を濁度(660nm) 1.0になるまで培養した物を使用した。この3本の三角フラスコの培養液を全て、肉汁培地3,000mlの入った5,000ml容ジャーファーマンターに植菌した。培養温度は、3.2.2で決定した温度に設定し、1週間培養した。培養した細菌は、30分間、4°C、10,000xgで集菌し、0.5%塩化ナトリウム水溶液を集菌した菌体に加え、先と同条件で遠心分離する事で菌体の洗浄を行った。洗浄した細菌は、使用するまで-20°Cの冷蔵庫にて使用するまで保存した。

(b) 粗酵素液

粗酵素液は、 -20°C で冷凍保存した細菌約40gに20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.0) 100mlに懸濁して、 10°C の水浴中にて解凍した後、氷水中にて超音波を10秒オン10秒オフのサイクルを2時間繰り返すことによって、細菌壁あるいは細胞膜を破壊して抽出した。破碎した液から沈殿物を除くため、30分間、 4°C 、 $20,000\times g$ で遠心分離した上澄みを粗酵素液として、精製を行った。

(c) DEAE-Sepharoseクロマトグラフィー

DEAE-Sepharose カラム(10x25cm、容積約2,000ml)に6,000mlの20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)[緩衝液A]を流速220ml/minで流すことで平衡化し、これに粗酵素液を流速220ml/minで流して酵素をカラム吸着させ、緩衝液Aを2,000ml流してカラムを洗浄した。続いて、0.2M、0.4M、0.6M塩化ナトリウムを添加した緩衝液Aをそれぞれ、4,000mlずつ流すことで三段階の塩濃度勾配をかけて、酵素を溶出させた。

溶出液は、UVモニターの吸光ピーク毎に分けて分取し、その溶液の酵素活性を測定した。GLDH活性の高い部分の溶液を選んで次の精製段階に進んだ。

(d) 硫酸アンモニウム分画

(c)のDEAE-SepharoseのGLDH活性の高かった分画に、液1,000ml当たり313gの硫酸アンモニウム(50%飽和)を加えた。これを30分間、 4°C 、 $20,000\times g$ で遠心分離した上澄みを取り、さらにこの上澄み液1,000ml当たり302gの硫酸アンモニウム(90%飽和)を加え、先と同じ条件で遠心分離した。この遠心分離の上澄みを捨てて、0.15M塩化ナトリウムを添加した50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) [緩衝液B] 5mlを沈殿に加えて、この沈殿を溶解した。この操作によって、硫酸アンモニウム50%~90%飽和で塩析するタンパク質を分画した。得られた酵素溶液をさらに次の精製段階に用いた。

(e) ゲル濾過クロマトグラフィー

Superdex 200 prep grade カラム(2.6x60cm;容積約320ml)に緩衝液Bを400ml、流速1ml/minで流して平衡化したカラムに、硫酸アンモニウム50%~90%飽和分画液を流し込み、さらに緩衝液Bを流速1ml/minで流した。カラムから出る溶出液を5mlずつ分取して、それぞれのGLDH活性を測定し、活性の高い分画を合わせた後、分画分子量30kDaの加圧攪拌式限外濾過装置を窒素ガスで5kgf/cm²の圧力をかけて、限外濾過を行い酵素溶液を濃縮した後、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)[緩衝液C]を添加し限外濾過で濃縮する操作を繰り返して酵素溶液の緩衝液を緩衝液Cに交換した。得られた酵素溶液をさらに次の精製段階に用いた。

(f) Q-Sepharose クロマトグラフィー

Q-Sepharose カラム(1.6x10cm;容積約20ml)に緩衝液Cを60ml、流速1ml/minで流して平衡化したカラムに、前精製段階で得られた酵素液を流速1ml/minで流しカラムに酵素を吸着させた後、緩衝液C 20mlを流すことで吸着した酵素を洗浄した。このカラムに、さらに200mlで0~0.5Mの塩化ナトリウムの直線勾配となるように1M塩化ナトリウムを含有する緩衝液Cを緩衝液Cと混合しながらカラムに流して、カラムから出る溶出液を5mlずつ分取し、それぞれのGLDH活性を測定し、活性の高い分画を混合した。この酵素溶液を20mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)[緩衝液D]に、(e)で行ったのと同じ方法で限外濾過を用いて緩衝液を交換した。得られた酵素溶液をさらに次の精製段階に用いた。

(g) CM-Sepharose クロマトグラフィー

CM-Sepharose カラム (1.6x2.5cm;容積約5ml)に緩衝液Cを25ml、流速1ml/minで流して

平衡化したカラムに、前精製段階で得られた酵素液を流速1ml/minで流しカラムに酵素を吸着させた後、緩衝液D 10mlを流すことで吸着した酵素を洗浄した。このカラムに、さらに200mlで0~0.6Mの塩化ナトリウムの直線勾配となるように1M塩化ナトリウムを含有する緩衝液Dを緩衝液Dと混合しながらカラムに流して、カラムから出る溶出液を5mlずつ分取し、それぞれのGLDH活性を測定し、活性の高い分画を混合した。この酵素溶液を1M硫酸アンモニウムを含有した20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)[緩衝液E]に、(e)で行ったのと同じ方法で限外濾過を用いて緩衝液を交換した。得られた酵素溶液をさらに次の精製段階に用いた。

(h) Phenyl-Sepharoseクロマトグラフィー

Phenyl-Sepharose カラム(0.7x5cm;容積約1ml) に緩衝液Eを20ml、流速1ml/minで流して平衡化したカラムに、前精製段階で得られた酵素液を流速1ml/minで流しカラムに酵素を吸着させた後、緩衝液E 10mlを流すことで吸着した酵素を洗浄した。このカラムに、さらに50mlで1~0硫酸アンモニウムの直線勾配となるように緩衝液Eと20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)とを混合しながらカラムに流して、カラムから出る溶出液を1mlずつ分取し、それぞれのGLDH活性を測定し、活性の高い分画を混合した。この酵素溶液を20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)に、(e)で行ったのと同じ方法で限外濾過を用いて緩衝液を交換した。この酵素液を最終精製酵素とした。

(2) 酵素精製度の確認および酵素の分子量の推定

酵素の精製度の確認を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native-PAGE)および等電点電気泳動によって確認した。また、分子量はドデシル硫酸ナトリウム添加のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて推定し

た。その手法を以下に示す。

(a) Native-PAGE

酵素を変性させずにそのままの状態、アクリルアミドゲル上で電気泳動させ、酵素が単一タンパク質まで精製されているか確認した。電気泳動には、PhastSystemを用いて、アクリルアミドゲルに7.5%の濃度の均一なゲルを用い、これにバッファーストリップを通して、約25分間、15°C、10mAの定電流をかけて電気泳動にかけた。タンパク質の染色は0.25% CBB-30%メタノール-10%酢酸水溶液で染色し、30%メタノール-10%酢酸水溶液でタンパク質に結合していない余分な色素を脱色し、10%酢酸-5%グリセリン水溶液で保護した。染色・脱色・保護もPhastSystemでPhoxy Manualに従ってプログラムを組み自動的に行った。

(b) SDS-PAGE

精製した酵素溶液10 μ lに0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液2 μ l、スクロース10mg、SDS10mg、メルカプトエタノール10 μ l、0.2%ブロモフェノールブルー水溶液0.5 μ l、蒸留水20 μ lを添加し、96°Cで2分間加熱して、タンパク質を変性した後、アクリルアミドが8~25%でグラジエント濃度勾配を持つゲルPhastGel Gradient 8-25をPhastSystemに設置し、SDSバッファーストリップを通して約25分間、15°C、10mAの定電流をかけて電気泳動にかけた。酵素の分子量を測定するため、LMW and HMW electrophoresis calibration kits のタンパク質も酵素と同様な変性処理を行って、酵素溶液と一緒に電気泳動を行った。Native-PAGEと同じ方法でタンパク質を染色・余分な色素を脱色・保護を行った。

(c) 等電点電気泳動

この酵素の等電点および精製度を調べるため、等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動はpH勾配がpH3~9ですでに形成されているPhastGel IEF 3-9をPhastSystemに設置し、約80分間Phoxy Manualに従ってプログラムを組んで自動的に酵素を電気泳動にかけた。等電点電気泳動後のタンパクの染色は、20%トリクロロ酢酸で固定化した後、0.1%硫酸銅(II)添加0.05% CBB-30%メタノール-10%酢酸水溶液を用いて染色し、30%メタノール-10%酢酸水溶液で脱色した。等電点を決定するためIsoelectric focusing calibration, Broad pI kitを酵素溶液と共に泳動した。

(d) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の決定

酵素の自然な分子量を測定するため、精製した酵素溶液をゲル濾過クロマトグラフィー Superdex 200 pg カラム(2.6x60.0cm)にかけた。平衡緩衝液・溶出緩衝液として、150mM塩化ナトリウムを含有した20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を用いた。精製した酵素をゲル濾過クロマトグラフィーにかけてから、LMWおよびHMW Gel filtration calibration kitsのタンパク質を同条件でクロマトグラフィーにかけて、ゲル濾過の分子量を決定した。

3.3 実験結果及び考察

3.3.1 GLDHの生産のための低温細菌L101株の最適培養条件の検討

5、10、15、20°Cにおける細菌の増殖曲線と酵素活性をFig.3-1に示す。培養菌体量、酵素生産量ともに15°Cの時が最も良好な結果が得られた。したがって、本細菌によるGLDH生産は、15°Cで行った。

3.3.2 GLDHの精製と精製度の確認

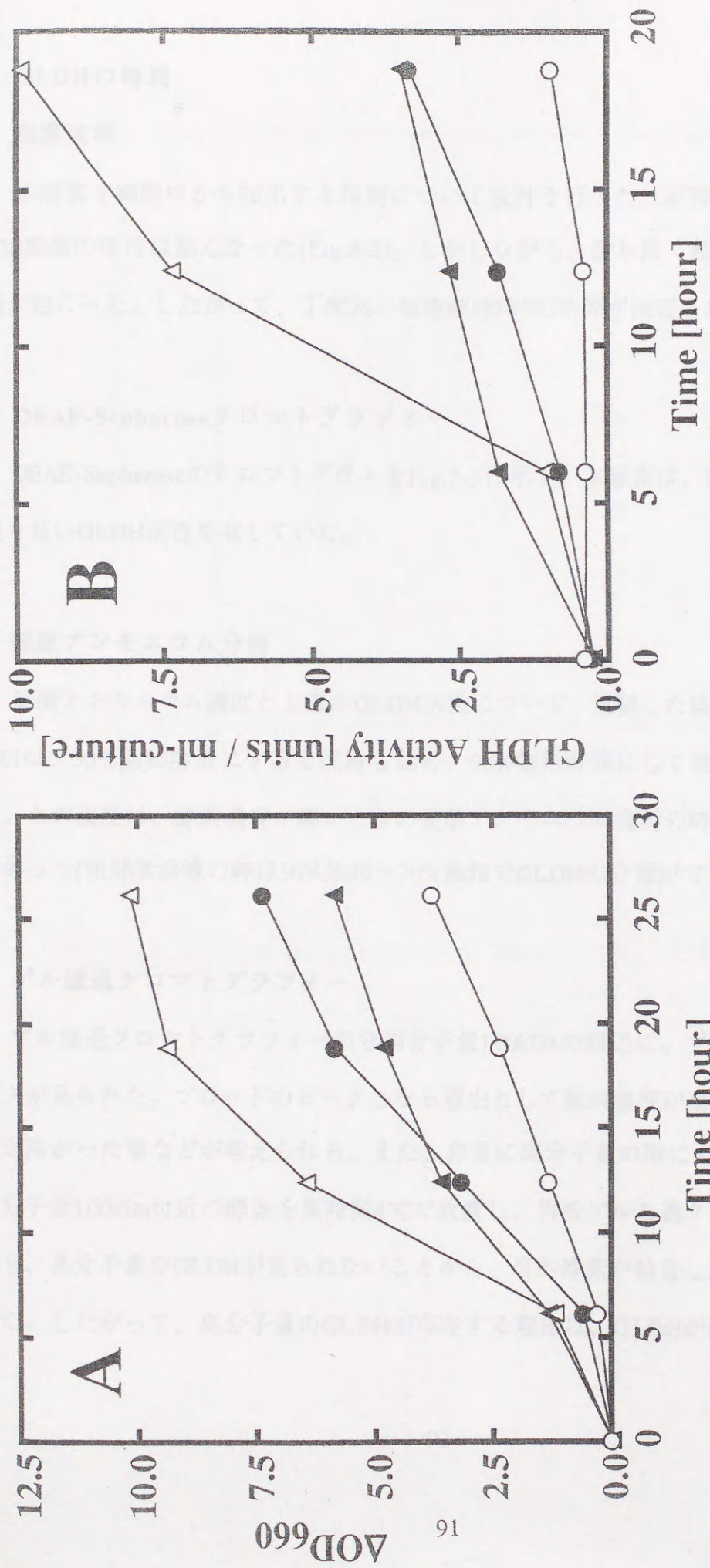


Fig.3-1 Growth of strain L101 (A) and the production of L-glutamate dehydrogenase (B) at 5 °C (○), 10 °C (●), 15 °C (△), and 20 °C (▲).

Strain L101 was cultured with shaking in a 100-ml flask in 20 ml of nutrient broth medium. ΔOD₆₆₀ indicated change in OD₆₆₀ (optical density 660 nm) with time.

(1) GLDHの精製

(a) 粗酵素液

本酵素を細胞中から抽出する時間について検討を行った。破碎時間を長くするほどGLDH酵素の活性は高くなった(Fig.3-2)。しかしながら、余り長く超音波をかけすぎると失活が起こった。したがって、丁度良い細胞破碎時間2時間が決定された。

(b) DEAE-Sepharoseクロマトグラフィー

DEAE-SepharoseのクロマトグラムをFig.3-3に示す。本酵素は、0.2MNaCl濃度の分画に最も高いGLDH活性を有していた。

(c) 硫酸アンモニウム分画

硫酸アンモニウム濃度と上清のGLDH活性について、実験した結果をFig.3-4に示す。GLDHは、50%飽和溶液にすると沈殿し始め、90%飽和溶液にして初めて全GLDHが沈殿した。この濃度は、酵素濃度が高いときの硫酸アンモニウム塩析の時よりもかなり高い濃度であった(粗酵素溶液の時は30%飽和~70%飽和でGLDHの分画ができた)。

(d) ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィーの分画分子量100kDaの周辺に、ブロードな酵素活性のピークが見られた。ブロードのピークとなる理由として試料濃度が高かったこと、試料の粘度が高かった事などが考えられる。また、非常に高分子量の所にもGLDH活性が見られた。分子量100kDa付近の酵素を長時間4°Cで放置し、再度ゲルろ過クロマトグラフィにかけても、高分子量のGLDHが見られないことから、目的酵素が結合したものではないと判断した。したがって、高分子量のGLDHが存在する理由は、GLDHが細胞膜などと結合し

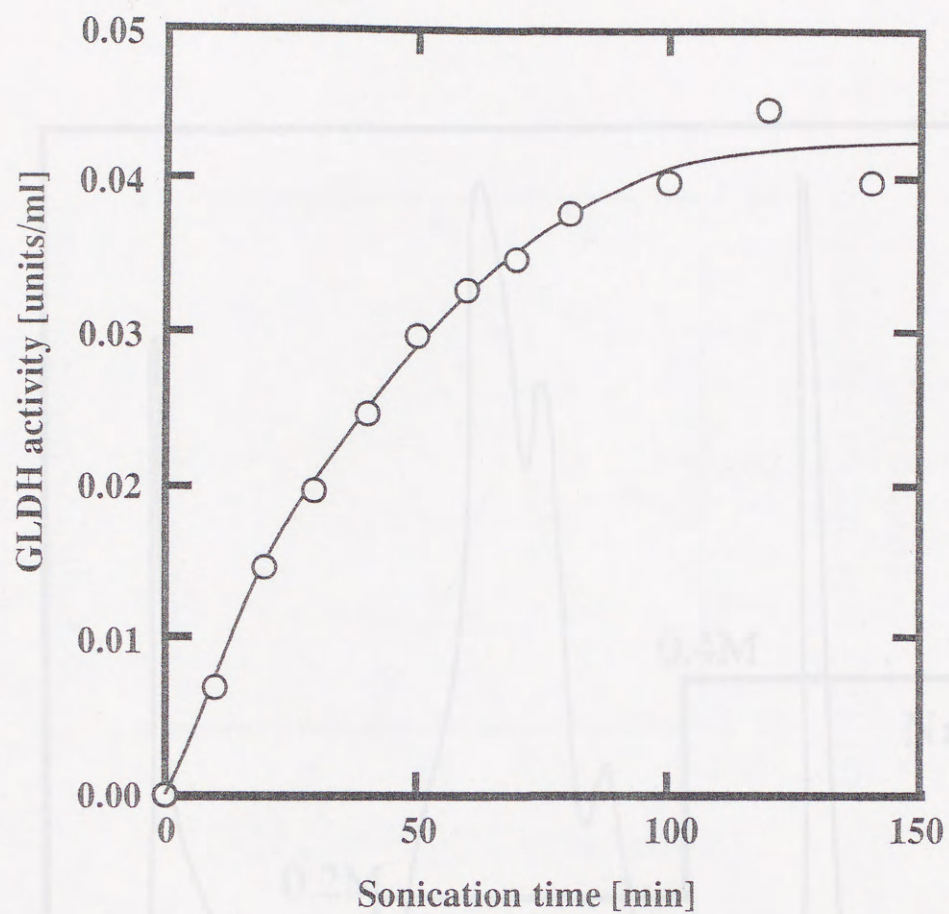


Fig.3-2 Effect of sonication time on GLDH activity.

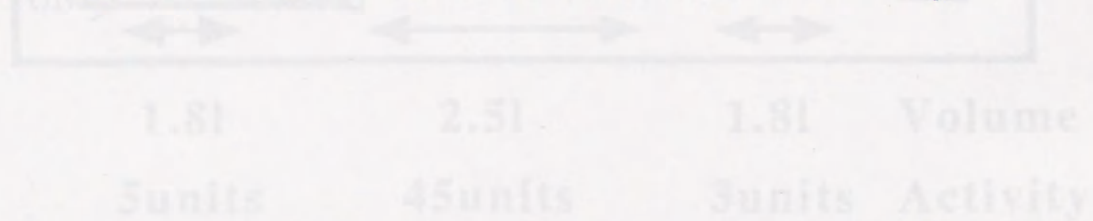


Fig. 3-3 DEAE-Sephacel Chromatogram.

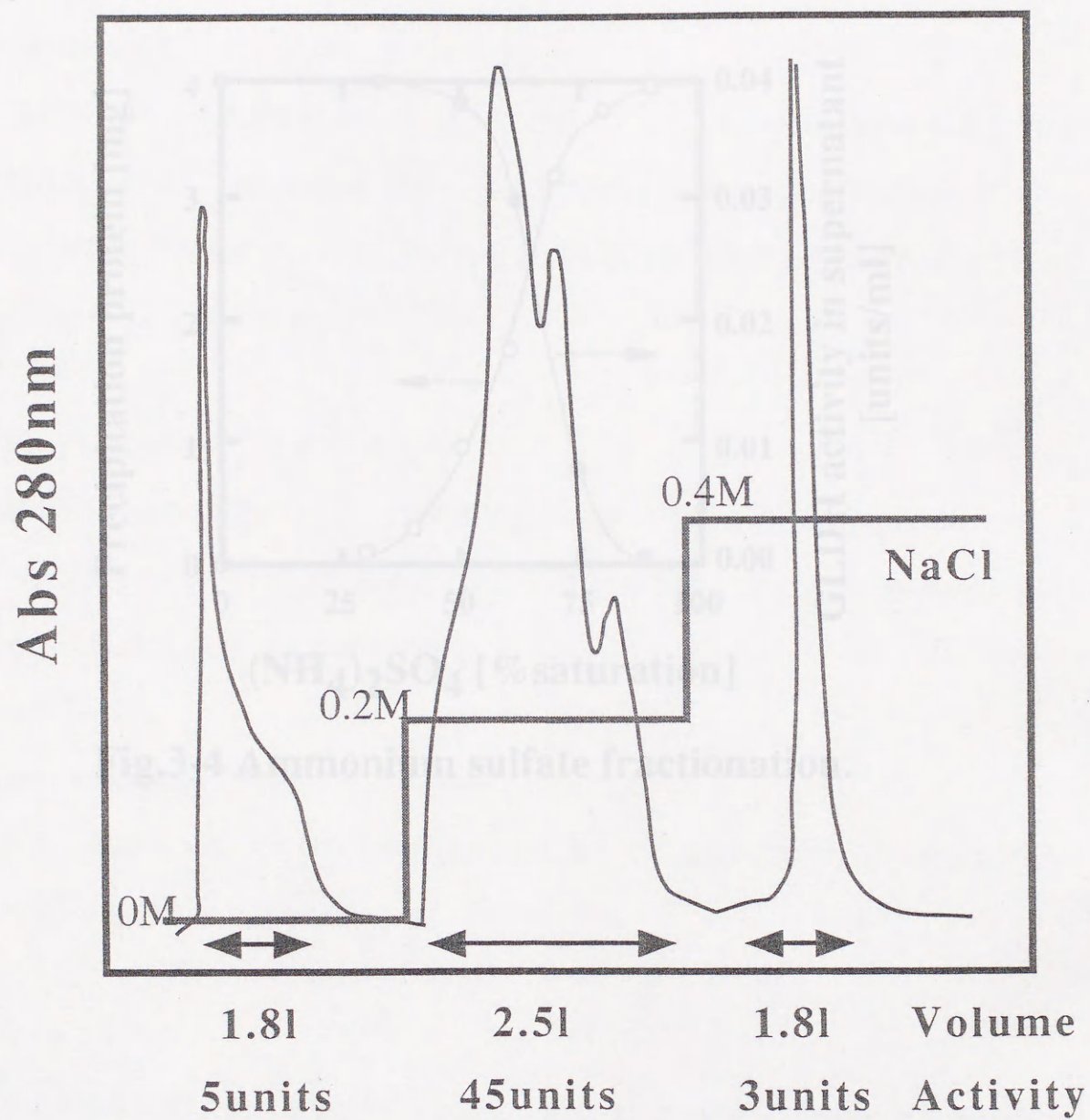


Fig. 3-3 DEAE-Sepharose Chromatogram.

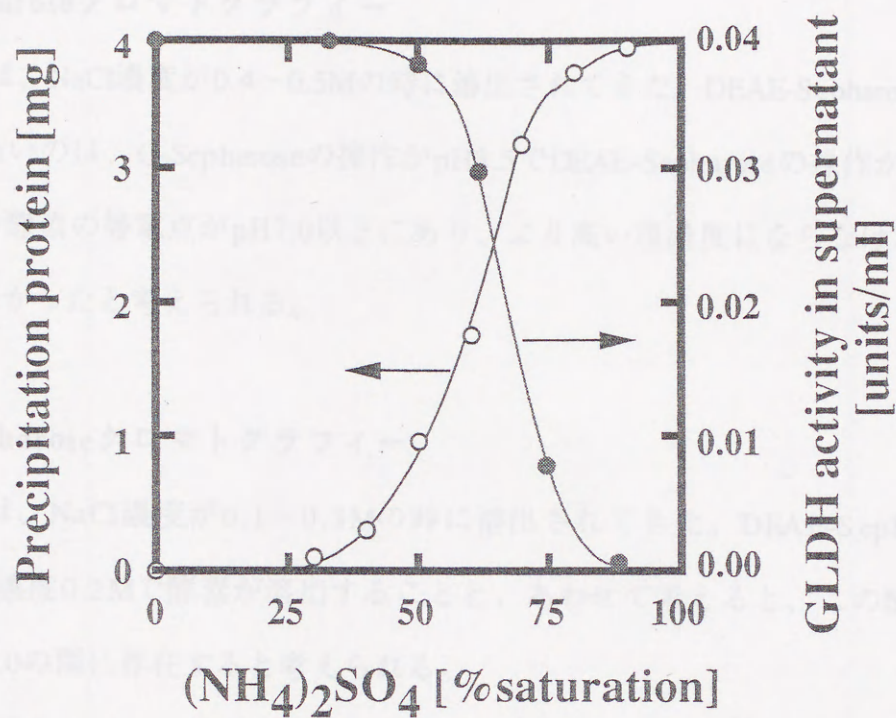


Fig.3-4 Ammonium sulfate fractionation.

た形で存在する、あるいは高分子量のGLDHのアイソザイムが存在するなどが考えられる。この高分子のGLDHが酵素溶液から分離されるため、精製酵素の比活性は低下した。

(e) Q-Sepharoseクロマトグラフィー

本酵素は、NaCl濃度が0.4~0.5Mの時に溶出されてきた。DEAE-Sepharoseの時と比べて塩濃度が高いのは、Q-Sepharoseの操作がpH8.5でDEAE-Sepharoseの操作がpH7.0であったので、この酵素の等電点がpH7.0以下にあり、より高い塩濃度にならなければカラムから溶出されなかったと考えられる。

(f) CM-Sepharoseクロマトグラフィー

本酵素は、NaCl濃度が0.1~0.3Mの時に溶出されてきた。DEAE-Sepharoseの時、pH7.0でNaCl濃度0.2Mで酵素が溶出することと、あわせて考えると、この酵素の等電点は、pH5.0~7.0の間に存在すると考えられる。

(g) Phenyl-Sepharoseクロマトグラフィー

本酵素は硫酸アンモニウムの濃度が0M付近になって、初めて溶出する非常に疎水性相互作用の強い酵素である事が分かった。

(h) 精製のまとめ

以上の各精製段階における総タンパク質量、総活性、比活性などの精製表をTable 3-1に示す。一連の精製操作によって、粗酵素の70倍の比活性を有する酵素を得ることができた。しかしながら、その収率は、0.8%と非常に低い値でしか得ることができなかった。その理由として考えられることは、この細菌がGLDHのアイソザイムを有しているという

Table 3-1 Purification of L-glutamate dehydrogenase from strain L101

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extracts	3300	91.25	0.028	100.0	1.0
DEAE-Sepharose	1267	45.55	0.036	49.9	1.3
Ammonium sulfate	1050	30.16	0.029	33.1	1.0
Superdex 200pg	776	19.13	0.025	21.0	0.9
Q-Sepharose	120	10.56	0.088	11.6	3.1
CM-Sepharose	5	1.73	0.346	1.92	12.4
Phenyl-Sepharose	0.37	0.73	1.960	0.80	70.0

ことである。DEAE-Sepharoseにおいても、ゲル濾過クロマトグラフィーの今回選択した分画以外に活性が存在しているのは、アイソザイムであると考えられる。しかしながら、このアイソザイムは、非常に分子量が高く、今回精製したGLDHに比べて、活性が低いことなどから本研究においては、研究対象にしなかった。また、一般に低温活性酵素は、非常に不安定である[95]ことから、特に吸着クロマトグラフィー(DEAE-, Q-, CM-Sepharose)の後の活性の低下が激しかった。

(2) 酵素の精製度の確認および分子量の推定

(a) Native-PAGE

精製した酵素のNative-PAGEのゲル写真をFig.3-5(A)に示す。CBB染色によって染色されるタンパク質のバンドは、1本であり、Native-PAGE上では単一にまで精製されていることが確認できた。

(b) SDS-PAGE

精製した酵素のSDS-PAGEのゲル写真をFig.3-5(B)に示す。ゲル写真上で2本のタンパク質のバンドが確認できた。Fig.3-6にSDS-PAGEの分子量マーカーに基づいた分子量と泳動距離の関係を示す。精製酵素の2つのタンパク質の分子量は、約76kDaと約34kDaであった。

(c) 等電点電気泳動

精製した酵素の等電点電気泳動のゲル写真をFig.3-5(C)に示す。ゲル写真上でのタンパク質のバンドは1本で、等電点的にも単一にまで精製できた。Fig.3-7に等電点電気泳動pIマーカーに基づいた等電点と電極からの距離の関係を示す。精製酵素の等電点は、

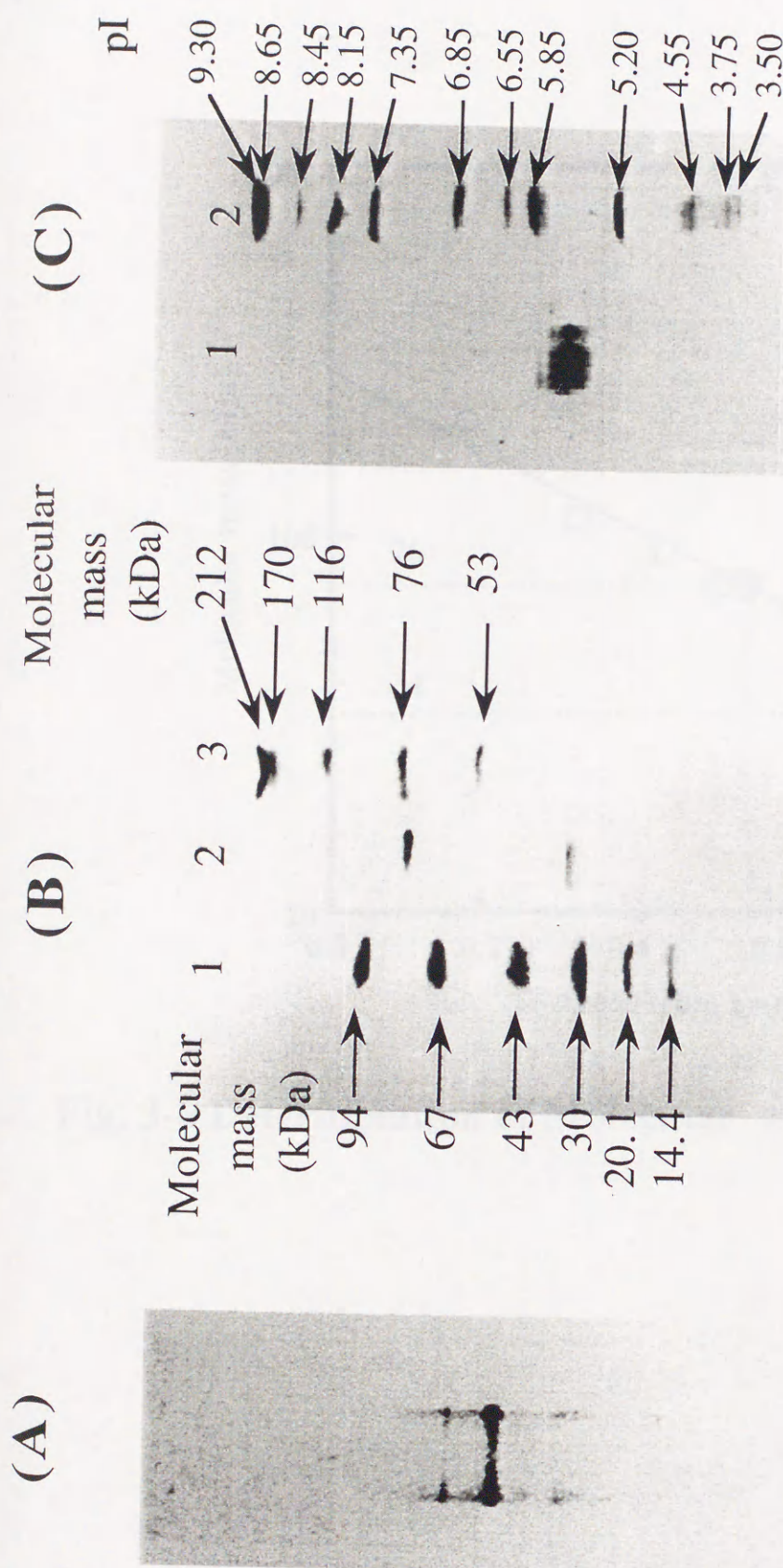


Fig. 3-5 Electrophoresis of the GLDH.

(A) Native-PAGE (7.5%) of L-glutamate dehydrogenase. Lane 1, purified enzyme. Lane 2, low molecular mass markers; phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa). Lane 3, high molecular mass markers; myosin (212 kDa), α_2 -macroglobulin (170 kDa), β -galactosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa), glutamic dehydrogenase (53 kDa). (C) Isoelectric point of L-glutamate dehydrogenase. Lane 1, purified enzyme. Lane 2, isoelectric point markers; amyloglucosidase (3.50), methyl red (3.75), soybean trypsin inhibitor (4.55), β -lactoglobulin A (5.20), bovine carbonic anhydrase B (5.85), human carbonic anhydrase B (6.55), horse myoglobin-acidic (6.85), horse myoglobin-basic (7.35), lentil lectine-acidic (8.15), lentil lectine-middle (8.45), lentil lectine-basic (8.65), trypsinogen (9.30). (D) Activity staining with L-glutamate and NBT. Lane 1, purified enzyme. Lane 2, L-glutamate dehydrogenase from bovine liver. Lane 3, L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X119-6.

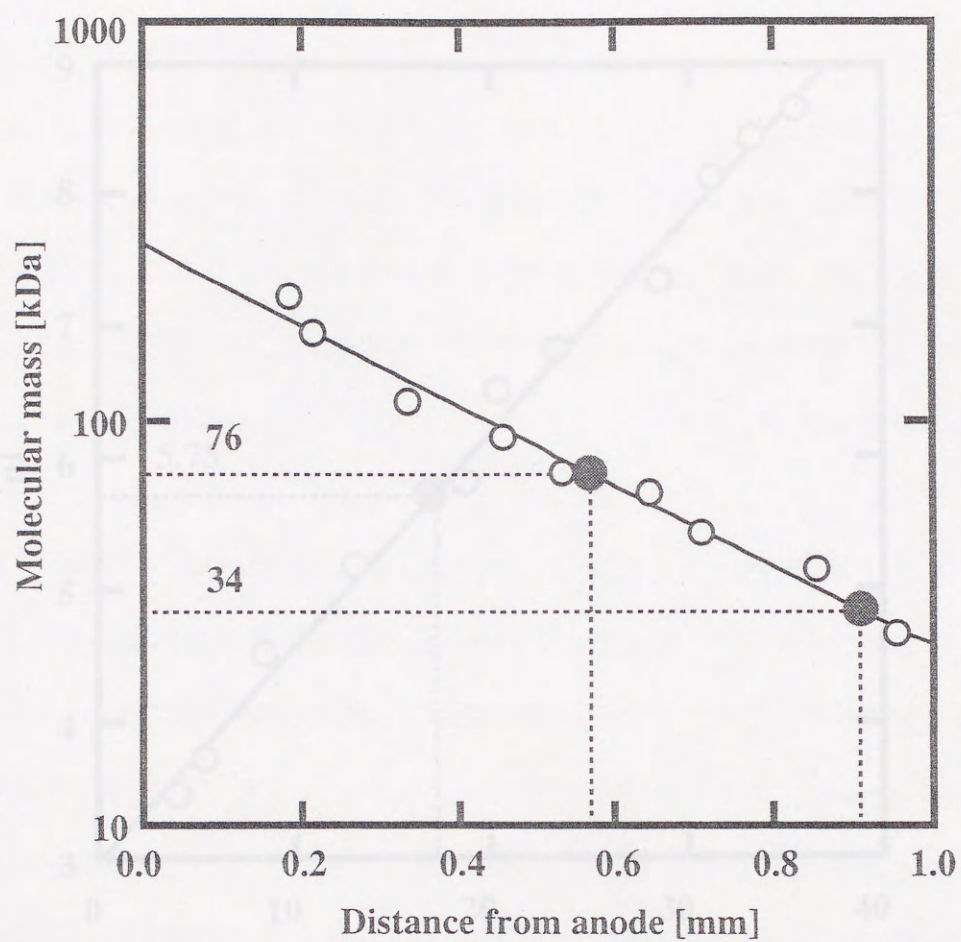


Fig. 3-6 Determination of Molecular weight by SDS-PAGE.

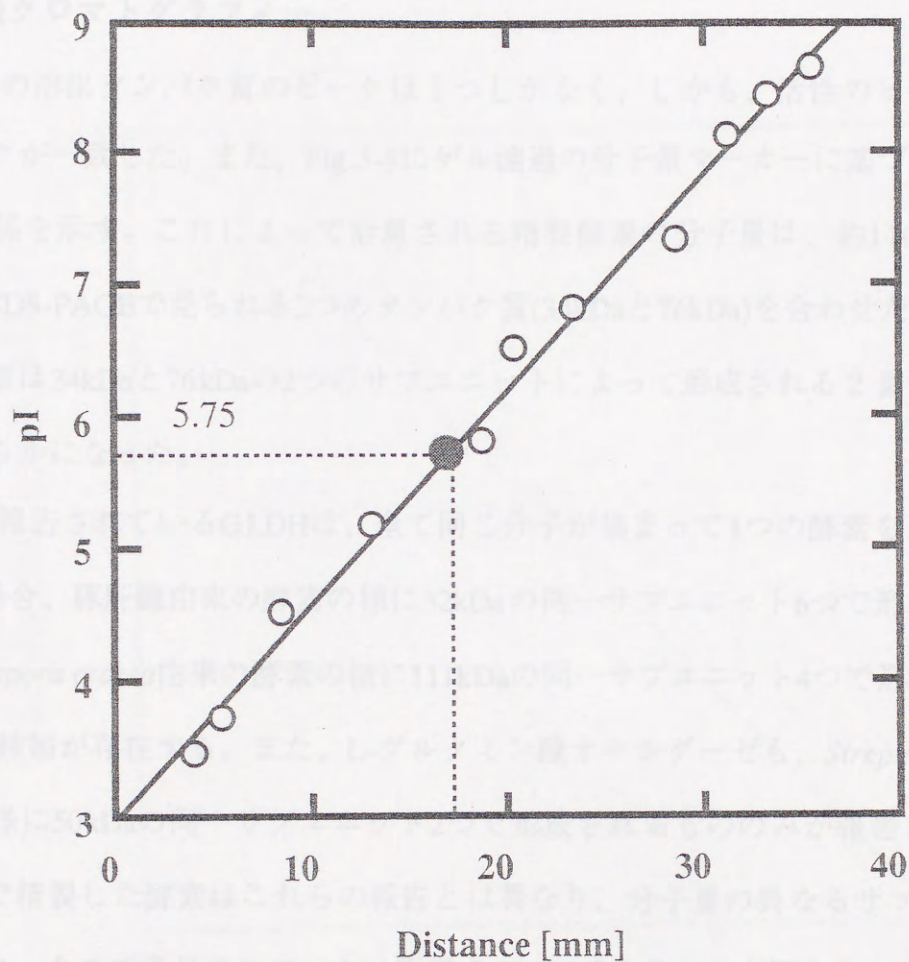


Fig.3-7 Determination of pI .

3.4 結言

新規の電泳用画L101管は、13℃で増産した時、増産、GLDH生産量共に一番高いことが明らかになった。この結果は、細菌を超音波で溶解し、DEAE-Sepharose、硫酸アミンカラム分離、Superdex 200lg、Q-Sepharose、CM-Sepharose、Phenyl-Sepharoseによって、10%に精製され、Native-PAGEと等電点電気泳動的に単一にまで精製できた。精製された

pI=5.7~5.8と計算できた。これは、イオン交換の吸着の結果から予想される等電点の範囲(pI= 5.0~7.0)に入っていた。

(d) ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過の溶出タンパク質のピークは1つしかなく、しかも、活性のピークとタンパク質のピークが一致した。また、Fig.3-8にゲル濾過の分子量マーカに基づく分子量と溶出体積の関係を示す。これによって計算される精製酵素の分子量は、約110kDaであった。これは、SDS-PAGEで見られる2つのタンパク質(34kDaと76kDa)を合わせた分子量に一致し、精製酵素は34kDaと76kDaの2つのサブユニットによって形成される2量体の酵素であることが明らかになった。

今までに報告されているGLDHは、全て同じ分子が集まって1つの酵素を形成している。GLDHの場合、豚肝臓由来の酵素の様に52kDaの同一サブユニット6つで形成されるもの[33]と*Neurospora crassa*由来の酵素の様に111kDaの同一サブユニット4つで形成されているもの[22]の2種類が存在する。また、L-グルタミン酸オキシダーゼも、*Streptomyces edus*由来の酵素の様に50kDaの同一サブユニット2つで形成されるもののみが報告されている[35]。本研究で精製した酵素はこれらの報告とは異なり、分子量の異なるサブユニット2つから構成され、今まで発見されていない新規のGLDHであることが明らかになった。

3.4 結言

新規の低温細菌L101株は、15°Cで培養した時が、増殖、GLDH生産量共に一番良いことが明らかになった。この酵素は、細菌を超音波で破碎し、DEAE-Sepharose、硫酸アンモニウム分画、Superdex 200pg、Q-Sepharose、CM-Sepharose、Phenyl-Sepharoseによって、70倍に精製され、Native-PAGEと等電点電気泳動的に単一にまで精製できた。精製された

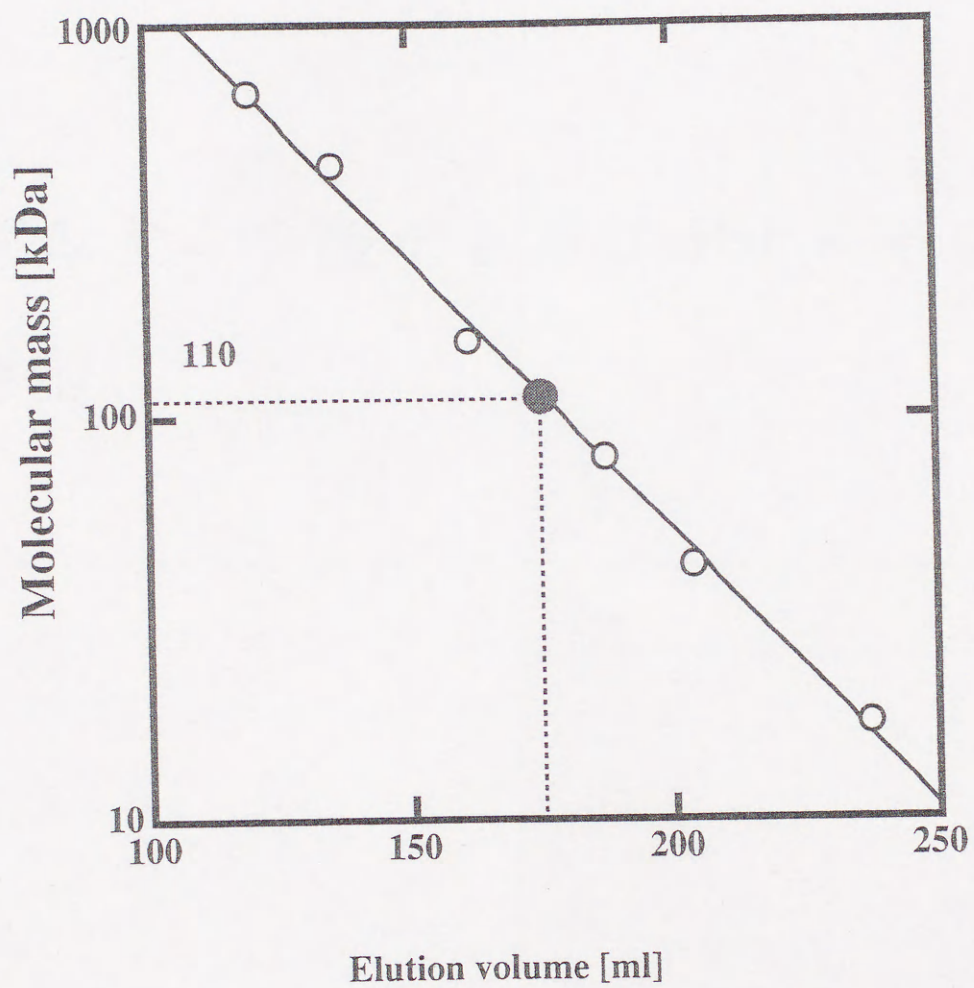


Fig.3-8 Determination of Molecular weight by gel filtration.

酵素の分子量は約110kDaであり、約34kDaと約76kDaの分子量の異なる2つのサブユニットによって酵素分子が形成される新規のGLDHであることが明らかになった。

第4章

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特性評価

第4章

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特性評価

4.1 緒言

本章では、3章で精製したL-グルタミン酸酸化還元酵素の特性を評価した。酵素の特性としては、まず、この酵素が低温活性酵素であるということを明らかにするために、その温度特性と、活性化エネルギーを常温酵素と比較した。この酵素がオキシダーゼかデヒドロゲナーゼかを明らかにするため、酸素・NAD(P)⁺などの電子受容体との反応性を調べた。また、この酵素に含まれる補酵素を酵素の可視・紫外吸収スペクトルなどを調べることによって明らかにした。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬および機器

ここでの試薬および機器は、前章までに明記しなかった物についてここで述べた。

亜ジチオン酸ナトリウム、3,3'-ジメトキシベンジジン、チオ硫酸ナトリウム、フェリシアンカリウム、*o*-フェナントロリン、ピリジン、ヨウ化酢酸、N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムは、和光純薬工業社製の特級を用いた。アンモニア濃度の測定には、和光純薬工業社製アンモニアテストワコーを使用した。2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)、1-メトキシフェナジンメソスルフェート(1-メトキシPMS)、9-ジメチルアミノベンゾ[α]フェノキサジン-7-イウム塩酸塩(メルドラブルー)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2Hテトラゾリウム(INT)は、同人堂社製を用いた。ニコチンアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)、ニコチンアデニンジヌクレオチドフォスフェート(NADP⁺)、ウシ肝臓由来のL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)は、オリエンタル酵母社製を用いた。西洋わさび由来ペルオキシダーゼはSigma社製を用いた。*Streptomyces* sp. X119-6由来のL-グルタミン酸オキシダーゼは、ヤマサ醤油社製を用いた。

酸素電極はABLE社製の酸素電極Model BO-Gを用いた。2-オキソグルタル酸の検出に

は、東ソー社製のTSK GEL ODS-80Ts(4.6 x 150 mm)を用いた。高周波誘導結合プラズマはApplied Research Laboratories Switzerland社製のFISONSを用いた。

4.2.2 酵素活性の温度依存性と熱安定性と活性化エネルギー

酵素活性の温度に対する影響を調べるため、精製酵素20 μ lに対し、50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含んだ20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 980 μ lを加え、吸光光度計に恒温槽を装着して、2分間、NBTの還元を測定し、2.2.2節の(3)にある式(2-1)、式(2-2)に従って活性を測定した。

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4-1)$$

$$\log_{10} k = -\frac{E_a}{2.30R} \cdot \frac{1}{T} + \log_{10} A \quad (4-2)$$

酵素の活性化エネルギーの算出は、アレニウスの式(式(4-1))に従って算出した。すなわち、式(4-2)に基づいて、反応速度(酵素活性)の対数に対して、絶対温度の逆数をプロットするアレニウスプロットを行い、その勾配から式(4-3)に従って計算した。

$$\text{slope} = -\frac{E_a}{2.30R}, E_a = -2.30R \cdot \text{slope} \quad (4-3)$$

ここで、 k は速度定数、 A は頻度因子[-]、 E_a は活性化エネルギー[J/mol]、 R は気体定数8.314[J/mol $\cdot$ K]、 T は絶対温度[K]、slopeはアレニウスプロットのグラフの勾配を示している。

酵素の熱安定性は、20分間精製した酵素をその温度でインキュベーションした後に、氷水中に入れ温度を下げ、20 $^{\circ}$ Cで上記と同じ条件で活性を測定し、インキュベーション前の酵素活性を100%とし、インキュベーション後の酵素が何%の酵素活性を残存しているかを計算し、残存活性を求めた。

4.2.3 酵素活性のpH依存性とpH安定性

酵素活性のpHの影響は、pH5.5～8.0の範囲では0.1Mリン酸緩衝液を用い、pH8.0～9.7の範囲では0.1Mホウ酸緩衝液を用いた。それぞれのpHでの酵素活性は20°Cで50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含んだ上記の0.1Mの緩衝液中で、NBTの還元速度を吸光光度計で測定する事によって計算した。

酵素のpH安定性は、pH5.5～8.0の範囲では20mMリン酸緩衝液、pH8.0～9.7の範囲では20mMホウ酸緩衝液中で20分間、20°Cでインキュベーションした後、50倍の50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含有する0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈して、20°Cで2分間、NBTの還元速度を計算し活性を計算した。インキュベーション前の酵素活性を100%とし、インキュベーション後の酵素が何%の酵素活性を残存しているか計算し、残存活性を求めた。

4.2.4 基質特異性

精製酵素の各種アミノ酸に対する基質特異性を、20mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)中で測定した。アミノ酸の濃度は50mMとして、1mM NBTを加えて、このNBTの還元速度を吸光光度計によって測定した。L-グルタミン酸との反応性を100%として、他のアミノ酸の反応性を比較した。

4.2.5 電子受容体との反応性

精製した酵素の電子受容体の反応性を調べた。電子受容体の反応性は、それぞれの酸化還元に伴う吸光度変化によって測定した。それぞれの測定する酸化還元体の吸光極大波長と吸光度係数は以下に示すとおりである。DCIP($\epsilon_{600\text{nm}}=17,500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;酸化体)、1-メ

トキシPMS($\epsilon_{505\text{nm}}=2,840\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;還元体)、メルドラブルー ($\epsilon_{570\text{nm}}=29,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;酸化体)、NBT($\epsilon_{530\text{nm}}=36,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;還元体)、INT($\epsilon_{490\text{nm}}=15,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;還元体)、NAD⁺($\epsilon_{340\text{nm}}=6,620\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;還元体)、NADP⁺($\epsilon_{340\text{nm}}=6,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;還元体)。反応は、50mM L-グルタミン酸と1mMの濃度の電子受容体を含んだ20mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)で行った。酸素との反応性は、密閉した自作のセル(Fig.4-1)中に精製した酵素と50mM L-グルタミン酸を含んだ20mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を充填し、酸素電極によって溶存酸素濃度の変化を調べて計算した。酸素電極は、チオ硫酸ナトリウムを蒸留水に過剰量加えた時に、溶存酸素濃度を0mMとして、蒸留水に空気を30分間、20°Cでバブリングによって吹き込んだ時の溶存酸素濃度を0.28mMして更正した物を使用した。

4.2.6 阻害剤

精製酵素の活性中心にあるアミノ酸残基を知るという目的で、良く阻害剤による酵素活性の阻害が調べられている。本精製酵素についても同様に阻害剤の影響を調べた。反応の阻害を調べるために使用した反応液は、50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含んだ20mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に各々の阻害剤を添加した980 μl の溶液に、精製した酵素20 μl を加え、20°C、2分間のNBTの還元を吸光光度計で測定し、何も添加しない時の酵素活性を100%とし、阻害剤を加えたときの酵素が何%の活性を残存しているかで計算した。以下に、どういう残基に関与する阻害剤、使用した阻害剤、濃度について示した。チオール基の阻害剤であるヨウ化酢酸は、2mMの濃度で添加した。金属キレート剤として、 α -フェナントロリンを2mM、EDTAを5mMで添加した。また、変性剤に対する構造の強さを調べるため、界面活性剤として、SDSを0.1%、N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムを0.1%添加した。

Fig.4-1. Equipment of DO measurement

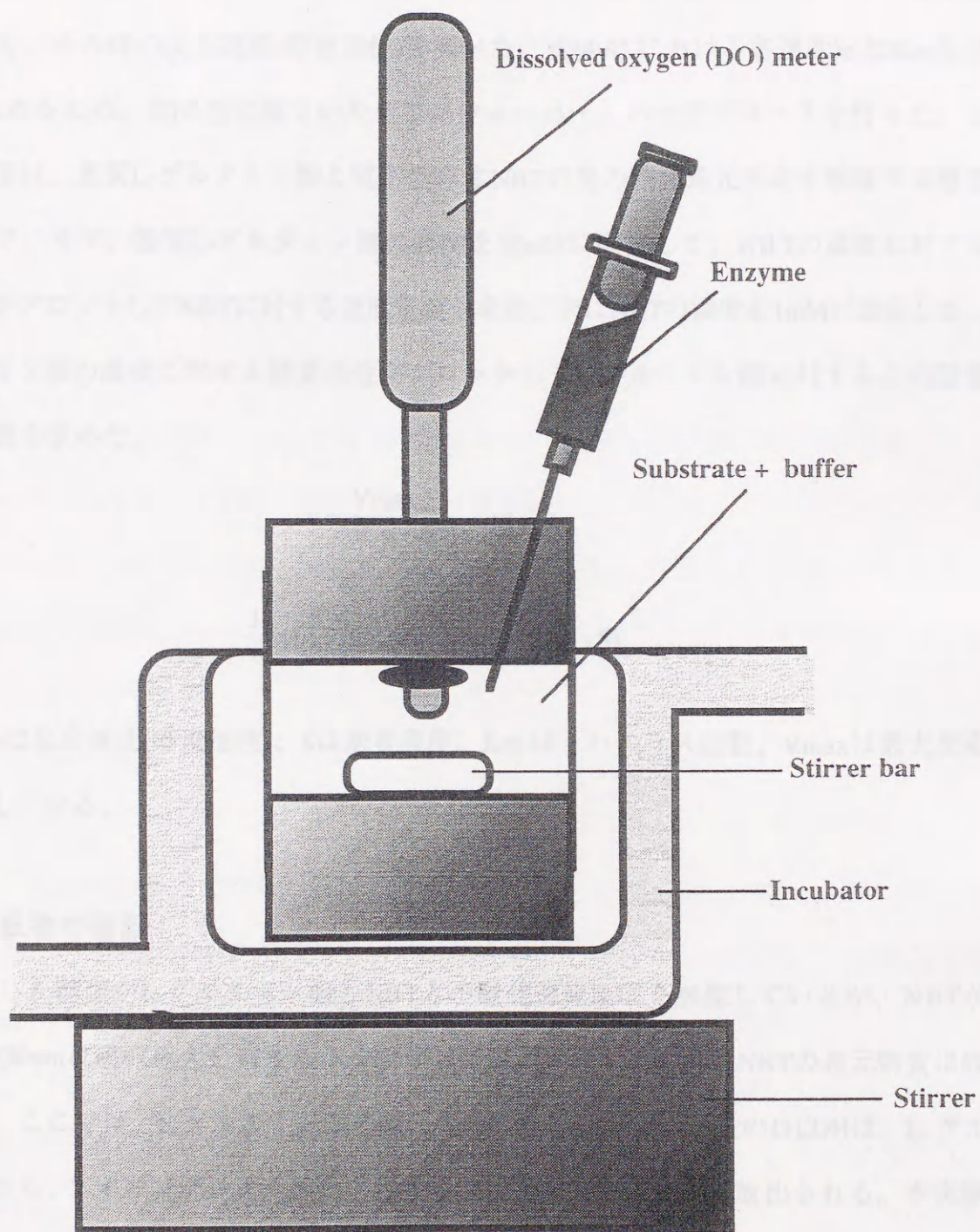


Fig.4-1 Equipment of DO measurement

4.2.7 酵素の速度論的解析

精製した酵素の酵素反応がミハエリス・メンテンの式(式(4-4))に従うとして、基質濃度を変えて、その時の反応速度(酵素活性)を調べた。式(4-4)における各速度定数 K_m 及び V_{max} を求めるため、式(4-5)に基づいたラインウェーバー・バークプロットを行った。この精製酵素は、基質L-グルタミン酸と電子受容体NBTの間の酸化還元反応を触媒する酵素であるので、まず、基質L-グルタミン酸の濃度を50mMに固定して、NBTの濃度に対する酵素活性をプロットしてNBTに対する速度定数を求め、次にNBTの濃度を1mMに固定して、L-グルタミン酸の濃度に対する酵素活性をプロットしてL-グルタミン酸に対するこの酵素の速度定数を求めた。

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (4-4)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4-5)$$

ここで、 v は反応速度(酵素活性)、 S は基質濃度、 K_m はミハエリス定数、 V_{max} は最大反応速度を示している。

4.2.8 生成物の確認

精製した酵素がL-グルタミン酸とNBTとの酸化還元反応を触媒しているが、NBTが還元して530nmに吸収極大を有するホルマザンに変わるので、容易にNBTの還元物質は確認できる。ここでは、L-グルタミン酸の酸化生成物を確認した。一般のGLDHは、L-グルタミン酸から、2-オキソグルタル酸とアンモニアがその反応によって放出される。本実験でも、これらの2つの物質について検出した。その方法とは以下の方法を用いた。

(1) アンモニアの生成

アンモニアの検出は、インドフェノールブルー反応[96]を利用したアンモニアテストキットを用いた。50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含有した20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)で20°Cで、1時間反応させてアンモニアが検出されるか確認した。

(2) 2-オキシグルタル酸の生成

2-オキシグルタル酸の検出はHPLCクロマトグラフィーを用いて、その保持時間によって確認した。反応は50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含んだ20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)中で、20°Cで1時間行った。反応停止は0.1Mリン酸溶液(pH2.0)で2倍に希釈して、酸により変性して沈殿する酵素とNBTを遠心分離及び0.2 μ mのフィルターによって取り除いた後、0.1Mリン酸溶液(pH2.0)を40°C、1.2ml/minで平衡化したODS-80Tsカラム(4.6x150mm)に反応液を10 μ l注入して調べた。L-グルタミン酸と2-オキシグルタル酸の検出は、240nmの吸光で検出した。

(3) 過酸化水素

過酸化水素の発生の有無も確認した。50mM L-グルタミン酸、0.005% 3,3'-ジメトキシベンジジンと0.005%西洋わさび由来ペルオキシダーゼを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0) 980 μ lに精製した酵素20 μ lを加え、430nmの吸光度の変化を3分間調べた。

4.3.9 補欠分子団の確認

(1) 活性染色

2.2.3(2)の活性染色と同じ方法で、活性染色を行った。染色した酵素は、3章で精製したL-グルタミン酸酸化還元酵素、ウシ肝臓由来NAD(P)+依存のGLDH、*Streptomyces* sp.

X119-6由来のL-グルタミン酸オキシダーゼを用いた。これらの酵素をNativePAGEで分離し、50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含有する20mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で室温で24時間染色した。

(2) 酸化体と還元体の可視・紫外吸収スペクトル、差スペクトル

精製した酵素の可視・紫外吸収スペクトルを20°C、スキャンスピード120nm/min、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で測定した。酵素の還元体のスペクトルは亜ジチオン酸ナトリウムの結晶を2つ加えることによって、酵素の酸化体のスペクトルはフェリシアンカリウムの結晶を2つ加えることによってそれぞれ得た。酵素の示差吸収スペクトル(還元体-酸化体)は、還元体のスペクトルから酸化体のスペクトルを差し引くことで得た。

(3) ピリジンフェロヘモクロム

酵素が含有するヘムの種類を同定するため、ヘムのピリジンフェロヘモクロムのスペクトルを得た。精製酵素を0.15M水酸化ナトリウム、0.2Mピリジン溶液となる様に調製し、これに亜ジチオン酸ナトリウムの結晶を2つ加えた。湖の状態での酵素のスペクトルを20°C、スキャンスピード120nm/minで得た。

(4) 発光分光分析(ICP)による鉄の確認

精製した酵素に含有される鉄の存在を確かめるために高周波誘導結合プラズマを用いて調べた。鉄の特徴的な発光248nmで測定を行った。

4.3 実験結果及び考察

4.3.1 酵素活性の温度依存性と熱安定性と活性化エネルギー

精製酵素の酵素活性の温度依存性をFig.4-2(A)に示す。精製した酵素は20mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で最適温度が55°Cであった。中温性細菌由来のGLDHの最適温度は60°Cであり[97,98]、常温酵素である牛肝臓由来のGLDHの最適温度は、72°Cであった。従って、本精製酵素は、これらの酵素よりも約10°C低温側に温度特性がシフトしており、我々の酵素は典型的な低温活性酵素であった。同じように、他の低温活性酵素においても、最適温度が低温域にシフトしていることが報告されている。例えば、*Bacillus psychrophilus*由来のヒスチジノールデヒドロゲナーゼは最適温度25°C(pH9.8) [58]、*Bacillus psychrosaccharolyticus*由来の乳酸デヒドロゲナーゼは最適温度25°C[60]、*Pseudomonas fluorescens* 114由来のプロテアーゼは最適温度35°C[99]、*Candida humicola*由来のプロテアーゼは最適温度37°C [100]であった。

Fig.4-2(B)に精製した酵素のアレニウスプロットを示す。高い温度域でアレニウスプロットが折れ曲がっているのは、熱によるタンパク質の変性のせいである。それよりも低い温度域では、アレニウスプロットは、ほぼ直線になっていた。このアレニウスプロットの直線の勾配から計算できる活性化エネルギーは、本精製酵素は7.4kJ/mol、中温性酵素であるウシ肝臓由来のGLDHは12.9kJ/mol、好熱性酵素である*Phormidium laminosum*由来のGLDHは21.3kJ/mol[101]であった。これらの結果、低温活性GLDHは、中温性GLDHよりも活性化エネルギーが低く、低いエネルギーで反応を触媒する事ができる優良な触媒であることがいえる。

精製したGLDHの熱安定性が、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で、5~55°Cの間の温度で20分間熱処理した後で計算された(Fig.4-2(C))。この酵素は、30°C以下では安定に存在した。しかしながら、中温性酵素のウシ肝臓由来のGLDHは、60°Cまで安定に存在した。3章で精製した低温活性L-グルタミン酸酸化還元酵素は、中温性酵素と比べて熱不安定であった。この酵素の熱不安定性は、低温で有効に働くために、この酵素が柔らかい構造を

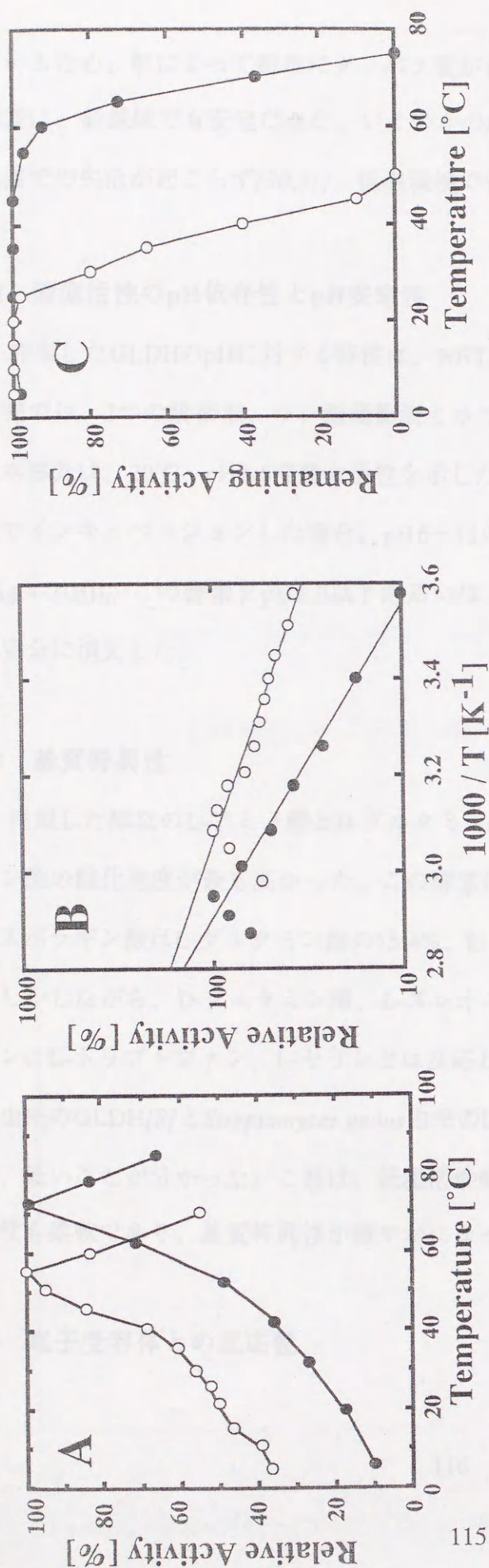


Fig.4-2 Effect of temperature on enzyme activity and stability.

(A) GLDH activity from strain L101 was measured by following the rate of reduction of NBT in 20 mM phosphate buffer (pH 7) using 50 mM L-glutamate and 1 mM NBT for 2 min (○). GLDH activity from beef liver was measured by following the rate of reduction of NAD⁺ in 20 mM phosphate buffer (pH 7) using 50 mM L-glutamate and 1 mM NAD⁺ for 2 min (●). (B) Arrhenius plots were obtained by plotting the logarithm of the relative activity for the reciprocal of the absolute temperature. The activation energy was 7.4 kJ/mol for GLDH from strain L101 (○) and 12.9 kJ/mol for GLDH from beef liver (●). (C) Enzyme stability was decided by measuring the remaining activity of GLDH from strain L101 (○) and GLDH from beef liver (●) after incubation for 20 min in 20 mM phosphate buffer (pH 7).

しているため、熱によって簡単にタンパク質が変性してしまう事が考えられる。また、この酵素は、低温域でも安定だった。いくつかの*Bacillus*属由来のNAD⁺依存性のGLDHの様に低温での失活が起こらず[30,31]、低温環境で安定に存在する酵素であることが分かった。

4.3.2 酵素活性のpH依存性とpH安定性

精製したGLDHのpHに対する特性は、NBTとL-グルタミン酸を基質として測定した。本研究では、2つの緩衝液、リン酸緩衝液とホウ酸緩衝液でpH6~11の範囲で影響を調べた。本酵素は、20°C、pH8.5で最大活性を示した(Fig.4-3(A))。酵素の安定性は、20分間、20°Cでインキュベーションした場合、pH6~11の範囲では、80%以上の活性を維持していた(Fig.4-3(B))。この酵素をpH5.0以下あるいは、pH12.0以上にすると5時間以内に酵素活性は完全に消失した。

4.3.3 基質特異性

精製した酵素のL-アミノ酸とD-グルタミン酸の基質特異性をTable4-1に示す。L-グルタミン酸の酸化速度が最も高かった。この酵素は、いくつかのL-アミノ酸とも反応した。L-アスパラギン酸はL-グルタミン酸の15.4%、L-グルタミンは10.3%の酸化活性を有していた。しかしながら、D-グルタミン酸、L-スレオニン、L-チロシン、L-システイン、L-ヒスチジン、L-トリプトファン、L-セリンとは反応しなかった。本酵素の基質特異性は、ウシ肝臓由来のGLDH[8]と*Streptomyces endus*由来のL-グルタミン酸オキシダーゼ[35]と比較すると、低いことが分かった。これは、低温活性酵素が構造的に柔軟なため、酵素の基質認識部位も柔軟であり、基質特異性が緩やかになったものと考えた。

4.3.4 電子受容体との反応性

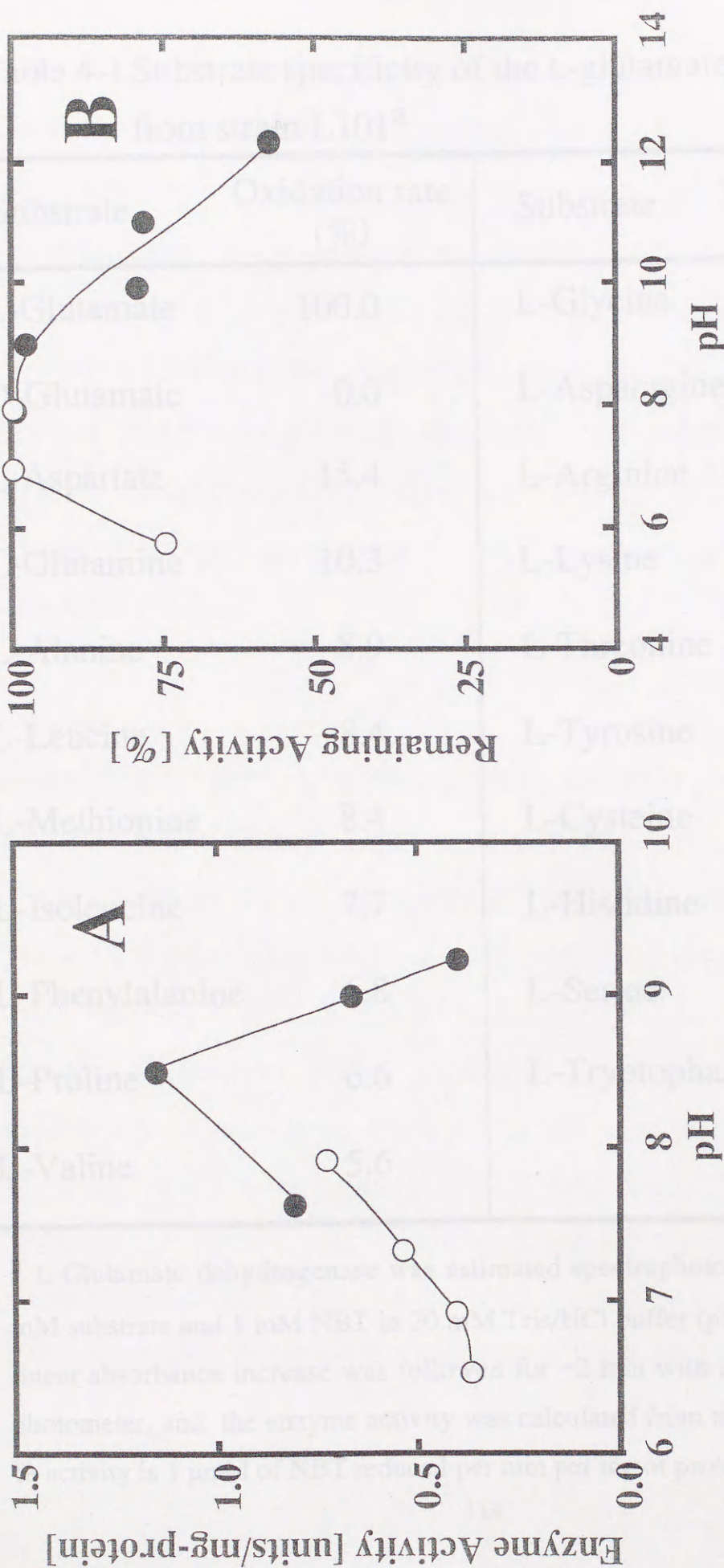


Fig. 4-3 Effect of pH on the enzyme activity and stability of GLDH from strain L101.

(A) Enzyme activity was measured at 20 °C in 100 mM buffer (phosphate buffer (pH 5.5-8) (○) or borate buffer (pH 8-12) (●)) containing 50 mM L-glutamate and 1 mM NBT for 2 min. (B) The purified enzyme was incubated for 20 min at 20 °C in each buffer. After incubation, the remaining activity was determined in 500 mM phosphate buffer (pH 7) containing 50 mM L-glutamate and 1 mM NBT.

Table 4-1 Substrate specificity of the L-glutamate dehydrogenase from strain L101^a

Substrate	Oxidation rate (%)	Substrate	Oxidation rate (%)
L-Glutamate	100.0	L-Glycine	2.7
D-Glutamate	0.0	L-Asparagine	1.3
L-Aspartate	15.4	L-Arginine	0.0
L-Glutamine	10.3	L-Lysine	0.0
L-Alanine	8.9	L-Threonine	0.0
L-Leucine	8.4	L-Tyrosine	0.0
L-Methionine	8.4	L-Cysteine	0.0
L-Isoleucine	7.7	L-Histidine	0.0
L-Phenylalanine	6.8	L-Serine	0.0
L-Proline	6.6	L-Tryptophane	0.0
L-Valine	5.6		

^a L-Glutamate dehydrogenase was estimated spectrophotometrically using 50 mM substrate and 1 mM NBT in 20 mM Tris/HCl buffer (pH 9.0) at 20 °C. The linear absorbance increase was followed for ~2 min with a recording spectrophotometer, and the enzyme activity was calculated from the $\Delta A/\text{min}$. The 100 % activity is 1 μmol of NBT reduced per min per mg of protein.

精製したL-グルタミン酸酸化還元酵素は、NAD⁺およびNADP⁺、酸素と反応しなかった(Table4-2)。この酵素の酸化還元反応に酸素が関与しないということから、この酵素は、L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)であることが明らかになった。しかしながら、1-メトキシPMS、DCIP、メルドラブルー、NBT、INTなどのいくつかの酸化還元色素に対して反応性を有しており、シトクロムcとも反応した。特に、1-メトキシPMSは、調査した電子受容体の中で最も活性が高く、NBTの約8倍の活性を有していた。電子受容体の反応性は、GLDHと電子受容体の間の構造的親和性に関係する物であり、酸化還元電位が高いからと言って反応性が高くなるわけではないようであった。今後さらにGLDHの電子受容体の結合部位などを決定したときに、電子受容体の反応性がどんな因子に左右されるか明らかになるであろう。

4.3.5 阻害剤

Table4-3に精製した新規のGLDHの阻害剤に対する影響を示す。活性阻害が見られた阻害剤は、タンパク質の変性剤である尿素、SDS、N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムであった。これは、本酵素が低温活性酵素であるため、構造に柔軟性を有しており変性剤の影響を強く受ける為であると考えられる。また、ヨウ化酢酸で阻害を受けなかったのも、この酵素は、活性中心にチオール基(-SH基)を含まないと考えられる。o-フェナンスロリンやEDTAのような金属キレート剤によっても活性がなくなることは、金属イオンを活性中心に含まないかあるいは、金属イオンがこれらのキレート剤よりも強い結合でタンパク質に結合していることが考えられる。フェニルメタンスルホニルフルオリドに対しても反応がなかった。このフェニルメタンスルホニルフルオリドはセリンが活性中心にあると化学修飾され活性がなくなるものであるのものでセリンを活性中心には含まない。このような阻害剤や化学修飾剤で活性中心や構造に迫ってみたが成果は得られなかった。

Table 4-2 Electron acceptors for L-glutamate dehydrogenase from strain L101^a

Electron acceptor	Reduction rate (%)	Redox potential (V)
1-Methoxy PMS	851	+0.06
DCIP	212	+0.67
Meldola's blue	191	+0.13
INT	141	-0.09
Cytochrome <i>c</i>	134	+0.22
NBT	100	-0.05
NAD ⁺	0	-0.32
NADP ⁺	0	-0.32
Oxygen ^b	0	+0.82

^a L -Glutamate dehydrogenase was estimated spectrophotometrically using 50 mM L-glutamate and 1 mM of electron acceptor in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) at 20 °C. The linear absorbance increase was followed for ~2 min with a recording spectrophotometer, and enzyme activity was calculated from the $\Delta A/\text{min}$. 100 % activity is 1 μmol of electron acceptor reduced per min per mg of protein.

^bThe reduction rate was detected by the decrease in the current of an oxygen electrode per min per mg of protein. The initial concentration of oxygen was 0.28 mM, a saturating concentration at 20 °C in 20mM Tris-HCl buffer (pH 9.0).

Table 4-3. Effect of various chemicals on GLDH activity^{a)}

Chemicals	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	-	100
2-Mercaptoethanol	2	100
Iodoacetic acid	2	100
EDTA ^{b)}	5	100
o-Phenanthroline	2	100
Urea	4,000	15
SDS ^{c)}	0.1%	0
SLS ^{d)}	0.1%	18

a) GLDH was estimated spectrophotometrically using 50 mM L-glutamate, 1 mM NBT, and chemical reagent in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9) at 20 °C. The linear absorbance increase was followed for ~2 min with a recording spectrophotometer, and the enzyme activity was calculated from the $\Delta A/\text{min}$. The 100 % activity is GLDH activity without chemical reagent.

b) EDTA= ethylenediaminetetraacetic acid, c) SDS= sodium dodecyl sulfate, d) SLS= sodium n-lauryl salcosinate.

4.3.6 酵素の速度論的解析

精製した新規のGLDHのL-グルタミン酸とNBTの速度定数などを解析するため、ミハエリス・メンテン型の反応に従うと仮定して、各パラメータを求めた。Fig.4-4はNBTの濃度を高濃度の1mMとして固定し、L-グルタミン酸の濃度を変えて酵素活性を測定したものであり、ラインウェーバー・バークプロットを取った物である。この結果、この酵素のL-グルタミン酸に対するミハエリス定数 $K_m=3.0\text{mM}$ 、最大活性 $V_{\max}=11\text{units/mg-protein}$ であることがわかった。Fig.4-5はL-グルタミン酸の濃度を高濃度の50mMとして固定して、NBTの濃度を変えて酵素活性を測定した物であり、ラインウェーバーバークプロットをとった物である。この結果この酵素のNBTに対するミハエリス定数 $K_m=81\mu\text{M}$ 、最大活性 $V_{\max}=11\text{units/mg-protein}$ であることが分かった。L-グルタミン酸のミハエリス定数の3.0mMは、他のNAD(P)+依存型のGLDHとほとんど同じ値であった(ウシ肝臓由来GLDHは1.8mM[5]、*Pea root*由来GLDHは7.3mM[5]など)。

4.3.7 生成物の確認

(1) アンモニア

NBTの還元速度 $0.10\mu\text{M/min}$ の酵素量で反応させたとき $0.19\mu\text{M/min}$ で生成した。このことから、NBT 1molからアンモニアが2mol生成する事がわかった。

(2) 2-オキソグルタル酸

反応液中のL-グルタミン酸と2-オキソグルタル酸は、HPLCにて分離したとき、それぞれ1.82分、2.90分の保持時間を有しており、反応生成物が同じカラムで2.90分の保持時間を持つことから、2-オキソグルタル酸が形成されていることを確認した。また、2-オキソグルタル酸は、NBTの還元速度 $0.10\mu\text{M/min}$ の酵素量で $0.18\mu\text{M/min}$ 生成することが確認さ

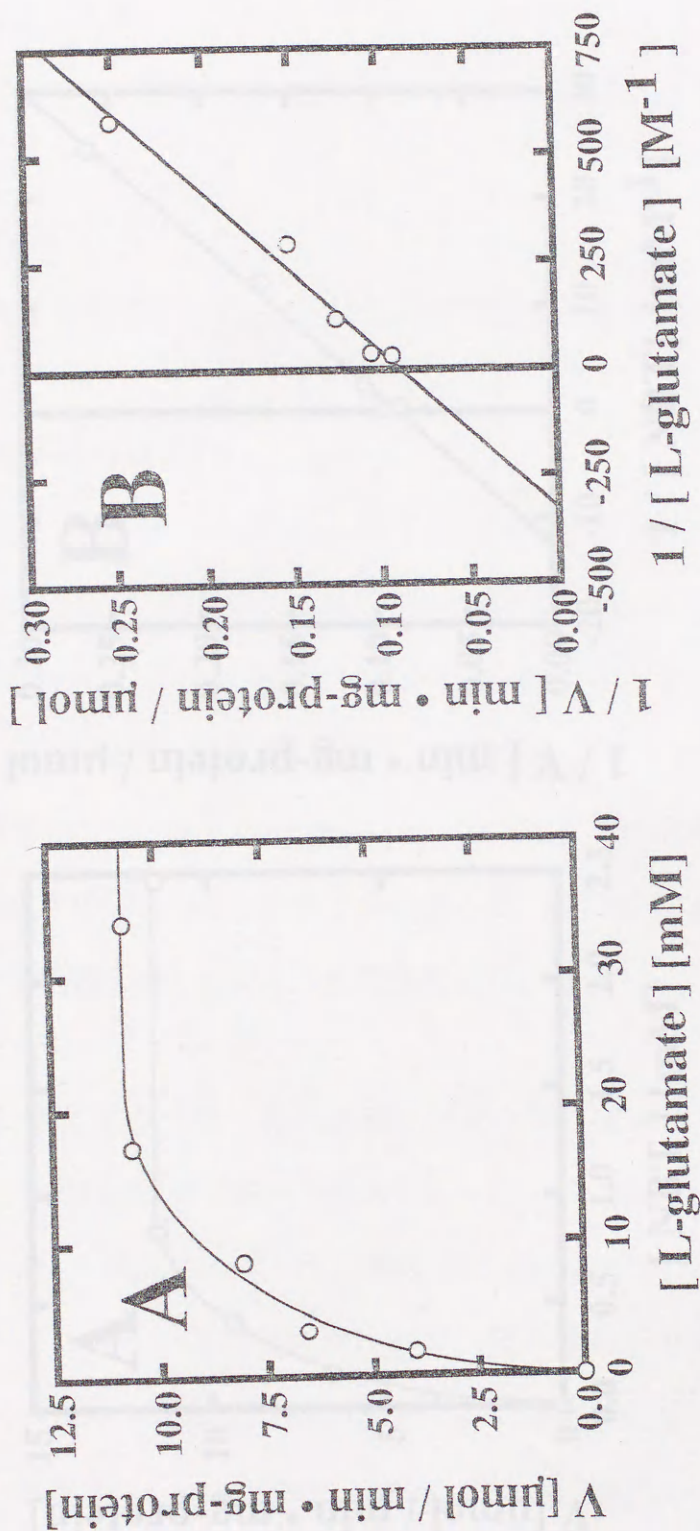


Fig.4-4 Effect of L-glutamate concentration on GLDH activity from strain L101.

(A) Reaction velocity of our GLDH versus L-glutamate concentration at fixed NBT concentration of 1 mM. Reaction velocity was measured by reduction rate of NBT at 530 nm in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM NBT and L-glutamate. (B) Lineweaver-Burk plots for L-glutamate at fixed NBT concentration of 1 mM.

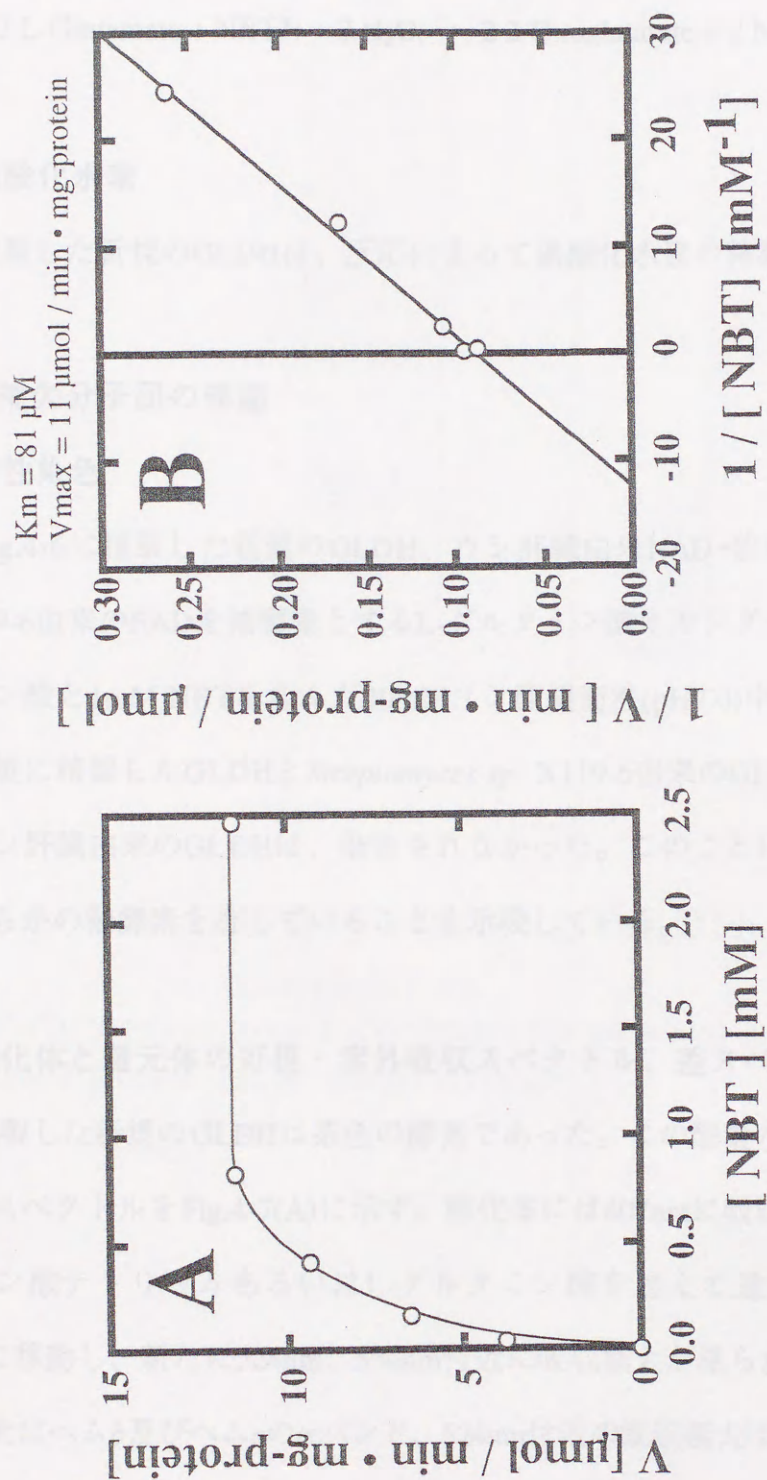
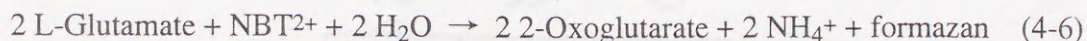


Fig.4-5 Effect of NBT concentration on GLDH activity from strain L101.

(A) Reaction velocity of our GLDH versus NBT concentration at fixed L-glutamate concentration of 50 mM. Reaction velocity was measured by reduction rate of NBT at 530 nm in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 50 mM L-glutamate and NBT. (B) Lineweaver-Burk plots for NBT at fixed L-concentration of 50 mM.

れた。このことから、NBT1molから2-オキソグルタル酸が2mol生成する事がわかった。従って、(1)のアンモニアの発生と合わせて考えると以下のような反応をこの酵素は触媒していると考えられる。



(3) 過酸化水素

精製した新規のGLDHは、反応によって過酸化水素の精製は認められなかった。

4.3.8 補欠分子団の確認

(1) 活性染色

Fig.4-6に精製した新規のGLDH、ウシ肝臓由来NAD⁺依存性のGLDH、*Streptomyces* sp. X119-6由来のFADを補酵素とするL-グルタミン酸オキシダーゼの活性染色を50mM L-グルタミン酸と1mM NBTを含んだ20mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で染色したものについて示す。新規に精製したGLDHと*Streptomyces* sp. X119-6由来のGLDHは、活性染色がなされたが、ウシ肝臓由来のGLDHは、染色されなかった。このことは、精製した新規のGLDHの中に何らかの補酵素を有していることを示唆している。

(2) 酸化体と還元体の可視・紫外吸収スペクトル、差スペクトル

精製した新規のGLDHは茶色の酵素であった。この酵素の酸化体と還元体の可視・紫外吸収スペクトルをFig.4-7(A)に示す。酸化体には407nmに吸収極大が見られた。これを亜ジチオン酸ナトリウムあるいはL-グルタミン酸を加えて還元すると407nmのピークは416nmに移動し、新たに524nm、556nm付近に吸収極大が見られるようになった。556nmの吸収極大はヘムb及びヘムcのαバンド、524nm付近の吸収極大はヘムb及びヘムcのβバンド、

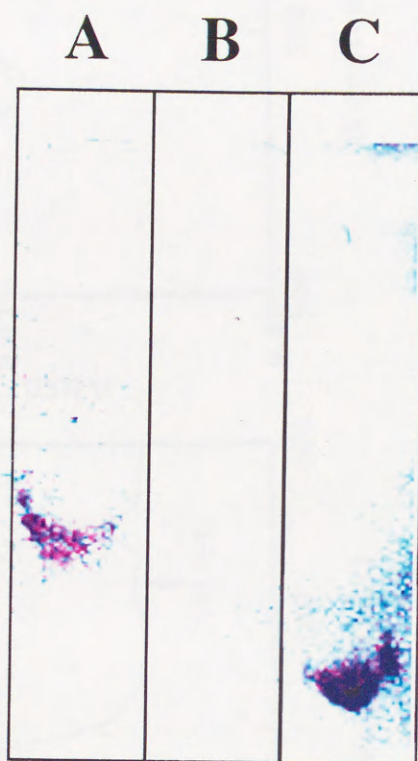


Fig. 4-6 Activity staining GLDH using NBT and L-glutamate.

(A) GLDH from strain L101. (B) GLDH from beef liver. (C) L-Glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X119-6

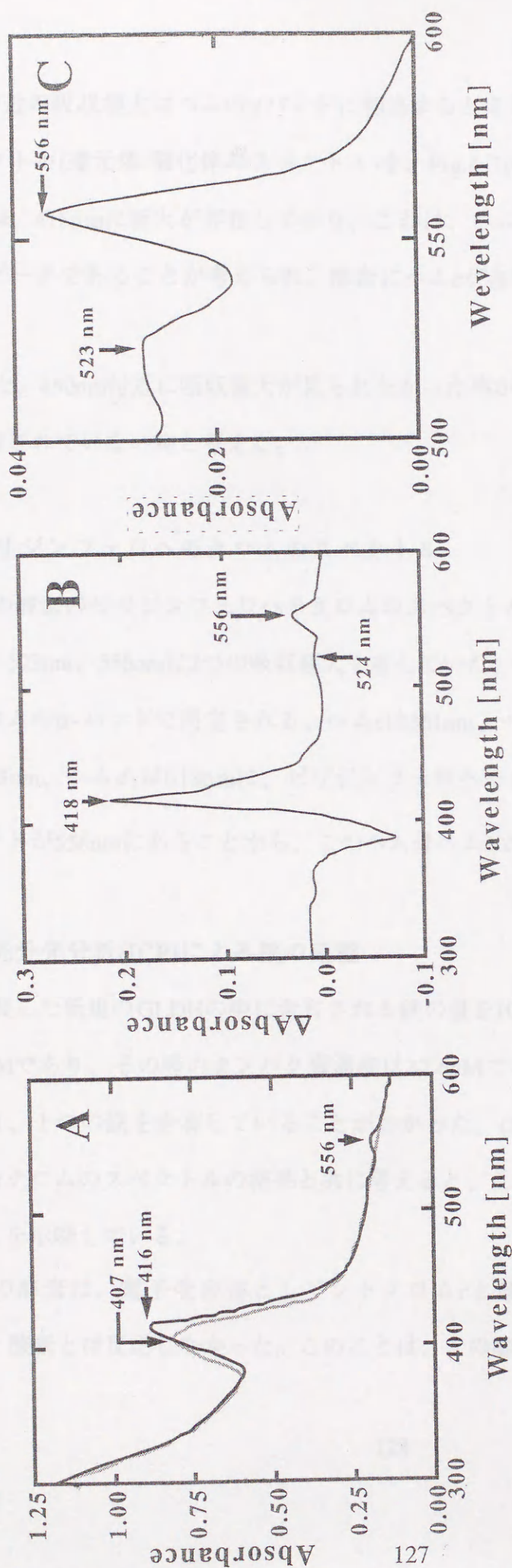


Fig.4-7 Ultraviolet/visible absorption spectra of reduced and oxidized GLDH in 50 mM phosphate buffer (pH7.0), and the pyridine ferrohemochrome spectrum.

(A) Ultraviolet/visible spectra of (---) reduced and (—) oxidized GLDH. The concentration of the enzyme was 1.5 mg/mL. Reduction of GLDH was performed by a few crystals of sodium dithionite. Oxidation of GLDH was performed by adding a few crystals of potassium ferricyanide. (B) Difference spectrum between reduced and oxidized GLDH spectrum minus the oxidized GLDH spectrum. (C) The pyridine ferrohemochrome spectrum. Pyridine ferrohemochrome was formed in 0.15 M NaOH and 0.2 M pyridine by adding a few crystals of dithionite.

410nm付近の吸収極大はヘムの γ バンドに相当すると考えられる[5-7]。この酵素の示差吸収スペクトル(還元体-酸化体のスペクトル)を、Fig.4-7(B)に示す。このスペクトルには、556、524、418nmに極大が存在しており、これは、ヘム b 及びヘム c の α 、 β 、 γ バンドに相当するピークであることが考えられ、酵素にヘム c が含有されている可能性が見いだされた。

また、450nm付近に吸収極大が見られなかったことからフラビン類の補酵素はこの酵素には含有されていない物と考えた。

(3) ピリジンフェロヘモクロムのスペクトル

この酵素のピリジンフェロヘモクロムのスペクトルをFig.4-7(C)に示す。このスペクトルは、523nm、556nmに2つの吸収極大を有していた。ヘムの同定はこのピリジンフェロヘモクロムの α -バンドで同定される。ヘム c は551nm、ヘム b は557nm、ヘム a は584nm、ヘム d は613nm、ヘム d_1 は618nmに、ピリジンフェロヘモクロムの α バンドを持つ[5-7]。この α -バンドが556nmにあることから、このヘムはヘム b であることが同定された。

(4) 発光分光分析(ICP)による鉄の確認

精製した新規のGLDHの中に含有される鉄の量をICPを用いて定量した。鉄の含有量は22.2 μ Mであり、その時のタンパク質濃度は22.6 μ Mであった。すなわち、この酵素1分子あたり、1つの鉄を含有していることがわかった。(2)の示差スペクトル及び(3)のピリジンフェロヘモクロムのスペクトルの結果と共に考えると、この酵素には1つのヘム b を含有していることを示唆している。

この酵素は、電子受容体としてシトクロム c と酸化還元色素と反応し、 NAD^+ 、 $NADP^+$ 、酸素とは反応しなかった。このことは、この酵素がアクセプター型のデヒドロゲ

ナーゼであることを示している。今までに、報告されているGLDHおよびL-グルタミン酸オキシダーゼで、アクセプター型のデヒドロゲナーゼは報告されておらず、ここで示されたようなヘムを補酵素に持つようなGLDHは報告されていない。本研究で初めて、ヘム b を含有するGLDHが見いだされた。

4.4 結言

精製した新規のGLDHは、最大活性を示す温度が55°Cで活性化エネルギーもウシ肝臓由来のGLDHに比べて約60%活性化エネルギーで反応を触媒する低温活性酵素であった。また、pH8.5で最も高い反応が得られ、pH6~11の間で安定に存在した。基質特異性はL-グルタミン酸が選択的に反応しL-アスパラギン酸、L-グルタミンともそれぞれ15%、10%反応した。電子受容体に、酸素、NAD⁺、NADP⁺を使用せず、シトクロム c や酸化還元色素を利用するアクセプター型のデヒドロゲナーゼであった。本酵素には1分子あたり1つのヘム b を含有していることが示され、新規のGLDHを発見する事ができた。

5.1 緒言

近年まで新しくスクリーニングして精製した試薬が全く新しいペームを活性中心にもつL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)であることが明らかになった。本章では、この新種のGDHを使用したセンサーを開発することを目指して研究を行った。そのため、第5章として、酵素、メドイエーターを基盤として構築した形でその電気化学的応答を調べ、実際に使用できるバイオセンサーの可能性を調査し、さらに、酵素とメドイエーターを固定化することによる実用化を目指す。

第5章

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼのセンサーへの応用

5.1.1 装置、酵素、電子メドイエーター均一系での電気化学的性質

電気化学測定は、三電極法を用いて行った。参電極は飽和塩化カリウム塩化銀電極を塩液中で分離して用いた。対極には白金線を用いた。作極極には、グラシーカーボン電極(直径3mm)を用いた。グラシーカーボンの代わりに、溶媒製ナフロン熱収縮チューブに銅線と共に300°Cのオーブンで封入し、シリコンカーバイドの粉末層を形成(メッシュ400、200、240)で層状凝縮した後、酸化アルミニウムスラリーで被覆し、被覆面とした。被覆した電極は超音波洗浄をかけた後、被覆剤を完全に除去した。電気化学測定を行う時は、測定液に酸化アルミニウムスラリーを用いて被覆した。酵素溶液は、溶存酸素を除去するために窒素ガスで30分間バブリングしてから用いた。

5.1 緒言

前章まで新しくスクリーニングして精製した酵素が全く新しいヘム b を活性中心にもつL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)であることを明らかにした。本章では、この新規のGLDHを使用したセンサーを構築することを目指して研究を行った。そのため、まず第一段階として、酵素-メディエーターを溶液中に溶解した形でその電気化学的応答を調べ低温で利用できるバイオセンサーの可能性を模索し、さらに、酵素とメディエーターを固定化することでさらなる実用化を目指す。

5.2 実験方法

5.2.1 試薬および機器

1,1'-フェロセンジメタノールはAldrich社製を用いた。(フェロセンメチル)トリメチルアンモニウム過塩素酸塩、フェロセンカルボン酸は東京化成社製を用いた。緩衝液はDojindo社製のグッドの緩衝液を用いた。酸化アルミスラリーはPRESI社製200Åを用いた。

ポテンシostatはセイコーEG&G社製Model263Aを用いた。

5.2.2 基質、酵素、電子メディエーター均一系での電気化学的特性

電気化学測定は、三電極法を用いて行った。参照電極は飽和塩化カリウム塩化銀電極を塩橋で分離して用いた。対極には白金線を用いた。作用極には、グラシーカーボン電極(直径3mm)を用いた。グラシーカーボンの周りに、溶融製テフロン熱収縮チューブに銅線と共に300°Cのオーブンで封入し、シリコンカーバイドの耐水研磨紙(メッシュ400、1000、2400)で順次研磨した後、酸化アルミニウムスラリーで研磨し、鏡面とした。研磨した電極は超音波洗浄をかけて、研磨剤を完全に除去した。電気化学測定を行う時は、測定毎に酸化アルミニウムスラリーを用いて研磨した。酵素溶液は、溶存酸素を除去するために窒素ガスで30分間バブリングしてから用いた。

(1) 電子メディエーターの反応特性

電子メディエーターとして200 μ Mの1,1'-フェロセンジメタノール、フェロセンカルボン酸、(フェロセンメチル)トリメチルアンモニウム過塩素酸塩のいずれかの内1つと、150mM L-グルタミン酸を含んだ25mM TAPS緩衝液(pH9.0)が存在している状態で走査電位1mV/s、25°Cでサイクリックボルタメトリー(CV)を得た。得られたCVよりベースラインを差し引いて、拡散電流値(i_d)を求めた。次に同濃度の基質とメディエーターを含む25mM TAPS緩衝液(pH9.0)にさらに精製した酵素を加えてCVを取り、触媒電流値(i_k)を求めた。この i_k/i_d が大きいほど反応性が高いことを示している。

(2) pH依存性

(1)で最も反応性の良かったメディエーターを用いて、精製したGLDHの電気化学反応における至適pHを求めるため、pHを変えて i_k/i_d を求めた。

(3) 温度依存性

精製したGLDHの電気化学反応における温度依存性を測定し、低温で測定可能なバイオセンサーを作製できたか確認した。また、比較として中温性酵素である*Streptomyces sp.* X119-6由来のL-グルタミン酸オキシダーゼについても電気化学的測定を行った。

5.2.3 酵素、電子メディエーター固定化電極の電気化学的特性

(1) 固定化方法

5.2.2でも使用したグラシーカーボン電極(直径3mm)にレドックスポリマー、精製した酵素溶液、牛血清アルブミンを薄く塗り、グルタルアルデヒド蒸気によって固定化し

(Fig.5-1)、これを作用極として電気化学反応を行った[102]。ここで用いたレドックスポリマーは、アクリルアミド-アクリル酸コポリマー(1:1)をN,N'-メチレンビスアクリルアミドで架橋したフェロセンを含むもので、文献[102]に従って合成したポリマーを用いた。レドックスポリマーと精製したGLDHと牛血清アルブミンの混合比は1:1:5とした。電気化学測定は、50mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)で、CVの走査速度は1mV/sで測定した。

(2) L-グルタミン酸濃度の依存性

酵素・メディエーター固定化電極を用いて、L-グルタミン酸の濃度依存性を5°Cと25°Cの両方の温度で測定した。

5.3 実験結果と考察

5.3.1 基質、酵素、メディエーター均一系での電気化学的特性

(1) 電子メディエーターの反応性

メディエータの反応性をTable5-1に示す。最も反応性が高かったのは、1,1'-フェロセンジメタノールであった。反応性が一番悪かったのは、フェロセンカルボン酸であった。フェロセンカルボン酸は側差にカルボニル基が付いており、測定pH9.0であるため、側差はマイナスの電化を帯びてしまう。このマイナスの電化を帯びることで酵素-メディエーター間の相互作用が起こりにくくなると考えられる。

(2) pH依存性

本酵素の電気化学反応のpH依存性をFig.5-2に示す。電気化学反応の至適pHは9.0であった。これは、L-グルタミン酸とNBTとの反応の至適pHと一致した。また、NBTとの反応の様に、pH9.0より高いあるいは低いpHになっても急に活性が低くなることはなかつ

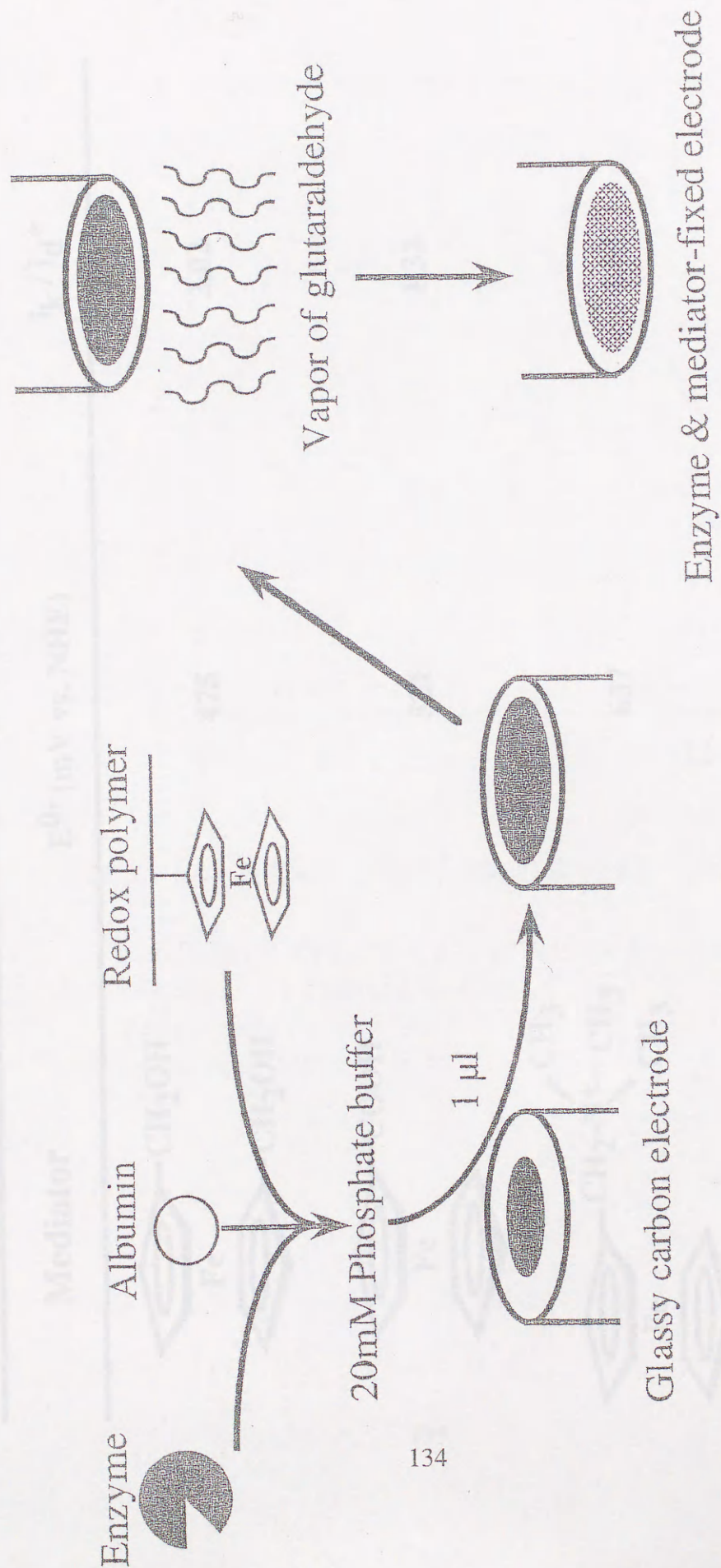


Fig. 5-1 Redox polymer, GLDH and BSA fixed on glassy carbon electrode.

Table 5-1 Interaction between GLDH and mediator

Mediator	E^0 , (mV vs. NHE)	i_k / i_d^*
 	475	2.02
 	521	1.32
 	637	1.65

* pH 9.0 (25mM TAPS buffer), 20°C

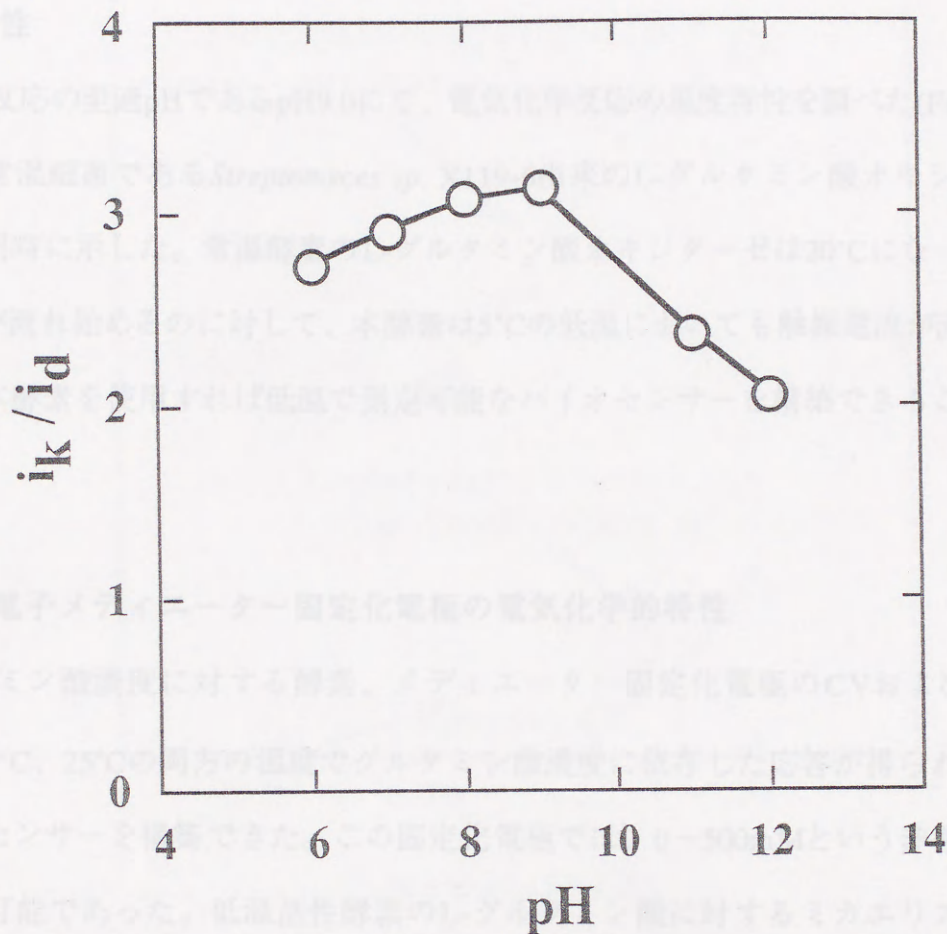


Fig.5-2 The pH-dependence of catalytic

Mediator : 200 μ M 1,1'-ferrocenedimethanol

Substrate : 150mM L-glutamate

Temperature : 20 °C

Scan rate : 1 mV $\cdot$ s⁻¹

た。

(3) 温度依存性

電気化学反応の至適pHであるpH9.0にて、電気化学反応の温度特性を調べた(Fig.5-3)。比較として、常温細菌である*Streptomyces sp.* X119-6由来のL-グルタミン酸オキシダーゼの温度特性も同時に示した。常温酵素のL-グルタミン酸オキシダーゼは20°Cになってようやく触媒電流が流れ始めるのに対して、本酵素は5°Cの低温においても触媒電流が流れた。このことは、本酵素を使用すれば低温で測定可能なバイオセンサーを構築できることを示している。

5.3.2 酵素、電子メディエーター固定化電極の電気化学的特性

L-グルタミン酸濃度に対する酵素、メディエーター固定化電極のCVおよび i_k/i_d をFig.5-4示す。5°C、25°Cの両方の温度でグルタミン酸濃度に依存した応答が得られ、低温で使用可能なセンサーを構築できた。この固定化電極では、0~500mMという非常に高い濃度で計測が可能であった。低温活性酵素のL-グルタミン酸に対するミカエリス定数は3.0mMであるから、ミカエリス定数の実に150倍の濃度のものが計れていることになる。これは、固定化している状態では、L-グルタミン酸が酵素のあるところまで入っていきなからではないかと考えられる。したがって、酵素の固定化方法などを検討すると、濃度の低いところで正確にL-グルタミン酸を検出できるセンサーが構築できるはずである。

5.4 結言

本研究で発見した低温活性GLDHは、フェロセン誘導体とも電子授受を行うことができ、フェロセンを電子メディエーターとする電気化学反応を起こさせることができる。本

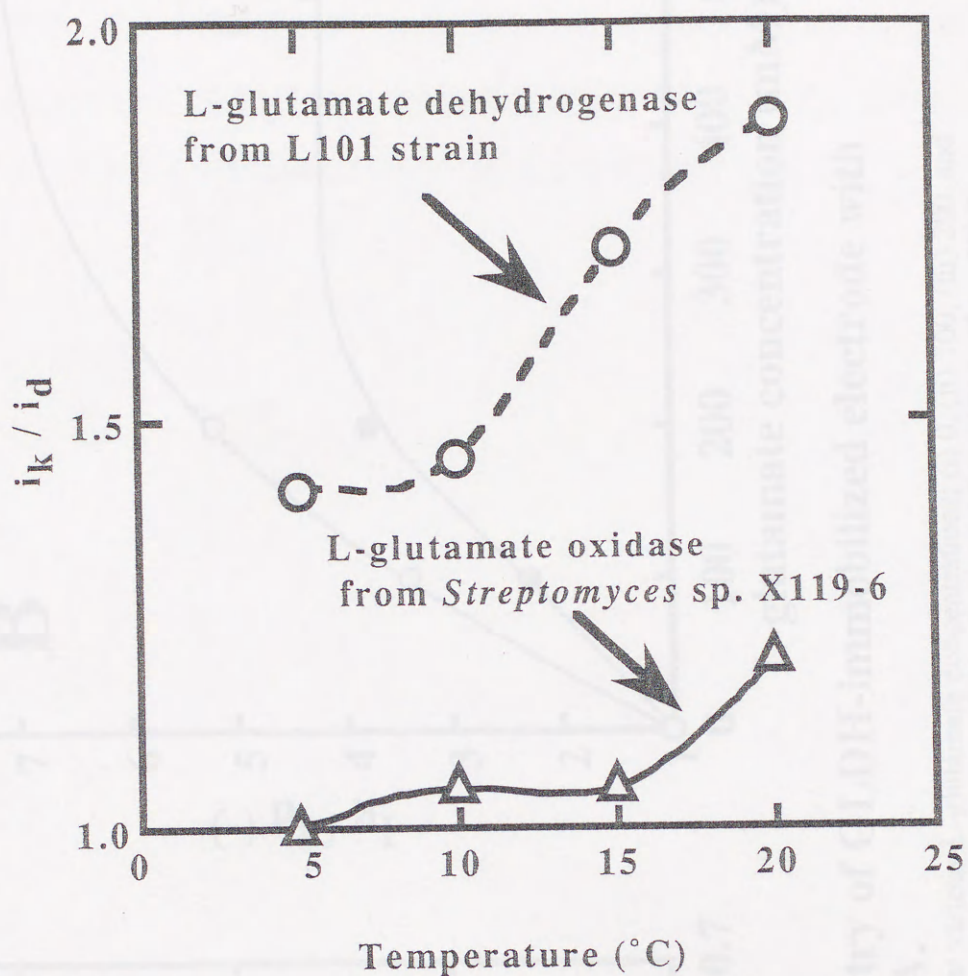


Fig.5-3 Temperature-dependence of catalytic

Substrate : 150mM glutamate

Mediator : 200 μ M 1,1'-ferrocenedimethanol

Scan rate : 1 mV $\cdot$ s⁻¹

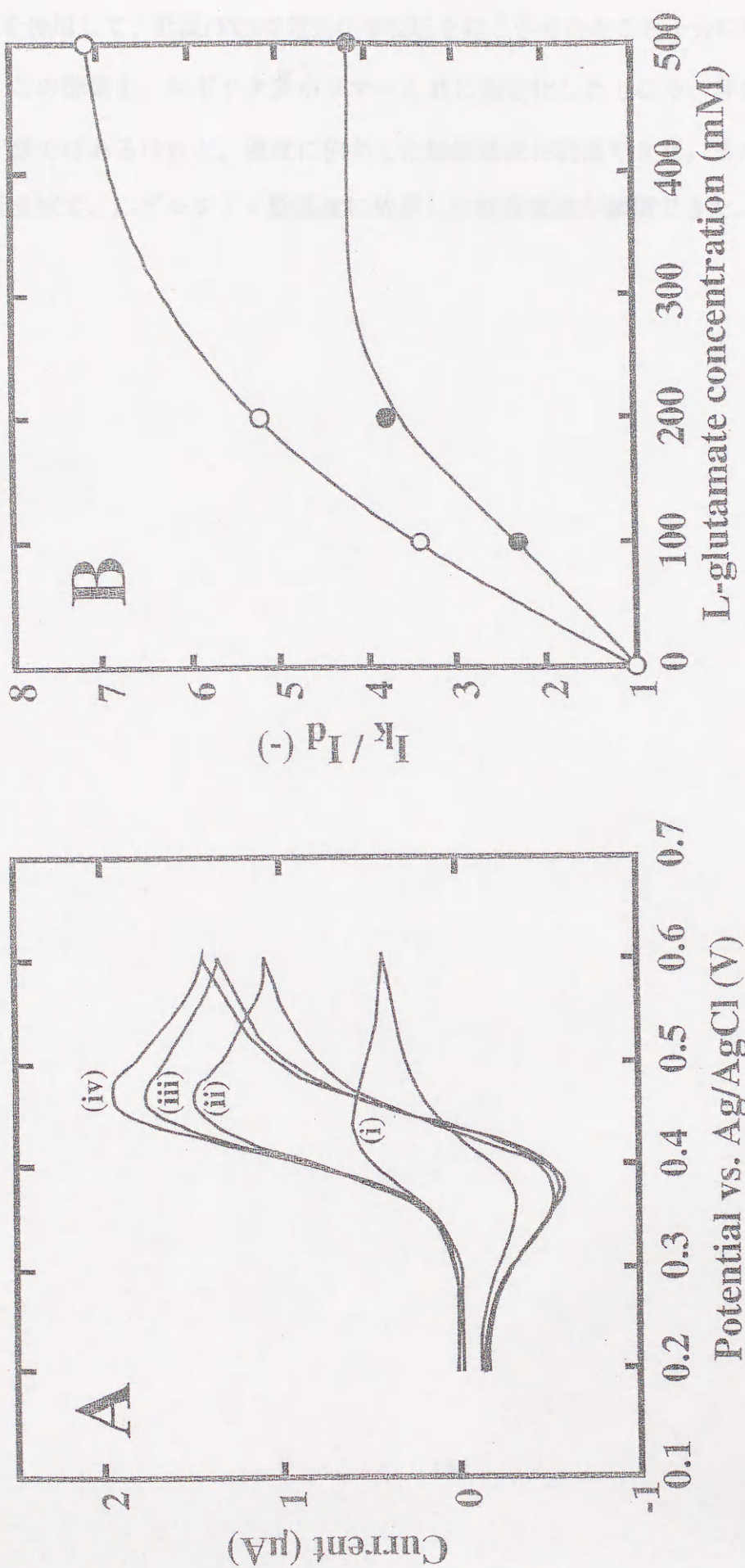


Fig. 5-4 Catalytic electrochemistry of GLDH-immobilized electrode with redox polymer and BSA.

(A): Cyclic voltammograms of enzyme electrode at various L-glutamate concentrations; (i) 0, (ii) 100, (iii) 200, and (iv) 500 mM. Cyclic voltammetry was carried out at scan rate 1mV/s at 5 °C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH9.0). Ratio of the mixture was redox polymer: GLDH: BSA= 1: 1: 5. (B): Correlation between I_k/I_d and L-glutamate concentration at 5 °C (○) and 25 °C (●). I_k is catalytic current, and I_d is redox current without L-glutamate.

GLDHを使用して、低温(5°C)で電気化学反応を起こさせたところ十分に触媒電流が流れた。

また、この酵素を、レドックスポリマーと共に固定化したところ、非常に高濃度のL-グルタミン酸ではあるけれど、濃度に依存した触媒電流が観測できた。また、この固定化電極でも低温域で、L-グルタミン酸濃度に依存した触媒電流が観測できた。

第6章

結論

本研究では、低温細菌から新たにレグルタシン酸デヒドロゲナーゼをスクリーニングし精製して、その特性を調べた低温下で使用するバイオセンサーへの応用を目指して研究を行った。

第2章では、136株の低温細菌を単離し、レグルタシン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)活性をL101株をスクリーニングし、菌株の選定を行った。L101株は、鮎の内臓

から単離された細菌で、15℃を最適増殖温度に持つ低温細菌であった。この細菌は、生化学特性などがVibrionaceae科のAeromonas属に非常に類似しているが、系統解析による

遺伝子解析の結果、Vibrionaceae科のAeromonas schubertii(相関性94%)と非常に近縁であり、オキシド・リダクターゼファミリーのOxidoreductase科のArcticibacterium proterotypicum(相関性95%)、Halobacterium(相関性95%)に近いという、新規属種の細菌であることがわかった。

結論

第3章では、第2章でスクリーニングし選定した新規の低温細菌L101株からGLDHを抽出し精製を行った。新規の低温細菌L101株は、15℃で培養した時が、増殖、GLDH生産量共に一番良いことが明らかになった。この細菌は、細胞を超音波で破砕し、DEAE-Sepharose、硫酸アンモニウム分画、Superdex 200pg、Q-Sepharose、CM-Sepharose、Phenyl-Sepharoseによって、70倍に精製され、Native-PAGEと等電点電気泳動的に単一にまで精製できた。精製された酵素の分子量は約14kDaであり、約34kDaと約78kDaの分子量の異なる2つのサブユニットによって酵素分子が形成される新規のGLDHであることが明らかになった。

第4章では、第3章で精製したGLDHの特性を評価した。精製した新規のGLDHは、最大活性を示す温度が33℃で活性化エネルギーもウシ肝臓由来のGLDHに比べて約90%活性化エネルギーで反応を触媒する低温活性酵素であった。また、pH8.3で最も良い反応が得られ、pH6~11の間で安定に存在した。基質特異性はレグルタシン酸が選択的に反応し、アスパラギン酸、レグルタシンともそれぞれ15%、10%反応した。電子受容体は、酸素、

本研究では、低温細菌から新たにL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼをスクリーニングし精製して、その特性を調べた低温下で利用できるバイオセンサーへの応用を目指して研究を行った。

第2章では、136株の低温細菌を単離し、L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)活性の高い細菌をL101株をスクリーニングし、菌体の同定を行った。L101株は、鮭の内臓から単離された細菌で、15°Cを最適増殖温度に持つ低温細菌であった。この細菌は、生化学特性などがVibrionaceae科のAeromonas属に非常に類似しているが、系統樹作成による遺伝距離はVibrionaceae科のAeromonas schubertii(相同性89%)と非常に離れており、オキシダーゼ陰性のEnterobacteriaceae科のAranicola proteolyticus(相同性96%)、Hafnia alvei(相同性95%)に近いという、新属新種の細菌であることがわかった。

第3章では、第2章でスクリーニングし同定した新規の低温細菌L101株からGLDHを抽出し精製を行った。新規の低温細菌L101株は、15°Cで培養した時が、増殖、GLDH生産量共に一番良いことが明らかになった。この酵素は、細菌を超音波で破碎し、DEAE-Sepharose、硫酸アンモニウム分画、Superdex 200pg、Q-Sepharose、CM-Sepharose、Phenyl-Sepharoseによって、70倍に精製され、Native-PAGEと等電点電気泳動的に単一にまで精製できた。精製された酵素の分子量は約110kDaであり、約34kDaと約76kDaの分子量の異なる2つのサブユニットによって酵素分子が形成される新規のGLDHであることが明らかになった。

第4章では、第3章で精製したGLDHの特性を評価した。精製した新規のGLDHは、最大活性を示す温度が55°Cで活性化エネルギーもウシ肝臓由来のGLDHに比べて約60%活性化エネルギーで反応を触媒する低温活性酵素であった。また、pH8.5で最も高い反応が得られ、pH6~11の間で安定に存在した。基質特異性はL-グルタミン酸が選択的に反応しL-アスパラギン酸、L-グルタミンともそれぞれ15%、10%反応した。電子受容体に、酸素、

NAD⁺、NADP⁺を使用せず、シトクロム c や酸化還元色素を利用するアクセプター型のデヒドロゲナーゼであった。本酵素には1分子あたり1つのヘム b を含有していることが示され、新規のGLDHを発見する事ができた。

第5章では、第3章で精製したGLDHをバイオセンサーへ応用した。新規低温活性GLDHは、フェロセン誘導体とも電子授受を行うことができ、フェロセンを電子メディエーターとする電気化学反応を起こさせることができる。GLDHを使用して、低温(5°C)で電気化学反応を起こさせたところ十分な触媒電流が流れた。また、この酵素を、レドックスポリマーと共に固定化したところ、非常に高濃度のL-グルタミン酸ではあるけれど、濃度に依存した触媒電流が観測できた。また、この固定化電極でも低温域で、L-グルタミン酸濃度に依存した触媒電流が観測できた。

以上本研究では低温環境中から分離した新規低温細菌L101株から、GLDHを精製し、特性を評価し、バイオセンサーに応用した。このGLDHは、ヘムを酵素中に有する全く新規の酵素であった。このため、当初の目的であった常温酵素との構造的な比較は残念ながら行えなかった。しかしながら、この酵素はフェロセン誘導体と良好に低温域においても十分に反応する酵素であるため、低温環境下でモニター可能なバイオセンサーに有効なバイオ素子となる。今後常温細菌、好熱性細菌などからも同じ酵素を得ることができれば、低温でも活発に反応を触媒するという低温活性酵素の構造的特徴を解明する有力な研究材料になることが期待できる。

参考文献

1. Olsiewski, P.J., Kaczorowski, G.J., and Walsh, C. (1980) Purification and properties of D-amono acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 4487-4494.
2. Sharp, R.E., Chapman, S.K., and Reid, G.A. (1996) Deletions in the interdomain hinge region of flavocytochrome b2: effect on intraprotein electron transfer. *Biochem.* **35**, 891-899.
3. Durham, D.R., and Perry, J.J. (1978) Purification and characterization of a heme-containing amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **134**, 837-843.
4. Jong, G.A.H., Caldeira, J., Sun, J., Jongejan, J.A., Vries, S., Loehr, T.M., Moura, I., Moura, J.J.G., and Duine J.A. (1995) Characterization of the interaction between PQQ and heme *c* in the quinohemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem.* **34**, 9451-9458.
5. Falk, J.E. (1964) Porphyrins and metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam.
6. Lemberg, R., and Barrett, J. (1973) The cytochromes. Academic Press, London New York.
7. Yamanaka, T., and Okunuki, K. (1974) Cytochromes. In: Microbial iron metabolism. Academic Press, London New York.
8. Smith, E.L., Austein, B.M., Blumenthal, K.M., and Nyc, J.F. (1975) Glutamate dehydrogenases. In P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes (3rd edition) vol.11A*. Academic Press, New York, 239-367.
9. Venard, R., and Fourcade, A. (1972) Glutamate déshydrogénase de levure spécifique du NADP. *Biochimie (Paris)* **54**, 1381-1389.
10. Neumann, P., Markau, K., and Sund, H. (1976) Studies of glutamate dehydrogenase. Regulation of glutamate dehydrogenase from *Candida utilis* by a pH and temperature-dependent conformational transition. *Eur. J. Biochem.* **65**, 465-472.
11. Kimura, K., Miyakawa, A., Imai, T., and Sasakawa, T. (1977) Glutamate dehydrogase from *Bacillus subtilis* PCI 219. I. Purification and properties. *J. Biochem.* **81**, 467-476.
12. Phibbs, Jr.P.V. and Bernlohr, R.W. (1971) Purification, properties and regulation of glutamic dehydrogenase of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **106**, 375-385.
13. Hemmilä, I.A., and Mäntsälä, P.I. (1978) Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **173**, 45-52.

14. Sakamoto, N., Korte, A.M., and Savageau, M.A. (1975) Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* **124**, 775-783.
15. Glass, T.L., and Hylemon, P.B. (1980) Characterization of a pyridine nucleotide-nonspecific glutamate dehydrogenase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **141**, 1320-1330.
16. Joannou, C.L., and Brown, P.R. (1992) NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* is a membrane-bound enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**, 205-210.
17. Coulton, J.W., and Kapoor, M. (1973) Purification and some properties of the glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Microbiol.* **19**, 427-438.
18. Winnacker, E.L., and Barker, H.A. (1970) Purification and properties of a NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium SB₄*. *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 225-242.
19. Bartholmes, P., and Jaenicke, R. (1968) Glutamatdehydrogenase im photosynthetischen bakterium *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* **60**, 235-245.
20. Chávez, S., and Candau, P. (1991) An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria. Identification and properties. *FEBS Lett.* **285**, 35-38.
21. Yarrison, G., Young, D.W., and Choules, G.L. (1972) Glutamate dehydrogenase from *Mycoplasma laidawii*. *J. Bacteriol.* **110**, 494-503.
22. Pahlich, E., and Joy, K.W. (1971) Glutamate dehydrogenase from pea roots: purification and properties of the enzyme. *Can. J. Biochem.* **49**, 127-138.
23. Bulen, W.A. (1956) *ABB* **62**, 173-.
24. Olson, J.A., and Anfinsen, C.B. (1952) *J. Biol. Chem.* **197**, 67-.
25. Seyama, S., Saeki, T., and Katunuma, N. (1973) Comparison of properties and inducibility of glutamate dehydrogenases in rat kidney and liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **73**, 39-45.
26. Syed, S.E., Engel, P.C., and Parker, D.M. (1991) Functional studies of a glutamate dehydrogenase with known three-dimensional structure: steady-state kinetics of the forward and reverse reactions catalysed by the NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1115**, 123-130.
27. Hudson, R.C., Ruttersmith, L.D., and Daniel, R.M. (1993) Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochim. Biophys. Acta* **1202**, 244-250.
28. Ohshima, T., and Nishida, N. (1993) Purification and properties of extremely thermostable

- glutamate dehydrogenases from two hyperthermophilic archaebacteria, *Pyrococcus woesei* and *Pyrococcus furiosus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 945-951.
29. Maulik, P., and Ghosh, S. (1986) NADPH/NADH-dependent cold-labile glutamate dehydrogenase in *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Biochem.* **155**, 595-602.
 30. Jahns, T. (1992) Occurrence of cold-labile NAD-specific glutamate dehydrogenase in *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**, 187-192.
 31. Jahns, T., and Kaltwasser, H. (1993). Properties of the cold-labile NAD-specific glutamate dehydrogenase from *Bacillus cereus* DSM 31. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 775-780.
 32. Veronese F.M., Nyc, J.F., Degani, Y., Brown, D.M., and Smith, E.L. (1974) Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. I. Purification and molecular properties. *J. Biol. Chem.* **249**, 7922-7928.
 33. Pantaloni D., and Dessen, P. (1969) Glutamate dehydrogenase. Attachment of NAD and NADP coenzymes and other nucleotides derived from adenosine-5'-phosphate *Eur. J. Biochem.* **11**, 510-519.
 34. Jurtshuk, P., and McManus, L. (1974) Non-pyridine nucleotide dependent L-(+)-glutamate oxidoreductase in *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta* **368**, 158-172.
 35. Böhmer, A., Müller, A., Passarge, M., Liebs, P., Honeck, H., and Müller, H.G. (1987) A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus* purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **182**, 327-332.
 36. Rocca, E., and Ghiretti, F. (1958) Purification of properties of D-glutamic acid oxidase from *Otopus vulgaris* Lam.. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 336-349.
 37. Gounot, A.M. (1986) Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia* **42**, 1192-1197.
 38. Margesin, R., and Schinner, F. (1994) Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *J. Biotech.* **33**, 1-14.
 39. Morita, R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **39**, 144-167.
 40. Goldstein, J., Pollitt, N.S., and Inouye, M. (1990) Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 283-287.
 41. Mueller, G.M., McKown, R.L., Corotto, L.V., Hague, C., Warren, G.J., Parody-Morreale, A., Murphy, K.P., Di Cera, E., Fall, R., DeVries, A.L., Gill, S.J. (1991) Inhibition of

- recrystallization in ice by chimeric proteins containing antifreeze domains. *J. Biol. Chem.* **266**, 7339-7344.
42. Lopez-Camacho, C., Salgado, J., Lequerica, J.L., Madarro, A., Ballestar, E., Franco, L., and Polaina, J. (1996) Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase A. *Biochem. J.* **314**, 833-838.
 43. De Filippis, V., De Antoni, F., Frigo, M., Polverino de Laureto, P., and Fontana, A. (1998) Enhanced protein thermostability by Ala-->Aib replacement. *Biochem.* **37**, 1686-1696.
 44. Davail, S., Feller, G., Narinx, E., and Gerday, C. (1994) Cold adaptation of proteins, purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *J. Biol. Chem.* **269**, 17448-17453.
 45. Hamamoto, T., Kanada, M., Horikoshi, K., and Kudo, T. (1994) Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3878-3880.
 46. Morita, Y., Nakamura, T., Hasan, Q., Murakami, Y., Yokoyama, K., and Tamiya, E. (1997) Cold-active enzymes from cold-adapted bacteria. *JAOCs* **74**, 441-444.
 47. Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S., and Shivaji, S. (1992) Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1918-1923.
 48. Voorhorst, W.G., Warner, A., de Vos, W.M., and Siezen, R.J. (1997) Homology modelling of two subtilisin-like proteases from the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus stetteri*. *Protein Eng.* **10**, 905-914.
 49. Arpigny, J.L., Feller, G., and Gerday, C. (1993) Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**, 331-333.
 50. Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F.M., Ottolina, G., Carrea, G., Rossi, M. (1998) Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily. *Biochem. J.* **332**, 203-212.
 51. Feller, G., Lonhienne, T., Deronne, C., Libioulle, C., Beeumen, J.V., and Gerday, C. (1992) Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplantis* A23. *J. Biol. Chem.* **267**, 5217-5221.
 52. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., Haser, R. (1998) Crystal structures of the psychrophilic

alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci.* **7**, 564-572.

53. Trimbur, D.E., Gutshall, K.R., Prema, P., and Brenchley, J.E. (1994) Characterization of a psychrotrophic *Arthrobacter* gene and its cold-active β -galactosidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4544-4552.
54. Rentier, F., Mande, S.C., Moyens, S., Terpstra, P., Mainfroid, V., Goraj, K., Lion, M., Hol, W.G.J., and Martial, J.A. (1993) Cloning and overexpression of the triosephosphate isomerase gene from psychrophilic and thermophilic bacteria structural comparison of the predicted protein sequences. *J. Mol. Biol.* **229**, 85-93.
55. Ishii, A., Imagawa, S., Fukunaga, N., Sasaki, S., Minowa, O., Mizuno, Y., and Shiokawa, H. (1987) Isozyme of isocitrate dehydrogenase from an obligately psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1: purification, and modulation of activities by growth conditions. *J. Biochem.* **102**, 1489-1498.
56. Ishii, A., Suzuki, M., Sahara, T., Takada, Y., Sasaki, S., and Fukunaga, N. (1993) Genes encoding two isocitrate dehydrogenase isozymes of a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Bacteriol.* **175**, 6873-6880.
57. Ochiai, T., Fukunaga, N., and Sasaki, S. (1984) Two structurally different NADP-specific isocitrate dehydrogenases in an obligately psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**, 479-481.
58. Lindsay, J.A., and Creaser, E.H. (1977) Purification and properties of histidinol dehydrogenases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic bacilli. *Biochem. J.* **165**, 247-253.
59. Vckovski, V., Schlatter, D., and Zuber, H. (1990) Structure and function of *L*-lactate dehydrogenases from thermophilic, mesophilic and psychrophilic bacteria, IX. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **371**, 103-110.
60. Zuber, H. (1988) Temperature adaptation of lactate dehydrogenase structural, functional and genetic aspects. *Biophys. Chem.* **29**, 171-179.
61. Tamiya, E., and Karube, I. (1992) Ultramicrobiosensors for monitoring of neurotransmitters. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **672**, 272-277.
62. Tamiya, E., Sugiura, Y., Takeuchi, T., Suzuki, M., and Karube, I. (1993) Ultra micro glutamate sensor using platinized carbon fiber electrode and integrated counter electrode. *Sensor*

and Actuators **8**, 219-228.

63. Tamiya, E., Sugiura, Y., Amou, Y., Karube, I., Kado, R.T., and Ito, M. (1995) Direct monitoring of glutamate released from cerebellar neurons using platinized carbon disk microelectrode modified with glutamate-oxidase-bound membrane. *Sensor & Materials* **7**, 249-260.
64. Wang, A.J., and Arnold, M.A. (1992) Dual-enzyme fiber-optic biosensor for glutamate based on reduced nicotiamide adenine dinucleotide luminescence. *Anal. Chem.* **64**, 1051-1055.
65. Minami, H., Sugawara, M., Odashima, K., and Umezawa, Y. (1991) Ion channel sensors for glutamic acid. *Anal. Chem.* **63**, 2787-2795.
66. Cass, A.E.G., Davis, G., Francis, G.D., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L., and Turner, A.P.F. (1984) Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* **56**, 667-671.
67. D'Costa, E.J., Turner, A.P.F., and Higgins, I.J. (1986) Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors* **2**, 71-87.
68. Higgins, I.J., Aston, W.J., Best, D.J., Turner, A.P.F., Jezequel, S.G., and Hill, H.A.O. (1984) in "Microbial Growth on C1 Compounds" (Crawford, R.L., and Hanson, R.S., eds.), p. 297. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C.
69. Turner, A.P.F., Aston, W.J., Bell, J., Colby, J., Davis, G., Higgins, I.J., and Hill, H.A.O. (1984) *Anal. Chim. Acta* **163**, 161-.
70. Preneta, A.Z. (1987) Studies on lactate oxidizing enzymes and their application to ferrocene-based enzyme electrodes for lactate. *Ph. D. Thesis, Cranfield Institute of Technology*.
71. Dicks, J.M., Aston, W.J., Davis, G., and Turner, A.P.F. (1986) *Anal. Chim. Acta* **182**, 103-.
72. Schneider, B.H. (1987) Biosensor and Bioelectrocatalysis studies of enzymes immobilized on graphite electrode materials. *Ph.D. Thesis, Cranfield Institute of Technology*.
73. Turner, A.P.F. (1988) Amperometric biosensors based on mediator-modified electrodes. *Method in Enzymol.* **137**, 90-103.
74. Feinstein, R. N., and Lindahl, R. (1973) Detection of oxidases on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **56**, 353-360.
75. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

76. Smibert RM, Krieg NR (1981) General Characterization. In: Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiology*. 409-443.
77. Hugh, R., and Leifson, E. (1953) *J. Bacteriol.* **66**, 24-.
78. Neyre, C.A., Döbereiner, J., LaLande, R., and Knowles, R. (1977) *Can. J. Microbiol.* **23**, 695-696.
79. Komagata, K., Iizuka, H., and Takahashi, M. (1965) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **11**, 191-.
80. Bürger, H. (1967) *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* **202**, 97-109.
81. Le Minor, L., and Hamida, F.B. (1962) *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **102**, 267-277.
82. Thornley, M.J. (1960) *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 37-52.
83. Møller, V. (1955) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **36**, 158-172.
84. Sierra, G. (1957) *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **23**, 15-22.
85. Wheeler, D.M. (1955) *J. Gen. Microbiol.* **35**, 13-26.
86. Kobayashi, Enomoto, Sakazaki, and Kuwabara (1963) *Jap. J. Bact.* **18**, 387-.
87. MacConkey, A. (1905) Lactose-fermenting bacteria in feces. *J. Hyg.* **5**, 333-378.
88. Holdeman, L.V., Cato, E.P., and Moore, W.E.C. (ed.) (1977) Identification charts, characterization methods, and media for anaerobic bacteria; describes in detail the preparation and use of prereduced media and culture techniques. *Anaerobe laboratory manual, 4th ed.* Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
89. Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
90. Kaneko, T., Katoh, K., Fujimoto, M., Kumagai, M., Tamaoka, J., and Katayama-Fujimura, Y. (1986) Determination of the nucleotide composition of a deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography of its enzymatic hydrolysate: a review. *J. Microbiol. Methods* **4**, 229-240.
91. Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., and Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4801-4805.
92. Olsen, G. (1988) Phylogenetic analysis using ribosomal RNA. *Methods in Enzymol.* **164**, 793-812.

93. Sankoff, D., Morel, C., and Cedergren, R.J. (1973) Evolution of 5S RNA and non-randomness of base replacements. *Nature New Biology* **245**, 232-234.
94. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
95. Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., and Gerday, C. (1996) Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 189-202.
96. Horn, D.B., and Squire, C.R. (1966) The estimation of ammonia using the indophenol blue reaction. *Clin. Chim. Acta* **14**, 185-194.
97. Op den Camp, H.J., Liem, K.D., Meesters, P., Hermans, J.M., and Van der Drift, C. (1989) Purification and characterization of the NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Bacillus fastidiosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **55**, 303-311.
98. Moyano, E., Cardenas, J., and Munoz-Blanco, J. (1992) Purification and properties of three NAD(P)+ isozymes of L-glutamate dehydrogenase of *Chlamydonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1119**, 63-68.
99. Hamamoto, T., Kaneda, M., Horikoshi, K., and Kudo, T. (1994) Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3878-3880.
100. Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S., and Shivaji, S. (1992) Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1918-1923.
101. Martinez-Bilbao, M., Martinez, A., Urkijo, I., Llama, M.J., and Serra, J. L. (1988) Induction, isolation, and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* **170**, 4897-4902.
102. Yokoyama K., Shibasaki, T. and Murakami, Y. (1996) Electrochemical characterization of enzyme electrodes mediated by ferrocene-containing acrylamide-acrylic acid copolymers. *Denki Kagaku* **64**, 1221-1227.

謝辞

本研究を行うに当たり、適切かつ有意義な助言を与えていただき、終始懇切丁寧な御指導を賜りました北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科、民谷栄一教授、横山憲二助教授に心から感謝致します。さらに、適切な御指導を賜りました北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科阪口利文助手、村上裕二助手に心より感謝致します。最後に、私をいつも助けていただいた、民谷・横山研究室の皆様にも心より感謝致します。



サブテーマ

新規低温細菌由来の脂質の構造解析

【略称】

ある1つの有機化合物の構造を知る上で最も基本的な、また必要なことは、その化合物の正確な分子量や分子式を定めることである。そのための手段として、マススペクトル分析がよく採用されている。そして、多くの場合、マススペクトルからは、分子量や分子式の情報だけでなく、その化合物の構造についてもある程度知られる。有機物のわかっている化合物を対象とする場合には、マススペクトルを使ってごく微量の（例えば10⁻⁹~10⁻¹²g）の物質の定性分析が可能である。したがって、現在、マススペクトルは有機化学を扱う研究において必要不可欠な研究手段の一つであると言っても過言ではない。

本研究では、低温環境下で自然に増殖する低温細菌が、産する脂質の構造を調べた。生物が低温環境で生きていくために、生物は、その体内の生体分子を変化させて、低温環境下で効率よく増殖し生きている。生体分子の低温適合性は、細胞内のタンパク質の構造を助けるコールドショックタンパク質、細胞膜の流動性を保つための脂質、低温で機能する酵素などが現在報告されている。その中で今回は、細胞膜を構成している脂質

サブテーマ指導教官： 辻本 和雄 教授

北陸先端科学技術大学院大学

山村 晃

新規低温細菌由来の脂質の構造解析

サブテーマ教官 辻本 和雄 教授

山村 晃

【概要】

ある1つの有機化合物の構造を知ろうと言う場合に、まず必要なことは、その化合物の正確な分子量や分子式を求めることである。そのための手段として、マススペクトル分析がよく採用されている。そして、多くの場合、マススペクトルからは、分子量や分子式の情報だけでなく、その化合物の構造についての手がかりも得られる。一方構造のわかっている化合物を対象とする場合には、マススペクトルを使つてごく微量の、例えば 10^{-9} ~ 10^{-12} gくらいの物質の定量分析も可能である。したがって、現在、マススペクトルは有機化学を扱う研究においてはなくてはならない研究手段の1つであると言っても過言ではない。

本研究では、低温環境下で良好に増殖する低温細菌が、有する脂質の構造を調べた。生物が低温環境で生きていくために、生物は、その体内の生体分子を変化させて、低温環境下で能率良く増殖し生育している。生体分子の低温適合性は、低温でのタンパク質発現を助けるコールドショックタンパク質、低温でも高い反応性を有する低温酵素、低温でも機能する細胞膜などが現在報告されている。その中で今回は、細胞膜を構成している脂質に注目した。低温細菌由来の脂質の構造を明らかにした報告例は非常に少ないが、常温細菌由来の脂質との違いがRussellらによって明らかにされている。その違いとは、脂肪酸の不飽和度が増加し、脂肪酸の平均長さが減少していることなどと報告されている。

本研究では、脂質を抽出し、リパーゼで加水分解することによって、脂質の構造を決定することを試みた。また、フラグメンテーションによる、構造の解析も試みた。

