

新しいアミノ酸脱水素酵素の開発

—富山県の土壌からの検索（第2報）—

浅野 泰久・種谷 昌子*・堀田 紀子

（生物工学研究センター）

摘要

NAD⁺-関与のアミノ酸脱水素酵素の酵素化学研究および多方面への利用を図ることを目的として、富山県内の土壌サンプル120個について、L-アミノ酸を含む培地で好気的に集積培養を行い、種々のアミノ酸脱水素酵素生産菌を分離した。基本培地としてアルカリ性培地4種類および中性培地5種類を用い、添加するL-アミノ酸として、L-フェニルアラニン、L-リジン、L-トリプトファン、L-イソロイシン、およびL-メチオニンを選択し、それぞれ組み合わせてスクリーニング培地として供した。また、土壌をあらかじめ熱処理する等の選別手法を加えた。その結果、458株の微生物を単離し、すべてについて無細胞抽出液を調製後酵素活性を測定したところ、その内の56株にNAD⁺-関与のアミノ酸脱水素酵素活性を認めた。熱処理をした土壌から、L-イソロイシンおよびL-ロイシンに対して高い活性を示すEI-23およびEI-26株を分離し、それぞれ *Bacillus stearothermophilus*、および *B. brevis* と同定した。また、L-メチオニンを基質とした中性培地から、フェニルアラニン脱水素酵素 (PheDH) 活性を示すグラム陽性のコリネフォルム型桿菌 (DM86-1株) を初めて分離し、*Microbacterium* sp. と同定した。

緒言

我々は、*Bacillus sphaericus*、*B.adius*、および *Sporosarcina ureae* から NAD⁺-依存性のフェニルアラニン脱水素酵素 (EC 1.4.1.20、PheDH) を結晶として得、酵素化学的諸性質を明らかにすると共に、それからの遺伝子クローニングにより一次構造を解明して来た^{1,2)}。また最近、グルタミン酸脱水素酵素の X 線構造解析の結果に基づいて、*B. sphaericus* 由来の PheDH の基質特異性の改変に成功している³⁾。前報では、富山県の土壌に由来する *B. cereus* に初めて PheDH 活性を検出した⁴⁾。これらのアミノ酸脱水素酵素は、 α -ケト酸と L-アミノ酸の間の可逆的な酸化還元

反応を触媒し、 α -ケト酸を原料とする立体選択的な L-アミノ酸の合成に利用することができる。種々の基質特異性を有する酵素を選択することによって多種類の L-アミノ酸の合成が可能になる。また、*B.adius* 由来の PheDH は、フェニルケトン尿症の新生児マスキリーニングの素子として実用化されている^{5,6)}。L-フェニルアラニンに対して、より選択性の高い酵素が得られれば、定量精度の向上が期待できる。また、特異性の異なる酵素が得られれば、現行の定量試薬およびシステムを利用して、各種の L-アミノ酸の微量定量法の開発に道を開くことになる。

今回は、前報に引き続いて、富山県の豊かな自然を分離源として、新しい NAD⁺-依存性アミノ酸脱水素酵素生産微生物を検索した。次のような酵素あるいは生産菌を得ることを念頭に置いた。すなわち、L-リジン、L-トリプトファン、L-メチオニン、L-イソロイシンおよび L-ロイシン等に選択性高く作用する新しいアミノ酸脱水素酵素、好熱性のアミノ酸脱水素酵素、および従来知られていない PheDH 生産菌等である。今回のスクリーニングでは、ロイシン脱水素酵素を生産する好熱性細菌、*Bacillus stearothermophilus* および *B. brevis*、並びに新しい PheDH 生産菌、*Microbacterium* 属細菌の分離に成功したので報告する。

実験方法

1. スクリーニング

(1) スクリーニング用培地

土壌からアミノ酸脱水素酵素産生菌を分離するためのスクリーニング用培地として表1に示す9種類の培地を使用した。

(2) 土壌サンプルの前処理

富山県内より採取した土壌 2～3 g を試験管に取り、シリコン栓を施した後、所定の温度で一定時間加熱した。冷却後、集積培養に供した。前処理の温度および時間は、それぞれ 80°C 15分間、80°C 1時間、55°C 5分間とした。

(3) 集積培養

*富山県バイオテクノロジーセンター

表1 培地一覧

成分等(%)	A	B	B'	C	D	D'	E	F	G
L-アミノ酸	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5
Yeast extract	0.5	0.5	0.5	0.05	0.05	0.05	0.2	0.5	0.5
Meat extract							0.2		
Malt extract				0.05					
Peptone	1.0	0.5	0.5					0.5	0.5
Starch					0.5	0.5	0.5		0.5
Glycerol							0.5		
K ₂ HPO ₄	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
KH ₂ PO ₄							0.1		
NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.01	0.05	0.05
CaCO ₃				0.01	0.02	0.02			0.02
CaCl ₂							0.005		
(NH ₄) ₂ SO ₄				0.2	0.2	0.2			
Na-propionate				0.05	0.02	0.02		0.02	
Na ₂ CO ₃	1.0	1.0						1.0	
pH	9.5	9.5	7.0	7.4	7.3	8.0	7.2	9.8	7.5

各培地を試験管(4 ml, Φ16.5mm)に分注し、その中に適量の土壌サンプルを加えた。これを300rpm、30°C (E培地は50°C)で1日間振盪培養した。次いで培養液10μLを同じ組成の培地4 mlの中に移し、同様の条件で振盪培養した。培養液中の基質の濃度変化をTLC(展開溶媒 n-ブタノール:酢酸:水=4:1:1、発色試験ニンヒドリン)によって確認した。基質濃度の減少または消失が認められた培養液を選別し、同培地組成の固形平板培地に塗抹した後、30°Cで1~2日間培養した。独立して出現したコロニーを選んで斜面培地に釣菌し、30°Cで1~2日間培養した後、保存すると共に酵素実験に用いた。

2. 無細胞抽出液の調製と活性測定法

(1) 無細胞抽出液の調製

各菌株をスクリーニング時と同じ組成の培地に植菌後、30°C (E培地は50°C)で20時間振盪培養し、遠心分離(12,000 × g、10分間、4°C)によって集菌した。菌体は生理食塩水で洗浄した後、0.1mMEDTA、5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し超音波破碎(9 kHz、10分)処理した。遠心分離(14,000 × g、20分間、4°C)により無細胞抽出液を得た。

(2) 活性測定法

酵素活性の測定は表2に示す反応液を用いて、L-アミノ酸の脱水素の際等モル生成するNADHを340nmにおける吸光変化で測定(ε=6,220M⁻¹·cm⁻¹)し、酵素活性を算出した。1分間に1 μmolの基質を変化

させ得る酵素量を1単位(U)とした。各菌の酵素活性は、菌の分離に用いたL-アミノ酸をそれぞれ基質として測定した。

表2 活性測定の反応液1 mlの組成

グリシン-KCl-KOH (pH10.4)	100μmol
NAD ⁺	2.5μmol
基質(L-アミノ酸)	10μmol
酵素液	0.1~0.2ml
蒸留水	適量

実験結果

1. スクリーニング

土壌サンプル120種を分離源として、A~Gの9種類の培地で集積培養を行い、458菌株を単離した。すべてについて無細胞抽出液を調製し酵素活性を測定したところ、56菌株にアミノ酸脱水素酵素活性を認めた(表3)。

A培地にL-フェニルアラニンを加えて得た活性菌は、グラム染色、コロニー観察、および顕微鏡観察により、孢子形成能を有するグラム陽性桿菌、*Bacillus*属細菌と判定された。L-リジン、あるいはL-トリプトファンを含むA培地によるスクリーニングでは、活性を示す菌数はわずかであった。またそれらの活性は弱く、透析に対して不安定であった。

C培地では、土壌の熱処理を行い、*Bacillus*属以外の孢子形成菌を得ることを期待したが、アミノ酸脱水素酵素活性を示す菌は、いずれも*Bacillus*属細菌と判定される孢子形成能を有するグラム陽性桿菌であった。

D培地(pH7.3)は、炭素源としてデンプンを加えた放線菌分離用培地に近い組成の培地である。平板培地ではカビの育成が早く、多くの細菌の単菌化が困難であったので、スクリーニングの効率が悪かった。そこで、アルカリ性のD'培地(pH8.0)によるスクリーニングを試みたが、D、D'培地ともに活性を示す菌は得られなかった。

E培地は好熱菌の分離を目的とした培地であるが、PheDHの活性菌は得られず、ロイシン脱水素酵素と思われる活性を示す菌を分離することができた。

F培地によるスクリーニングでは、L-メチオニンの資化菌を分離できたが、L-メチオニンに対する活性は微弱であった。

G培地は、デンプンを炭素源とする中性培地で、L-メチオニン、およびL-フェニルアラニンに活性を有する菌の分離を目的とした。

表3 スクリーニング用培地、土壌サンプルの前処理、培養条件、分離菌株および活性菌の出現状況

培地	土壌サンプル	前処理	基質	培養条件	分離菌	活性菌
A	No.1~57	無し	L-Phe	30°C 振盪	25	5
			L-Lys		57	1
			L-Trp		32	1
B	No.1~5	80°C 15min	L-Phe	30°C 振盪	34	5
B'	No.1~5	80°C 15min	L-Phe	30°C 振盪	28	4
C	No.1~25	80°C 15min	L-Phe	30°C 振盪	45	6
D	No.1~20	無し	L-Phe	30°C 振盪	14	0
			L-Ile		7	0
D'	No.1~20	無し	L-Phe	30°C 振盪	14	0
			L-Ile		3	0
E	No.11~40	55°C 5 day	L-Phe	50°C 振盪	14	0
			L-Ile		11	7
F	No.1~120	無し	L-Met	30°C 振盪	93	12
G	No.81~120	無し	L-Met	30°C 振盪	64	7
			L-Phe		44	8
計					458	56

2. アミノ酸脱水素酵素活性を示した菌株

(1) A 培地により分離された活性菌

分離された114菌株の中、活性を有した菌は7株であった(表4)。

(2) E 培地により分離された活性菌

本培地は、大島らによって好熱性放線菌の分離に用いられた培地であり⁷⁾、好熱性菌あるいは耐熱性菌の分離が期待された。培地に加える基質としてL-フェニルアラニンまたはL-イソロイシンを用いたところ、L-イソロイシンに活性を示す菌が7株分離された。L-イソロイシンに活性を示した7菌株の無細胞抽出液についてL-ロイシンを基質とした活性を測定したところ、両基質に対する活性値はほぼ同等の値を示した。これらの酵素を精製しないかぎり明言できないが、L-イソロイシンに特異的な酵素は含まれていないと考えた(表5)。これらの菌の内、耐熱性が高いEI-23株およびEI-26株の2株を選び菌学的な同定を行った。

(3) F 培地により分離された活性菌

単離された12菌株についてL-メチオニンあるいはL-フェニルアラニンを基質とする脱水素酵素活性の有無を確認した。これらの菌は、いずれもL-メチオニンに対する活性が1~3 U/Lと低い値しか示さなかったが、M78株(34U/L)やM81-2株(45U/L)の様に比較的高いPheDH活性を示す菌を分離することができた。

(4) G 培地により分離された活性菌

G 培地の基質にはL-フェニルアラニンとL-メチオ

表4 A培地による分離菌の培地1ℓ当たりの活性値と諸性質

菌株	基質	酵素活性(U/L)	諸性質
AP1	L-Phe	40	有孢子桿菌グラム(+)
AP2	L-Phe	61	同上
AP13	L-Phe	17	同上
AP18	L-Phe	24	同上
AP19	L-Phe	11	同上
AP20	L-Lys	9.0	不明
AT6	L-Trp	3.5	不明

表5 E培地による分離菌の培地1ℓ当たりの活性値

菌株 No.	酵素活性		活性 イソロイシン/ロイシン
	L-イソロイシン(U/L)	L-ロイシン(U/L)	
EI 18	9.4	9.3	1.0
EI 20	26	19	1.4
EI 22	13	13	1.0
EI 23	67	68	1.0
EI 26	25	22	1.1
EI 27	8.8	12	0.73
EI 29	11	11	1.0

ニンを用い、両者に対する活性を有する菌の分離を目的としたスクリーニングを行った。L-フェニルアラニンを基質とした場合は7菌株の活性菌を分離することができた。これらの菌は、L-メチオニンに対する活性が、やはり1~3 U/Lと低かったが、L-メチオニンで選別した菌株中には、DM81-2株(16U/L)やDM86-1株(22U/L)の様に比較的高いPheDH活性を示す

菌を分離することができた。上記の中、L-フェニルアラニンに対する活性値の高い DM86-1株 (22U/L) の様に比較的高い PheDH 活性を示す菌が分離できた。上記の中、L-フェニルアラニンに対する活性値の高い DM86-1株について菌学的同定を行った。

3. 菌株の同定

常法⁹⁾および Bergy's Manual of Systematic Bacteriology⁹⁾に従って、以下の菌学的同定を行った。

(1) EI-23株

EI-23株は、EI-26株と共に、あらかじめ土壌を55°Cにて5日間加熱した後、L-イソロイシンを含む pH7.2 の中性の E 培地で50°Cで集積培養を行った結果得られた菌である。いずれも L-イソロイシンの要求性が認められたので、0.3%の L-イソロイシンを含む培地ですべての同定実験を行った。EI-23株は、好気性のグラム不定性桿菌であり、顕微鏡観察により孢子形成が認められることから *Bacillus* 属に属する。さらに本菌は、60°Cまでの生育が認められた。運動性なし。楕円孢子形成能を有し、孢子囊のふくらみが認められた。孢子は周辺に位置する。カタラーゼ陽性、D-グルコースから酸およびガスを生成しない。Egg-yolk 反応および VP 反応は陰性である。チロシン分解が認められ、カゼイン分解は認められない。このように、EI-23株は60°Cまでの生育、楕円孢子形成能、孢子囊のふくらみが認められることから、*B. stearothermophilus* に非常に近い菌種であると同定した。しかしながら、*B. stearothermophilus* として65°Cまでの生育が認められないことは例外的である。本菌の上記性質および他の諸性質をまとめて表6にまとめた。

(2) EI-26株

EI-26株は、好気性のグラム陰性桿菌であり、顕微鏡観察により孢子形成が認められることから *Bacillus* 属に属するものと考えられる。さらに本菌は、55°Cまでの生育が認められる。楕円あるいは円形の孢子形成能および運動性を有し、孢子囊のふくらみが認められる。孢子は周辺側に位置する。カタラーゼ陽性、D-グルコースから酸およびガスを生成しない。Egg-yolk 反応および VP 反応が陰性である。カゼイン分解は認められるが、チロシン分解は認められない。以上の性質から、EI-26株を *Bacillus brevis* と同定した。本菌の上記性質および他のデータをまとめて表6にまとめた。

(3) DM86-1株

DM86-1株は、土壌を加熱せず、L-メチオニンを含む pH7.5 の中性の G 培地で、30°Cで集積培養を行った結果得られた菌である。DM86-1株は、運動性を有し、

表6 EI-23およびEI-26株の同定

観察項目	EI-23	EI-26
a) 形態		
1 細胞の型	桿菌	桿菌
2 多形成の有無	—	—
3 運動性の有無	—	+
4 孢子の有無	+	+
形状	楕円	楕円
5 グラム染色	Variable	—
b) 各培地における生育状況		
1 肉汁寒天平板培養における生育状態 (50°C, 3日間)	(50°C, 3日間)	(50°C, 3日間)
イ) コロニーの形状(直径)	3~4 mm	3~4 mm
ロ) コロニーの形	円形	粗円形
ハ) コロニー表面の形状	平滑	平滑
ニ) コロニーの隆起状態	平面	平面
ホ) コロニーの色調	淡黄色	淡黄色
ヘ) コロニーの透明度	不透明	不透明
ト) コロニーの光沢	なし	なし
2 リトマスミルク(30°C, 3日間)	還元	凝固
3 細胞内孢子	—	—
4 嫌氣的生育	—	—
c) 生理学的性質		
1 硝酸塩の還元	—	—
2 VP	—	—
3 オキシダーゼ	+	+
4 カタラーゼ	+	+
5 生育の範囲		
イ) pH5.7における生育	—	—
ロ) 温度	~60°C	~55°C
6 O-Fテスト(グルコース)	ND	ND
7 D-グルコースからの酸	—	—
ガスの生成	—	—
8 耐塩性		
3%	+	—
5%	—	—
7%	—	—
10%	ND	ND
9 Egg-yolk反応	生育せず	生育せず
10 デンプンの加水分解	+	—
11 カゼインの分解性	—	+
12 チロシンの分解性	+	—
13 ゼラチンの分解性	ND	ND
14 Arginine dihydrolase	ND	ND
15 Dextrose azideにおける生育	—	—
16 DNase	—	+
17 Aesculin	—	—

孢子形成能を有さない好気性のグラム可変性のコリネフォルム型桿菌である。本菌は、カタラーゼおよびオキシダーゼ陽性である。細胞壁分析により、ミコール酸は認められず、ジアミノ酸はリジンである。分岐のあるイソおよびアンテイソ型脂肪酸が認められた。以上の性質から、DM86-1株を *Microbacterium* sp. と同

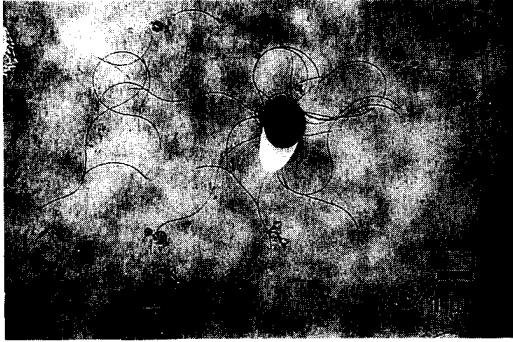


図1 DM86-1株の電子顕微鏡写真

定した。本菌の電子顕微鏡写真を図1に示す。

考察

筆者らは、前報に引き続いて、富山県内の土壌120種を分離源として、微生物の生産するアミノ酸脱水素酵素を検出した。基本培地としてアルカリ性培地4種類および中性培地5種類を用い、添加するL-アミノ酸として、L-フェニルアラニン、L-リジン、L-トリプトファン、L-イソロイシン、および、L-メチオニンを選択し、それぞれを組み合わせるスクリーニング培地として供した。単離した458株すべてについて無細胞抽出液を調製し、酵素活性を測定したところ、56株にNAD⁺-関与のアミノ酸脱水素酵素活性を認めた。このデータはかなり高率である。この理由として、TLCによるアミノ酸の減少を確認してあらかじめ一次選別を行ったこと、およびアルカリ性培地や土壌の熱処理による選別が、アミノ酸脱水素酵素活性が比較的広く分布している *Bacillus* 属細菌を優先的に残存させたこと等が考えられる。事実、アルカリ性培地を用いて分離される活性株は、ほぼすべてが有孢子グラム陽性桿菌である *Bacillus* 属細菌と判定された。土壌の熱処理を行った後、中性培地による集積培地を行い、*Bacillus* 属以外の有孢子細菌の分離を試みたが、顕著な活性を示す菌は見い出せなかった。また、L-リジンおよびL-トリプトファンに作用する脱水素酵素を強力に生産する微生物を見い出すことはできなかった。本報告では、好熱性のロイシン脱水素酵素生産菌を選び、*Bacillus stearothermophilus* および *B. brevis* と同定した。なお、*B. stearothermophilus*¹⁰⁾ および *B. brevis*¹¹⁾ については、すでにそれらが生産するロイシン脱水素酵素の性質についての報告がなされている。また、PheDH 生産菌として、*Microbacterium* 属細菌を同定した。*Microbacterium* 属細菌に PheDH 脱水素酵素活性を認めたのは、

本報告が初めてである。

参考文献

- 1) 浅野泰久, 日本農芸化学会誌, 65, 1617~1626 (1991)
- 2) Yamada A., Dairi T., Ohno Y., Huang X.-L., Aasano Y., *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1994~1995 (1995)
- 3) Seah S. Y. K., Britton K. L., Baker P. J., Rice D. W., Asano Y., Engel P. C., *FEBS Letters* 370, 93~96 (1995)
- 4) 黄新立, 浅野泰久, 富山県立大学紀要, 4, 211~215 (1994)
- 5) Asano Y., Nakazawa A., Endo K., Hibino Y., Ohmori M., Numao N., Kondo K. *Eur. J. Biochem.*, 168, 153~159 (1987)
- 6) Naruse H., Ohashi Y. Y., Tsuji A., Mæda M., Nakamura K., Fujii T., Yamaguchi A., Matsumoto M., Shibata M. *Screening*, 1, 63~66 (1992)
- 7) Takada H., Yoshimura T., Ohshima T., Esaki N., Soda K. *J. Biochem.* (Tokyo) 109, 371~376 (1991)
- 8) 長谷川武治, 微生物の分類と同定 (学会出版センター) (1975)
- 9) Sneath P. H. A., Mair N. S. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1104~1138 (1986)
- 10) Nagata S., Tanizawa K., Esaki N., Sakamoto Y., Ohshima T., Tanaka H., Soda K. *Biochemistry*, 27, 9056~9062 (1988)
- 11) Schütte H., Hummel, W., Tsai H., Kula, M. -R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 306-317 (1985)

Screening for New Amino Acid Dehydrogenases —Soil of Toyama Prefecture as a Source of Microorganisms (II)—

Yasuhisa ASANO, Masako TANETANI* and Noriko HORITA

Biotechnology Research Center

We screened for new NAD⁺-dependent amino acid dehydrogenases, from soil of Toyama Prefecture. Various medium were used with a supplement of one of each of L-phenylalanine, L-lysine, L-tryptophan, L-isoleucine, or L-methionine. Some of the soil samples were preheated. Four hundred and fifty-eight strains were isolated from 120 soil samples. Fifty-six producers were found to have an activity of NAD⁺-dependent amino acid dehydrogenase. Producers of isoleucine and leucine dehydrogenases were isolated and identified as *Bacillus stearothermophilus* and *B. brevis*, respectively. *Microbacterium* sp. was isolated and identified as a producer of phenylalanine dehydrogenase, by using a neutral medium containing L-methionine.

Key words: phenylalanine dehydrogenase, leucine dehydrogenase, *Microbacterium* sp., *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus brevis*

* Toyama Biotechnology Center