

## 海洋性真核微生物ヤブレッツボカビ類が産生する過酸化水素除去タンパクの生産

宮崎大学農学研究科 ○岡戸遊、宮崎大学農学部海洋生物環境学科 林雅弘・田岡洋介

### 【目的】

過酸化水素は様々な産業において殺菌・洗浄・漂白等に利用されており、利用後の排水に残存している過酸化水素の分解には酵素であるカタラーゼが使用されている。過酸化水素の具体的な利用分野としては、半導体産業、パルプ産業、食品産業、循環水槽や温泉などにおける殺菌等があげられる。カタラーゼは動植物、微生物など好気性の生物がもつ酵素であり、過酸化水素を水と酸素に分解する。カタラーゼ生産に於いて、既に実用化されているものには、原核微生物である *Micrococcus* や真菌である *Aspergillus* 由来のものが汎用されているが、例えば前者の場合、①カタラーゼを精製するためには強固な菌体を破壊しなければならない。②精製の際に夾雑タンパク質が多く完全な精製が容易ではない、等の課題があるのが現状である。本研究では、新規カタラーゼ生産生物として海洋性真核微生物であるヤブレッツボカビに着目した。ヤブレッツボカビ類は、油糧微生物と言われ、その細胞内に著量のドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸を含有していることが特徴である。高度不飽和脂肪酸などの二重結合を有した脂肪酸は活性酸素による酸化を受けやすいため、発表者らは、ヤブレッツボカビはその生命を維持するために高度な活性酸素除去機構を有していると推定した。ヤブレッツボカビ類のカタラーゼに関する研究報告は皆無であるため、本研究では、ヤブレッツボカビを新規のカタラーゼ生産菌として利用することを目的とし、細胞内のカタラーゼ活性の評価を行った。

### 【材料と方法】

ヤブレッツボカビ類 22 株を供試株として用いた。3%過酸化水素水を用いて定性的に細胞内のカタラーゼ活性を評価するとともに、細胞内のカタラーゼ活性の定量的評価は、細胞内粗酵素抽出液を用いて行った。培養菌体を Washing Buffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub> [pH 8.0]) 中で破碎し、これを粗酵素抽出液とした。カタラーゼ活性は Ichise et al., (2008) の方法に従い測定し、粗酵素抽出液に含まれるタンパク質 1 mg 当りのカタラーゼ活性に換算した。試験管内で培養試験を行い、ヤブレッツボカビ間でのカタラーゼ活性の強弱を比較するとともに、増殖能力が高い *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 株を用いて種々の条件下で液体培養試験を行い、カタラーゼ活性に与えるファクター (培養時間、細胞形態、過酸化水素の培地添加等) を検証した。

### 【結果とまとめ】

- ① 3%カタラーゼ試験：供試 22 株全ての株でカタラーゼ陽性を示した *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 株では反応が極端に弱かった。
- ② カタラーゼ活性の経時的変化：培養に伴い mh0186 株のカタラーゼ活性はドラスティッ

クに変化したが、培地中のグルコースが枯渇した後の飢餓条件下において、活性が高まる傾向がみられた。

③ 栄養細胞と遊走細胞

mh0186 株の場合、栄養細胞の活性値 7179Unit と比較して、遊走細胞は 21229Unit であり、有意に高い値を示した。

④ 過酸化水素添加試験

3mM の過酸化水素の添加により、mh0186 株のカタラーゼ活性は添加直後に著しく増加し、添加 8 時間後には未添加と比較して 5.7 倍の活性値を示した。

【今後の展望】

- ・ カタラーゼ生産菌として用いられている *Micrococcus* 属といった微生物よりもヤブレットボカビ類は細胞破砕が容易で、酵素タンパクの抽出効率が向上する。
- ・ また原核生物は基本的に二分裂による細胞分裂での生活環を有しているが、ヤブレットボカビ類の場合、遊走細胞を選択的に回収することで高活性の酵素タンパクを回収できる。
- ・ 過酸化水素を培地に添加することにより、カタラーゼ活性の促進が可能。

【本技術に関する知的財産権】

発明の名称：ヤブレットボカビ類を用いたカタラーゼ活性を有するタンパク質の製造方法

出願番号：特願 2014-023848

出願人：宮崎大学

発明者：田岡洋介、岡戸ゆう、林雅弘