

新規なフィターゼ生産菌のスクリーニング

生命分子化学講座 応用菌学

関口 幸恵

【背景と目的】 フィチン酸は、イノシトール環に6つのリン酸基が結合した物質で、植物中の主なリンの貯蓄形態である。フィターゼは、フィチン酸のリン酸基を段階的に遊離する酵素で、飼料添加物として有用である。現在知られている多くのフィターゼがフィチン酸からエクアトリアル位にある5つのリン酸基のみを遊離し、アキシアル位にある2位のリン酸基を残したmyo-inositol 2-monophosphateを最終産物としており、6つのリン酸基を完全に遊離したイノシトールを最終産物とするフィターゼは酵母(*Debaryomyces castellii* CBS 2923及び*Schwanniomyces castellii* CBS 2863)からのみ報告されている。そこで本研究では、イノシトールを最終産物とするフィターゼの生産細菌を土壌から単離し、そのフィターゼについて生産の特徴付けと精製を行った。

【方法と結果】 フィチン酸を唯一の炭素及びリン源とした改変最少培地を用いた集積培養によって、土壌試料から候補株を81株単離した。単離株について、改変最少培地中での生育と、培養上清及び菌体を粗酵素とした場合のフィターゼ活性を指標とした選抜を行った。その結果、9-3B、9-4A、10-3A、10-4B株が高い生育と高いフィターゼ活性を持っていた。この4株について、菌体破碎液の可溶性画分を粗酵素としてフィチン酸と反応させたところ、イノシトール生産が確認されたことから、これらの単離株が生産するフィターゼの最終産物はイノシトールであることが示唆された。これらの単離株について、16S rRNAの塩基配列を決定し簡易同定を行ったところ、9-3B及び9-4A株は*Klebsiella pneumoniae*、10-3A及び10-4B株は*Enterobacter aerogenes*であった。

改変最少培地での生育、及びフィターゼ活性が最も高かった9-3B株について詳しく生育を調べた結果、9-3B株はフィチン酸を0.17 M含んだ改変最少培地で最も高い生育を示し、24時間培養後も培地のpHはほとんど変化しなかった。また、炭素源をイノシトール、リン源を Na_2HPO_4 と KH_2PO_4 とした最少培地で9-3B株を培養したところ、フィターゼ活性及びイノシトール生産は確認されず、9-3B株のフィターゼの発現はフィチン酸によって誘導されることが分かった。9-3B株のフィターゼは、40-80%飽和硫酸アンモニウム沈殿、疎水性相互作用クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーによって、フィターゼ活性で約57倍、イノシトール生成活性で約14倍に精製され、目的タンパク質の等電点はpH7.5以上、分子量は約45 kDaであることが分かった。