

3

技術発表

### 3.5 2023 年度実験・実習技術研究会

#### 発表

題 目：ガラスビーズ破砕法を用いたパン酵母由来アルコールデヒドロゲナーゼの抽出  
方法の改善

所属・氏名：化学電気系グループ 中池 由美

# ガラスビーズ破碎法を用いたパン酵母由来アルコールデヒドロゲナーゼの抽出方法の改善

○中池 由美<sup>a)</sup>、鍵和田 聡<sup>b)</sup>

<sup>a)</sup>京都大学大学院 工学研究科 技術部、<sup>b)</sup>奈良女子大学 研究院自然科学系生物科学領域

## 1. 緒言

京都大学工学部工業化学科3回生の必修科目である学生実験では、分析化学、物理化学、有機化学、無機化学、生物化学の実験を行っている。本発表では、生物化学実験で行っているアルコールデヒドロゲナーゼ（以後、ADH）の活性に関する実験を取り上げ、これまで学生実験で行う上で生じた課題とその改善方法について検討したので報告する。

ADHの実験は、学生実験でよく取り扱われるテーマである。本実験では、ADHによるエタノールの脱水素反応速度を求め、続けて種々のアルコールを用いて酵素の基質特異性の特性に関する実験を行っている。市販のADHを使用するのではなく、身近な材料であるパン酵母からタンパク質抽出液を調製して使用しており、ADH活性を評価したところ、これまで非常に低いADH活性しか示さないことが度々生じていた。この原因について我々は、2点に注目した。一つは、パン酵母の品質低下の可能性である。学生実験では、生イーストを用いている。生イーストは一般にドライイーストに比べて活性が高いと言われているが、その反面保存はきかず、冷蔵保存下で一週間程度しか持たないほど品質管理が難しい。もう一つは、タンパク質抽出液の調製方法である。これは、同じロットの酵母培養液を用いた場合でも、各学生にタンパク抽出をさせたところ、ADH活性が出たり出なかったりすることがあったことから原因の一つとして考えられる。そこで、我々は本実験により適したタンパク質抽出方法の探索と、生イーストからドライイーストへの適用を目的に検討した。

## 2. タンパク質抽出法の検討

はじめに、タンパク質抽出方法の影響について調べた。生イーストをスクロース水溶液に懸濁させ40℃で1時間振盪させた。この培養液(500μL)に精製水(500μL)を加えて懸濁したあと、遠心分離し菌体を集めた。この菌体を用いて酵母抽出液を調製した。抽出方法として4つを選択した。すなわち、これまで学生実験で実施しているThermo Fischer製のYeast Protein Extraction Reagent(以下Y-PER)を用いる「Y-PER法」と、界面活性剤TritonX-100を用いた「界面活性剤存在下での凍結融解法(以下Freeze-Thaw法)」を検討した。さらに穏和な抽出方法として、三菱商事ライフサイエンス製Zymolyaseを用いた「酵素消化法(以下Zymolyase法)」、より強力な抽出法として「ガラスビーズによる破碎法(以下、Beads法)」を選択した。各方法で菌体を処理した後、遠心分離し、上澄み液を回収することによってタンパク質抽出液を得た。得られた抽出液中のADH活性は、補酵素NAD<sup>+</sup>共存下、エタノールとADH反応によって生じるNADHの吸光度の変化を紫外可視分光器で測定し、アルコールの酸化反応速度を求めることにより評価した。その結果を図1に示す。Y-PER法で行ったところ、反応速度は $14.1 \times 10^{-7} \text{ M/s}$ であった(図1, Y-PER)。一方、Freeze-Thaw法では、ほぼ反応の進行は見られなかった(Freeze-Thaw-s)。そこで、遠心分離した際の沈澱を用いて活性を測定したところ、中程度の活性が見られた(Freeze-Thaw-p)。この結果から、Freeze-Thaw法で活性が見られなかったのは、プロテアーゼなどによってADHが失活したのではなく、十分に細胞壁や細胞膜が分解されておらず、遠心分離した際にADHが細胞膜とともに沈澱したためだと考えられる。Zymolyase法により調製した場合、Y-PER法のサンプルより反応速度が約1.5倍上昇した(Zymolyase)。一般にガラスビーズによる破碎法は簡便な方法である一方、酵素が失活したり、ビーズに吸着し活性の低下が見られることがしばしばある。しかし本実験で検討してみたところ、最も高い活性を示すことが明らかとなった(Beads)。

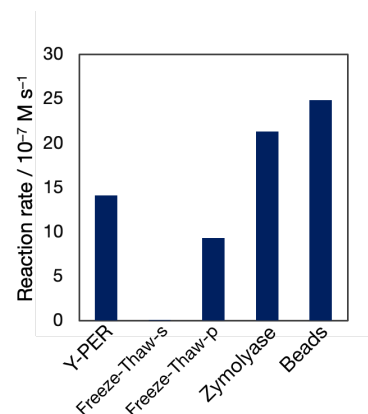


図1 各方法により調製した抽出液中のADHによるエタノール酸化反応速度の比較

Freeze-Thaw-s, -p はそれぞれ凍結融解処理後の上澄み液、沈澱を示す

### 3. イーストの検討

次に生イーストの品質管理の課題を解決するためドライイーストの本実験への適用を検討した。本学生実験は120名もの学生が受講しており、設備の制約から数カ月に渡って十数人ずつ順番に実施している。酵母のコンタミネーションや品質低下によるADH活性の低下が懸念されたため、実施期間中に何度も生イーストを購入しなおす必要があった。ドライイーストを代用できれば、よりイーストの管理が簡便になり、安定した実験運営ができると考えられる。本実験では厳密にはセミドライイースト（以下ドライイーストと記す）を用いた。一般に生イーストの水分量は70%に対してドライイーストは10%程度であることから、ドライイーストは生イーストに対して単位重量あたり3倍量の菌体が含まれていると考えられる<sup>[1,2]</sup>。ドライイースト製造時に生じる菌体の死滅も考慮し、本実験では、生イーストに対して、重量比0.5のドライイーストを用いた。タンパク質抽出液は、Y-PER法とBeads法を用いて調製した。その結果、ドライイーストを用いても同程度のADH活性が見られることが明らかになった（図2）。

### 4. 基質特異性に関する検討

生イーストとドライイーストからBeads法で調製したタンパク質抽出液を用いて、アルコールに対する基質特異性の影響を調べた<sup>[3]</sup>。アルコールとして、エタノール（EtOH）の他に1-ブタノール（*n*-BuOH）と2-プロパノール（*i*-PrOH）を選択した。その結果、EtOH、*n*-BuOH、*i*-PrOHの順に反応速度の低下が見られ、*i*-PrOHに至っては、EtOHの5分の1まで減少した。この傾向はドライイーストを用いた場合でも高い再現性が確認できた（図3）。

### 5. 結言

以上のように、アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）活性評価の実験において、タンパク質抽出方法とパン酵母の種類を検討した。その結果、ガラスビーズを用いた細胞破碎法が最も高いADH活性を示す抽出法であることがわかった。さらに、本実験では低コストかつ管理が容易なドライイーストの利用が可能であることを明らかにした。従来の「生イースト、Y-PER法」の組み合わせから、「ドライイースト、Beads法」に変更することにより、高いADH活性の発現に加えて、処理時間を1/10に短縮でき、さらに実験費用を1/10以下に抑えられることがわかった（図4）。本実験結果は、生物化学実験でよく用いられるADH活性評価の実験テーマにおいて、高効率かつ管理が容易な新しい実験プロトコルを提案するものであり、大学における学生実験運営において有用な知見を与えるものである。

### 参考文献

- [1] Karimi, K. et al. *Food and Bioproducts Processing*, **2012**, 90, 52–57.
- [2] 辻調グループ HP <https://www.tsuji.ac.jp/column/cat661/post-334.html>
- [3] Plapp, B. V. et al. *Biochemistry*, **2014**, 53, 5791–5803.

### 謝辞

本実験を行うにあたり、京都大学工学部工業化学科（令和6年度より理工化学科）の先端化学実験を受講してきた学生のデータを参考にさせていただきました。本実験の担当教員および関係者に感謝申し上げます。

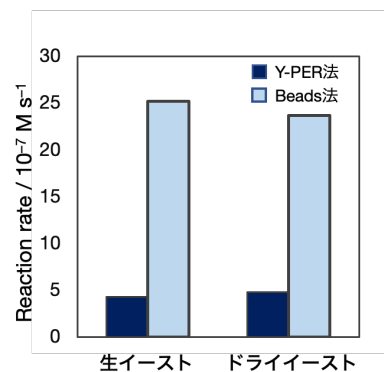


図2 生イーストとドライイーストを用いたADHによるエタノール酸化反応速度の比較

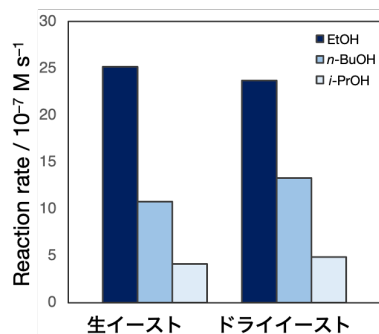


図3 生イーストとドライイーストを用いたADHの基質特異性の比較

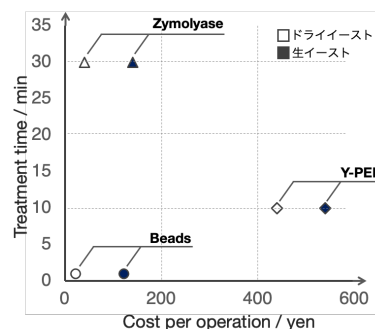


図4 各タンパク抽出方法に必要な処理時間（縦軸）と実験コスト（横軸）