

講演番号：4C05-08

質疑応答日時、会場：3月18日 11:00～ ミーティングルーム C

乳酸センサ用フラビン依存性乳酸デヒドロゲナーゼの探索および特性評価

Screening and characterization of flavin-dependent lactate dehydrogenase for lactate sensor

○鈴木 遼太、鉺 陽介、一柳 敦 (キッコーマン 研開本部)

○Ryota SUZUKI, Yosuke MASAKARI, Atsushi ICHIYANAGI (Kikkoman Corp. R&D Div.)

酵素センサを用いた検体の連続乳酸測定は、例えば敗血症の診断や治療効果を判定する手法として重要である。乳酸測定用酵素としては乳酸オキシダーゼ (LOX) やニコチンアミドジヌクレオチド依存性乳酸デヒドロゲナーゼ (NAD-LDH)、フラビン依存性乳酸デヒドロゲナーゼ (F-LDH) が知られている。しかし、LOX を用いる場合、検体中の溶存酸素濃度が測定結果に影響を与える恐れがある。また、NAD-LDH は補酵素が脱離しやすく、その上ピルビン酸から乳酸への逆反応も触媒してしまうために定量性にも問題がある。一方 F-LDH は (i) 補酵素結合型である、(ii) 乳酸と不可逆的に反応する、(iii) 測定結果が溶存酸素濃度に影響を受けない、という点でセンサへの利用に適しているが、これまでに報告のある F-LDH には耐熱性が低いという課題があった。

そこで我々はこの課題解決に向けて、耐熱性酵母の中から F-LDH を探索した結果、従来の酵素よりも耐熱性に優れた *Pichia kudriavzevii* 由来 F-LDH を見出した。この F-LDH を固定化した電極を作製し、応答電流値を測定したところ、7 mM までの乳酸を定量することが可能であった。

Continuous monitoring of lactate in a sample using enzyme-based sensor is an important method, for example, for the diagnosis and evaluating the treatment effect of sepsis. Lactate oxidase (LOX), nicotinamide dinucleotide-dependent lactate dehydrogenase (NAD-LDH), and flavin-dependent lactate dehydrogenase (F-LDH) are known as enzymes for lactate measurement. However, the dissolved oxygen concentration in the sample may affect the measurements because LOX reacts with oxygen. NAD-LDH easily releases a cofactor NAD and catalyzes the reverse reaction from pyruvate to lactate, which interferes accurate measurement. On the other hand, F-LDH is suitable for use in sensors because (i) it is cofactor-bound, (ii) it reacts irreversibly with lactate, and (iii) the measurements are not affected by the dissolved oxygen concentration, however, the reported F-LDH has a problem in low thermal stability.

To solve this problem, we searched for F-LDH from thermotolerant yeasts and found one from *Pichia kudriavzevii*. This F-LDH is more thermostable than the reported one. The linear relationship between lactate concentration and output current was observed up to 7 mM with F-LDH-modified electrode.

lactate monitoring, dehydrogenase, enzyme-based sensor

発表責任者：鈴木 遼太 (rsuzuki@mail.kikkoman.co.jp)