

331 *Microcyclus* sp. の2-オキソチアゾリジン-4-カルボン酸ラセマーゼの精製とその性質

(工技院・微工研) ○望月一哉

1.目的 演者らは、昨年度の本大会において *Microcyclus* sp. B-1株の生産する2-オキソチアゾリジン-4-カルボン酸(以下、OTCと略記する。)ラセマーゼの部分精製について報告した。今回、本酵素を電気泳動的に単一に精製したので、本酵素の精製および幾つかの性質を以下報告する。

2.方法・結果 OTCラセマーゼ活性は、(R)-OTCを基質として旋光度の経時変化で測定した。*Microcyclus* sp. B-1株を0.5%(RS)-OTCを含む培地で培養し、得られた菌体をガラスビーズ法で破碎し、粗抽出物を得た。粗抽出物に硫酸を60%飽和となるように加え、沈澱した画分を、Butyl-Toyopearl 650Mを用いた疎水クロマトグラフィー、Fractogel® EMD DEAE 650(S)およびDEAE MemSep™1000を用いた二回のイオン交換クロマトグラフィー、Hydroxyapatite-MPを用いた吸着クロマトグラフィーで順次分画し、SDS-PAGEにおいて分子量32 kDの一本のバンドを与える精製酵素標品を得た。この一連の精製操作の活性収率は約5%で、精製倍率は約240倍であった。GFCで推定した本酵素の非変成状態での分子量は160 kDであり、本酵素は五量体の四次構造を取ると推測される。本酵素の至適温度は47℃付近であり、至適pHはpH 8であった。本酵素は、40℃迄の温度では安定であったが、それ以上の温度では不安定であり、60℃に10分間晒すと完全に失活した。また、本酵素はpH 5.5付近で最も安定であった。HgCl₂, AgNO₃, PCMB, ヨードアセトアミドといったSH阻害剤は、本酵素を著しく阻害した。これらの阻害剤の他に、CuSO₄, FeSO₄にも阻害効果が見られた。その他の特徴は、現在検討中である。

Purification of 2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid racemase from *Microcyclus* sp.

○Kazuya Mochizuki

Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology.

332

ビフィズス菌のFructokinaseの精製とその諸性質について

(岐大 農 生物資源利用) 堀津浩章 ○村山晃一 北川裕久 河合啓一 高見澤一裕 鈴木徹
(日本メナード化粧品) 川合芳文 小西宏明

(目的) 演者らは、先にGlucoseを炭素源として培養した *Bifidobacterium* 属菌体内にFructokinase (FK)が存在することを認め、糖代謝経路におけるその役割について報告した¹⁾。今回は本FKの精製と諸性質について報告する。

(方法) *B. adolescentis* を2.0%Fructoseを含む培地で20時間静置培養後、得られた菌体を超音波破碎して粗酵素液を得た。精製は硫酸分画、DE-32およびButyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィーの後、分取型ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置による分離を行った。酵素活性は、共役酵素系を用いNADPHの増加に伴う340nmにおける吸光度の上昇により測定した。

(結果) Butyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィーにより、FKはFK1及びFK2に分離し、2種のアイソザイムが存在することが明らかとなった。この両FKをそれぞれ分取型ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置に供したところ電気泳動的に単一のタンパク質バンドを示す酵素標品を得ることができた。SDS-PAGEおよびHPLCゲルろ過から、FK1は分子量38,000の単量体、FK2は分子量35,000の2量体であることが推定された。温度およびpH安定性についてはFK1とFK2に差異は見られなかった。しかし、Fructoseに対するK_mはそれぞれ0.6mMと0.3mM、ATPに対するK_mは0.6mMと0.5mMであり、FK2のほうがともに幾分低いK_m値を示した。またN-末端アミノ酸配列にもFK1とFK2で差異が見られた。

1) 堀津ら; 昭和63年度日本醗酵工学会大会要旨集 p.199

Purification and characterization of fructokinases from *Bifidobacterium*.H.Horitsu, K.Murayama, H.Kitagawa, K.Kawai, K.Takamizawa, T.Suzuki, Y.Kawai* and H.Konishi*
(Div. of Bioresources Util. Fac. of Agric. Gifu Univ. and *Nippon Menard Cosmetic Co.Ltd.)