

# 431 プロウロキナーゼの工業的リフォールディング法の検討 東ソー(株)東京研究所

○半澤敏、本間信幸、新谷孝司

【目的】大腸菌を宿主とする遺伝子発現系は目的蛋白質が正しい高次構造を取らず不溶性物質となる欠点があるが、組換えのしやすさや高生産性等に利点がある。その工業的利用には生産物の効率的リフォールディング法の確立が必要である。特にリフォールディングを高い蛋白質濃度で実施できれば生産設備の小規模化、排水の削減等、工業的メリットは大きい。我々はプロウロキナーゼ（一本鎖ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子、scuPA）を題材にリフォールディングの高濃度化を検討した。

【方法】大腸菌K12KY1436/pUK02株を培養した後、IPTGでscuPA遺伝子を発現させ、菌体破碎後遠心分離でそのインクルージョンボディ(I)を回収してアルカリで溶解後、中和することによるリフォールディングを検討した。この時H-(NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> (n=3,4)の式で表されるアミンの5%水溶液で溶解すると、プラスミン処理で誘導されるウロキナーゼ基質の分解活性はもっとも高かった。また、可溶化の際に2Mの尿素を共存させると活性回収率は増大した。同方法は塩酸グアニジンによる方法と比べて、活性回収率に対する(I)濃度の影響が少なかった。1Mのグルコースを添加すると、さらに(I)濃度の影響は少なくなった。本方法は、大腸菌を利用した蛋白製造においてリフォールディング工程の後の回収・精製工程における硫酸等の削減や設備の小規模化に有効と期待される。

Study of the industrial refolding method of prourokinase

Satoshi Hanzawa, Nobuyuki Honma, Koji Shintani (TOSOH Corp.)

【Key words】 prourokinase, refolding, E. coli, inclusion body

# 432 *Corynebacterium* sp. ALY-1株由来のpoly (α-L-guluronate) lyaseの グルロン酸オリゴマーに対する作用

(香川県発食試) ○松原保仁、(香川県食試) 岩崎賢一、(長崎大・水産) 村松毅

【目的】*Corynebacterium* sp. ALY-1株由来のpoly (α-L-guluronate) lyaseはポリグルロン酸(平均重合度24)を分解し、見かけ上重合度2,3,4の不飽和オリゴマーを生成する。酵素の基質分解様式を明らかにし、活性部位の知見を得るため、グルロン酸オリゴマーに対する本酵素の作用機作について速度論的に検討した。

【方法及び結果】*Corynebacterium* sp. ALY-1株由来のpoly (α-L-guluronate) lyaseの精製は既報1)に基づいて行った。グルロン酸オリゴマーはポリグルロン酸の塩酸加水分解物をBio-Gel P-6カラムを用いて分取して調製した。本酵素は5糖以上のグルロン酸を速やかに分解したが、4糖のグルロン酸の分解は非常に緩やかであった。本酵素の分子活性( $k_{cat}$ )はグルロン酸ヘキサマー以上の基質において一定の値を示した。つまり、本酵素のサブサイトはグルロン酸残基6個に相当するものと推定された。さらに、グルロン酸オリゴマーの酵素分解物の解析から、本酵素の触媒部位はグルロン酸オリゴマーの非還元末端側から数えて2番目と3番目の間に存在するものと推定された。

1)Y. Matsubara *et. al.*, *J. Prot. Chem.*, in press

Action of poly(α-L-guluronate)lyase from *Corynebacterium* sp. on oligomeric guluronates.

○Y. Matsubara (Kagawa Prefec. Ferment. & Food. Exp. Stn.)

K. Iwasaki (Food Research Institute, Kagawa Prefec.)

T. Muramatsu (Faculty of Fisheries, Nagasaki Univ.)

【Key Words】 *Corynebacterium* sp., poly (α-L-guluronate) lyase, subsite, active site