

338 超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis* VA1 株由来エステラーゼの解析  
(京大院工・合成生化、CREST 今中プロジェクト)

○堀田裕司、江崎聡、跡見晴幸、今中忠行

【目的】我々は、当研究室で単離された超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis* 由来のエステラーゼに着目し、本酵素の有機合成プロセスにおける応用を視野に入れた特性解析を行っている。

【方法および結果】*P. calidifontis* VA1 株の粗酵素液中にエステラーゼ活性を検出した。そこで、耐熱性エステラーゼ活性を指標にしたショットガン法により、*Pc-est* 遺伝子を取得した。その塩基配列を解析したところ、*Pc-EST* は 313 アミノ酸残基からなる分子量 34kDa のタンパク質と予想され、ヒト由来のホルモン感受性リパーゼと 29%の相同性を示すことが判明した。本遺伝子を発現ベクターに挿入し、大腸菌を宿主とした遺伝子の発現、及び発現産物 *Pc-EST* の精製を行った。本酵素の生化学的特性解析を行った結果、最適温度は 90°C、最適 pH は 7.0 であった。また、本酵素を 100°C で 2 時間熱保持しても活性の減少はほとんど見られず、本酵素は非常に高い耐熱性を有することが判明した。このことから、*Pc-EST* の様々なバイオプロセスへの応用が期待できる。

Characterization of thermostable esterase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis* VA1.

○Yuji Hotta, Satoshi Ezaki, Haruyuki Atomi, and Tadayuki Imanaka

(Dept. Synth. Chem & Biol. Chem., Grad. School Eng., Kyoto Univ., CREST Imanaka Project)

【Key Words】esterase, archaea, hyperthermophile, *Pyrobaculum calidifontis*

339 低温菌 *Cytophaga* sp. KUC-1 由来アスパルターゼ：反応速度論的解析とクローニング

○増田 有紀、福井 結子、老川 典夫、左右田 健次  
〔関西大・生物工〕

【目的】アスパルターゼは L-アスパラギン酸から非酸化的小および非加水分解的にアンモニアを脱離しフマル酸を生成する反応を可逆的に触媒する。常温菌、好熱菌の本酵素は詳しく研究されている。われわれは、単離した低温菌 *Cytophaga* sp. KUC-1 が、15°C を最適生育温度とするにも関わらず耐熱性アスパルターゼを著量、生産することを見いだした。本研究では本酵素の精製と酵素科学的性質の解明及びその遺伝子のクローニングを目的とする。

【方法・結果】本菌を超音波破碎し得られた粗酵素を各種クロマトグラフィーによって 116 倍、比活性 301 U/mg に精製した。本酵素はその分子量が約 192,000 であり、同一のサブユニット（分子量約:50,000）4 個から構成されるホモテトラマーであった。酵素科学的性質を調べたところ、本酵素は低温菌由来にもかかわらず熱に対して高い安定性を示した。さらに反応速度論的解析により本酵素がアロステリック酵素であり、pH に依存してその協同性が変化することが明らかになった。また、本酵素の内部配列を明らかにした。

Aspartase from *Cytophaga* sp. KUC-1: Kinetic Analysis and Cloning

Yuki Masuda, Yuko Hukui, Tadao Oikawa, Kenji Soda.

Biotech., Kansai Univ.

【Key words】

Aspartase, Psychrophile, Enzyme, Kinetics, Cloning, Purification