

2P-1085 *Streptomyces griseocarneus* NBRC13471 由来スフィンゴミエリナーゼ C の大量発現

○富田 優¹, 杉森 大助¹, 荻野 千秋², 松本 優作¹
(¹ 福島大院・理工,² 神戸大院・工・応化)

【緒言】スフィンゴミエリナーゼC (以下SMC) はスフィンゴミエリンを加水分解し、セラミドとホスホコリンを遊離するPLC類縁酵素である。SMCはスフィンゴミエリンに対してのみ、PLCはグリセロリン脂質に対してのみ作用する点で、基質特異性が全く異なる。この基質認識メカニズムの違いは未解明である。そこで本研究では、基質認識メカニズム解明を目指し、放線菌宿主ベクター系を用いた*S. griseocarneus* NBRC13471由来SMCの大量発現を行った。

【方法、結果】大腸菌／放線菌シャトルベクターpUC702に*Streptovorticillium cinnamomeum*由来ホスホリパーゼD (以下PLD) のプロモーター、ターミネーター間にSMC遺伝子を導入した発現ベクターを作製した。ここで、シグナルペプチド配列として*Stv. cinnamomeum* PLD由来シグナルペプチドを、宿主として数種の放線菌について検討した。その結果、*S. lividans* 1326を宿主とした場合、SMCを菌体外に大量発現させることができた。培養条件の検討では、28℃に比べ、20℃で培養することで培養上清中に2倍以上の活性2.3 U/mlを得た。さらに、バッチ培養と流加培養（グルコースとトリプトン逐次添加）を比較した結果、後者は培養後期まで高活性を維持するものの、前者の比活性の約50%と、非効率であった。また、酵素反応液中のMg²⁺濃度の増加とともに直線的に酵素活性が上昇し、10 mM Mg²⁺存在下で11U/mgであった比活性が、1 Mでは241 U/mgと、約22倍となった。

Overexpression of shingomyelinase C from *Streptomyces griseocarneus* NBRC13471

○Yu TOMITA¹, Daisuke SUGIMORI¹, Chiaki OGINO²,
Yusaku MATSUMOTO¹
(¹Grad. Sch. Symbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ.,²Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

Key words over expression,*Streptomyces*, shingomyelinase C, secretory production

2P-1087 放線菌由来金属イオン非要求性ホスホリパーゼ A の探索と精製

○加納 功大, 杉森 大助
(福島大院・理工)

1. 緒言

ホスホリパーゼPLA₁およびPLA₂(両者を併せてPLAと略す)はリン脂質を脂肪酸とリゾレシチンに加水分解する酵素である。PLAは、リゾリン脂質製造や油脂の精製、小麦の物性改良等への利用が期待されている。しかし、産業上有用なPLAの開発は進んでおらず、特に酵素反応時に金属イオンが不要なPLAの開発が強く望まれている。そこで本研究では、放線菌由来の金属イオン非要求性PLAの探索と精製を行った。

2. 実験方法と結果

環境中から分離した放線菌1500菌株についてスクリーニングを行った。その結果、15菌株で0.20 U/ml以上のPLA活性が認められた。これらのうち、酵素活性の再現性が良かった*Streptomyces* sp. NA329株を選抜し、PLAの精製を試みた。

精製条件の検討の結果、硫酸分画、陰イオン交換、疎水性相互作用、ゲル過クロマトグラフィーを用いた精製方法が有効であることがわかった。精製した酵素をSDS-PAGE分析した結果、分子質量106 kDa付近に単一バンドが検出された。これまでに、このような分子質量を持つPLAは知られておらず、新規PLAと考えられた。

精製酵素を用いて、Ca²⁺イオンとEDTAの影響について調べた結果、Ca²⁺イオンによる依存性あるいは活性化はなく、EDTAによる顕著な影響も受けなかった。これより、本酵素が金属イオン非要求性の新規PLAであることがわかった。また、反応温度とpHの影響について調べた結果、pH 7.2、50℃付近で最大活性を示した。

Screening and Purification of metal ion independent Phospholipase A from *Streptomyces* sp.

○Kota KANO, Daisuke SUGIMORI
(Grad. Sch. Symbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ.)

Key words Phospholipase A, Purification, Characterization, *Streptomyces*

2P-1086 *Streptomyces griseocarneus* NBRC13471 由来スフィンゴミエリナーゼ C の大量発現および速度論的解析

○松本 優作¹, 富田 優¹, 杉森 大助¹, 荻野 千秋²
(¹ 福島大院・理工,² 神戸大・工・応化)

【目的】スフィンゴミエリナーゼC (以下SMC) はスフィンゴミエリンを加水分解し、セラミドとホスホコリンを遊離するPLC類縁酵素である。これまでに、*Bacillus cereus*および*Listeria ivanovii*由来SMCについて構造解析が進められるなどの研究がなされてきた。しかしながら、SMCとPLCの基質認識や触媒作用メカニズムの違いは未解明である。そこで本研究では、SMCの基質認識や触媒メカニズムを分子レベルで解明するとともにSMCの機能向上や触媒特性の改変を目指し、放線菌*S. griseocarneus* NBRC13471由来SMCの大量発現と酵素精製、速度論的解析を行った。

【方法と結果】*S. lividans* 1326を宿主とし、*Streptovorticillium cinnamomeum*由来ホスホリパーゼD(以下PLD)のプロモーター、ターミネーター間にSMC遺伝子を導入した発現ベクターpUC702を用いて形質転換し、SMCを培養上清中に大量発現させた。培養上清中から硫酸アンモニウム分画と疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーにより、酵素を精製した。速度論的解析により、ミカエリス定数 (K_m =6.93 mM), 最大反応速度 (V_{max} =0.350 mM・min⁻¹), 分子活性 (k_{cat} =4.49×10² s⁻¹)を求めた。本酵素はMg²⁺要求性であることから、Mg²⁺濃度と活性の関係について調べたところ、活性はMg²⁺濃度に比例して増大することがわかった。また、Mg²⁺と酵素間の解離定数(K_d)は限りなく0に近づき、Mg²⁺と酵素は極めて強く結合し、ほとんど解離しないことを示唆する結果を得た。

Overexpression and kinetics of sphingomyelinase C from *Streptomyces griseocarneus* NBRC13471

○Yusaku MATUMOTO¹, Yu TOMITA¹, Daisuke SUGIMORI¹,
Chiaki OGINO²
(¹Grad. Sch. Symbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ.,²Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

Key words overexpression,*Streptomyces*, sphingomyelinase C, kinetics

2P-1088 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来のリパーゼ Lip60 の精製とその諸性質

○紙本 泰志¹, 大箸 信一², 袴田 佳宏²
(¹ 金工大・院・工,² 金工大・ゲノム研)

【目的】本研究は、麹菌*A. oryzae* RIB40株由来のリパーゼLip60について、麹菌による組換えLip60の大量発現及び得られた酵素の精製を行うことを目的とした。

【方法】*A. oryzae*の組換え体をYPD培地により培養(30℃, 100rpm, 3days)し、その上清を粗酵素液とした。粗酵素を60%飽和の硫酸で分画透析を行い、50mM酢酸緩衝液 (pH5.5)で平衡化したTOYOPEARL SuperQ-650M及びSephacryl S-100 HRにより、Lip60を精製した。精製したLip60を用いて最適反応pH、最適反応温度及び1-モノオレイン、1,3-ジオレイン、トリオレイン、オリーブ油に対する作用について調べた。活性測定にはpNP-palmitateを基質として用いた。

【結果・考察】精製により精製倍率416倍、比活性125U/mgの酵素が得られた。SDS-PAGE及び活性染色により単一のバンドとして確認された。最適反応pHはpH6.0で、最適反応温度は40℃であった。TLCにより1-モノオレイン、1,3-ジオレイン、トリオレイン、オリーブ油から脂肪酸の遊離が確認できた。またエステル合成能も認められたことから、油質の改質等に应用できると考えられた。

Purification and Characterization of Lipase Lip60 from *Aspergillus oryzae* RIB40

○Taishi Kamimoto¹, Shinichi Ohashi², Yoshihiro Hakamada²
(¹Grand. Sch. Kanazawa Inst Tech.,²Kanazawa Inst Tech. Genome Biotech Lab.)

Key words *Aspergillus oryzae*, lipase, purification, characterization