

2Da12 大腸菌由来酵素RimKを用いたポリ- α -グルタミン酸合成

○八木田 歩, 有村 泰宏, 新井 利信, 木野 邦器
(早大・理工・応化)
kkino@waseda.jp

【目的】我々はこれまでリガーゼ酵素を用いたオリゴペプチドの効率的合成法の開発研究を展開してきたが、ポリアミノ酸を合成する新規酵素の取得には至っていない。ポリアミノ酸は1~2種類のアミノ酸の繰り返しで構成され、吸水性や抗菌活性など多様な機能性を有するため、新たなポリアミノ酸やその効率的合成法の開発が求められている。本研究では、ポリアミノ酸合成活性を有する酵素の候補として *Escherichia coli* K-12由来のリボソーム S6 タンパク質 (RpsF) の修飾酵素である RimK に着目した。RimK は RpsF の C 末端グルタミン酸 (Glu) 残基に1~4分子の遊離 Glu を付加する修飾活性を有していることが報告されている。今回、Glu を単独基質に ATP の加水分解反応と共役してポリ- α -グルタミン酸を合成する新規活性を RimK に見出したので報告する。

【方法・結果】大腸菌を用いて組換え RimK を調製し、タンパク質構成性20種のアミノ酸を単独基質として検討を行った。ATP の加水分解時に副生するリン酸量から Glu に対するリガーゼ活性の存在が示唆され、質量分析によって Glu のホモポリマーを検出した。さらに、反応生成物をエタノール沈殿によって簡易的に精製し NMR 分析を行った結果、本ポリマーが α -位での結合を有することが明らかになった。また、RimK によって合成されるポリ- α -グルタミン酸の鎖長は pH によって変化し、pH 9.0 にて最長の46量体となった。これまでに γ -位での結合を有するポリ- γ -グルタミン酸合成酵素は多数報告されているが、 α -位での結合を有するポリ- α -グルタミン酸を合成する酵素は初めての発見となる。

Poly- α -glutamic acid synthesis using a novel catalytic activity of RimK from *Escherichia coli* K-12

○Ayumi Yagita, Yasuhiro Arimura, Toshinobu Arai, Kuniki Kino
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words RimK, poly-alpha-glutamic acid, peptide synthesis, ribosomal protein

2Da14 *Trichoderma* 属のセルラーゼと相乗作用を示す放線菌酵素の探索と精製

○吉本 結香, 魚住 昌太郎, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
(阪府大院・生環科)
monger@biochem.osakafu-u.ac.jp

Trichoderma 属由来のセルラーゼ剤 (Celluclast) はセルロース分解活性に優れているが、天然基質の分解においてはいくつかの弱点が存在する。そこで本研究では、Celluclast と併用することでその弱点を補い、天然基質 (稲わら) に対し相乗的な分解作用を示す酵素を生産する放線菌を探索し、相乗作用を示す酵素の同定を試みた。まず、アルカリ処理稲わらを単一炭素源とする培地を用いて、土壌から 500 株の放線菌を分離した。続いて、分離した株の培養上清と Celluclast を用い、アルカリ処理稲わらの目視による分解の比較や生成還元糖の定量を行った結果、最も安定的に相乗作用を示した *Streptomyces* sp. No.465 株を用いて、この相乗作用に関与する酵素の単離を試みることにした。Celluclast との相乗作用を指標に部分精製を行い、各種基質を用いた分解活性を測定し、培養上清のそれらと比較したところ、キシラン分解活性のみが高収率で回収されていることが明らかとなった。そこで、今度はキシラン分解活性を指標に精製を行った。培養上清を各種クロマトグラフィーに供し、得られた活性画分を SDS-PAGE で確認したところ、分子量約 23000 の単一バンドが検出されたので、これを精製キシラナーゼとして相乗作用の評価を行った。培養上清が Celluclast と相乗作用を示したときのキシラナーゼ活性と同量の活性を示す精製キシラナーゼを用いて Celluclast との相乗作用について検討したところ、精製キシラナーゼのみで Celluclast と相乗作用を示すことが確認できた。現在この酵素について性質検討を行っている。

Screening and purification of an actinomycete enzyme showing synergistic action with cellulases from *Trichoderma*

○Yuka YOSHIMOTO, Syotaro UOZUMI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI
(Grad. Sch. Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words Synergistic action, xylanase

2Da13 *Actinomadura* sp. T16-4株由来ポリ乳酸分解酵素の性質

○原 光子, 安西 航太, 徳山 真治
(静岡大・農・応生化)
acstoku@ipc.shizuoka.ac.jp

【目的】ポリ乳酸 (PLA) は、植物由来のセルロースやデンプンを原料に発酵で得られる乳酸を重合させた高分子化合物で、生分解性プラスチックの材料として用いられている。自然界において PLA は微生物により乳酸に分解されるが、PLA 分解酵素の性質の詳細は不明である。本報告では PLA 分解酵素の生化学的性質の解明を目的とし、*Actinomadura* sp. T16-4 株から PLA 分解酵素を精製し、その諸性質を検討した。【方法】PLA 分解活性は、乳化 PLA の濁度 (660 nm) の減少から求め、酵素単位は1分間に乳化 PLA の濁度を 1.0 減少させる酵素量とした。乳化 PLA は 1% PLA 溶液 (ジクロロメタン) に 10 倍量の Tris-HCl 緩衝液 (20 mM, pH 9.0) を加え、超音波処理 (400 W, 15 分間) を行い調製した。本酵素の精製は硫酸沈殿、CM-TOYOPEARL 650M を用いて行った。【結果および考察】*Actinomadura* sp. T16-4 株は BM 培地中で PLA 分解酵素を生産 (2.5 U/ml) した。培養液から本酵素を SDS-PAGE で単一バンドを示すまでに精製 (170 U/mg, 収率 26 %) した。本酵素は PLA、PCL および *p*-NP esters (特に *p*-NP butyrate) を分解し、さらにゼラチンにも作用した。本酵素の比活性は既報の PLA 分解酵素の中で最も高い値を示した。本酵素はエステラーゼであるが、プロテアーゼ活性も示し、セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF に阻害された。本酵素の至適温度及び熱安定性は、それぞれ 70℃ および 50℃ であり、至適 pH 及び pH 安定性はそれぞれ pH 9.0 及び pH 6.0 ~ 9.0 であった。PLA 分解反応物の TLC 及び HPLC 分析から、本酵素は PLA を末端から認識し切断するエキソ型の酵素である可能性が示唆された。現在、本酵素のさらなる機能解析を行うために遺伝子の取得を試みている。

Properties of poly lactic acid degrading enzyme from *Actinomadura* sp. T16-4

○Choko Hara, Kota Anzai, Shinji Tokuyama
(Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ.)

Key words Poly lactic acid degrading enzyme, Actinomadura

2Da15 *Paenibacillus cookii* SS-24 由来セルラーゼの固定化の効果

○篠田 優¹, 金政 真², 荒井 基夫²
(¹中部大院・応生,²中部大・環境生科)
kanamasa@isc.chubu.ac.jp

我々は、これまでに土壌より新規セルラーゼ生産細菌 *Paenibacillus cookii* SS-24 を分離し、本菌株が生産するセルラーゼの精製と性質、遺伝子クローニングについて研究を行ってきた。本酵素はセルロース、キトサン、リケナンに対して分解活性を有しており、キトサンオリゴ糖生産や糸状菌の細胞壁の分析、セルロース系バイオマスの前処理への応用が期待できる。しかし本酵素の応用には耐熱性や再利用が出来ない点で問題がある。従って本研究では本酵素を固定化し、得られた固定化酵素の性質を評価した。先ず本酵素を大腸菌で発現させ、硫酸塩析 (80% 飽和)、DEAE-TOYOPEARL 陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、電気泳動的に均一な標品を調製した。次いで 136U (キトサナーゼ活性) の精製酵素を 1ml の CNBr-activated Sepharose 4B に共有結合で固定化し、1.7U/ml ゲルの固定化酵素を得た。遊離酵素は至適反応条件下 (pH 4.3, 70℃) で 1 時間処理を行うと失活するが、固定化酵素を同条件で処理すると 28% の活性が残存していた。本酵素をキトサンに対して pH 4.3, 30℃ で 24 時間反応させた分解産物を TLC で分析したところ、主にキトサンダイマー、トリマー、テトラマーが生成していることが分かった。固定化酵素は遊離酵素と比較し耐熱性が向上しており、キトサンに対しては遊離酵素と同様の分解様式であった。現在、固定化条件の検討や得られた固定化酵素を使用したキトサンオリゴ糖生産についての検討を行っている。

Immobilization of cellulase from *Paenibacillus cookii* SS-24

○Suguru Shinoda¹, Shin Kanamasa², Motoo Arai²
(¹Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., ²Dept. Envi. Biol., Chubu Univ.)

Key words *Paenibacillus*, chitosanase, cellulase, immobilization