

2P-037 *Streptomyces sanglieri* A14 株由来ホスホリパーゼのキャラクタリゼーションならびにグリセロ糖脂質の加水分解特性

○大田 淳平, 杉森 大助
(福島大院・理工)
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【目的】小麦粉中にはグリセロ糖脂質(以下、GL)とグリセロリン脂質(以下、GP)が含まれており、これらの脂肪酸エステル結合を加水分解し、リゾ体とする酵素は小麦粉の物性改良や品質向上に効果があると報告されている。GLとGPの両者に作用する酵素として、放線菌由来ホスホリパーゼ(以下、PL)が特許出願されている。しかしながら、その作用pHは中性付近であり、麵加工(pH 10-11条件下)には適していない。そこで、より広範囲のpH領域でGLとGPに活性を示す酵素のスクリーニングを行った。その結果、*Streptomyces sanglieri* A14株が目的酵素を菌体外に生産することを見出した。本報では、本酵素の諸性質について発表する。

【実験方法】A14株の培養上清から硫酸沈殿と各種カラムクロマトグラフィーにより酵素を精製した。精製酵素を用いて諸特性解析を行った。さらに、ゲノム解析およびLC-MS/MS解析により、遺伝子を同定した。

【結果と考察】A14株の培養上清720mlより、ジガラクトシルジアシルグリセロール(以下、DGDG)に対する比活性が32.2 U mg-protein⁻¹の酵素を得た。SDS-PAGE分析の結果、本酵素は約29 kDaであり、pH 10.5、45°C付近で最大活性を示し、弱酸性から塩基性pHまで活性を示した。本酵素はホスファチジルセリン(以下、PS)に対して最も高い活性を示し、DGDGに対する活性はPSの45%であった。本酵素は264アミノ酸からなり、その配列は*Streptomyces albidoflavus* 由来ホスホリパーゼA₁と71.1%の相同性を持つことがわかった。

Characterization of phospholipase from *Streptomyces sanglieri* A14 and the hydrolytic property for glycolipid

○Jumpei Ota, Daisuke Sugimori
(Grad. Sch. Symbio. Syst. Sci. Tech., Fukushima Univ.)

Key words phospholipase, *Streptomyces*, glycolipid, gene cloning

2P-038 *Syncephalastrum racemosum* 由来エタノールアミノキシダーゼの異種組換え発現ならびに機能解析

○長南 圭介¹, 村山 和隆², 酒瀬川 信一³, 松本 英之³, 杉森 大助¹
(¹福島大院・理工, ²東北大院・医工, ³旭化成ファーマ)
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【緒言】Ethanolamine oxidase(以下EAO)は、エタノールアミン(以下EA)の酸化脱アミノ化反応を触媒する酵素であり、本酵素を用いることで間接的にリン脂質の定量が可能になる。本研究では、糸状菌*S. racemosum*由来EAOの基質認識機構解明および機能解析を目的として、EAOの異種組換え発現、基質特異性試験ならびに速度論解析を行った。さらに、立体構造モデル解析により基質認識に関与するアミノ酸残基を推定した。

【実験方法】EAO遺伝子のcDNAの3'末端にHis-tagを付加した後、発現ベクターpET-24a(+)に導入し、*E. coli*を宿主としてEAOを菌体内発現させた。無細胞抽出液からHisTrapカラムを用いて組換えEAO(以下rEAO)の精製を行い、機能解析を行った。また、EAOの立体構造を予測し、既知アミノキシダーゼ(以下AOX)との構造比較を行うことで基質認識に関与するアミノ酸残基を推定した。

【結果と考察】基質特異性試験の結果、EAOは芳香族アミンよりもEAなどの直鎖脂肪族アミンに対して高い特異性を示した。また、EAに対するK_m=0.847 mM、V_{max}=6.99 μmol min⁻¹ mg-protein⁻¹を決定し、その触媒効率率は*Arthrobacter* sp.由来AOXの約14倍高かった。さらに、EAOの立体構造モデルを既知AOXの構造と比較した結果、活性中心付近に存在する基質認識ゲートやその周辺のアミノ酸残基に顕著な違いがあることがわかった。現在、これらの残基に関して部位特異的変異解析などを進めている。

Heterologous expression and characterization of ethanolamine oxidase from *Syncephalastrum racemosum*

○Keisuke Chonan¹, Kazutaka Murayama², Shin-ichi Sakasegawa³, Hideyuki Matsumoto³, Daisuke Sugimori¹
(¹Grad. Sch. Symbio. Syst. Sci. Tech., Fukushima Univ., ²Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ., ³Asahi Kasei Pharma Corp.)

Key words amine oxidase, structure modeling

2P-039 Protein engineering and temperature control as means of directing positional specificity in phospholipase D-catalyzed synthesis of 1-phosphatidylinositol

○Jasmina Damjanovic, Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

To establish enzymatic synthesis of bioactive phosphatidylinositol (PI) from phosphatidylcholine and *myo*-inositol, we previously obtained PI-synthesizing enzymes by mutagenesis of inositol-accepting residues, W187, Y191 and Y385, of the *Streptomyces antibioticus* phospholipase D (SaPLD). Since the isolated PLDs generated PI as a mixture of positional isomers among which only 1-PI is the natural one, the current study developed strictly 1-PI specific variants by mutagenesis of another four inositol-accepting residues of the W187N/Y191Y/Y385R SaPLD (NYR) yielding PI in the ratio of 1-/3-PI = 76/24. NYR-186T and NYR-186L emerged as the most improved, achieving 1-/3-PI ratio of 93/7 and 87/13 respectively, at 37°C. Structure model analyses pointed at G186T and G186L mutations to increase rigidity of the accepting site, thus limiting the possible orientations of *myo*-inositol. Further structure rigidification at low temperatures increased the specificity of both variants to 1-/3-PI > 97/3 at 20°C, with no change in PI yield. The two variants show different thermodynamic mechanisms of specificity increase and, very different thermodynamic behavior compared to 3-PI specific PLDs.

Protein engineering and temperature control as means of directing positional specificity in phospholipase D-catalyzed synthesis of 1-phosphatidylinositol

○Jasmina Damjanovic, Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words phospholipase D, protein engineering

2P-040 バイオサーファクタントによる農業用プラスチック資材の生分解制御

○北本 宏子¹, 福岡 徳馬², 篠崎 由紀子¹, 土屋 渉³, 山崎 俊正³, 山元 季実子¹
(¹農環研, ²産総研・機能化学, ³生物研)
kitamoto@affrc.go.jp

【背景と目的】農業用マルチフィルム等、生分解性ポリエステル(BP)製資材は、農業現場で分解速度が安定しないという課題がある。環境中でBP分解を制御できれば、BPの用途が飛躍的に拡大すると期待される。土壌中のBP分解は、真核微生物が重要な役割を担う。また、酵母*Pseudozyma antarctica*が生産するエステラーゼ(PaE)や、糸状菌由来のクチナーゼが、ポリブチレンサクシネート等のBPを効率良く分解することが知られている。今回、我々はPaEを代表的な分解酵素と仮定し、界面活性剤でBP表面を覆うことで酵素の接触を物理的に抑制する新しい分解抑制手法を検討したので報告する。

【方法と結果】バイオサーファクタント(生物由来の界面活性剤)の一種であるマンノシルエリスリトールリビッド(MEL)を添加することで、PaEによるBP粒子のポリマー分解に伴う粒子径の減少が抑制された。表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて分解挙動を追跡したところ、MELはBPフィルム表面に吸着し、PaEのフィルムへの接触を抑制することで酵素分解を阻害していた。農業用マルチフィルム状に成型したBPフィルムは、MELの表面処理によってPaEによる分解だけでなくBP分解菌と接触させた場合の分解も抑えられた。MELはアルコール洗浄等で簡単にフィルム表面から除去でき、フィルムの生分解性が回復した。今回報告するMELによるフィルム表面処理法は、BPの生分解性を制御する新しい利用法を提案するものである。(本研究の一部は、農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業で実施した。)

Control of enzymatic degradation of biodegradable polymers by biosurfactants

○Hiroko Kitamoto¹, Tokuma Fukuoka², Yukiko Shinozaki¹, Wataru Tsuchiya³, Toshimasa Yamazaki³, Kimiko Yamamoto-Tamura¹
(¹NIAES, ²AIST, ³NIAS)

Key words *Pseudozyma antarctica*, biodegradable plastic, mannosylerythritol lipid