

2B10-3 放線菌由来リン脂質代謝酵素の変異体の機能解析

○荻野 千秋, 泉 麻里子, 大石 多佳子, 清水 宣明
(金沢大・工・物質化学)

Phospholipase D (以下 PLD) は動物、植物、バクテリアなどあらゆる生物に存在し、脂質代謝に関与する酵素である。PLD はリン脂質に対して二つの反応を触媒する事が明らかとなっている。一つは加水分解反応で、基質となる phosphatidylcholine (PC) と大量の水が共存する時に、phosphatidic acid (PA) と choline を遊離する。もう一つはリン酸基転移反応で、PC とアルコール分子の共存下でリン脂質の極性基に作用して、極性基の変換を行い、異なるリン脂質を生成する。このリン酸基転移反応を利用して様々なリン脂質が安価な PC より工業的に生産されている。全ての生物主由来の PLD では、触媒に関与する領域が良く保存されていて、2 回繰り返し HxKxxxDxxxxxxG (G/S) 配列として存在している。我々は昨年の年会において、これらの配列内に存在する G (G/S) 領域に関して変異体解析を行い、野生型より高い活性を示す変異体の取得に関して報告を行った。本年度では、これらの変異体に関しての酵素的なキャラクタリゼーションとリン脂質合成への応用に関して報告を行う。

Characterization of mutants phospholipase D from *Streptovorticillum cinnamoneum*

○Chiaki Ogino, Mariko Izumi, Takako Ohishi, Nobuaki Shimizu
(Department of chemistry and chemical engineering, Kanazawa University)

Key words phospholipase D, Streptomyces, HKD motif, transphosphatidylolation

2B10-5 リパーゼを用いた有機溶媒中でのエステル交換反応

○土屋 太佑¹, 木村 睦¹, 小駒 喜郎¹, 近藤 慶之¹,
内尾 良輔², 山中 茂³
(¹信州大繊維・機能高, ²セラリカ野田, ³信州大繊維、応生科)

【目的】脂肪酸のエステル交換反応の際に用いられる基質は、主としてモノカルボン酸である。脂肪酸の両末端にカルボキシル基を有するジカルボン酸を基質に用いたエステル交換反応を試みた。

ジカルボン酸とトリグリセリドに各種リパーゼを加えて非水溶媒中で反応させた。両末端のカルボン酸とトリグリセリドの脂肪酸とのエステル交換反応によりどのような生成物を得られるか解析した。

【実験方法及び結果】反応の基質には、tripalmitin 及び sebacic acid を用いた。リパーゼとしては、5 種類を用いた。基質とリパーゼを n-hexane もしくは 1,4-dioxane のいずれかを反応溶媒とし、それぞれの酵素の各至適温度で 72 時間攪拌した。生成物の確認は、Maldi TOF-MS による分子量測定で行なった。

n-hexane を溶媒とし反応させた結果、3 種類のリパーゼ TL IM, RM IM (Novozymes 社) 及び Lipase AK (ALDRICH 社) で分子量 1325m/z のピークが見られ、tripalmitin と sebacic acid の反応生成物の 2 量体が生成した。TL IM では、さらに分子量の大きい 1822m/z と 2318m/z のピークも認められ、約 496m/z の同生成物の逐次付加が起こり 4 量体を生成した。また、リパーゼを添加しなかった場合及び溶媒に 1,4-dioxane 溶媒を用いた場合はどちらも、原料由来のピークが認められたのみであった。

Unique interesterification reaction by lipases in organic solvents

○Daisuke Tsuchiya¹, Mutsumi Kimura¹, Yoshiro Ogoma¹, Yoshiyuki Kondo¹, Ryousuke Uchio², Shigeru Yamanaka³
(¹Dept.Functl.Polym.Sci.,Fac.Textile Sci.Tech.,Shinshu Univ., ²CERARICA NODA Co.,Ltd., ³Dept.Appl.Biol.,Fac.Textile Sci.Tech.,Shinshu Univ.)

Key words interesterification, lipase, triglyceride, dicarboxylic acid

2B10-4 リパーゼを用いた共役リノール酸異性体の高純度精製

○永尾 寿浩¹, 山内(佐藤) 良枝², 杉原 耿雄³, 岩田 敏夫²,
永尾 晃治⁴, 柳田 晃良⁴, 安達 修二⁵, 島田 裕司¹
(¹阪市工研, ²リノール油脂, ³徳島文理大工, ⁴佐賀大農, ⁵京大院農)

【目的】サフラフー油から工業的に製造されている共役リノール酸 (CLA) 中には、抗癌および体脂肪低減作用をそれぞれ保持する *cis*-9,*trans*-11 (*c9*, *t11*)-CLA および *trans*-10,*cis*-12 (*t10*, *c12*)-CLA 異性体が等量ずつ含まれている。これらの生理活性をさらに詳細に調べるため、両異性体の高純度標品が要望されている。我々はこれまでに CLA 混液から両 CLA 異性体の分画・濃縮を行ってきたが、目的とする異性体以外の脂肪酸が 10% 以上含まれている問題点があった。本研究では、夾雑する脂肪酸含量の低い高純度 CLA 異性体の調製を行った。

【方法および結果】はじめに、97% リノール酸をアルカリ条件下で共役化し、*c9*, *t11*-CLA および *t10*, *c12*-CLA をそれぞれ 45 および 47 wt% 含む混液を調製した。この CLA 混液を用い、*Candida rugosa* リパーゼによる選択的エステル化と蒸留、および尿素付加を組み合わせた方法で各異性体の分画と精製を行った。特にエタノールを用いた尿素付加は、*c9*, *t11*-CLA と *t10*, *c12*-CLA 以外の CLA の除去に効果的であった。これらの方法を用いることにより、*c9*, *t11*-CLA および *t10*, *c12*-CLA 含量をそれぞれ 93 および 95% にまで精製することができた。

Enzymatic purification of conjugated linoleic acid isomers

○Toshihiro Nagao¹, Yoshie Yamauchi-Sato², Akio Sugihara³, Toshio Iwata², Koji Nagao⁴, Teruyoshi Yanagita⁴, Shuji Adachi⁵, Yuji Shimada¹
(¹Osaka Municipal Tech. Res. Inst., ²Rinoru Oil Mills Co., Ltd., ³Tokushima Bunri Univ., ⁴Saga Univ., ⁵Kyoto Univ.)

Key words *Candida rugosa*, conjugated linoleic acid, lipase, urea adduct fractionation

2B11-1 光学選択性の改変した *Burkholderia cepacia* KWI-56 由来リパーゼ変異体の解析

○小西 宏幸¹, 古賀 雄一², 加藤 且也³, 中野 秀雄¹,
山根 恒夫¹
(¹名大院生命農・生物機構, ²NEDO, ³産総研)

Burkholderia cepacia KWI-56 Lipase は、光学活性化化合物である *p*-Nitrophenyl 3-Phenylbutyrate に対して強い光学選択性を有し、その (S)- 体に対して加水分解活性を示す酵素である。前年度の本大会において、Lipase KWI-56 と高い相同性を持つ酵素の立体構造をもとに酵素-基質複合体モデルを構築し、変異導入箇所を疎水ポケット内の 4 箇所に絞り、1 分子 PCR 法と無細胞タンパク質合成反応を組み合わせる in vitro で変異タンパク質ライブラリーを構築するシステム SIMPLEX (Single-Molecule-PCR-linked in vitro expression) により、光学選択性の変化した変異リパーゼの取得に成功したことを報告した¹⁾。今回、得られた変異リパーゼのうち数種類について、大量調製を行い、酵素的解析を行った。その結果、これらの変異リパーゼは、Lipase KWI-56 の (S)- 体基質に対する比活性と同程度、あるいはそれ以上の比活性を (R)- 体基質に対して有していた。また、Ethyl 3-Phenylbutyrate に対する光学選択性は、Lipase KWI-56 が (S) 体に対して E=33 である一方、変異リパーゼの一つは、(R) 体に対して E=38 であった。¹⁾ 古賀ら、平成 14 年度日本生物工学会大会講演要旨集 p77

Analysis of lipase variants with reversed enantioselectivity from *Burkholderia cepacia* KWI-56

○Hiroyuki Konishi¹, Yuichi Koga², Katsuya Kato³, Hideo Nakano¹, Tsuneo Yamane¹
(¹Nagoya Univ.Grad.Sch.Biol.Agr.Sci., ²NEDO, ³Nat.Inst.Adv.Ind.Sci.Technol.)

Key words lipase, enantioselectivity, 1 分子 PCR, 無細胞タンパク質合成, SIMPLEX, *Burkholderia cepacia*