

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4912636号
(P4912636)

(45) 発行日 平成24年4月11日 (2012. 4. 11)

(24) 登録日 平成24年1月27日 (2012. 1. 27)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/20 (2006. 01)

C 1 2 N 9/20

C 1 2 P 21/00 (2006. 01)

C 1 2 P 21/00 C

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 R 1/00 (2006. 01)

C 1 2 N 9/20

請求項の数 11 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-223872 (P2005-223872)

(22) 出願日 平成17年8月2日 (2005. 8. 2)

(65) 公開番号 特開2006-42820 (P2006-42820A)

(43) 公開日 平成18年2月16日 (2006. 2. 16)

審査請求日 平成19年9月14日 (2007. 9. 14)

(31) 優先権主張番号 P120043110

(32) 優先日 平成16年8月2日 (2004. 8. 2)

(33) 優先権主張国 マレーシア (MY)

微生物の受託番号 DSMZ DSM 17139

前置審査

(73) 特許権者 505291413

ユニバーシティ プトラ マレーシア

マレーシア スランゴル ユービーエム

セルダン 4 3 4 0 0

(74) 代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(74) 代理人 100172018

弁理士 佐藤 俊彦

(72) 発明者 ラジャ ノーア ザリハ アブド. ラーマン

マレーシア ダルール エーサン、セラン

ゴー、セルダン、ユービーエム 4 3 4 0

0 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なジオバチルス微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジオバチルス T 1 株 D S M 1 7 1 3 9 から、配列番号 3 および 4 のプライマーを用いて単離される 遺伝子によってコードされる、遺伝子組換え耐熱性ジオバチルス T 1 リパーゼの製造方法であって、

シグナルペプチドを有しない前記耐熱性ジオバチルス T 1 リパーゼの N 末端を G S T と融合させたタンパク質として宿主原核細胞中で発現することを含む方法。

【請求項 2】

シグナルペプチドが遺伝子組換え耐熱性ジオバチルス T 1 リパーゼの N 末端の 2 8 個のアミノ酸である、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

精製過程において界面活性剤を用いない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

シグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオバチルス T 1 リパーゼと G S T との融合タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

シグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオバチルス T 1 リパーゼと G S T との融合タンパク質から G S T タグを切断することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

シグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオパチルス T 1 リパーゼをさらに精製することを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

araC、T7、T7lacおよびtacから選択されるいずれかのプロモーターを有する、pBAD、pGEX-4T1、pRSET CおよびpET22b(+)から選択されるいずれかのベクターを用いてシグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオパチルス T 1 リパーゼを発現する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

tacプロモーターを有するpGEX-4T1ベクターを用いてシグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオパチルス T 1 リパーゼを発現する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

イソプロピル - D - チオガラクトピラノシドによってシグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオパチルス T 1 リパーゼとGSTとの融合タンパク質の発現を誘導する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

0.025 mMのイソプロピル - D - チオガラクトピラノシドによって、少なくとも12時間以上、シグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオパチルス T 1 リパーゼとGSTとの融合タンパク質の発現を誘導する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

0.025 mMのイソプロピル - D - チオガラクトピラノシドによって、少なくとも12時間以上、シグナルペプチドを有しない遺伝子組換え耐熱性ジオパチルス T 1 リパーゼとGSTとの融合タンパク質の発現を誘導し、さらに該宿主原核細胞から41902ユニット以上のリパーゼ活性を検出する工程を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な微生物およびその製造方法に関する。より具体的には、本発明は耐熱性リパーゼ T 1 を産生する新規な微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

リパーゼは、通常の生物体のための極めて重要な代謝酵素であり、脂肪を加水分解して遊離脂肪酸を産生することができる。リパーゼまたはアシルグリセロールヒドロラーゼは、長鎖トリグリセリドを、ジアシルグリセリド、モノグリセリド、グリセロールおよび遊離脂肪酸に加水分解する酵素である。しかしながら、リパーゼはまた、アルコールおよび脂肪酸からの、またはエステル交換を介してのエステルの形成において、加水分解の逆反応を触媒することもできる。

【0003】

リパーゼは、食品加工において風味ある乳製品に対しての、医薬において消化剤としての、脂肪および油の改善などのための酵素として、幅広く用いられている。リパーゼは、各用途のために種々の特性を有することが要求されており、耐熱性リパーゼは、広範な分野に適用され、様々に用いられることが要求されている。

【0004】

微生物細胞外リパーゼは、通常、動物性または植物性リパーゼよりもより耐熱性である。微生物細胞外リパーゼは、工業および診断薬において潜在的な用途を有する。商業用酵素における主要な要求は熱安定性であるが、これは、熱変性が酵素不活性化の一般的な原因であるからである。さらに、酵素の熱安定性を高めることにより、より高温で酵素反応

10

20

30

40

50

を行うことができるようになるが、これは変換速度、基質溶解性を増大させ、そして微生物の増殖の可能性および反応媒体の粘度を低減する一助となる。

【 0 0 0 5 】

好熱菌は、耐熱性酵素を産生するよい候補となり得るが、収率が低いことや、高温発酵装置が必要となる可能性があることから、実用的でない場合が多い。この問題を克服するために、遺伝子工学による分子学的アプローチが、原核細胞系を介した経済的な大量生産のための高レベルの発現を達成する良好な代替手段となっている。これまでのところ、数種の耐熱性リパーゼのクローニングおよび異種宿主の細胞内での発現に成功している。

【 0 0 0 6 】

基礎研究および商業的目的において、原核細胞系における外来タンパク質の発現が、高レベルの発現を達成するために最も広く用いられている。発現ベクターおよび宿主は、クローニングされた遺伝子の最大限の発現を達成するのに重要な問題であり、外来遺伝子の分子学的クローニングは当該遺伝子の発現の成功を保証するものではない。

【非特許文献1】Leow et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2004;68(1):96~103

【非特許文献2】Frangioni and Neel, Anal Biochem. 1993;210(1):179~87

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明は、工業用途に適した耐熱性リパーゼを効率的に産生することを目的の1つとする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明においては、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術による耐熱性リパーゼの迅速なクローニング、および様々な種類のプロモーターを用いて原核細胞系により発現される耐熱性リパーゼ T1 遺伝子の操作を提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明において用いられる細菌株、ジオバチルス属 T1 株 (Geobacillus sp. T1 株) は、耐熱性 T1 リパーゼ遺伝子を提供するものであり、本発明はこれを製造する方法を含む。本発明はまた、耐熱性 T1 リパーゼ遺伝子を発現する宿主細胞を包含する形質転換体、およびその製造方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、パーム油廃液から単離され、リパーゼを産生することができる細菌、ジオバチルス T1 株の生物学的に純粋な菌株であって、該細菌が、以下の特性を有するものに関する：

a) 活動温度範囲および活動温度

活動温度範囲が 20 から 75 であり、最適温度が少なくとも 70 であり、

b) 活動 pH

pH 5 ~ 6 の範囲の活動 pH を有し、

c) 形態学的および生理学的活性

好気性、グラム陽性、内生孢子形成性の桿菌状細菌であり、幅 0.8 ~ 1.0 μm および長さ 2.5 ~ 6.0 μm を有し、2% の NaCl に耐性であり、クエン酸および硝酸塩試験について陽性であり、

d) 酸性活性

作用糖類として、D - フルクトース、L - アラビノースおよび D - キシロースを有し、このうち D - フルクトースに対して高い酸性活性を有し、

f) 細胞脂肪酸

イソ分枝ペンタデカン酸 (イソ C 15)、ヘキサデカン酸 (イソ C 16) およびヘプタデカン酸 (イソ C 17) を 78.33% の割合で有し、このうちイソ C 15 およびイソ C 17 が豊富であり、

g) 分類学的同定

10

20

30

40

50

Geobacillus kaustophilus (D S M 7 2 6 3^T) と 6 4 . 9 % の類似性を有し、および *Geobacillus thermoleovorans* (D S M 5 3 6 6^T) と 6 8 . 8 % の類似性を有し、

h) 種の同定

リボプリント (RiboPrint) パターンを用いた場合、種の同一性は 0 % である。

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、ジオバチルス T 1 株が、パーム油廃液から、N a C l を含む p H 7 . 0 の強化培地中に 6 0 の温度にて単離されたものである、上記菌株に関する。

本発明はさらに、ジオバチルス T 1 株が、D S M Z (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen: ドイツ微生物・細胞カルチャーコレクション) に、D S M 1 7 1 3 9 として寄託されたものである、上記菌株に関する。

本発明はさらにまた、ジオバチルス T 1 株を同定する方法であって、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅を含み、ここで耐熱性 T 1 リパーゼ遺伝子の P C R 増幅が、以下の工程:

- a) 少なくとも 9 4 での少なくとも 4 分間の予備変性工程、
- b) 少なくとも 9 4 での少なくとも 1 分間の変性工程、
- c) 5 6 ~ 7 0 での少なくとも 2 分間のアニーリング工程、
- d) 少なくとも 7 2 での少なくとも 1 分間の伸長工程、
- e) 少なくとも 9 4 での少なくとも 7 分間の最終伸長工程を含む方法に関する。

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、P C R 増幅サイクルが、2 5 ~ 4 5 サイクル反復される、上記同定方法に関する。

さらに、本発明は、ジオバチルス T 1 株を、栄養ブロス 0 . 8 %、寒天 1 . 5 %、ピクトリアブルー 0 . 0 1 %、トリオレイン 0 . 2 5 % (v / v) を含むトリオレイン寒天にて培養することを含む、リパーゼを産生する方法に関する。

さらにまた、本発明は、p G E X - 4 T 1 ベクターを用いて、単離された組換え耐熱性 T 1 リパーゼ遺伝子を作製する方法に関する。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、以下の特徴を有する、シグナルペプチドを有する融合タンパク質を製造する方法に関する:

- a) p B A D、p G E X - 4 T 1、p R S E T C または p E T 2 2 b (+) ベクターを含む原核細胞系における、シグナルペプチドを有する耐熱性 T 1 リパーゼの発現、
- b) a r a C、T 7、T 7 1 a c または t a c プロモーターを有すること、
- c) t a c プロモーターにより制御されている p G E X - 4 T 1 からの高レベルの発現を有すること、
- d) 0 . 0 5 m M の I P T G で少なくとも 8 時間誘導した場合に、1 1 , 7 0 8 U / l のリパーゼ活性を有すること、
- e) 2 0 % ~ 2 8 % の T 1 リパーゼ回収率および少なくとも 7 . 3 倍の T 1 リパーゼ精製倍率を有すること、
- f) 少なくとも 3 0 . 1 9 2 U / m g の精製融合リパーゼ活性を有すること。

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに、以下の特徴を有する、シグナルペプチドを有しない融合タンパク質を製造する方法に関する:

- a) 0 . 0 2 5 m M の I P T G で少なくとも 1 2 時間誘導した場合に 4 1 , 9 0 2 U / l のリパーゼ活性を有すること、
- b) 少なくとも 2 7 9 倍の発現レベルの増加を有すること、
- c) 7 0 % ~ 7 5 % のリパーゼ回収率、および少なくとも 2 . 8 7 倍の精製倍率を有すること、
- d) 少なくとも 2 9 7 . 9 2 9 U / m g の精製融合リパーゼ活性を有すること、
- e) T 1 成熟リパーゼを有すること。

【 0 0 1 5 】

本発明はさらにまた、以下の特徴を有する、T 1 成熟リパーゼを製造する方法に関する：

a) 活動温度活性および安定性

6 0 ~ 8 0 の範囲の温度で活動し、最適温度が約 7 0 であること、

b) 活動 pH 活性および安定性

p H 6 ~ 1 0 で 3 0 分間活動し安定であり、最適なアルカリ p H が 9 であること、

c) 作用金属イオン

Na^+ 、 Mn^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} で作用し、

Mn^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} に対して少なくとも 3 0 分間安定であり、

Cu^{2+} および Fe^{2+} で、それぞれ約 5 2 % および 6 0 % のリパーゼ活性を少なくとも 3 0 分間有すること、

d) 作用界面活性剤のリパーゼ活性への影響

6 3 % ~ 8 8 % の割合で、0 ~ 3 0 分間作用すること、

e) 基質特異性

オリーブ油、トウモロコシ油、ヒマワリ油、パーム油およびトリグリセリドなどの天然油に作用し、天然油が好ましい基質であること、

f) リパーゼ阻害剤

金属キレート剤、還元剤、セリンプロテアーゼ阻害剤およびアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤と共に作用し、かつ触媒メカニズムがセリンおよびアスパラギン酸残基に関連すること。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、工業用途における触媒として使用するための、ジオバチルス T 1 株から単離された耐熱性 T 1 リパーゼの製造方法に関する。

さらに、本発明は、以下の特性を有する、安定性のある耐熱性 T 1 リパーゼを製造する方法に関する：

a) 融合リパーゼについては 6 5 、成熟リパーゼについては 7 0 の最適温度を有すること、

b) 8 ~ 9 の間の最適 pH を有すること、

c) pH 6 ~ 1 2 で安定性を有すること。

さらにまた、本発明は、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) を有する融合リパーゼ T 1 を製造する方法であって、該融合リパーゼ T 1 が約 6 3 k D a の分子量を有する方法に関する。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 7 】

ジオバチルス属 T 1 株のスクリーニング

ジオバチルス属 T 1 株の単離および同定は好熱菌種に関する本発明の基礎となるものである。ジオバチルス属 T 1 株の培養物は、Enzyme and Microbial Technology Research Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Science and Environmental Studies, Universiti Putra Malaysia から得ることができる。

【 0 0 1 8 】

マレーシアのパーム油廃液からリパーゼ産生菌をスクリーニングする過程で、トリオレイン寒天プレートにおいて陽性の結果をもたらす T 1 を単離した。このリパーゼ産生菌の系統学的な位置を確認するために、形態学および生理学的特徴、1 6 S r R N A 分析、細胞脂肪酸分析、D N A 組成分析、D N A / D N A ハイブリダイゼーション分析およびリボプリント分析を行った。

【 0 0 1 9 】

ジオバチルス属 T 1 株の単離および同定

サンプルは、マレーシアのセラゴールにて、パーム油廃液から採取した。ジオパチルス属 T 1 株は、60、150 rpm の振盪条件下の、NaCl 0.2%、MgSO₄・7H₂O 0.04%、MgCl₂・6H₂O 0.07%、CaCl₂・2H₂O 0.05%、KH₂PO₄ 0.03%、K₂HPO₄ 0.03%、(NH₄)₂SO₄ 0.05%、そして唯一の炭素源としてオリーブ油 (2%) を含む強化培地から単離した。これを、リパーゼ産生菌のスクリーニングのためにトリオレイン寒天プレート上に播種した。

【0020】

本発明の別な態様においては、ジオパチルス T 1 株は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅を含む方法により同定することができる。典型的には耐熱性 T 1 リパーゼ遺伝子を PCR 増幅する。PCR 増幅は、

- a) 少なくとも 94 での少なくとも 4 分間の予備変性工程、
- b) 少なくとも 94 での少なくとも 1 分間の変性工程、
- c) 56 ~ 70 での少なくとも 2 分間のアニーリング工程、
- d) 少なくとも 72 での少なくとも 1 分間の伸長工程、
- e) 少なくとも 94 での少なくとも 7 分間の最終伸長工程

の各工程を含むことができる。また、PCR 増幅サイクルは、25 ~ 45 サイクル反復してもよい。

【0021】

形態学的研究のために、純粋な細菌株を栄養寒天プレート上に画線し、60 でインキュベートした後、グラム染色を施し、染色結果を光学顕微鏡で観察した。形態学的および生理学的特徴を、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen : ドイツ微生物・細胞カルチャーコレクション) に送付し、本菌株は同機関に、DMS 17139 として寄託された。生理学的特徴の検討は、カタラーゼおよびオキシダーゼ試験、嫌気性増殖、Voges-Proskauer 試験、30、40 および 70 での増殖、pH 5.7、NaCl 2%、5% または リゾチムブロスを含む培地での増殖、D - グルコース、L - アラビノース、D - キシロース、D - マンニトールおよび D - フルクトースの発酵、デンプン、ゼラチン、カゼインおよび Tween 80 の加水分解、チロシンの分解、クエン酸塩およびプロピオン酸塩の利用、硝酸塩の還元、インドールの産生、フェニルアラニンデアミナーゼおよびアルギニンジヒドロラーゼ試験を行った。脂肪酸は、Sherlock 微生物同定システムの指示書にしたがって抽出および分析した。

【0022】

16S rDNA を、2 個のユニバーサルプライマーを用いて PCR により増幅し、PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物を、TOPO TA PCR 2.1 クローニングベクター (Invitrogen) にクローニングした。組換えプラスミドを抽出し、そして次に、ABI PRISM 377 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングした。

【0023】

染色体 DNA を単離および精製し、そして G + C 含量を、クロマトグラフィー条件を用いて決定した。DNA を加水分解し、そして得られたヌクレオチドを逆相 HPLC で分析した。DNA / DNA ハイブリダイゼーションは、2600 型分光光度計を用いて分析した。

【0024】

標準化自動リボタイピング (standardized, automated ribotyping) は、Qualicon (登録商標) リボプリンター (RiboPrinter) システムを用いて行った。リボプリンターシステムは、リボタイピングのための分子処理工程を、独立した自動機器内で組み合わせたものである。工程は、細胞溶解、制限酵素 EcoR I による染色体 DNA の消化、電気泳動による断片の分離、DNA 断片のナイロンメンブレンへのトランスファー、大腸菌由来の rrnB オペロンから生成したプローブへのハイブリダイゼーション、rrnB オペロン配列を含む断片に対するプローブの化学発光による検出、画像検出およびリボプリントパターンのコンピュータ解析を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

単離した T 1 株は、好気性、グラム陽性、内生孢子形成性の桿菌であった（幅 $0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$ および長さ $2.5 \sim 6.0 \mu\text{m}$ ）（図 1）。T 1 株の DNA 塩基組成は、およそ $52.6\% \text{ mol G+C}$ であった。円筒形の内生孢子は、菌端の膨大した孢子嚢に出現する。T 1 株は 70°C でさえも増殖するが、 30°C および 40°C では増殖は認められなかった。同株は、 2% までの NaCl の存在に耐性であった。酸は、D - フルクトースからは産生されたが、D - グルコースおよび D - マンニトールからは産生されなかった。クエン酸塩および硝酸塩試験の結果は陽性を示した。形態学的および生理学的特徴は、表 1 および 2 に示してある。

【 0 0 2 6 】

【表 1】

表 1 : ジオバチルス T 1 株の形態学および生理学的特徴

特徴	ジオバチルス T 1 株	
細胞幅 (μm)	0.8~1.0	
細胞長 (μm)	2.5~6.0	
孢子 楕円／円筒形	+	
膨大孢子嚢	d	10
カタラーゼ	+	
オキシダーゼ	-	
嫌気性増殖	-	
VP 反応	-	
VP ブロス中の pH	4.9	
30℃での増殖	-	20
40℃での増殖	-	
70℃での増殖	+	
以下の条件での増殖		
培地 pH 5.7	+	
NaCl 2%	+	
5%	-	30
リゾチームブロス	-	
以下の物質からの酸の産生		
D-グルコース	-	
L-アラビノース	w	
D-キシロース	w	40

【 0 0 2 7 】

【表 2】

D-マンニトール	-	
D-フルクトース	+	
グルコースからのガス産生	-	
レシチナーゼ	n.g.	
以下の物質の加水分解		10
デンプン	+	
ゼラチン	-	
カゼイン	-	
Tween 80	-	
チロシンの分解	+	
以下の物質の利用		20
クエン酸塩	+	
プロピオン酸塩	-	
硝酸塩還元	+	
インドール産生	-	
フェニルアラニンデアミナーゼ	-	
アルギニンジヒドロラーゼ	-	30

+ : 陽性、- : 陰性、w : 弱い反応、n.d. : 検出せず、n.g. : 増殖せず

【 0 0 2 8 】

【表 3】

表2 ジオバチルス T 1 株および関連する好熱性桿菌の生化学的、形態学的および生理学的特性の比較

特徴	1	2	3	
DNAのG+Cmol%	52.6	53.7	51.0	
30℃での増殖	-	-	-	10
70℃での増殖	+	+	+	
胞子の形状	C	O	O/C	
胞子の位置	T	T	T	
カタラーゼ	+	+	n.d.	
オキシダーゼ	-	+	-	
嫌気性増殖	-	-	-	
グルコースからの酸産生	-	+	+	20
アセトインの生成	-	-	-	
インドールの生成	-	-	-	
H ₂ Sの生成		n.d.	n.d.	
クエン酸塩の利用	+	-	+	
以下の物質の加水分解				
デンプン	+	+	+	30
ゼラチン	-	n.d.	+	
カゼイン	-	w	-	
硝酸塩還元	+	n.d.	+	

+ : 陽性、- : 陰性、w : 弱い反応、n.d. : 検出せず、C : 円筒形、O : 楕円形、T : 菌端。分類は以下のように示した : 1 . *Geobacillus zalihaai*、2 . *Geobacillus thermoleovorans* (Zarilla & Perry, Syst Appl Microbiol. 1987;9:258 ~ 264)、3 . *Geobacillus kaustophilus* (White et al., Antonie Van Leeuwenhoek. 1993-94;64(3-4):357 ~ 86)

【 0 0 2 9 】

1 5 1 9 b p の完全 1 6 S r D N A 配列 (A Y 1 6 6 6 0 3 : 配列番号 1) は、以下のように決定した。

【表 4】

1	gagtttgatc	ctggctcagg	acgaacgctg	gcggcggtgcc	taatacatgc	aagtcgagcg	
61	gaccggatcg	gagcttgctc	tgatttggtc	agcggcggac	gggtgagtaa	cacgtgggca	
121	acctgcccgc	aagaccggga	taactccggg	aaaccggagc	taataccgga	taacaccgaa	
181	gaccgcatgg	tctttggttg	aaaggcggcc	tttggtgtgc	acttgcggtg	gggcccgcgg	
241	cgcattagct	agttggtgag	gtaacggctc	accaaggcga	cgatgcgtag	cgggcctgag	
301	agggtgaccg	gccacactgg	gactgagaca	cggcccagac	tcctacggga	ggcagcagta	10
361	gggaatcttc	cgcaatgggc	gaaagcctga	cggagcgcgc	ccgcgtgagc	gaagaaggcc	
421	ttcgggtcgt	aaagctctgt	tgtgagggac	gaaggagcgc	cgttcgaaga	gggcggcgcg	
481	gtgacggtac	ctcacgagga	agccccggct	aactacgtgc	cagcagccgc	ggtaatacgt	
541	agggggcgag	cgttgctccg	aattattggg	cgtaaagcgc	gcgcaggcgg	ttccttaagt	
601	ctgatgtgaa	agcccacggc	tcaaccgtgg	agggtcattg	gaaactgggg	gacttgagtg	
661	caggagagga	gagcgggaatt	ccacgtgtag	cggtgaaatg	cgtagagatg	tggaggaaca	20
721	ccagtggcga	aggcggtctc	ctggcctgca	actgacgtgc	aggcgcgaaa	gcgtggggag	
781	caaacaggat	tagataccct	ggtagtccac	gccgtaaacg	atgagtgcga	agtgttagag	
841	gggtcacacc	ctttagtgtc	gcagctaacg	cgataagcac	tccgccgggg	gagtacggcc	
901	gcaaggctga	aactcaaagg	aattgacggg	ggcccgcaca	agcggtgagc	catgtggttt	
961	aattcgaagc	aacgcgaaga	accttaccag	gtcttgacat	cccctgacaa	cccaagagat	
1021	tgggcgttcc	cccttcgggg	ggacagggtg	acagggtggtg	catggttgct	gtcagctcgt	
1081	gtcgtgagat	gttggttaa	gtcccgaac	gagcgaacc	ctgcctcta	gttgccagca	30
1141	cgaaggtggg	cactctagag	ggactgccgg	cgacaagtcg	gaggaaggtg	gggatgacgt	
1201	caaateatca	tgccccctat	gacctgggct	acacacgtgc	tacaatgggc	ggtacaaagg	
1261	gctgcgaacc	cgcgaggggg	agcgaatccc	aaaaagccgc	tctcagttcg	gattgcagge	
1321	tgcaactcgc	ctgcatgaag	ccggaatcgc	tagtaatcgc	ggatcagcat	gccgcggtga	
1381	atacgttccc	gggccttgta	cacaccgccc	gtcacaccac	gagagcttgc	aacacccgaa	
1441	gtcgggtgagg	caaccgcga	gggagccagc	cgcgaaggt	ggggcaagt	attggggtga	40
1501	agtcgtaaca	agtagccg					

【 0 0 3 0 】

T 1 株の細胞脂肪酸の大半はイソ脂肪酸であった（表 3）。このうち、イソ分枝ペンタデカン酸（イソ C 15）、ヘキサデカン酸（イソ C 16）およびヘプタデカン酸（イソ C 17）が、全脂肪酸の 78.33% を占めており、特にイソ C 15 およびイソ C 17 が豊富であった。この脂肪酸プロファイルにより、ジオバチルス属は、*Bacillus Alicyclobacillus*、*Brevibacillus*、*Aneurinibacillus*、*Sulfobacillus* および *Thermobacillus* 属の他の中温菌および好熱菌と明確に区別される。T 1 株および *Geobacillus thermoleovorans* D S M 5 3 6^T は、*Bacillus* rRNA 群 5 の典型的な脂肪酸プロファイルを共有するが、表 3 に示すとおり、イソ C 16 の脂肪酸組成における % により区別することができる

。【 0 0 3 1 】

【表 5】

表 3 ジオバチルス T 1 株および系統学的な近縁種の細胞脂肪酸組成

脂肪酸	ジオバチルス属 T 1 株	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (D S M 5 3 6 6 ^T)	
1 0 : 0		2.7	10
1 4 : 0 イソ		1.0	
1 4 : 0	7.22	1.4	
1 5 : 0 イソ	32.42	22.6	
1 5 : 0 アンテイソ	1.01	1.3	
1 5 : 0	0.82	2.1	20
1 6 : 0 イソ	6.14	21.0	
1 6 : 0	4.98	11.2	
1 7 : 0 イソ	39.77	18.5	
1 7 : 0 アンテイソ	4.97	4.6	
1 7 : 0	0.53	1.3	30
1 8 : 1 イソ H	0.38		
1 8 : 0 イソ	0.36	0.9	
1 8 : 0	0.47	3.4	
1 8 . 1		1.2	
1 9 : 0 イソ	0.91		40
不飽和 C 1 6		6.6	
その他		0.2	

【 0 0 3 2 】

DNA / DNA ハイブリダイゼーションの検討を、T 1 株と系統学的な近縁種との間の分類上の関連性を確認するために行った。T 1 株と標準株 *Geobacillus kaustophilus* D S M 7 2 6 3^T および *Geobacillus thermoleovorans* D S M 5 3 6 6^T との間のゲノム DNA / DNA の近縁性は、それぞれ 6 4 . 9 および 6 8 . 8 であった (表 4)。

【表 6】

表 4 ジオバチルス T 1 株および好熱桿菌の DNA / DNA 再会合レベル (%)

生物	ジオバチルス T 1 株
<i>Geobacillus kaustophilus</i> D S M 7 2 6 3 ^T	66.9、62.9 (平均=64.9)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> D S M 5 3 6 6 ^T	70.0、67.6 (平均=68.8)

【 0 0 3 3 】

DNA / DNA 再会合値は、種の定義のための DNA / DNA 類似性の閾値である 70 % を下回った。リボプリント分析を、T 1 株の近縁関係 (affiliation) の決定のために行った。しかしながら、T 1 株のリボプリントパターンは、D u p o n t 同定ライブラリーによっては、種のレベルでの同定 (> 0 . 8 5) がなされるようには同定されなかった。そのリボプリントパターンは、*Geobacillus kaustophilus* D S M 7 2 6 3 ^T に対して最も高い類似性を示した (0 . 6 9) 。*Geobacillus therleovorans* D S M 5 3 6 6 ^T のパターンの類似性はいくらか低かった (0 . 5 7) 。*Geobacillus kaustophilus* D S M 7 2 6 3 ^T および *Geobacillus thermoleovorans* D S M 5 3 6 6 ^T のパターンは、0 . 6 4 のバイナリーな類似性 (binary similarity) を示した。

10

【 0 0 3 4 】

結果として、T 1 株は、形態学および生理学的検討、細胞脂肪酸組成、DNA 組成、DNA / DNA ハイブリダイゼーションおよびリボプリント分析により、新種の成員として認められるに値するものである。したがって、我々は、T 1 ^T 株について、新種、*Geobacillus zalihae* sp. nov. の創設を提案する (za.li.'hae N.L. gen. n. zalihae of za liha は、極限微生物について多大な貢献を行った Universiti Putra Malaysia の科学者に敬意を表したものである)。細胞は桿菌状であり、幅 0 . 8 ~ 1 . 0 μ m、長さ 2 . 5 ~ 6 . 0 μ m の、グラム陽性細菌である。菌端芽胞は円筒形であり、胞子嚢は膨大している。T 1 株の DNA 塩基組成は、およそ 5 2 . 6 % m o l G + C であった。同株は、多量のイソ脂肪酸を含んでおり、このうちイソ C 1 5 およびイソ C 1 7 が豊富であった (7 7 . 1 9 %) 。増殖は好気性であり、7 0 °C でも増殖し続け、2 % までの NaCl に耐性があるが、嫌気性に増殖することはできない。カタラーゼおよび硝酸塩試験は陽性である。D - グルコースおよび D - マンニトールから酸は産生しないが、クエン酸塩を利用することができる。デンプンを加水分解するが、ゼラチンおよびカゼインは加水分解しない。

20

【 0 0 3 5 】

ジオパチルス属 T 1 株からの耐熱性リパーゼ遺伝子のクローニングおよびシーケンシング細菌株およびプラスミド

耐熱性 T 1 リパーゼ遺伝子を有する組換えプラスミド p B A D / T 1 (非特許文献 1) を、サブクローニングの給源として用いた。大腸菌株は LB 培地中、3 7 °C で増殖させた。p R S E T C (Invitrogen)、p E T 2 2 b (+) (Novagen) および p G E X - 4 T 1 (Amersham Bioscience、United Kingdom、England) を、サブクローニングおよび発現に用いた。

30

【 0 0 3 6 】

DNA 操作

プラスミド DNA は、QIAGEN miniprep spin kit (QIAGEN、Hilden、Germany) により、製造者の説明書にしたがって単離した。PCR 産物は、GeneClean Kit (Qbiogene、Carlsbad、USA) により、供給者の説明通りに精製した。大腸菌のコンピテント細胞は、慣用の CaCl₂ 法により調製した。

【 0 0 3 7 】

耐熱性 T 1 リパーゼ遺伝子のサブクローニングおよび発現

40

T 1 リパーゼ遺伝子のサブクローニングは、制限酵素サイト B a m H 1 / E c o R 1 を組み込んだプライマーのセット、すなわち、T 1 リパーゼのオープンリーディングフレームをサブクローニングするための p G E X - F o r : 5 ' -GAA GGG ATC CGT GAT GAA ATG CTG TCG GAT TAT G-3 ' (配列番号 2) および p G E X - R e v : 5 ' -AAT AGA ATT CTT A AG GCT GCA AGC TCG CCA A-3 ' (配列番号 3)、および T 1 成熟リパーゼ遺伝子をサブクローニングするための E H 2 - F o r : 5 ' -GAC GGG ATC CGC ATC CCT ACG CGC CAA TGA T-3 ' (配列番号 4) および p G E X - R e v : 5 ' -AAT AGA ATT CTT AAG GCT GCA AGC T CG CCA A-3 ' (配列番号 3) を設計することにより行った。ライゲーションしたプラスミドを大腸菌株を形質転換するのに用い、適切な抗生物質を含むトリブチリン LB 寒天プレートによりスクリーニングした。組換えプラスミドを含む大腸菌 B L 2 1 (D e 3) p 1

50

y s S を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンおよび $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを添加した 200 ml の LB 培地を含む 1 l のブルーキャップボトル中、ロータリーシェーカー上 (200 rpm)、 37°C で増殖させた。

【0038】

シグナルペプチドを有する組換えクローンとシグナルペプチドを有しない組換えクローンとを、 1 mM のイソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) により、 $\text{OD}_{600 \text{ nm}} \sim 0.5$ にて、様々な誘導期間 (0、4、8、12、20、28、36 および 44 時間) 誘導した。これを、IPTG の濃度 (w/o、0.025、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5 および 2.0 mM) および誘導 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ (0.25、0.50、0.75 および 1.00) を変化させることにより、さらに最適化した。培養物 (10 ml) を遠心分離により回収し、 50 mM のリン酸カルシウムバッファー (pH 7.0) 2 ml で再懸濁し、その後超音波処理 (Branson 250 sonifier: 出力 2、デューティサイクル 30%、2 分) を施し、遠心分離 ($12,000 \text{ rpm}$ 、20 分) により澄清化した。粗製透明溶解液をリパーゼアッセイに用いた。

10

【0039】

電気泳動

SDS - PAGE を 12% のゲル上で行い、これによりタンパク質を分析した。広範囲のタンパク質標準物質 (MBI Fermentas、St. Leon-Rot、Germany) を、分子量マーカーとして用いた。

【0040】

20

T1 リパーゼの精製

400 ml の組換え培養物を遠心分離により回収し、超音波処理の前に 40 ml に濃縮した。粗製細胞溶解液を、 10 ml のカラム容積を有する、PBS (pH 7.3) で平衡化したグルタチオン - セファロース HP カラム (XK16/20) に、 $0.2 \text{ ml}/\text{分}$ の流速で負荷した。カラムは、タンパク質が検出されなくなるまで同じバッファーで洗浄した。結合したリパーゼは、 10 mM の還元グルタチオンが添加されたトロンビン開裂バッファー (20 mM の Tris - HCl、 100 mM の NaCl および 0.33 mM の CaCl₂、pH 8.4) により溶出した。融合タンパク質を 20__ にて 20 時間トロンビン開裂に供し、そしてバッファーをセファデックス G - 25 に交換した後、PBS (pH 7.3) に対して透析した。GST タグおよびトロンビン酵素は、グルタチオン - セファロース HP、HiTrap グルタチオン 4 FF および HiTrap ペンズアミジンを連続的に用いることによりさらに除去した。

30

【0041】

シグナルペプチドを含む T1 リパーゼの発現は、それぞれ araC、T7、T7lac または tac プロモーターの制御下にある、pBAD、pRSET C、pET22b (+) または pGEX - 4T1 を含む原核細胞系によって行った。これらのうち、高レベルの発現を誘導することに関して、tac プロモーターの制御下にある pGEX - 4T1 発現系により比較的高レベルの発現が達成され、これをさらなる研究のために選択した。シグナルペプチドを有する組換えプラスミド pGEX - 4T1 を含む組換えクローンの可溶性たんぱく質を増大させるために、簡単な最適化を行った。合計 $11,708 \text{ U}$ のリパーゼ活性が、 0.05 mM の IPTG により $\text{OD}_{600 \text{ nm}} \sim 0.5$ にて 8 時間誘導した場合に検出され、このときの比活性は $30.192 \text{ U}/\text{mg}$ であった (表 5)。

40

【0042】

【表 7】

表5 シグナルペプチドを含むまたは含まない T 1 リパーゼ遺伝子の発現

最適化条件	培養物 1 lあたりの総活性	
	シグナルペプチド有り	シグナルペプチド無し
誘導時間 (時間)	5,627(8)	23,915(12)
誘導剤濃度 (mM)	11,708(0.050)	31,609(0.025)
誘導 OD _{600nm}	-	41,902(0.750)

10

注記：組換えプラスミド p G E X / T 1 または p G E X / T 1 S を含む宿主 B L 2 1 (D e 3) p l y s S を、1 m M の I P T G により OD_{600nm} ~ 0.5 にて種々の時間誘導した。括弧内の数字はそれぞれのパラメータの最適値を示す。総活性は、1 l の培養物をベースに算出した。

【0043】

理論的には、T 1 リパーゼを G S T 融合タンパク質として原核細胞系で発現させることにより、アフィニティークロマトグラフィーを用いた組換えリパーゼの迅速な精製が可能となる。しかしながら、我々は、高レベルの活性が検出されたにもかかわらず、組換えリパーゼの可溶性画分がグルタチオンセファロース 4 F F に結合しなかったため、これを精製することができなかった。これは、G S T およびシグナルペプチドの高疎水性領域により、立体構造の変化や G S T ドメインの不適切な折畳みが起こるためと思われる。幾つかのケースでは、G S T 融合タンパク質は、完全にまたは部分的に不溶性であった。さらに、高レベルの発現が、部分的な、高度に不溶性の融合タンパク質の不適切な折畳みに寄与し、それにより融合タンパク質のアフィニティークラムへの結合が妨げられる可能性があった。

20

【0044】

Frangioni および Neel (非特許文献 2) によれば、G S T 融合タンパク質の不溶性はよく起こるものである。このため、サルコシル溶解法を、部分的に不適切に折り畳まれた活性な T 1 融合リパーゼを可溶化するのに用いた。可溶化融合タンパク質を正しい折畳みに折畳み直し、これにより G S T 融合タンパク質がアフィニティークロマトグラフィーに結合できるようにする目的で、非イオン界面活性剤 T r i t o n X - 1 0 0 を、サルコシルを抑制 (sequester) するために用いた。表 6 に示すとおり、融合タンパク質を陰イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤とで処理することにより、約 2 5 % の回収率、および 7.3 倍の精製倍率が得られた。

30

【0045】

【表 8】

表6 シグナルペプチドを有する G S T 融合リパーゼの精製

40

精製工程	総活性 (U)	総タンパク質 (mg)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製 倍率
細胞溶解物	1,824.90	37.90	48.15	100.00	1.00
グルタチオンセファロース	454.79	1.29	352.55	24.92	7.31

注記：融合タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィーでの結合のために、2 % の陰イオン界面活性剤サルコシルと 1 % の非イオン界面活性剤 T r i t o n X - 1 0 0 とにより可溶化した。

50

【 0 0 4 6 】

シグナルペプチドは、真核細胞および原核細胞の両方において、ほぼすべてのタンパク質が分泌経路に入るのを制御しており、タンパク質が膜を介して輸送されるときに切除される。しかしながら、シグナルペプチドは、耐熱性 T 1 リパーゼの構造遺伝子に寄与しない。したがって、我々は、マトリックス支持体に不動化されたグルタチオンへの G S T 融合タンパク質のアフィニティー結合を妨げることなく、G S T タグおよび T 1 成熟リパーゼの折畳みおよび相互作用を改善する目的で、シグナルペプチドを除いて T 1 リパーゼを発現させることを試みた。

【 0 0 4 7 】

合計 28 個のアミノ酸残基が G S T 部分をカバーする T 1 リパーゼの動きを制限していたため、シグナルペプチドの除去は融合リパーゼを硬化させた。T 1 リパーゼ遺伝子の操作は、発現レベルを、誘導時間および誘導剤濃度について、それぞれ 4 . 25 倍および 2 . 70 倍と顕著に改善した (表 5)。発現のさらなる最適化により、0 . 025 mM の IPTG で OD_{600nm} ~ 0 . 75 にて 12 時間誘導した場合、培養物において 41 , 902 U / l の発現レベルが得られた。これは、野生型ジオバチルス属 T 1 株と比較した場合、発現レベルの約 279 倍の増加である。

【 0 0 4 8 】

融合タンパク質からシグナルペプチドを除去することにより、活性な T 1 リパーゼの収率が改善されるばかりでなく、また、グルタチオンセファロース 4 F F カラムでのアフィニティークロマトグラフィーによる、均質になるまでの精製が簡易化された (図 2)。表 7 に示すとおり、およそ 72 . 55 % の回収率と、2 . 87 倍の精製倍率が得られた。融合リパーゼの精製により、比活性が 103 . 762 U / mg (粗製細胞溶解液) から 297 . 929 U / mg (精製融合リパーゼ) へと増加した。

【 0 0 4 9 】

T 1 成熟リパーゼは、次の精製工程により得た (表 8)。融合リパーゼは、トロンピンプロテアーゼにより、20、20 時間で切断し、そして透析の前に、バッファーを PBS (pH 7 . 3) に交換し、かつ遊離グルタチオンを除去するためにセファデックス G - 25 に供した。G S T タグおよびトロンピン酵素を除去するために、これをグルタチオンセファロース HP、HiTrap グルタチオンセファロース 4 F F およびベンズアミジン F F (high sub) でのアフィニティークロマトグラフィーに順次供した。

【 0 0 5 0 】

【表 9】

表 7 シグナルペプチドを有しない G S T 融合リパーゼの精製

精製工程	総活性 (U)	総タンパク 質(mg)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製 倍率
細胞溶解物	3,732.331	35.970	103.762	100.00	1.00
グルタチオンセファロース	2,707.880	9.089	297.929	72.55	2.87

注記：融合タンパク質の直接精製は、界面活性剤を一切含まないアフィニティークロマトグラフィーにより行った。

【 0 0 5 1 】

【表 10】

表8 T1成熟リパーゼの精製

精製工程	総活性 (U)	総タンパク質 (mg)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製倍 率
細胞溶解物	28,848.120	138.255	208.659	1.00	100.00
アフィニティー1	20,557.051	42.038	489.011	71.26	2.34
アフィニティー2	14,852.742	15.487	959.033	51.49	4.60

10

注記：T1成熟リパーゼの精製は、アフィニティークロマトグラフィーによって行った。アフィニティー1は、グルタチオンセファロースHPを表す。アフィニティー2は、連続して設置されたグルタチオンセファロースHP、HiTrapグルタチオンセファロース4FFおよびHiTrapベンズアミジン（high sub）を表す。

【0052】

T1融合リパーゼおよびT1成熟リパーゼの特徴化

T1リパーゼを、40 から80 までの範囲の5 間隔の温度で、30分間、酵素活性について試験した。温度安定性試験は、種々の温度で様々な時間について行った。組換えT1リパーゼはまた、pH活性および安定性の決定のためにpH4～12の範囲の広範囲のpH値に保った。バッファー系として、50mMの酢酸バッファー（pH4～6）、リン酸カルシウムバッファー（pH6～8）、Tris-HClバッファー（pH8～9）、グリシン-NaOHバッファー（pH9～11）、およびNa₂HPO₃/NaOHバッファー（pH11～12）を用いた。エフェクター（金属イオン、界面活性剤）および阻害剤の効果は、ペプスタチン（1.0mM）を除き、それぞれ1mMおよび5mMの濃度で、50 、30分の条件で検討した。

20

【0053】

温度の活性および安定性に対する影響は、種々の温度で30分間試験した。60 ～80 の温度範囲で最も活性が高く、最大活性は70 で得られた（図2）。リパーゼの活性および安定性に対するpHの影響は、種々のpHで30分間、振盪条件下で試験した。図3に示すとおり、広いpH範囲、特にpH6～10で活性があり、オリーブ油を基質に用いた場合、最適pHは9であった。pHによる処理により、T1成熟リパーゼがアルカリpHで比較的安定であることが示された（図4）。

30

【0054】

終濃度1mMの金属イオンの影響を、50 、30分間の処理で試験した。図5に示すとおり、Na⁺、Mn²⁺およびK⁺は、リパーゼ活性を、15分間の処理の後で若干高めた。Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、K⁺およびZn²⁺、特にCa²⁺は、30分間の処理の後でさえ、酵素活性を有意に低下させることなく安定化効果を示した。しかしながら、Fe²⁺およびCu²⁺は、30分後にリパーゼ活性を60%および52%と、強く抑制した。リパーゼ活性への界面活性剤の影響は、0.1%の濃度で検討した（図6）。0.1%のTweenの添加により明確な向上が見られ、特にTween80は、0および30分の処理の後、リパーゼ活性をそれぞれ63%および88%増加させた。

40

【0055】

基質のリパーゼ活性への影響について、種々のトリグリセリドおよび天然油を、基質特異性を検討するために用いた。図7は、T1リパーゼにとって、天然油が、トリグリセリドに比べて基質として好ましいことを示している。同酵素は、オリーブ油、トウモロコシ油、ヒマワリ油およびパーム油などの長い炭素鎖を有する天然油に対してより選択的であった。これは、T1リパーゼの工業用触媒としての良好な可能性を示すものである。

【0056】

50

いくつかの金属キレート剤、還元剤、セリンプロテアーゼ阻害剤およびアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤などの阻害剤のリパーゼ活性への影響を、T 1 成熟リパーゼに対する抑制効果の検討に用いた。EDTAが5 mMにおいてもリパーゼ活性にわずかな影響しか示さなかったことから、同酵素は金属酵素ではなかった。また、 β -メルカプトエタノールおよびDTTなどの還元剤は、T 1 リパーゼに対し、わずかな抑制効果しか示さなかった。一方、同リパーゼは、5 mMのPMSFおよび1 mMのペプスタチンの添加により強く抑制され、これはセリンおよびアスパラギン酸残基が触媒メカニズムに重要な役割を演じていることを示すものである(図8)。なお、*Bacillus stearothermophilus*からのP 1 リパーゼは、10 mMのPMSFにより77%の抑制を示した(Sunchaikul et al., *Protein Expr Purif.* 2001;22(3):388~98)。

10

【0057】

精製したT 1 融合リパーゼおよびT 1 成熟リパーゼの特性を、リパーゼ活性に対するGSTタグの影響を検討するために比較した。両方のリパーゼを精製し、その生理化学的特性を検討した(表9)。融合パートナーの存在により、最適温度およびpHは、それぞれ65 およびpH 8と若干低下した。一方、金属イオンおよび基質については、有意な差異は観察されなかった。しかしながら、Tween 20~80は、T 1 成熟リパーゼに対して向上効果をもたらしたが、融合パートナーの存在下でのみ安定であった。いずれのリパーゼも、試験した濃度のセリンプロテアーゼ阻害剤およびアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤により抑制された。

20

【0058】

【表11】

表9 耐熱性T 1 成熟リパーゼと融合リパーゼとの比較

特性	融合リパーゼ	成熟リパーゼ
最適温度	65°C	70°C
温度安定性	$T_{1/2}$ =65°Cで2.5時間	$T_{1/2}$ =60°Cで12時間
最適pH	8	9
pH安定性	8~10	8~11
金属イオン	Mg ²⁺ 、Ca ²⁺ 、Mn ²⁺ 、K ⁺ およびNa ⁺	Mg ²⁺ 、Ca ²⁺ 、Mn ²⁺ 、K ⁺ およびZn ²⁺
界面活性剤	TweenおよびTriton X-100で安定	TweenおよびTriton X-100で安定
基質	天然油	天然油
阻害剤	PMSFおよびペプスタチン	PMSFおよびペプスタチン

30

【0059】

GSTタグは、シグナルペプチドを有しないT 1 成熟リパーゼに硬く融合されているため、3次元構造および生物活性に最小限の影響を与えたにすぎず、生理化学的特性に有意な変化をもたらさなかった。T 1 成熟リパーゼの方が、わずかにpH 1単位および5 高かった最適pHおよび最適温度以外は、T 1 融合リパーゼおよび成熟リパーゼとの間に有意な差異はなかった。T 1 融合リパーゼおよび成熟リパーゼの、セリンプロテアーゼ阻害剤およびアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤に対する挙動は同じであった。このことから、我々は、融合タンパク質の精製が簡易化され、より大量かつ経済的に製造されるGSTタグと融合したT 1 リパーゼを、工業用途、特に温水洗濯用の洗剤向けに提案する。さらに、高濃度の融合リパーゼにおける凝集により形成される融合タンパク質の沈殿は、これを、融合リパーゼのpIからかけ離れたpH 9のバッファーに溶解することにより、容易に

50

可溶化された。

【産業上の利用可能性】

【0060】

本発明によるT1リパーゼ、特にT1融合リパーゼは、耐熱性であり、精製が容易であるため、工業用途、特に温水洗濯用の洗剤などに適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】T1株の顕微鏡写真を示す写真図である。

【図2】成熟T1リパーゼの温度による活性を示す図である。精製T1リパーゼを、種々の温度で30分間、250rpmの振盪速度で、オリーブ油を基質としてアッセイした。

10

【図3】T1リパーゼの活性試験を示す図である。同酵素を、pH4～pH12の様々なpHで、比色法によりアッセイした。用いた記号は以下のとおりである。○：酢酸バッファー、△：リン酸カルシウムバッファー、□：Tris-HClバッファー、×：グリシンバッファー、◇：Na₂HPO₃/NaOHバッファー。安定性試験では、T1リパーゼは、様々なpH(1:1、v/v)でのプレインキュベーションの後に、70℃で30分間アッセイした。

【0062】

【図4】T1リパーゼの安定性を示す図である。同酵素を、pH4からpH12までの様々なpHで30分間前処理した後に、T1リパーゼの残存活性をアッセイした。用いた記号は以下のとおりである。○：酢酸バッファー、△：リン酸カルシウムバッファー、□：Tris-HClバッファー、×：グリシンバッファー、◇：Na₂HPO₃/NaOHバッファー。安定性試験では、T1リパーゼは、様々なpH(1:1、v/v)でのプレインキュベーションの後に、70℃で30分間アッセイした。

20

【図5】リパーゼ活性に対する金属イオンの影響を示した図である。

【図6】リパーゼ活性に対する界面活性剤の影響を示した図である。

【図7】リパーゼ活性に対する基質の影響を示した図である。

【図8】リパーゼ活性に対する阻害剤の影響を示した図である。

【図 2】

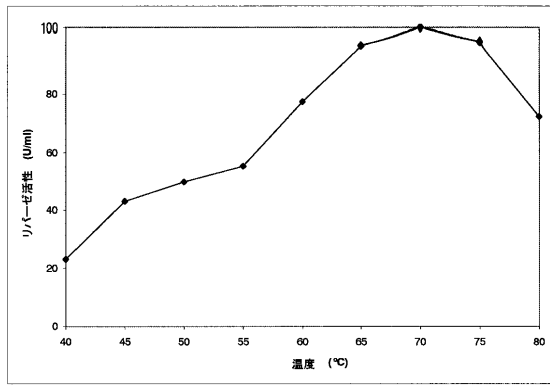


図 2

【図 3】

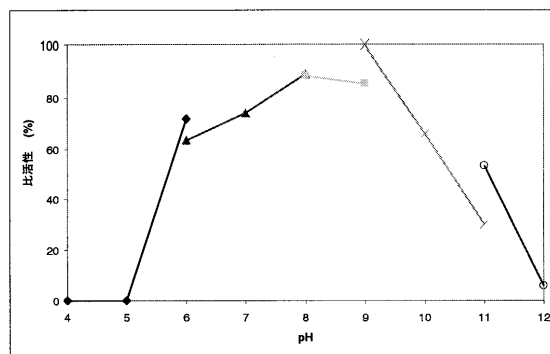


図 3

【図 6】

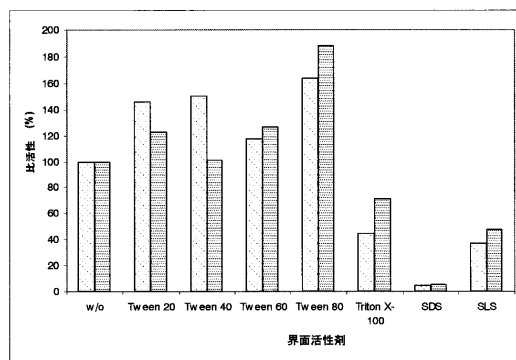


図 6

【図 7】

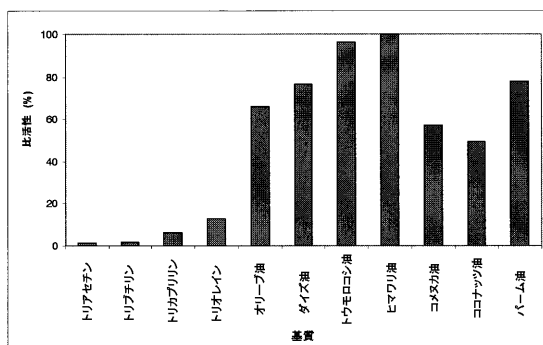


図 7

【図 4】

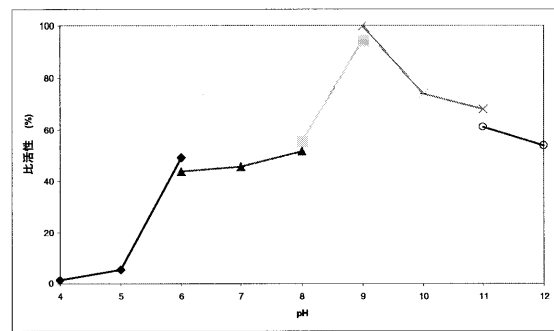


図 4

【図 5】

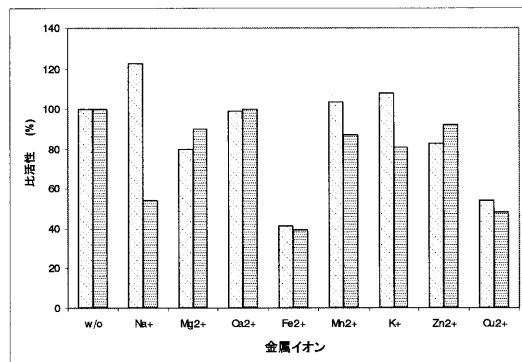


図 5

【図 8】

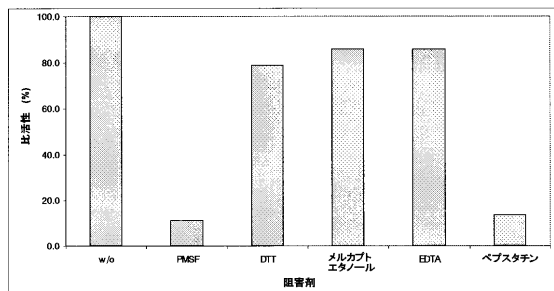


図 8

【図 1】



図 1

【配列表】

0004912636000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:00

- (72)発明者 アブ バカー サレー
マレーシア ダルール エーサン、セランゴー、セルダン、ユーピーエム 4 3 4 0 0 内
- (72)発明者 マヒラン バスリ
マレーシア ダルール エーサン、セランゴー、セルダン、ユーピーエム 4 3 4 0 0 内
- (72)発明者 レオウ シーン コー
マレーシア ダルール エーサン、セランゴー、セルダン、ユーピーエム 4 3 4 0 0 内

審査官 水落 登希子

- (56)参考文献 Biosci.Biotechnol.Biochem. , 2 0 0 4 年 1 月 2 4 日 , Vol.68, No.1 , p.96-103
Biosci.Biotechnol.Biochem. , 1 9 9 8 年 , Vol.62, No.6 , p.1243-1246
J.Bacteriol. , 1 9 9 9 年 , Vol.181, No.17 , p.5242-5249
J.Chromatography B , 2 0 0 3 年 , Vol.786 , p.7-15
Clin.Exp.Immunol. , 1 9 9 9 年 , Vol.115 , p.397-403

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 P 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 8
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S (S T N)
G e n B a n k / G e n e S e q