学　位　論　文

低温性食用油分解菌 YY31 株の単離と

それが有する低温適応型リパーゼ LipYY31 の

キャラクタリゼーション

Isolation of an Edible-Oil Degrading Psychrotrophic

Bacterium Strain YY31 and Characterization of

Its Cold-Adapted Lipase LipYY31.

富山大学大学院

理工学教育部（博士課程）

地球生命環境科学専攻

山代　陽子

目　次

要　旨・・・

5. LipYY31 の酵素活性の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19

結　果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22

I. 食用油分解菌 YY31 株の単離とキャラクタリゼーション・・・・・・・・・・・・22

1. YY31 株の単離とハロー形成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22

2. 細胞形態と食用油への走化性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22

3. 増殖曲線と食用油の分解率・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23

4. SDS-PAGE とザイモグラムによる産生リパーゼの検出・・・・・・・・・・・23

5. 生化学性状と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による菌種の同定・・・・・・・・24

II. YY31 株が産生するリパーゼ LipYY31 のキャラクタリゼーション・・・・・・・24

1. リパーゼ遺伝子 *lipYY31* の塩基配列と推定アミノ酸配列・・・・・・・・・24

2. LipYY31 大量発現系の構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26

3. LipYY31 のリパーゼ活性の至適 pH 及び温度・・・・・・・・・・・・・・・26

4. LipYY31 の基質特異性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27

5. LipYY31 の酵素活性に及ぼす金属イオン，界面活性剤及び有機溶剤の影響・27

考　察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28

結　語・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

謝　辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36

図・表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44

要　旨

新規の低温適応型リパーゼを得るため，低温性食用油分解菌の単離とその産生リパーゼのキャラクタリゼーションを行なった。まず，富山・石川両県下の計 109 地点から，海水，河川水，池水，下水，土壌などの試料を採取し，キャノーラ油を添加した寒天培地に，各試料水や土壌懸濁液を塗布して培養した。そして，試料に含まれていた細菌が，寒天培地上で増殖して形成したコロニーの周縁に，キャノーラ油を分解してできる透明帯（ハロー）を顕著に形成した株を単離した。こうして得られた 42 株の食用油分解菌の中で，特に優れた油分解能を示した YY31 株を以後の実験に供した。光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡による観察から，YY31 株はグラム陰性の桿菌で，1 本の極鞭毛を用いて運動し，食用油に対し正の走化性を示すことが明らかとなった。生化学性状と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から，YY31 株は *Pseudomonas* sp. と同定された。ハロー形成，増殖速度及び油脂の分解率は，25°C において最も高かったが，5°C においても顕著な増殖と油脂の分解が見られたため，YY31 株は低温性食用油分解菌と考えられた。菌体と培養上澄を試料とした SDS-PAGE とザイモグラムより，YY31 株の産生するリパーゼは 1 種類で，その分子量は約 50 kDa であることが示された。PCR 及びインバース PCR を用いてリパーゼ遺伝子の塩基配列の解析を行なったところ，YY31 株産生リパーゼ（LipYY31 と命名）の遺伝子は，1,410 bp の Open Reading Frame から成り，アミノ酸 470 残基，分子量 49,584 Da のタンパク質に相当するリパーゼをコードすることが推定された。この推定アミノ酸配列の相同性検索から，

LipYY31 は新規なリパーゼでサブファミリーI.3 に属することが示唆された。さらに，そのアミノ酸配列中の触媒作用を持つ Ser 残基周辺に，リパーゼ固有の保存領域 GXSXG (X: 任意のアミノ酸) モチーフが存在することも示された。次に，LipYY31 の遺伝子を組み込み形質転換させた大腸菌で LipYY31 を過剰発現させ，それを回収・精製し，そのリパーゼ活性を調べた。その結果, LipYY31 の活性至適温度は 25-30°C で, 0-5°C でもその約 20-40% にあたる活性を示した。この結果より，LipYY31 は低温適応型リパーゼと考えられた。なお, LipYY31 の活性の至適 pH は 8.0 だった。また, LipYY31 の活性は, Cd^{2+}, Zn^{2+}, EDTA により強く阻害され，Ca^{2+}によって大きく促進された。LipYY31 は，トリグリセリド類と *p*-ニトロフェニルエステル類の中の，それぞれトリカプリン（C10:0）と *p*-ニトロフェニルカプレート（C10）に対し高い基質特異性を示した。LipYY31 は，ゴマ油やダイズ油のような天然基質に対しても高い活性を示した。さらに，LipYY31 は，界面活性剤や有機溶剤の存在下でも高い活性と安定性を示した。

以上のように，YY31 株の有する LipYY31 が，中低温域において安定した活性を示すことや，金属イオン，界面活性剤，有機溶剤との併用が可能であることなどから，LipYY31 の産業や環境改善など広汎な分野への応用が期待された。

Abstract

To obtain a novel cold-adapted lipase, we isolated an edible-oil degrading psychrotrophic bacterium, and characterized its lipase. In both Toyama and Ishikawa prefectures, water and soil samples were collected from 109 stations like as sea, rivers, ponds, sewages, and soils. These samples were spread on agar plates containing canola oil. Bacterial colonies showing lipase production (halo formation) were isolated. One strain, designated as YY31, showed the highest lipolytic activity in 42 strains which formed colonies with obvious halo, and was selected for further study. Observation by an optical microscope and a transmission electron microscope (TEM) showed that the strain YY31 was gram-negative, rod shaped, motile by means of one polar flagellum, and exhibited chemotaxis toward edible oil droplets. From results of biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence, YY31 was identified as *Pseudomonas* sp. YY31. And results of halo formation, growth curve and edible-oil degrading rate implied that strain YY31 was a psychrotrophic because both growth and lipolytic activity were the most active at 25°C, and they were also active at 5°C. SDS-PAGE and zymogram analysis of the bacterial body and the culture broth supernatant revealed that strain YY31 produced only one lipase and the molecule mass was about 50 kDa. The lipase (designated as

LipYY31) gene was amplified by PCR and inverse PCR, sequenced, and analyzed. The LipYY31 DNA fragment contains an open reading frame of 1,410 bp which encoded a protein of 470 amino acids with an estimated molecular mass of 49,584 Da. Homology search based on deduced amino acid sequence of LipYY31 suggested that LipYY31 would be a novel lipase, showed high sequence similarity to those of subfamily I.3 lipase and had a conserved GXSXG motif around the catalytic Ser residue. Overexpression of recombinant lipase LipYY31 in transformed *E. coli* and purification was performed, and lipase activity of LipYY31 was measured. Its optimal temperature was 25-30°C, and it retained 20 -40% of its activity at 0-5°C. Thus, Lip YY31 was considered as a cold-adapted lipase. The optimal pH value was 8.0. The activity was strongly inhibited by Cd^{2+}, Zn^{2+}, EDTA and was highly dependent of Ca^{2+}. Tricaprin and *p*- nitrophenyl caprate were the most favorable substrates among the triglycerides and *p*-nitrophenyl esters, respectively. LipYY31 also had high activity towards natural substrates including edible vegetable oils and animal fats such as sesame oil and soybean oil. Furthermore, LipYY31 was very active and stable in the presence of several detergents and organic solvents.

In this study, LipYY31 derived from strain YY31 exhibited high and stable activity at low and moderate temperatures and was very active and stable in the presence of

metal ions, several detergents, and organic solvents. These properties show that LipYY31 may have potential economic benefits and are expected to make the lipase useful for some industrial and environmental applications.

緒　言

現在，多様な種類の酵素が製造され，我々の日常生活に用いられている。グローバルインダストリーアナリシス社の推計によると，産業用酵素の世界市場は 2015 年までに 37,400 万ドルに達するとされており，カルボヒドラーゼ，プロテアーゼ，そしてリパーゼが主要な製品区分を占めると予想されている（www.prweb.com/releases/industrial_enzymes/proteases_carbohydrases/prweb8121185.htm）。

リパーゼ（トリアシルグリセロール・アシルハイドロラーゼ，EC3.1.1.3）は，脂肪酸とグリセリンからなる脂肪の，エステル部位の加水分解と合成を可逆的に触媒する酵素である。この酵素は，多くの植物や動物，そして微生物により産生され，自然界に普遍的に存在している（Nagarajan *et al.*, 2012）。中でも，微生物由来のリパーゼは多様性に富んでおり，その多くが，それぞれに特徴的な触媒作用や基質特異性などを示すことが知られている。そのため現在では，食品加工業，化学産業，バイオ医薬業，環境浄化産業などの幅広い産業分野が，それぞれの目的に見合う特徴を持った微生物由来のリパーゼを選択し，活用している。例えば，食品の風味加工や色調保存，洗剤の油洗浄力の強化，バイオディーゼル生産における触媒工程の短縮，産業用・家庭用排水溝の油性汚濁の処理などが，そうしたリパーゼの適用例として挙げられる（Hasan *et al.*, 2006; Sangeetha *et al.*, 2011）。

微生物の中でも細菌が産生するリパーゼは，それらのアミノ酸配列や生化学性状に基づき 8 つのファミリー(I-VIII) に分類される。いくつかの細菌由来のリパーゼは，精製されて

特性が調べられ，さらにはそれらの遺伝子がクローニングされて塩基配列まで解析されている（Choo *et al.*, 1998; Amada *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011）。そして，ファミリーI のリパーゼは，さらに I.1 から I.7 まで 7 つのサブファミリーに分類されている。*Pseudomonas* 属の細菌が産生するリパーゼのほとんどは，I.1，I.2，I.3 の 3 つのサブファミリーのいずれかに属していることが報告されている（Jaeger *et al.*, 1994; Arpigny *et al.*, 1999; Tayyab *et al.*, 2011）。サブファミリー I.1 と I.2 のリパーゼは，アミノ酸配列が 30-40%の相同性を有している一方，サブファミリーI.3 のリパーゼのアミノ酸配列は，それら二つのサブファミリーとは 20% 以下の相同性しか持っていないことが示されている。この I.3 に属するリパーゼに共通の特徴として，分子量が 50-68 kDa で，アミノ酸配列にシステイン残基を含まず，C-末端領域に分泌シグナルといくつかの GGXGXDXUX モチーフ（X: 任意アミノ酸; U: 疎水性アミノ酸）の反復配列を持つことなどがある。また，このリパーゼはタイプ I 分泌系(TISS)，別名 ABC (ATP-binding cassette) 輸送系，を経由して分泌されると考えられている（Angkawidjaja *et al.*, 2006; Rosenau *et al.*, 2000）。しかし，サブファミリーI.1 や I.2 に比べ，I.3 に関する報告例は少なく，その構造や機能には未だ不明な点が多い（Angkawidjaja *et al.*, 2006）。

低温下で高い脂質分解活性を示す低温適応型のリパーゼは，低温処理工程を含む応用分野への適用が期待されている魅力的な生体触媒である。例えば，低温処理を行なうことで製品回収率や精製度の上昇が見込める薬品・化粧品・食品の製造，バイオディーゼルの生

産，寒冷地における油脂汚染の廃水処理や土壌浄化，冷水対応型洗剤の添加物などへの利用である（Joseph *et al.*, 2008; Tutino *et al.*, 2009）。そして，好冷性あるいは低温性の油脂分解微生物は，この低温適応型のリパーゼを産生する可能性が高いと考えられている。また，界面活性剤や有機溶剤の存在下でも活性を保持しているリパーゼは，洗剤に添加して油脂分解力を向上させたり，工業的に無水系での物質の合成を行なう際などに使用できたりすることから，大きな関心を集めている（Tutino *et al.*, 2009; Ogino *et al.*, 2000）。

そこで本研究では，富山・石川両県の低温環境下から採取した試料水を用い，低温性食用油分解菌の単離を試みた。そして，単離した食用油分解菌の中で最も油分解能の高かった低温性細菌 *Pseudomonas* sp.YY31 株と，この細菌が産生するサブファミリーI.3 に属するリパーゼ LipYY31 について，産業や環境浄化への応用の可能性を探ることを目的に研究を進めた。

材料と方法

I. 食用油分解菌 YY31 株の単離について

1. 単離方法と培養条件

富山・石川両県下の計 109 地点から，海水，河川水，下水，土壌などの，15℃以下にあった試料を採取し，それらから食用油分解菌の単離を試みた。初期スクリーニングとして，超音波で乳化した 1% (w/v) キャノーラ油（味の素，東京）を含む標準寒天培地(日水製薬，東京) に少量の試料水や土壌懸濁液を塗布し，25°C で培養を行なった。そして，寒天培地上に生育・形成された細菌コロニーの中から，その周縁に油分解を示す透明帯（ハロー）を顕著に形成した株を選びだした。さらにそれらを寒天培地上に単一種のコロニーのみが形成されるまで，釣菌と植菌塗布を繰り返す単離操作を行なった。こうして単離した 42 株のキャノーラ油分解菌の中から，油を含む寒天培地上で最も大きなハローを形成した YY31 株を以後の研究に供した。YY31 株は，石川県津幡町森林公園内の池水を単離源とする細菌で，採水時の水温は 15°C であった。

YY31株の培養条件を検討するため，1% (w/v)の食用油脂（キャノーラ油，オリーブ油（味の素，東京)，ラード（雪印，東京)）を含む標準寒天培地あるいはM9寒天培地（0.68% Na_2HPO_4 (無水)，0.3% KH_2PO_4, 0.05% NaCl, 0.1% NH_4Cl, 2mM $MgSO_4$, 0.1mM $CaCl_2$, 1.5% agar）に，事前に形成させておいたYY31株のコロニーから滅菌爪楊枝の先で釣菌して点状に植菌し，5°C，15°C，25°C，35°Cで1週間培養した後に形成されたコロニーとハロ

ーの直径の大きさを比較した。

2. 単離された細菌 YY31 株のキャラクタリゼーション

2.1 形態及び食用油への走化性の観察

菌の形態及び運動性は，位相差顕微鏡と暗視野顕微鏡 (BX51，BH2; オリンパス，東京) で観察した。次に，1% (w/v) リンタングステン酸 (和光純薬) でネガティブ染色した菌体を JEM-1200EXII 透過型電子顕微鏡 (日本電子，東京) を用い，80 kV の加速電圧で観察・撮影を行なった。グラム染色にはフェイバーG（日水製薬)を用いた。食用油に対する走化性は，YY31 株を懸濁した M9 液体培地を，食用油脂（キャノーラ油，オリーブ油，ラード）を 1 辺に塗布したカバーガラスを載せたスライドグラスに封入し，その 30 分後に暗視野顕微鏡による観察を行ない，デジタルカメラ（DS-5M; ニコン，東京）で撮影した。

2.2 増殖曲線と油分解率の測定

まずは，標準液体培地を用いて 25°C で前培養した YY31 株を，初期菌体密度が 1×10^6 cells/ml となるよう，1 % (w/v) の食用油脂（キャノーラ油，オリーブ油，ラード）を含む標準液体培地と M9 液体培地に植菌した。次に，前述の培養条件の検討において，コロニーとハローの両方の形成が明らかに認められた温度域の，下限と上限である 5 °C と 25°C

で, 120 rpm の振盪培養を行なった。このようにして培養した液の一部を経時的に回収し, 細菌計算盤（エルマー，東京）を用いて菌体密度を計測して増殖曲線を， また，*n*- ヘキサン（和光純薬）を用いて培養液中の残存油脂を抽出・乾燥・秤量して，油分解率を求めた。

2.3 産生リパーゼの検出

YY31 株が産生するリパーゼ（LipYY31 と命名）の検出とそれらの分子量を推定するため，菌体と濃縮した培養上澄を試料として SDS-PAGE（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis）とザイモグラムを行なった。菌体試料は，1% (w/v) キャノーラ油を含む標準液体培地で 7 日間培養した YY31 株の懸濁液を，10,000 rpm で 30 分間の遠心（MX-301；トミー，東京）にかけ，得られた沈澱分画を油を含まない新鮮な液体培地で洗浄したものとした。培養液の上澄試料は，遠心で得られた上澄を 0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルターDISMIC (アドバンテック，東京)で濾過して溶液中の不溶物を除去後，分画分子量 10,000 のフィルター付遠心管（Amicon® Ultra-15；ミリポア, Bedford, MA, USA）を用いた限外濾過により, 約 100 倍に濃縮したものとした。SDS-PAGE は，Laemmli の方法（Laemmli, 1970）に従い，10% (w/v) ポリアクリルアミドゲル（和光純薬）を用いて, 定電圧 40V で 15 時間の泳動を行なった。ゲル中のタンパク質は, 0.25% (w/v) の CBB（Coomassie Brilliant Blue；和光純薬）で染色した。また，リパーゼ活性を持つ酵素の検出は，トリブチリンを基質とするゲルを用いたザイモグラムで行なった

（Sommer *et al.*, 1997）。まず，SDS-PAGE のゲル内の SDS を除去するため，電気泳動後のゲルを 20% (v/v) イソプロパノール（和光純薬）で 20 分間洗浄し，ついで蒸留水で 10 分間ずつ 2 回洗浄を行なった。このゲルを 1% (w/v) トリブチリン，25 mM Tris-HCl (pH 8.0)，5 mM $CaCl_2$ を含む 1.3% (w/v) 寒天の白濁したゲルに重ねた。それを 25°C で 1 日間静置し，リパーゼ活性すなわちトリブチリン分解活性を示すタンパク質のバンドを，白濁した寒天ゲル中に透明なバンドとして可視化した。リパーゼ活性を持つバンドの分子量の推定は，低分子マーカー（phosphorylase b: 97.4 kDa，bovine serum albumin: 66.2 kDa，ovalbumin: 45.0 kDa，carbonic anhydrase: 31.0 kDa，trypsin inhibitor: 21.5 kDa，lysozyme: 14.4 kDa）と高分子マーカー（Myosin: 200.0 kDa, β-galactosidase: 116.3 kDa，phosphorylase b: 97.4 kDa，bovine serum albumin: 66.2 kDa，ovalbumin: 45.0 kDa）（バイオラッドラボラトリー，東京）を用いて行なった。タンパク質の濃度は，Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) を用いて測定した。その際，標準液には牛血清アルブミン(Bovine Serum Albumin；和光純薬）を用いた。

2.4　生化学性状

YY31 株の生化学的な諸性質は，API 20NE (BioMerieux, Marcy, l'Etoile, France)を用いた試験に加え，カタラーゼ試験，オキシダーゼ試験で調べた（表 1)。カタラーゼ試験は，菌株のコロニーに 30% (v/v) H_2O_2（和光純薬）を 1 滴添加し，気泡の発生を認めれば陽性

と判定した。オキシダーゼ試験は，チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙（日水製薬）を用いて行なった。

2.5　細菌種の同定

菌種の同定は，解析した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いた BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索により行なった。まず，YY31 株のコロニーを蒸留水に懸濁後，それを 100°C で 10 分間加熱して，菌体内の DNA を蒸留水中に遊離させた。続いて，16S rRNA のユニバーサルプライマー27f (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3')と 1525r (5'- AAAGGAGGTGATCCAGCC -3')を用い，16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を，サーマルサイクラー（Takara PCR Thermal Cycler Dice Gradient; タカラバイオ，滋賀）を用いた PCR で増幅した。PCR は，最初に 95℃で 2 分間加熱し，その後 94℃で 1 分間の熱変性，60℃で 1 分間のアニーリング，72℃で 1 分間の伸長反応のサイクルを 35 回繰り返した後，4℃まで冷却して保存した。増幅産物は，QIAquick PCR purification kit (キアゲン，東京) を用いて精製した後，BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)と ABI Prism 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシークエンスを行なった。得られた塩基配列の類似配列の検索は，NCBI ウェブサイト(http://www.ncbi/nlm.nih.gov) の BLAST を用いて行なった。

II. YY31 株が産生するリパーゼ LipYY31 について

1. リパーゼ遺伝子 *lipYY31* の解析

まず，フェノール・クロロホルム抽出法により YY31 株のゲノム DNA を抽出した。次いで,既報のリパーゼである Lip TK-3 と KB-Lip（Tanaka *et al.*, 2012; Rashid *et al.*, 2001）の遺伝子の塩基配列の，保存性の高い領域を参照して設計したプライマー，5'- CACAA-CCTGGATAACGGCTT -3' (forward) 及び 5' - TCGCGGATCGTGTCATTGCC -3' (reverse) を用いて PCR を行ない，YY31 株のリパーゼ遺伝子（*lipYY31* と命名）の内部断片 1,112 bp を増幅した。PCR プログラムは，最初に 94℃で 3 分間加熱し，その後 94℃で 1 分間の熱変性，55℃で 1 分間のアニーリング，72℃で 1 分間の伸長反応のサイクルを 35 回繰り返し，72℃で 3 分間加熱した後に 4℃に冷却した。そのようにして得られた増幅産物を精製し，その塩基配列の解析を行なった。

次に YY31 株のゲノム DNA を同様に再度抽出し，それを制限酵素 *Hin*d III（ニッポンジーン，東京）を用いて切断後，T4 DNA ligase (タカラバイオ)を用いてセルフライゲーションさせたものを，インバース PCR の鋳型とした。インバース PCR は，前述の塩基配列解析で得られたリパーゼ遺伝子の内部断片の既知配列から設計した 2 組のプライマー，

f1: 5'- CGATTCCACGGTGATCGTCGCCAAC -3'と r1: 5'- TTGCACGGCCTCCAATGCGGCTTTT -3',

f2: 5'- CGGTGATCGTCGCCAACCTGTCCGA -3'と r2: 5'- CGTCCAATGCGGCTTTTTCCGAATC -3'

を用いて，塩基配列が未知の隣接領域の増幅を行なった。得られた増幅産物を精製し，塩基配列の解読と分析を行なった。

2. LipYY31 のアミノ酸配列の推定

解読された塩基配列からの *lipYY31* の ORF 検索，LipYY31 のアミノ酸配列の推定，マルチプルアライメント，分子量と等電点の計算には Genetyx Ver.8 ソフト(ゼネティックス，東京）を用いた。データベース照合によるホモロジー検索は，NCBI ウェブサイトの BLAST を用いて行なった。なお，本研究で決定した YY31 株のリパーゼ遺伝子 *lipYY31* の塩基配列は，アクセッション番号 AB642679 として国際塩基配列データベース（GenBank/EMBL/DDBJ）に登録した。

3. LipYY31 を発現する遺伝子組換え体の作製

LipYY31 の遺伝子 *lipYY31* の ORF を PCR で増幅した。PCR の際には，発現ベクター pET-47b (Novagen, Madison, WI, USA)の *Sma* I サイト及び *Hin*d III サイト，そして *lipYY31* の両端の塩基配列に基づき設計した特異的プライマー，f3: 5'- CTCTTTCAGGGACCCATGGGTATCTTTGAC -3'と，r3: 5'- CTGCGGCCGCAAGCTTTTAGCTAATGAAAAG -3' とを使用した。増幅された PCR 断片は，In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (タカラバイオ)を用いて pET-47b の *Sma* I，*Hin*d III サイト間に挿入した。この組換えプ

ラスミドを，プロトコルに従って大腸菌 *E. coli* BL21(DE3)（Novagen）に導入し，LipYY31 を過剰に発現するための組換え体を作製した。この組換え体を 1%（w/v）トリブチリン（和光純薬）と 25 μg/ml カナマイシン（和光純薬）を添加した Luria-Bertani (LB) 寒天培地（1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar）に植菌・培養し，増殖して形成されたコロニーの周辺に透明なハローが生じたものを，*lipYY31* が挿入された組換え体とし選択した。さらに，挿入した遺伝子に変異がないことを確認するため，Pure Yield Plasmid Miniprep System（プロメガ，Madison, WI, USA)を用いて，組換え体から組換えプラスミドを抽出した。次いで，ベクターpET-47b の両端を標的とするユニバーサル T7 プライマーを用いて，挿入された DNA（*lipYY31*）を PCR で増幅した後に塩基配列を決定し，その塩基配列中の変異の有無を確認した。

4. LipYY31 の過剰発現と精製

リパーゼ LipYY31 のキャラクタリゼーションを行なうために，上記大腸菌の組換え体を用いて，N-末端に 6 つの His-Tag を付加された LipYY31 を過剰発現させた。まず，カナマイシン(25 μg/ml)を添加した LB 培地に組換え体を植菌し，37°C で一晩の前培養を行なった。新たな LB 培地に，その 1%（v/v)となる前培養液を移して本培養を行ない，550 nm の吸光度が 0.4 になったとき，最終濃度が 1 mM となるよう isopropyl-β-D-thiogalacto-

pyranoside (IPTG)（和光純薬）を添加し， 37°C の培養をさらに 4 時間継続した。得られた培養液を 10,000 x g で 10 分間遠心して菌体を回収し，菌体湿重量 1g 当たり 5ml の Bug Buster protein extraction reagent (Novagen) に懸濁し，室温で 15 分間静置して溶菌させた。溶菌液は，遠心(16,000 x g, 20 分間)により可溶性画分と不可溶性画分に分離した。各分画を試料とするザイモグラムを行なった結果，組換えリパーゼは不可溶性画分に存在していたため，不溶性分画を 8 M 尿素で変性させて可溶化した。これを His GraviTrap カラム（GE Healthcare, UK）を用いて精製後，50 mM Tris-HCl (pH 8.0)で一晩，透析した。精製の確認は，前述の YY31 株産生リパーゼの検出方法と同様に，10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE とザイモグラムにより行なった。

5. LipYY31 の酵素活性の測定

LipYY31 の基質特異性に関する検討は，既報（Winkler and Stuckmann, 1979）の方法に若干の変更を加えたものを，そして基質には *p*-ニトロフェニルエステルを用いた。反応液は，0.4% (w/v) Triton X-100（和光純薬）と 0.1% (w/v) アラビアゴム（和光純薬），50 mM Tris-HCl (pH 8.0)バッファーの混合液 165 µl に，イソプロパノールで調整した 16.6 mM *p*-ニトロフェニルエステルを含む基質溶液を 15 µl と，100 mM $CaCl_2$ を 10 µl を加えた溶液を用いた。この反応液が透明になるまで超音波処理した後に，25°C で 10 分間のプレインキュベートを行ない，ついで 10 µl の LipYY31 溶液を添加した。この溶液は，0.2 µg/ml の

LipYY31 を含むように，予め 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)で調整した。酵素反応は 25°C で 20 分間行ない, 反応時間終了と同時に 100°C で 5 分間の加熱処理により反応を停止させた。その後，12,000 rpm で 3 分間の遠心を行ない，得られた上澄の吸光度を 405 nm の波長に設定したマイクロプレートリーダー(Model 550; Bio-Rad, CA, USA)で測定した。なお，リパーゼ活性の 1 単位(U)は，1 分間あたりに 1 µmol の *p*-ニトロフェノールを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。基質にトリグリセリドを用いた測定では，トリグリセリドから遊離する脂肪酸量を既報（Amada *et al.*, 2000）の方法に改変を加えた方法で滴定した。このときの反応液は, 0.4% (w/v) Trion X-100 と 0.1% (w/v) アラビアゴム, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)からなる混合液 1.8 ml に，基質としてトリグリセリド 0.3 g と 100 mM $CaCl_2$ 100 µl を加えた溶液とした。反応液中の基質が均一に分散するまで超音波処理した後に，25°C で 10 分間プレインキュベートし, ついで 100 µl の LipYY31 溶液を添加した。この溶液は，50 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に 0.2 µg/µl の LipYY31 を含有するように調整した。それらの混合液を 170 rpm で振とうし，25°C で 20 分間の酵素反応を行なった後，アセトン：エタノール(1:1, v/v) 7 ml を添加し反応を停止させた。その後，遊離脂肪酸を 10 mM NaOH による滴定で定量した。この場合のリパーゼ活性の 1 単位(U)は，1 分間あたりに 1 µmol の脂肪酸を遊離させるのに必要な酵素量と定義した。LipYY31 の至適温度及び pH については，基質特異性の最も高かった *p*-ニトロフェニルカプレート(C10)を基質として使用した。至適温度については，pH 8.0 の 50 mM Tris-HCl をバッファーとして使用し，反応温度を変え

て LipYY31 の加水分解活性を調べた。LipYY31 の熱安定性については, LipYY31 を 50mM Tris-HCl (pH 8.0)に溶解し，0°C，5°C，15°C，25°C，35°C，45°C のいずれかの温度で 6 時間インキュベートした後に，反応温度 25°C，pH 8.0 で酵素反応を行ない，各残存活性を測定して調べた。LipYY31 の至適 pH と各 pH 下における安定性は，pH 4.0-10.0 の間で検討した。至適 pH は，pH4.0 – 10.0 に調整した GTA バッファー（50 mM 3,3-ジメチルグルタミン酸，50 mM Tris, 50 mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール）からなる反応液に LipYY31 を加え, 25°C で 20 分間反応させたときの酵素活性を測定することで求めた。また，pH 安定性は，pH4.0 – 10.0 に調整した GTA バッファーに LipYY31 を溶解し，5°C で 24 時間インキュベートした後に，pH 8.0 の反応液を用いて 25°C で 20 分間の酵素反応を行ない，残存活性を測定して調べた。金属イオンと界面活性剤が LipYY31 に及ぼす影響の検討では，1 あるいは 5 mM の金属イオン，または 0.005% (w/v) の界面活性剤を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)の反応液を用いて酵素活性を測定した。有機溶剤に対する LipYY31 の安定性は，12.5%, 25%, 50% (v/v) の有機溶剤を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で調整した LipYY31 溶液を，5°C で 1 時間インキュベートした後に，25°C で 20 分間の酵素反応を行ない，各残存活性を測定して調べた。

結　果

I.　食用油分解菌 YY31 株の単離とキャラクタリゼーション

1.　YY31 株の単離とハロー形成

食用油分解菌を単離するための試料は，河川 17 地点，池 17 地点，海 6 地点，下水 12 地点，土壌 6 地点を含む合計 109 か所で採取した。そして，食用油を含む寒天培地上でハローを形成した株の中から，まずはハローが比較的大きい 42 株の分解菌が単離された。次いで，これらの中で，形成されたコロニー及びハローのそれぞれの直径と，その直径の比が最も大きかった YY31 株を選択し，以下の実験に供した。

2.　細胞形態と食用油への走化性

グラム染色を行なったところ，YY31 株はグラム陰性菌であることが明らかになった。位相差顕微鏡を用いて観察した結果，YY31 株は桿菌で，運動性を持つことがわかった。さらに，キャノーラ油などを共存させて観察すると，時間の経過とともに共存する油滴に多くの細胞が集まるという，食用油への正の走化性が観察された(図 1A)。透過型電子顕微鏡による観察では，YY31 株は長径 1.6 ± 0.6μm 短径 0.8 ± 0.1 μm の桿菌で，1 本の極鞭毛を持つことがわかった (図 1B)。

3. 増殖曲線と食用油の分解率

寒天培地上でのコロニー及びハローの形成能を調べた結果，YY31 株は，5°C から 35°C の間で増殖と食用油分解能を示すことが確認された（図 2)。そして，コロニー及びハローのそれぞれの直径，さらにはそれらの直径の比が最大となった 25°C が，YY31 株の生育及び食用油分解に関しての至適温度であると思われた(図 2)。増殖においては, 5°C では 25°C に比べて増殖開始時間の遅延が見られたものの，増殖がプラトーに達した際の菌体密度は 25°C とほぼ同等になった（図 3A, 3B)。また，YY31 株は，標準液体培地に添加されたキャノーラ油を，培養開始から 2 週間後には，25°C で約 86.2%，5°C で約 78.8% 分解することが示された（図 4)。

4. SDS-PAGE とザイモグラムによる産生リパーゼの検出

そこで，YY31 株が産生するリパーゼ LipYY31 について調べた。まず，YY31 株の菌体と濃縮した培養液上澄を試料とする SDS-PAGE を行ない，さらにトリブチリンを基質とするザイモグラムを試みた。その結果，菌体と培養液上澄の両方に約 50 kDa のリパーゼが 1 種類検出された（図 5)。

5. 生化学性状と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による菌種の同定

YY31 株の生化学諸性状を API 20 NE を用いて解析した結果と，好気性でカタラーゼとオキシダーゼに陽性であるという結果（表 1）を合わせた解析から，YY31 株は *Pseudomonas fluorescens* と約 98.6% の性状的相同性を持つことが示された。一方，16S rRNA 遺伝子の塩基配列も *Pseudomonas* 属のものと相同性が高く，特に *P. fluorescens* A506 (CP003041.1)（Loper *et al.*, 2012）及び *P. reactans* strain PSR2 (GQ354529.1)（Oksinska *et al.*, 2011）の塩基配列と 100% (1492bp/1492bp) の一致率が示された。これらの結果より，本分解菌 YY31 株を *Pseudomonas* sp. YY31 株と命名した。

II. YY31 株が産生するリパーゼ LipYY31 のキャラクタリゼーション

1. リパーゼ遺伝子 *lipYY31* の塩基配列と推定アミノ酸配列

まずは，YY31 株が産生するリパーゼ LipYY31 の遺伝子（*lipYY31*）の，塩基配列の解読を試みた。近縁種の既報リパーゼ遺伝子の保存領域の塩基配列から設計したプライマーと，YY31 株から抽出したゲノム DNA を用い，PCR で *lipYY31* 遺伝子の一部を増幅した。この増幅産物の塩基配列を解読し，その両端を起点として新たに設計したプライマーを用いてインバース PCR を行ない，更に長い遺伝子の塩基配列の解読を試みた。その結果，1,410

bp の *lipYY31* の ORF を含む，2,349 bp の塩基配列が解読できた。そこで，この ORF について解析を行なうと，等電点は 4.9 で，G+C 含量は約 60%，このリパーゼは 470 アミノ酸残基からなり，その分子量は 49,584 Da であることが推定された。また，この ORF に対応するアミノ酸配列にはシステイン残基が含まれないことや，サブファミリーの I.3 に分類されるリパーゼに高い相同性を持つことが示された。このアミノ酸配列に基づいた BLAST の相同性検索より，LipYY31 は，*Pseudomonas* sp. TK-3 株のリパーゼ(LipTK-3; BAM 05474) (Tanaka *et al.*, 2012）と 94.38% ，*P. fluorescens* SBW25 株のリパーゼ（YP_0028 72716) (Gal *et al.*, 2003）と 93.80% ，*Pseudomonas* sp. R81 株のリパーゼ（ZP1118811 927) (Mathimaran *et al.*, 2012）と 92.75%，*Pseudomonas* sp. KB700A 株のリパーゼ (KB-Lip; BAB649137) (Rashid *et al.*, 2001）と 90.91%，*Pseudomonas* SIK W1 株のリパーゼ（TliA; AAD09856) (Ahn *et al.*, 1999)と 89.63%の相同性を持つことが示された。また，LipYY31 はその推定アミノ酸配列中に，触媒 triad (Ser207, Asp255, His313)と，Ser207 残基の周辺にリパーゼ特有の保存的領域 GXSXG モチーフを持っており，N-末端にシグナル配列を持たない一方，C-末端に 9 残基の GGXGXDXUX 配列モチーフの 5 回の繰り返しと，2 つの推定分泌シグナルを持っていた（図 6)。

2. LipYY31 大量発現系の構築

次に，YY31 株が産生するリパーゼ LipYY31 の大量発現系の構築を行なった。リパーゼ遺伝子 *lipYY31* の ORF を組み込んだ pET -47b ベクター を作製し，それを *E. coli* BL21 (DE3) に導入して，pET-lip を保持する *E. coli* BL21 (DE3) を作製し， N-末端に His-tag を付加された融合タンパク質として LipYY31 を過剰発現させた。そして，トリブチリンを基質としたザイモグラムにおいて，LipYY31 が，YY31 株の菌体及び培養液上澄試料に含まれる分泌リパーゼと同様に，約 50 kDa のタンパク質であることを確認した（図 7)。また，SDS-PAGE ゲルにおいて CBB 染色されたバンドの色調濃度比解析より，この組換えリパーゼが 90% 以上精製されていることが推察された。

3. LipYY31 のリパーゼ活性の至適 pH 及び温度

大量発現させた後に精製した LipYY31 は，pH 8.0 で最も高いリパーゼ活性とその活性の保持が示された (図 8A)。そこで，反応液の pH を 8.0 として，LipYY31 の活性に及ぼす温度の影響を調べた。その結果，25°C と 30°C の間で最大活性が示され，5°C においてもその約 38% の活性が示された (図 8B)。一方，LipYY31 を所定温度で 6 時間インキュベートした後の残存活性は，25°C の処理で約 50%まで減少し，55°C では失活することが示された。また，0°C から 15°C の温度域では，LipYY31 の活性はほぼ 100% 保持され (図 8B)，その活性は 5 日間でほとんど変化しなかった。

4. LipYY31 の基質特異性

精製された LipYY31 の，トリグリセリド類，*p*-ニトロフェニルエステル類，天然油脂類に対する比活性を，25°C，pH 8.0 の条件下で調べた（表 2)。その結果，トリグリセリド類ではトリカプリン（C10:0）が，*p*-ニトロフェニルエステル類では *p*-ニトロフェニルカプレート（C10）が，最もよく分解された。そして，トリカプリン，*p*-ニトロフェニルカプレートに対する比活性はそれぞれ，930.0 U/mg, 706.3 U/mg であった。さらに，LipYY31 は，ゴマ油，ダイズ油，オリーブ油のような長鎖脂肪酸を多く含む天然油脂類の分解に対しても高い活性を示し，それらの比活性は各々，390.0 U/mg，329.2 U/mg，317.5 U/mg であった。

5. LipYY31 の酵素活性に及ぼす金属イオン，界面活性剤及び有機溶剤の影響

次に, LipYY31 の活性に及ぼす金属イオンの影響を, 1 mM と 5mM の濃度で調べた（表 3)。 その結果，Cu^{2+}，Co^{2+}，Cd^{2+}，Zn^{2+}は，1 mM でリパーゼ活性を阻害した。中でも，Cd^{2+}と Zn^{2+}は 1 mM で，ほぼ完全にリパーゼ活性を阻害した。一方，Mn^{2+}と Pb^{2+}は，今回の使用濃度範囲では酵素活性にほとんど影響を及ぼさなかった。また，Ca^{2+}は，1mM と 5mM の両濃度で LipYY31 の活性を強く促進し，特に 5mM では Ca^{2+}非存在下の 7 倍以上の活性が示された。そして，2 価金属イオンのキレート剤である EDTA 存在下では，酵素活性は全く検出されなかった。

同様に，界面活性剤が LipYY31 の活性に及ぼす影響を調べた（表 3)。その結果，0.005% (w/v)の界面活性剤存在下におけるリパーゼ活性は，イオン性界面活性剤である SDS と CTAB で阻害された。特に，陽イオン性の CTAB で約 60% の活性が阻害された。一方，非イオン性界面活性剤の Triton X-100 で 2 倍以上に，Tween 20 と Tween 80 では約 1.8 倍に，Tween 40 と Tween 60 では約 1.3 倍に促進された。

さらに，有機溶剤存在下における酵素の安定性を調べた(表 4)。12.5%，25.0%，50.0% (v/v) の各有機溶剤に LipYY31 を 1 時間混合させたところ，アセトンを除く全ての有機溶剤で，酵素活性は 80% 以上保持されていた。中でも，イソプロパノールは 25.0%，50.0% で，LipYY31 の活性をそれぞれ，1.5 倍，1.2 倍に高める作用を持つことが示された。

考　察

本研究において，石川県下の冷水池から単離した低温性細菌 *Pseudomonas* sp. YY31 株と，それが産生するリパーゼのキャラクタリゼーションを行なった。

YY31 株の生化学性状及び形態観察の結果が *Pseudomonas* 属の特徴を示唆するものであったことと，16S rRNA 遺伝子の塩基配列が既報 2 種の *Pseudomonas* 属の配列と 100% 一致したことから，この菌を *Pseudomonas* sp. YY31 株と命名した。なお，16S rRNA 遺伝子の結果のみでは, YY31 株が既報の 2 種（*P. fluorescens* A506 と *P. reactans* strain PSR2）

のいずれかと同一なのか，あるいは新種なのかは判断できなかった。そこで，今後，脂肪酸組成の比較や，DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる全ゲノムの比較など，さらなる検討が必要であると思われた。また，コロニー及びハロー形成，増殖曲線と油分解活性を調べた結果より，YY31 株の増殖及び油分解活性の至適温度は 25°C であったが，5°C でも増殖と油分解活性が見られたことから，YY31 株は，中温のみならず低温にも適応して増殖できる低温性細菌（Morita, 1975）であると考えられた。35°C ではほとんど増殖ができなかったことからも，この推察が支持されるものと思われた。なお，本研究で用いた培地や添加した油種が増殖や油分解率に及ぼす影響には，ほぼ同様な傾向が示され，標準培地よりも M9 で，キャノーラ油よりもラードで，増殖と油分解率の遅延が見られた。しかし，いずれの条件下でも，培養時間の経過とともに増殖と油の分解が進行し，最終的にはほぼ同程度の細胞密度にまで増殖することが判り，また油脂分解率もほぼ同じであったことより，YY31 株は貧栄養の環境下でも，各種の油を分解し増殖できることが示唆された。YY31 株が産生するリパーゼは，1 種類で，その分子量は約 50 kDa だった。このリパーゼは，YY31 株の菌体と培養液の両方に存在することが確認されたため，菌体内で産生された後に菌体外に分泌され，油脂を分解すると考えられた。興味深いことに，YY31 株の菌はキャノーラ油に対し明らかな走化性を示した。データは示さないが，この行動はオリーブ油とラードに対しても観察された。これらの結果から，YY31 株はこれらの油脂に共通する物質に誘引され，走向する可能性が示唆された。こうした特性は細菌の油脂分解機序について理解を

深めるための糸口となるかも知れず，このような誘引物質の同定，その受容体や細胞内情報伝達機構などを明らかにするための研究に繋がることが期待される。

LipYY31 と名付けられた YY31 株が産生するリパーゼを，近縁種由来で既報のリパーゼの 1 次構造や特性（Arpigny *et al.*, 1999; Angkawidjaja *et al.*, 2006）で比較した．その結果，LipYY31 の 1 次構造である推定アミノ酸配列は，サブファミリーI.3 と報告されている LipTK-3 （Tanaka *et al.*, 2012）, KB-Lip (Rashid *et al.*, 2001）, TliA (Ahn *et al.*, 1999）の推定アミノ酸配列と非常によく類似（89-94%）していた。また LipYY31 は，それら近縁のサブファミリーI.3 と同様，アミノ酸配列の N-末端領域に触媒 triad (Ser207, Asp255, His313）と，リパーゼ固有の保存領域である GXSXG モチーフを持っており，反対側の C-末端領域には 9 残基の反復配列である GGXGXDXUX モチーフの 5 回の繰り返しと推定分泌シグナルを持っていた。これらの結果より，LipYY31 はサブファミリーI.3 に属すると考えられた。次に，特性についてみてみると，LipYY31 のリパーゼ活性の至適温度は 25-30°C であり，5°C ではその約 40% の活性を示したが，35°C 以上では活性が急激に低下するという，典型的な低温適応型酵素の性質を示した（Feller *et al.*, 2003）。興味深いことに，近縁の各リパーゼの活性の至適温度は，LipTK-3 が 20-25°C (Tanaka *et al.*, 2012），KB-Lip が 35°C (Rashid *et al.*, 2001），TliA が 45-55°C (Angkasidjaja *et al.*, 2007）とそれぞれで異なっていた。そして，アミノ酸配列の小さな差異が，こうした至適温度の大きな差異につながるのではないかと推測された。なお，LipYY31 のアミノ酸配列と高い相同性を示し

た *P. fluorescens* SBW25 及び *Pseudomonas* sp. R81 由来のリパーゼについては，現時点でまだその特性に関する詳細な報告がなされていないため，比較ができなかった。

基質特異性については， LipYY31 はトリカプリン（C10:0)と *p*-ニトロフェニルカプレート(C10)をよく分解した。トリグリセリド類と *p*-ニトロフェニルエステル類に関しては，基質の溶媒への溶解度が酵素活性に影響を及ぼすことがよく知られている。しかし LipYY31 は，反応液への溶解度が中程度である中鎖脂肪酸を最もよく分解しており，中鎖よりも溶解度が高い短鎖脂肪酸と，反対に溶解度が低い長鎖脂肪酸とに対する活性は，比較的低かった。つまり，LipYY31 の基質特異性は，基質の溶解度に大きく依存するものではないことが示唆された。本研究で使用したトリグリセリド類及び *p*-ニトロフェニルエステル類に対する酵素活性を，近縁リパーゼのものと比較すると，TK-3 由来の LipTK-3 (Tanaka *et al.*, 2012）はトリカプリリン(C8:0)と *p*-ニトロフェニルカプリレート(C8)，SIK W1 株由来の TliA (Lee, *et al.* 1993）はトリカプロイン(C6:0)とトリカプリリン(C8:0)に対して強い活性を示したと報告されている。一方，KB700A 株由来の KB-Lip (Rashid *et al.*, 2001） は，LipYY31 と同様に *p*-ニトロフェニルカプレート(C10)とトリカプリン（C10:0）に基質特異性を持つ一方, トリオレイン(C18:1)に対しては LipYY31 よりも約 10 倍も高い活性を持つ。したがって，LipYY31 と KB-Lip は，異なった構造や機能を持つリパーゼであることが推察された。LipYY31 は，植物性と動物性両方の天然油脂に対しても高い活性を示した。天然油脂類に対するリパーゼ活性の報告は，近縁リパーゼの中では LipYY31 と最もアミノ酸

配列の相同性が高かった LipTK-3 のみである。そして，LipYY31 は LipTK-3 と，天然油脂類に対する似た活性を示した。しかし，前述のように，活性の至適温度とトリグリセリド類や *p*-ニトロフェニルエステル類に対する基質特異性に関して両者は異なる特性を示したことから，機能がやや異なっているものと考えられた。以上の構造的，機能的特徴から，LipYY31 は既報のリパーゼとは異なった新規のリパーゼである可能性が強く示唆された。

各種金属イオン存在下における LipYY31 の活性を調べた結果，Co^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}により完全に阻害された。一方，その活性は 1 mM 以上の Ca^{2+}添加により著しく上昇し，反対に 2 価金属のキレート剤である EDTA を 1 mM 以上存在させると有意に阻害された。サブファミリーI.3 に属するリパーゼの活性は全て，EDTA により強く阻害され，Ca^{2+}依存性が高いと報告されている（Amada *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2001; Angkasidjaja *et al.*, 2007）。サブファミリーI.3 のリパーゼは，共通して C-末端領域に 9 残基 GGXGXDXUX の多重反復配列からなる Ca^{2+}の結合部位と推定されている領域を持っており，この領域が Ca^{2+}存在下で β ロールを形成して（Angkawidjaja *et al.*, 2006），N-触媒領域の折りたたみ構造に関与する分子内シャペロンの役割を果たすと考えられている（Angkasidjaja *et al.*, 2007; Meier *et al.*, 2007）。LipYY31 も C-末端領域にこの反復配列を持っていることから，上述のような Ca^{2+}による活性化と EDTA による阻害が見られたものと推測される。また，LipYY31 は，0.005%の Tween 20，Tween 40，Tween 60，Tween 80，そして Triton X-100 のような，非イオン性界面活性剤の存在下で高い活性を示した。この結果から，LipYY31

は，低温下のみならず，界面活性剤の存在下でも有用であることが示唆された。一方，陰イオン性界面活性剤である SDS と，陽イオン性界面活性剤である CTAB のイオン性の両界面活性剤は，ともに LipYY31 の酵素活性を阻害した。これらイオン性の界面活性剤は，タンパク質の帯電部位に吸着して，タンパク質を可溶化あるいは変性させることがよく知られている。特に，陽イオン性の界面活性剤は，陰イオン性のものよりもタンパク質への吸着性が高いため，CTAB がより強く LipYY31 のリパーゼ活性を阻害したものと考えられた。ところで，酵素の有機溶剤の存在下における安定性は，その酵素を無水系で扱う際に重要である（Kanjanavas *et al.*, 2010）。LipYY31 は，検討に用いたほとんどすべての有機溶剤に対し高い安定性を示したため，工業的に無水系で行なう物質合成などに適用できる可能性が十分にあることが推察された。

以上のように，LipYY31 が，中低温において，安定した活性を示すことや，金属イオン，界面活性剤，有機溶剤との併用が可能であることなどから，食品加工，化学，バイオ医薬などの産業分野や，油脂汚染地における廃水処理やバイオレメディエーションなどの環境分野への，広汎な応用が期待できる可能性が示唆された.

結　語

本研究により，低温性食用油分解菌 *Pseudomonas* sp. YY31 株は，中低温で貧栄養の条件下でも多種の油脂を分解し，増殖が可能であることが明らかになった。また，その遺伝子組換えリパーゼ LipYY31 も，同じく中低温域に高い活性を持ち，さらに，金属イオン，界面活性剤，有機溶剤に対し，高い活性と安定性を示した。そして，YY31 株及び LipYY31 が，産業や環境浄化などの広汎な分野への適用が可能であることが示唆された。

謝　辞

本研究の遂行と学位論文の執筆にあたり，指導教官である中村省吾教授には，終始，厳しくもあたたかなご指導とご支援を賜りました。心より深く感謝申し上げます。研究指針，研究方法，論文作成のご指導のみならず，在学中に生じた多岐にわたる悩みに対しても，公私問わず，心に沁みる数々のご助言をいただきました。これらなくしては，本研究の継続と完遂はあり得ませんでした。

田中大祐教授，酒徳昭弘助教には，特に実験方法に関し多大なご指導とご支援をいただきました。心より感謝申し上げます。濃やかなご配慮と適切な助言により，研究過程で生じ得る種々の危機を事前に回避，あるいは失敗を，無事，軌道修正することができました。

本論文の作成にあたっては，審査委員として多くの助言とご配慮をいただきました，上田晃教授、加賀谷重浩教授に，心より感謝申し上げます。他分野からいただくご指摘は，刺激となるとともに，自身の至らなさを反省する良い機会となりました。

また，研究以外でも，多くの方々のお世話になりました。素敵な笑顔と愛のこもった叱咤激励をたくさんいただきました，研究室内外の学生・教職員のみなさまに，心より御礼申し上げます。みなさまのあたたかな優しさは，ずっと忘れません。

最後に，長期にわたり，辛抱強く心身ともに支え見守ってくれた家族と友人に，深い感謝の意を表し，謝辞といたします。

とても幸せな日々でした。どうもありがとうございました。

2014 年 3 月

山代　陽子

参考文献

Ahn, J. H., Pan, J. G. and Rhee, J. S. (1999). Identification of the *tliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *J. Bacteriol.*, **181**, 1847-1852.

Amada, K., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. (2000). Over-production in *Escherichia coli*, purification and characterization of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1478**, 201-210.

Angkasidjaja, C., You, D. J., Matsumura, H., Kuwahara, K., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2007). Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation. *FEBS Lett.*, **581**, 5060-5064.

Angkawidjaja, C. and Kanaya, S. (2006). Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 2804-2817.

Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.*, **343**, 177-183.

Choo, D. W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K. and Esaki, N. (1998). A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: Gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 486-491.

Feller, G. and Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 200-208.

Gal, M., Preston, G. M., Massey, R. C., Spiers, A. J. and Rainey, P. B. (2003). Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Mol. Ecol.*, **12**, 3109-3121.

Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Tech.*, **39**, 235-251.

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. and Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 29-63.

Joseph, B., Tamteke, P. W. and Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.*, **26**, 457-470.

Kanjanavas, P., Khuchareontaworn, S., Khawsak, P., Pakpitcharoen, A., Pothivejkul, K., Santiwatanakul. S., Matsui, K., Kajiwara, T. and Chansiri, K. (2010). Purification and characterization of organic solvent and detergent tolerant lipase from thermo-tolerant *Bacillus* sp. RN2. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 3783-3792.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lee, Y. P., Chung, G. H. and Rhee, J. S. (1993). Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1169**, 156-164.

Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis II, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., Elvourne, L. D. H., Stockwell, V. O., Hartney, S. L., Breakwell, K., Henkels, M. D., Tetu, S. G., Rangel, L. I., Kidarsa, T. A., Wilson, N. L., van de Mortel, J. E., Song, C., Blumhagen, R., Radune, D., Hostetler, J. B., Brinkac, L. M., Durkin, A. S., Kluepfel, D. A., Wechter, W. P., Anderson, A. J., Kim, Y. C., Pierson III, L. S., Pierson, E. A., Lindow, S. E., Kobayashi, D. Y., Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., Thamashow, L. S., Allen, A. E. and Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLOS Genet.*, **8**, e1002784.

Luo, Y., Zheng, Y., Jiang, Z., Ma, Y. and Wei, D. (2006). A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, **73**. 349-355.

Mathimaran, N., Srivastava, R., Wiemken, A., Sharma, A. K. and Boller, T. (2012). Genome sequences of two plant growth-promoting fluorescent *Pseudomonas* strains, R62 and R81. *J. Bacteriol.*, **194**, 3272-3273.

Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K. E. and Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 31477-31483.

Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **39**, 144-167.

Nagarajan, S. (2012). New tools for exploring, 'old friends-microbial lipases'. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168**, 1163-1196.

Ogino, H.m Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M. and Ishikawa, H. (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa*. LST.03. *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 451-457.

Oksinska, M. P., Wright, S. A. I. and Pietr, S. J. (2011). Colonization of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) by strains of *Pseudomonas* spp. with respect to their nutrient utilization profiles. *Eur. J. Soil Biol.*, **47**, 364-373.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi. H. and Imanaka, T. (2001). Low-temperature lipase from phychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4064-4069.

Rosenau, F. and Jaeger, K. E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanism of secretion. *Biochimie*, **82**, 1023-1032.

Sangeetha, R., Arulpandi, I. and Geetha, A. (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. *Res. J. Microbiol.*, **6**, 1-24.

Sommer, P., Bormann, C. and Gotz, F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl. Environ. Microb.*, **63**, 3553-3560.

Tanaka, D., Yoneda, S., Yamashiro, Y., Sakatoku, A., Kayashima, T., Yamakawa, K. and Nakamura, S. (2012). Characterization of a new cold-adapted lipase from *Pseudomonas* sp. TK-3. *Appl. Biochem. Biotech.*, **168**, 327-338.

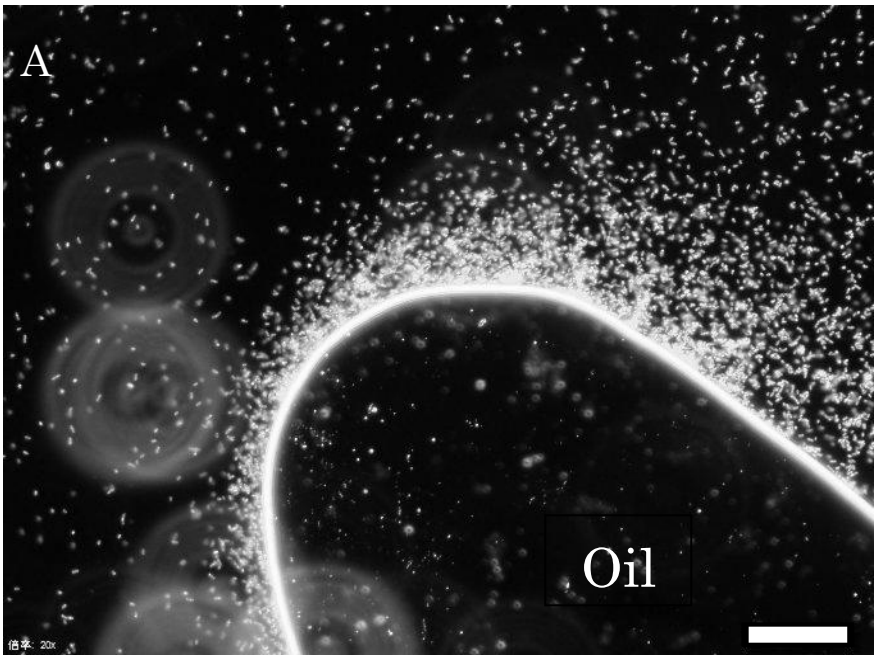
Tayyab, M., Rashid, N. and Akhtar, M. (2011). Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 272-278.

Tutino, M. L., di Prisco, G., Marino, G. and de Pascale, D. (2009). Cold- adapted esterases and lipases: from fundamentals to application. *Protein Pep. Lett.*, **16**, 1172-1180.

Winkler, U. K. and Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **138**, 663-670.

Zhang, J. W. and Zeng, R. Y. (2008). Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323. *Mar. Biotechnol.*, **10**, 612-621.

Zheng, X., Chu, X., Zhang, W., Wu, N. and Fan, Y. (2011). A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene RT cloning and characterisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 971-980.



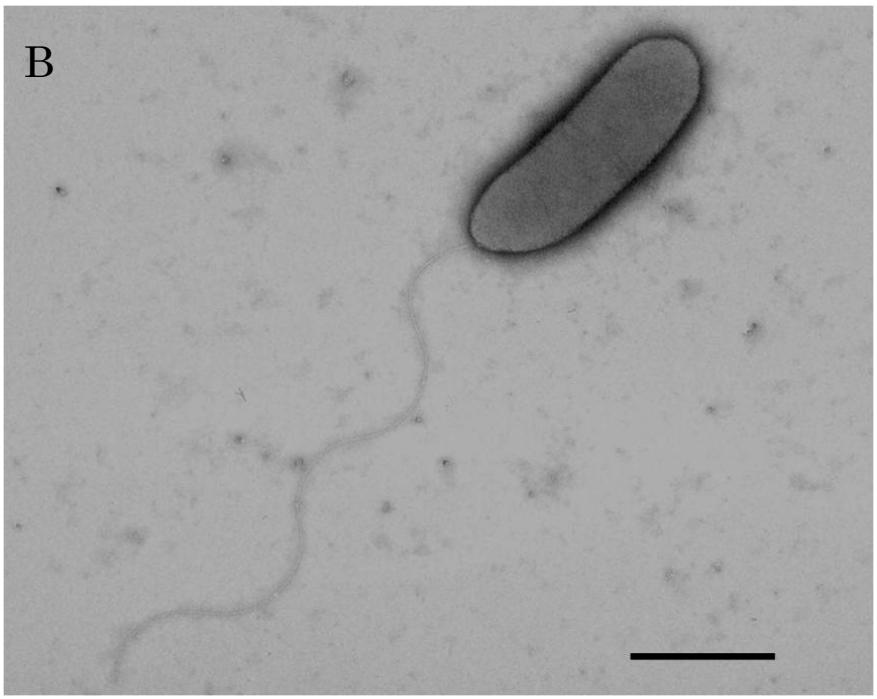


図 1.　YY31 株のキャノーラ油への走化性と形態。(A)は，M9 液体培地に含まれるキャノーラ油滴の外縁に，YY31 株が集まる様子（正の走化性）を示す暗視野顕微鏡像。バーは 50 µm。(B)は，ネガティブ染色した YY31 株の菌体の透過型電子顕微鏡像。バーは 1 µm。YY31 株は桿菌で，1 本の極鞭毛を持っていた。

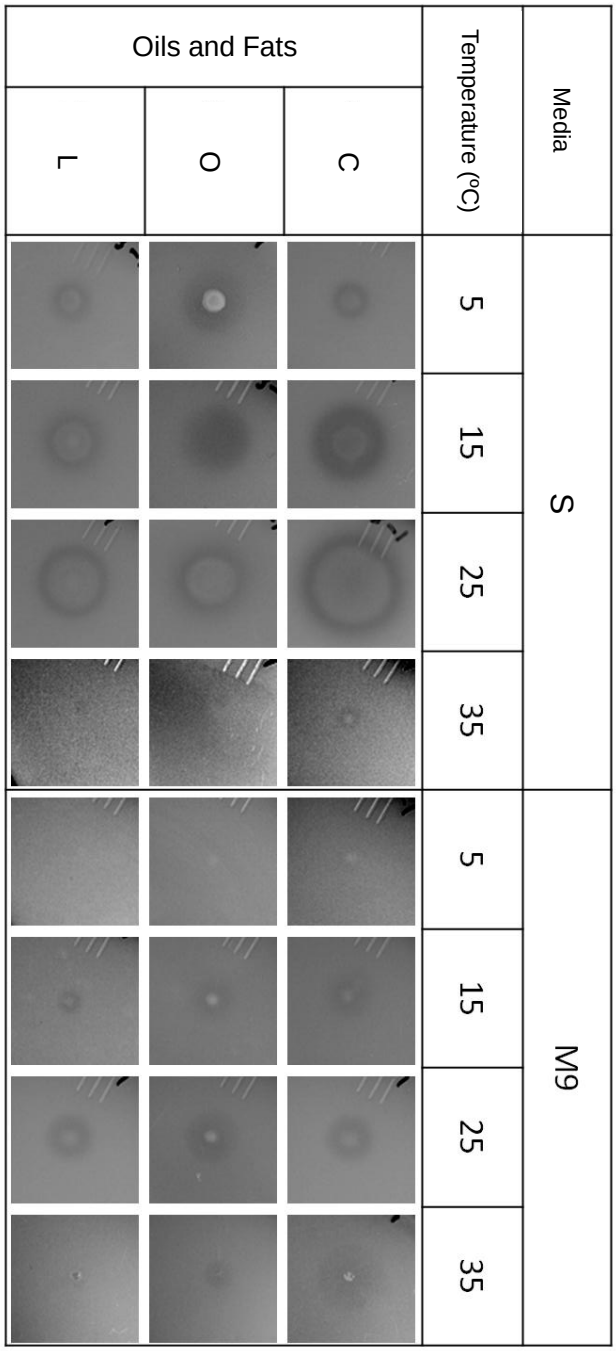
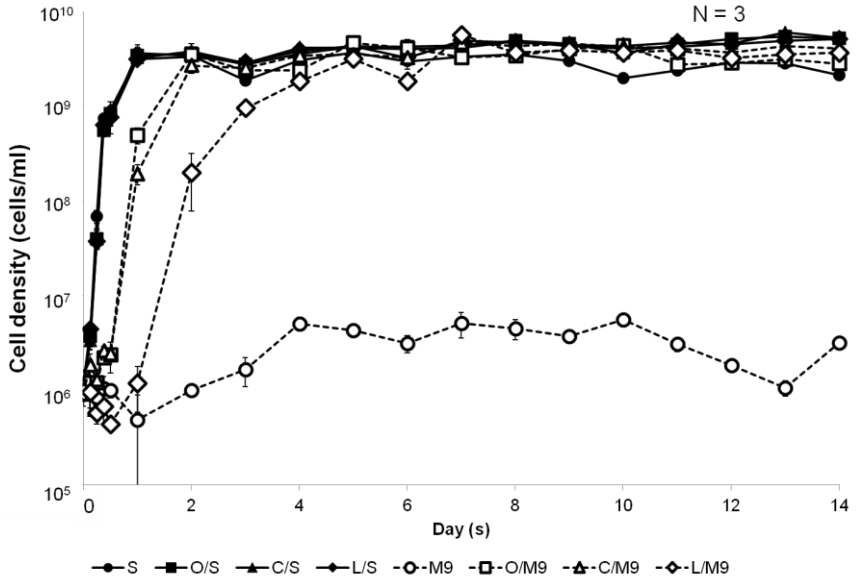


図 2.　*Pseudomonas* sp. YY31 株のコロニーとハローの形成。1% (w/v)のキャノーラ油 (C), オリーブ油 (O), ラード (L) を添加した培地に YY31 株を植菌し，培養開始から 1 週間後の様子を示す。コロニーとハローは，富栄養の標準寒天培地 (S) と貧栄養の M9 寒天培地 (M9) の両方に形成された。それらは 5℃から形成が認められ， 25℃でそれらの直径が最大となった。

A



B

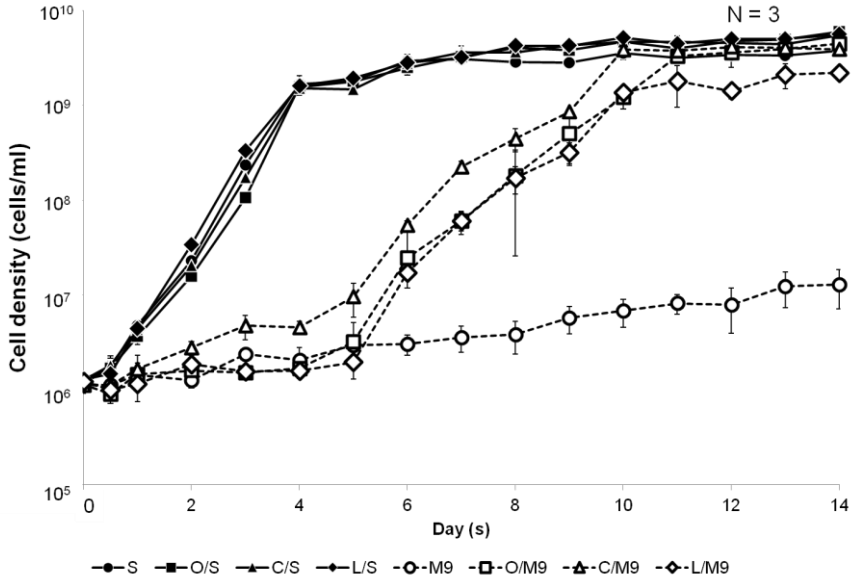


図 3.　YY31 株を 25°C (A) と 5°C (B) の温度下で培養したときの増殖曲線。バーは標準偏差で，n = 3。増殖は，いずれの温度でも，標準液体培地（S, 実線）で培養したほうが，M9 液体培地で培養（M9, 破線）したものよりも早くプラトーに到達した。5°C での培養は 25°C での培養に比べ，増殖の遅延が見られた。オリーブ油（O, 四角），キャノーラ油（C, 三角），ラード（L, 菱形）の各々1% (w/v)の存在下では，標準液体培地では油種の影響をほとんど受けなかった。M9 液体培地では，キャノーラ油で増殖がやや促進される傾向が見られた。油脂を添加した場合のプラトーに到達した際の菌体密度は，いずれの培養条件でもほぼ同じだった。

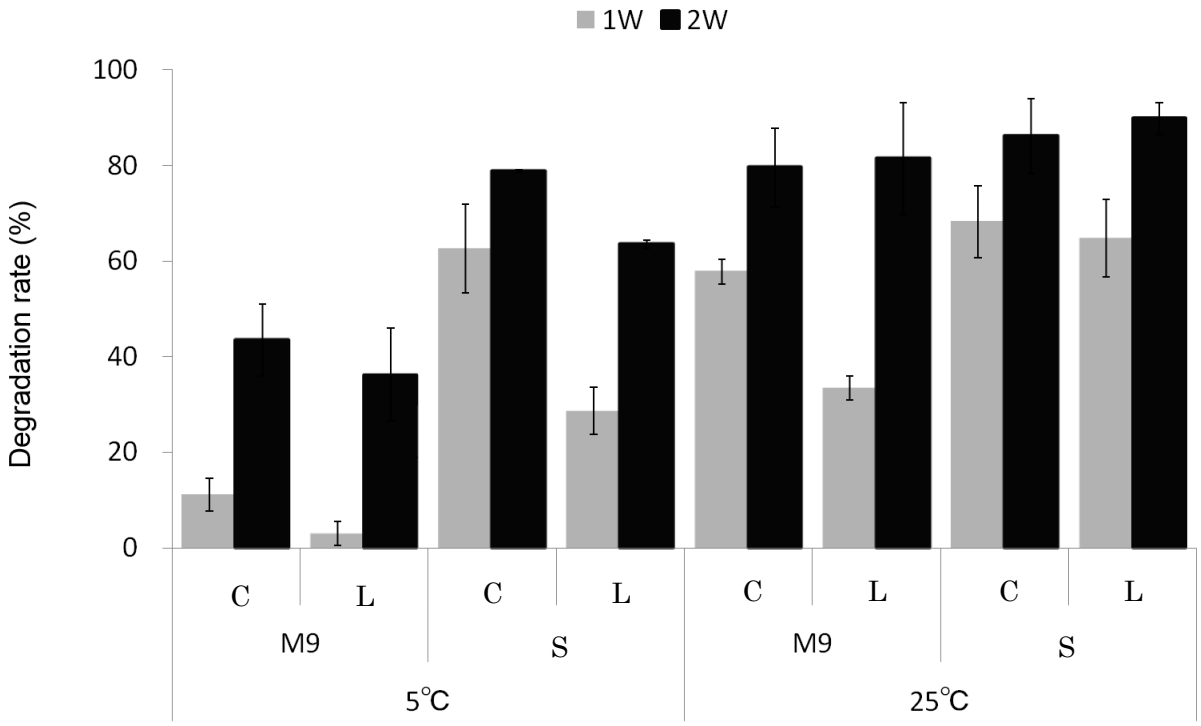


図 4.　YY31 株を 5°C (左) と 25°C (右) で培養したときの油脂分解率。バーは標準偏差で，n = 3。培養開始前の培地に含まれる油脂の乾燥質量を 100% とし，培養開始から 1 週間後（グレー）と 2 週間後（黒）に，培地中に分解されずに残存する油脂の乾燥重量との比を示した。25℃では，培養 2 週間後に，M9 液体培地（M9）と標準液体培地（S）の両方で，キャノーラ油（C）とラード（L）の 80% 以上を分解した。5℃では，M9 よりも標準液体培地の油脂分解率が高くなった。培養 1 週間後では，YY31 株はラードよりもキャノーラ油をよく分解する傾向が見られた。

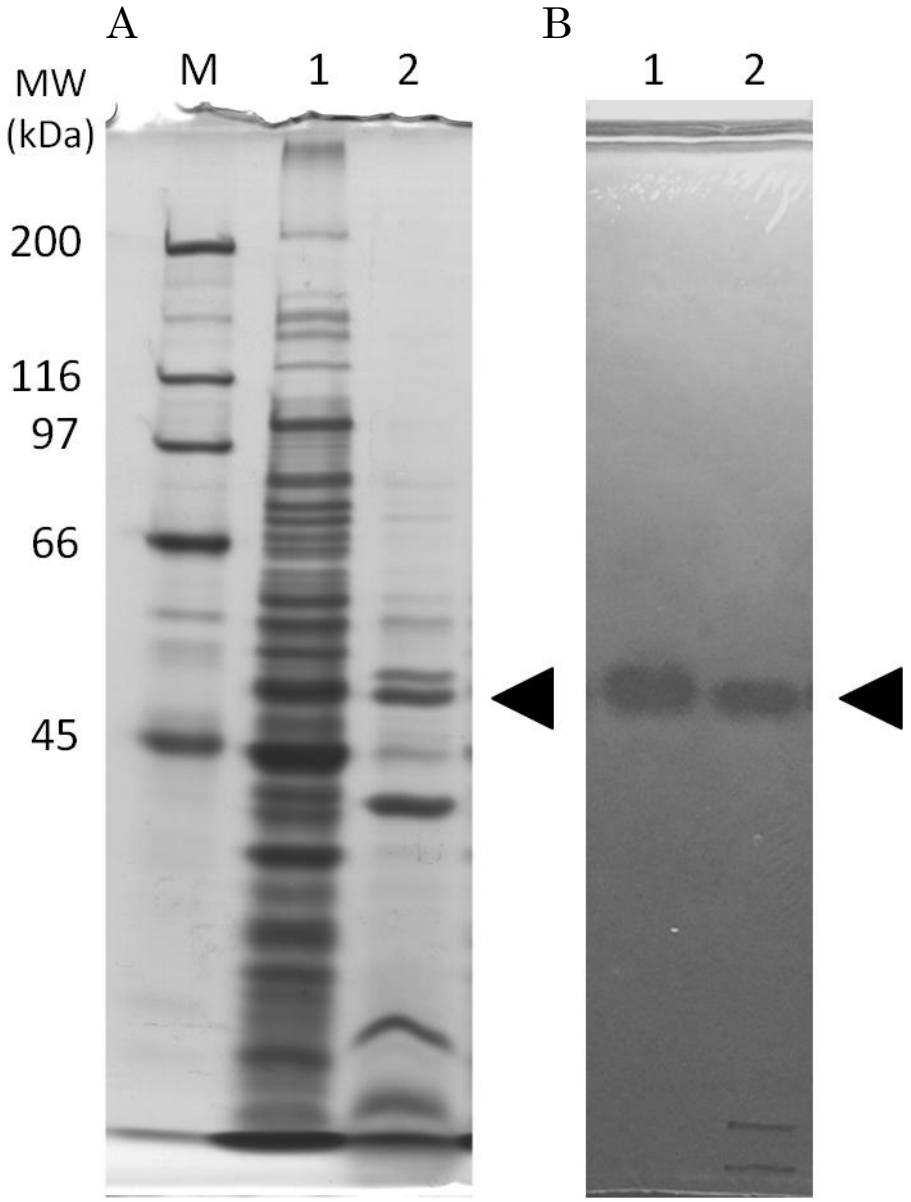


図 5. YY31 株が産生するリパーゼ。SDS-PAGE (A) と，トリブチリンを基質とするザイモグラム (B) の結果を示す。レーンは左から，M: 分子量マーカー，1: YY31 株の菌体試料，2: 培養 1 週間後の培養上澄の濃縮試料。リパーゼ（矢尻）は 1 種類で，菌体と培養上澄の両方に存在することが認められた。その推定分子量は約 50 kDa であった。

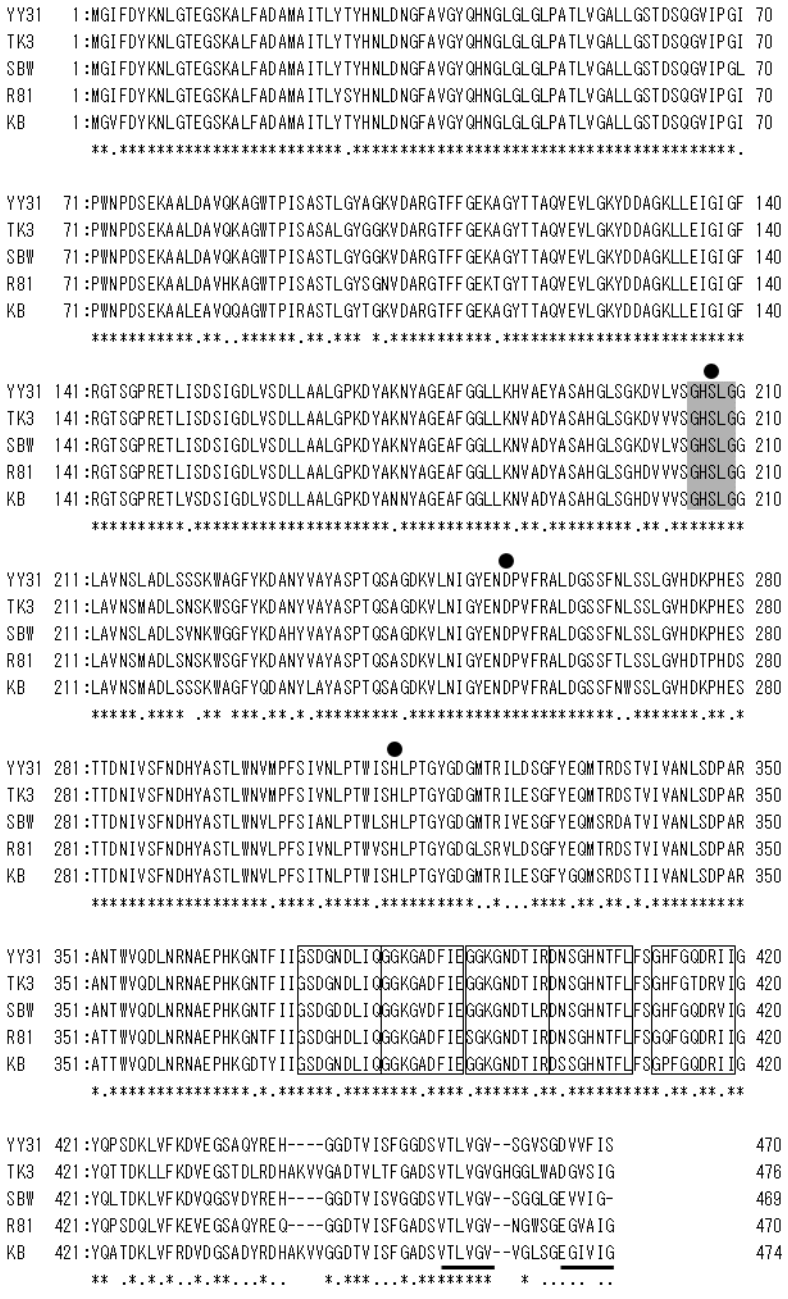


図 6. LipYY31 と近縁種が持つリパーゼのアミノ酸配列の比較。リパーゼは，YY31 株に由来する LipYY31 (YY31)，*Pseudomonas* sp. TK-3 株由来の LipTK-3 (TK-3)，*P. fluorescens* SBW25 由来のリパーゼ（SBW），*Pseudomonas* sp. R81 株由来のリパーゼ（R81），*Pseudomonas* sp. KB700A 由来の KB-Lip (KB)を比較した。図中のアスタリスクは同一アミノ酸残基，黒点は保存的アミノ酸残基，濃灰色はリパーゼのコンセンサス配列 GXSXG，黒丸は触媒 Triad（Ser, Asp, His），実線枠は 5 回の反復的 9 残基配列モチーフ GGXGXDXUX, 下線は推定 C-末端分泌シグナルを示す。

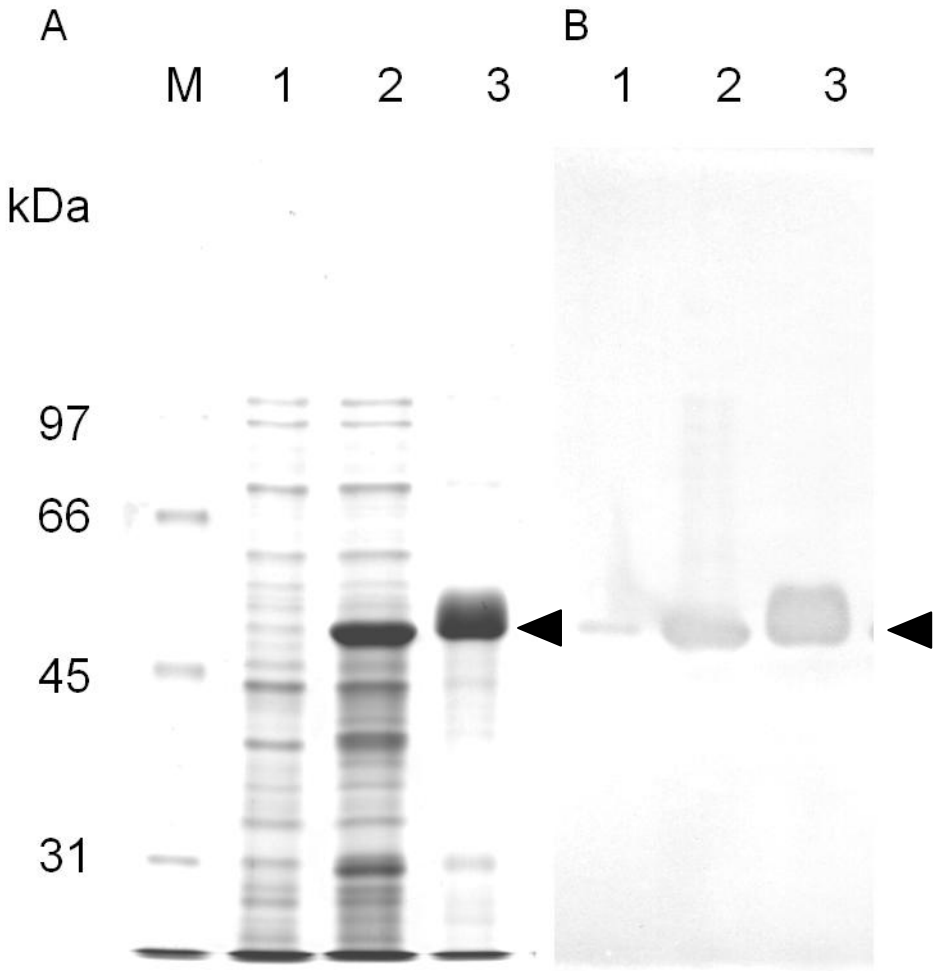


図 7.　LipYY31 の遺伝子組み換えによって作製した形質転換体での LipYY31 の発現及び精製過程。SDS-PAGE (A) とトリブチリンを基質とするザイモグラム (B) の結果を示す。レーンは左から，M: 低分子マーカー，1: YY31 株のリパーゼ遺伝子を挿入して形質転換した大腸菌 BL21 (DE3)の菌体試料，2: 1 mM IPTG 処理により，リパーゼ（矢尻）を大量発現させた大腸菌 BL21 (DE3)の菌体試料，3: 精製された LipYY31。リパーゼの分子量は約 50 kDa で，精製後の LipYY31 が全タンパクに占める割合は，常に 90% 以上であった。

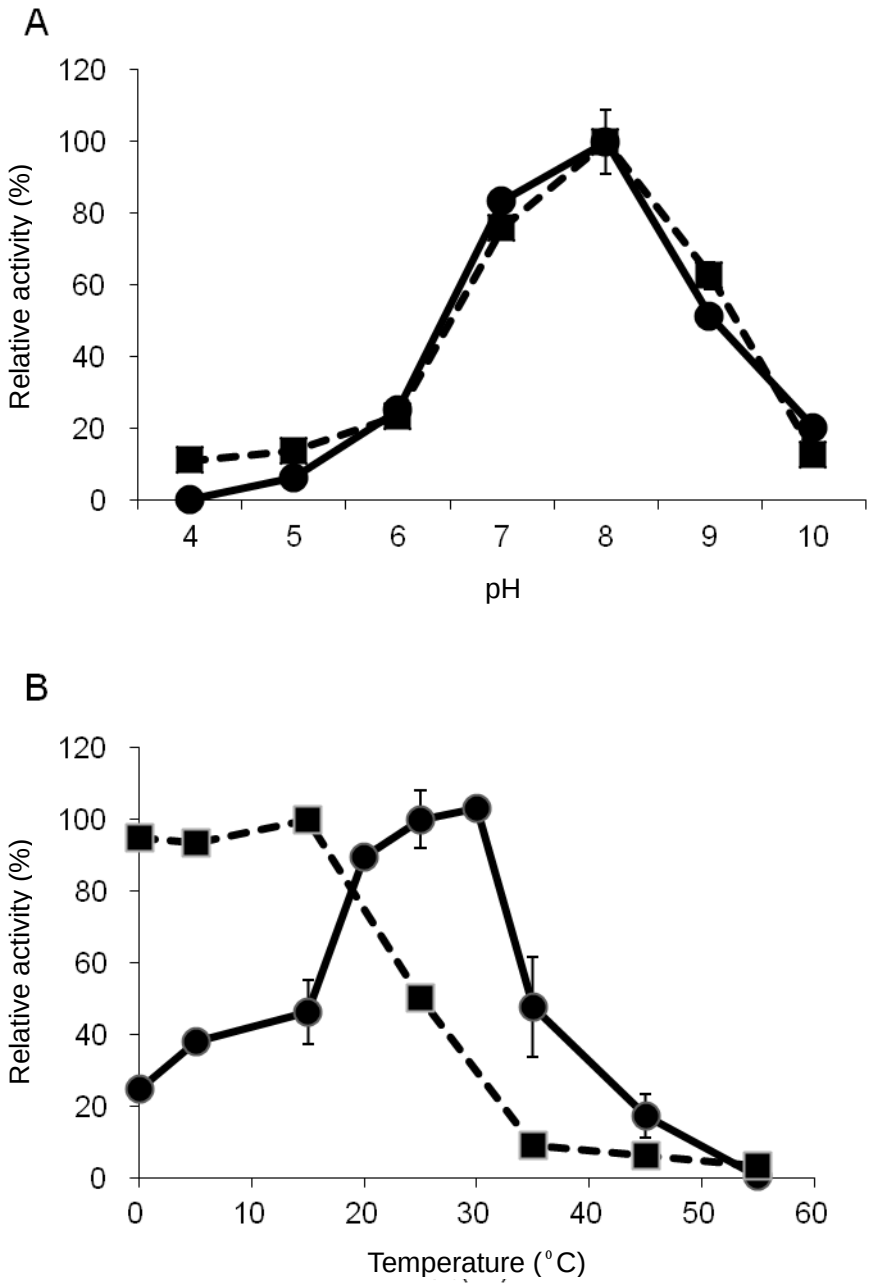


図 8.　LipYY31 の活性と安定性に及ぼす pH (A) と温度 (B) の影響。実線でつないだ黒丸は酵素活性，波線でつないだ黒四角は残存活性を表す。基質は *p*-ニトロフェニルカプレート（C10）を用いた。LipYY31 の pH に対する安定性は，5°C で 24 時間，各 pH で保存した後に，熱に対する安定性は，各温度で 6 時間，pH8.0 で保存した後に，残存活性を測定した。LipYY31 の至適 pH は 8.0 であり，残存活性も pH 8.0 で最大だった。また，LipYY31 の至適温度は 25-30℃であり，15℃以下で安定した残存活性が示された。LipYY31 は，15℃以下において，同程度の残存活性を 5 日間以上保持していた。

表 1.　YY31 株の生化学性状

Characteristics	YY31
Nitrate reduction	+
Indole production	−
Acid production from glucose	−
Arginine dihydrolase	+w
Urease	−
Hydrolysis of :	
Esculin	−
Gelatin	+w
p-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside	−
Assimilation of :	
Glucose	+
Arabinose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	−
Maltose	−
Gluconate	+
Caprate	+
Adipate	+
Malate	+
Citrate	+
Phenyl-acetate	−
Oxidase	+
Catalase	+

+: 陽性，-: 陰性，+w: 弱陽性 （API 20NE 試験，オキシダーゼ試験，カタラーゼ試験による）

表 2.　LipYY31 の基質特異性

Substrates	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
Triglycerides/natural lipids		
Triacetin (C2:0)	5.0	1
Tributyrin (C4:0)	185.0	20
Tricaprylin (C8:0)	800.0	86
Tricaprin (C10:0)	930.0	100
Tripalmitin (C16:0)	0.0	0
Triolein (C18:1)	106.7	11
Olive oil	317.5	34
Soybean oil	329.2	35
Sesame oil	390.0	42
Canola oil	280.8	30
Lard	175.0	19
p-Nitrophenyl esters		
p-Nitrophenyl acetate (C2)	46.7	7
p-Nitrophenyl butyrate (C4)	41.7	6
p-Nitrophenyl caprylate (C8)	682.0	97
p-Nitrophenyl caprate (C10)	706.3	100
p-Nitrophenyl laurate (C12)	344.5	49
p-Nitrophenyl palmitate (C16)	117.5	17
p-Nitrophenyl stearate (C18)	167.6	24

トリグリセリドと天然油脂は，遊離脂肪酸量を滴定により測定し，*p*-ニトロフェニルエステルは遊離 *p*-ニトロフェノール量を吸光度により測定し，定量した。

表 3. Lip YY31 の活性に及ぼす金属イオン，キレート剤，界面活性剤の影響

Additives	Relative activity (%)	
Metal ions / Chelator	1 mM	5 mM
None	100	100
$CaCl_2$	318	750
$MgCl_2$	118	138
$MnCl_2$	88	109
$PbCl_2$	100	98
$CuCl_2$	51	17
$CoCl_2$	46	1
$CdCl_2$	3	1
$ZnCl_2$	0	0
EDTA	0	0
Detergents	0.005% (w/v)	
None	100	
Triton X-100	218	
Tween 20	184	
Tween 40	128	
Tween 60	131	
Tween 80	185	
SDS	83	
CTAB	37	

p-ニトロフェニルカプレート（C10）を基質として，各反応液に上記の試薬を添加してリパーゼ活性を測定した。

表 4.　LipYY31 の安定性に及ぼす有機溶剤の影響

Organic solvents (v/v)	Relative activity (%)		
	12.5%	25.0%	50.0%
None	100	100	100
Methanol	88	102	110
Ethanol	114	105	93
2-propanol	153	151	120
Acetone	91	62	60
DMSO	125	106	82

LipYY31 を各有機溶剤と 5℃で 1 時間インキュベートした後に，*p*-ニトロフェニルカプレート（C10）を基質としてリパーゼの残存活性を測定した。