

D313

Chitosanase-LIPOzyme の調製とその機能評価

(大阪大院・基礎工) ○ (正)馬越 大*・ Kien Xuan Ngo・(正)島内 寿徳・(正)久保井 亮一

生体環境に調和したプロセス設計の鍵は「生体膜 (Biomembrane)」のストレス応答に隠されている。従来型の細胞内部の要素物質(遺伝子/タンパク質)の構造・機能に着目した Genome/Proteome に加え、生体膜そのものが誘導する潜在機能を主眼に置いた Membranome の重要性が認識されつつある¹⁾。近年、リポソーム界面に必要最小限の要素物質を集積化した、酵素様触媒(LIPOzyme: Liposome + Enzyme)の開発例も報告されている²⁻⁴⁾。Chitosanase は *Streptomyces griseus* で生産される分泌性タンパク質であり、オリゴキトサンやグルコサミンの生産に利用される酵素である。本研究室では、これまで *S.griseus* を用いた Chitosanase の生産・放出プロセスについて検討し、リポソーム共存下で熱ストレス負荷する事により、その生産性が大きく改善される事を報告している⁵⁻⁷⁾。本研究では、酸化ストレス(過酸化水素)負荷した条件下で、Chitosanase をリポソーム膜表面に提示させた Chitosanase LIPOzyme を調製し、その基礎的な特性を解析した結果について報告する。

【実験】

1. リポソームの調製

各種の単一脂質(1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)および 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidic acid (POPA))ならびに POPC と Cholesterol (Ch)を 2:1 で混合した脂質薄膜を Tris-HCl buffer(0.1M, pH=8.0)で水和させ、凍結/融解(5cycle)した後、extrusion 法によりリポソーム粒径を 100 nm に調整した。

2. Chitosanase の調製と活性評価

上記リポソーム共存下(最終脂質濃度 0.4mM)で、*S.griseus* 細胞を培養し、熱ストレス(37→41°C, 20分毎, 15~20回)ならびに酸化ストレス(2mM H₂O₂)を負荷した。培養後、細胞を遠心分離で回収し、上清を、ろ過処理して、リポソーム-Chitosanase 複合体を回収した。Chitosanase 活性は、Glycol キトサンの加水分解速度から決定した。

【結果および考察】

リポソーム-Chitosanase 複合体の概念図を Fig.1 に示す。これまでに、熱/酸化ストレス条件下における *S.griseus* 細胞の Chitosanase 生産性に及ぼすリポソームの添加効果について報告している⁵⁻⁷⁾。リポソーム共存下において熱ストレスを負荷する事により、Chitosanase の生産性が増加し、また、培地中に存在するリポソームとの相互作用している事が示唆された⁵⁾。特に、過酸化水素存在下では、Chitosanase 生産性は維持されたまま、その放出性が改善される事がわかった。酸化ストレスにより、(i) タンパク質分泌に関連する機能停止、(ii) 脂質膜の酸化、(iii) それに伴う構造の不安定なタンパク質の結合増加/外来性脂質膜(リポソーム)の相互作用の増加が誘導されるものと推測された。*S.griseus* 細胞を各種リポソ-

ム共存下で熱/酸化ストレス処理する事により、細胞表面でのプロセッシングを経ずに、Chitosanase が放出され、細胞外のリポソームと相互作用するものと期待される。上記のストレス負荷操作の後、分離回収したリポソームを Chitosanase-LIPOzyme と定義する。複合体を形成した Chitosanase の分子量を SDS-PAGE で解析した結果、通常と比較して約 5kDa 高い分子量であり、Chitosanase にシグナルペプチドが付与されている可能性が示唆された。また、リポソーム表面の Chitosanase の Trp 蛍光解析から、構造の一部が脂質膜内部の Glycerol 領域まで挿入されている事が推察された。各種リポソームに対して調製した Chitosanase-LIPOzyme の酵素活性を測定した。通常の Chitosanase 活性と比較して、酵素活性が増加し、特に、負電荷を持つ POPA リポソームを用いた場合、 k_{cat}/K_m 値が、5 倍程度まで増加する事がわかった。リポソーム表面に提示する事により、(i) 基質の濃縮効果あるいは(ii) 触媒能力の改善が誘導されたものと考えられる。さらに詳細な検討が必要ではあるが、同様の戦略により、代謝生産物である酵素の高性能化が図れるものと期待される。

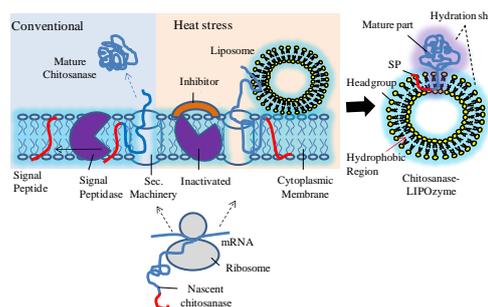


Fig.1 Schematic illustration for the preparation of chitosanase-LIPOzyme by *S. griseus* cell on the basis of the heat induced the secretion of chitosanase containing SP associated-lipid membrane of liposome.

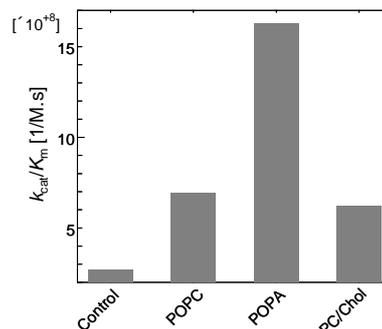


Fig.2 Catalytic rate k_{cat}/K_m catalyzed by mature chitosanase (control) and various kinds of chitosanase LIPOzyme.

【引用文献】

1)久保井ら, 膜, 33, 300 (2008) / 馬越ら, 分離技術, 39, 109 (2009), 馬越, 膜, 34, 179 (2009), 2) L.Q. Tuan *et al.*, *Langmuir*, 24, 350 (2008), 3) H. Umakoshi *et al.*, *Langmuir*, 24, 4451 (2008), 4) B.T. Huong *et al.*, *Langmuir*, 24, 10537 (2008), 5) K.X. Ngo *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 602 (2008), 6) K. X. Ngo *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 471 (2009), 7) K. X. Ngo *et al.*, *Colloid Surface B*, 73, 399 (2009)

E-mail: MSB@cheng.es.osaka-u.ac.jp

TEL/FAX: +81-(0)6-6850-6285