

海洋環境からのコレステロールエステラーゼ生産放線菌の 分離と諸性状

Isolation and Characterization of Cholesterol Esterase-Producing Actinomycetes
from the Marine Environment

今田千秋¹・小野寺かおる¹・寺原 猛¹・小林武志¹・山田勝久²

Chiaki IMADA¹, Kaoru ONODERA¹, Takeshi TERAHARA¹,
Takeshi KOBAYASHI¹ and Katsuhisa YAMADA²

Abstract

A total of 611 cholesterol esterase (CHE) producing actinomycete strains were isolated and characterized from marine bottom sediments, marine organisms and beach sands collected from bays, coastal and offshore waters, and beaches facing the Pacific and the East China Sea around Japan. Three hundred positive strains exhibiting CHE activity were isolated. The percentage of positive strain (hit rate) was 49.1 %. Highest hit rate of 74.3 % (26 positive strains out of 35 strains) was observed in Tateyama Bay in Chiba Prefecture. Among the various samples, the highest hit rate of 67.8 % (61 positive strains out of 90 strains) was observed in the samples from coastal sand. Among the 300 positive strains, 3 strains which had high CHE activity were selected and used for further studies. Two strains named A and B were isolated from sediment samples from Tokyo Bay in May (5 m) and October 2009 (20 m), respectively, whereas one strain named C was isolated from the sediment sample obtained from the East China Sea (300 m). From the 16S rDNA analysis, strains A and B showed high homology with *Streptomyces rubrolavendulae* whereas strain C was close to *S. glauciniger*. Among the three, strain B showed stable highest CHE activity and was selected for the purification and characterization of the enzyme. The CHE was isolated from the culture supernatant of strain B by ammonium sulfate precipitation, anion-exchange chromatography and gel filtration. The final preparation showed a single band on native electrophoresis. The molecular weight of the purified CHE was 62.2 kDa. The CHE exists as dimer forms composed of 22.7 kDa and 39.5 kDa in water solution. The CHE was stable up to 70°C and also showed pH stability from 4 to 10. The enzyme decomposed substrates such as linoleic acid cholesterol and oleic acid cholesterol.

Key Words: cholesterol esterase, marine, actinomycetes, *Streptomyces*

要 旨

日本列島の岩手県から沖縄県および東シナ海の下底堆積物・生物・海浜砂試料から 27°C で分離培養した放線菌合計 611 株のコレステロールエステラーゼ (CHE) 生産菌を探索し、300 株の陽性株を得、ヒット率 (供試菌株数に対する陽性菌数の割合) は 49.1% であった。最高ヒット率海域は千葉県館山湾で 74.3% (35 株中 26 株)。分離サンプルでは、海岸砂のヒット率が 67.8% (90 株中 61 株) と最高であった。これら陽性 300 株中、CHE 高活性 3 株 (いずれも海底堆積物) が得られた: 東京湾 (2009 年 5 月、水深 5 m、A 株と命名)、東京湾 (2009 年 11 月、水深 20 m、B 株と命名)、東シナ海 (2009 年 10 月、水深 300 m、C 株と命名)。これら 3 株の 16S rDNA の塩基配列解析から、A、B 株はともに *Streptomyces rubrolavendulae*、また C 株は *S. glauciniger* と高い相同性を示した。

¹ 東京海洋大学 (〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

² 株式会社ディーエイチシー (〒106-8571 東京都港区南麻布 2-7-1)

最も活性が高く、CHE を安定生産する B 株培養液上清から、硫酸沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過によって CHE を単離・精製し、CHE は分子量 62.2 kDa、水溶液中では 227 kDa と 39.5 kDa の二量体の形で存在することを確認した。本 CHE は 70°C 以下で安定、また pH4-10 では全く失活せず、リノール酸コレステロールやオレイン酸コレステロールを基質として分解することが判明した。

キーワード：コレステロールエステラーゼ、海洋、放線菌

1. 諸 言

血清中のコレステロールエステルの脂肪酸には、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、アラキドン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸など様々な脂肪酸が含まれている (五島, 1971)。そのため、血清中の総コレステロールの測定など、医療用のコレステロールエステラーゼ (以下 CHE) としては、鎖長の異なる広範囲の脂肪酸エステルに作用するものが望まれている (Du *et al.*, 2010)。しかしながら、現在使用されている臨床検査用の CHE は基質特異性が狭く、全てのコレステロールエステルを加水分解できないことから単一 CHE を用いると不正確な測定値になったり、また、複数種類の CHE を使用すると費用が高額になるという問題点が指摘されている (Sugihara *et al.*, 2002)。さらに、医療に利用する上では、温度、pH、薬剤および空気酸化などに対する安定性の高い CHE が望まれている。

放線菌は、抗菌物質や抗腫瘍物質などの生理活性物質の生産微生物の過半数を占めることが知られていて、新規 CHE の発見が期待されている (今田, 2009; Lazzarini *et al.*, 2006; Okami and Hotta, 1988)。ただし、微生物由来、特に放線菌由来の CHE は、活性部位のアミノ酸配列が哺乳類由来の CHE と異なるという報告があり、放線菌由来の CHE は反応メカニズムが異なる可能性があって医療用とするには更なる検討が必要ではある (Xiang *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2007)。

生理活性物質の探索源として注目されている放線菌は、これまでそのほとんどが陸域土壌から分離されたものであった。しかし、近年、陸上由来放線菌からの新規物質の発見が次第に困難な状況になっ

てきた (Watve *et al.*, 2001)。これに対して、海洋の放線菌はまだあまり研究されていない未知の微生物である。微生物の生活の場としての海洋環境は温度、塩分、水圧および pH などが陸上環境と大きく異なる。そのため、陸上微生物にはみられない新しい二次代謝産物を生産する菌株の存在の可能性が高いと考えられ、近年海洋環境から有用微生物を探索する研究が盛んに行われるようになってきた (Suzuki *et al.*, 1994; Takizawa *et al.*, 1993)。また、魚類体内にはコレステロールが含まれていることから (Maita *et al.*, 2006)、ヒトと同じような機能を持つコレステロールやコレステロールエステルが海洋環境中で存在している可能性がある。そのため、海底に沈降した魚類などの生物遺骸を分解するために CHE 活性を有する微生物の存在の可能性が考えられる。しかしこれまで、海洋由来の微生物から CHE を分離した報告は見られない。

そこで、本研究では浅海と深海の様々な海域から採取した海底堆積物および海洋生物試料から放線菌を分離して CHE の生産菌を探索し、得られた CHE 高生産菌の培養液から CHE を単離・精製し、諸性状を調べることを目的とした。

2. 材料および方法

2.1.1. 海洋環境からの放線菌の分離

放線菌の分離試料には、海洋の表層 (200 m 以浅) と深層 (200 m 以深) で採取した堆積物・生物・流木と、海岸の砂を用いた。海底堆積物は、東京湾 (水深 3-22 m, 2009 年 5 月, 8 月, 11 月および 2010 年 1 月, 5 月)、岩手県大槌湾 (水深 0-100 m, 2009 年 6 月)、和歌山県田辺湾 (近畿大学水産研究所魚類養殖生簀周辺, 水深 0-10 m, 2009 年 9 月)。

鹿児島湾若尊カルデラ（水深 200-206 m, 2009 年 10 月）および東シナ海（水深 0-300 m, 2009 年 10 月）から得た。海岸砂は千葉県銚子市犬吠埼海岸（2009 年 5 月）、館山市館山湾（2009 年 10 月）、鹿児島県桜島（2009 年 10 月）、および奄美大島（2009 年 7 月）のマングローブ林周辺から採取した。また、伊豆半島（水深 0-70 m, 2009 年 8 月）のトラフナマコ（*Holothuria pervicax*）、東シナ海（水深 300 m, 2009 年 10 月）のリンボウガイ（*Guildfordia triumphans*）に付着していたイソギンチャク（学名不明）などの生物試料を用いた。東シナ海では流木も採取して利用した。これらの海洋試料の採取点を図 1 に示した。

分離試料は採取後、滅菌したプラスチック袋に入れて低温に維持した状態で実験室に持ち帰り、滅菌生理食塩水中に懸濁し、適宜希釈した後、その 0.2 ml を各分離培地に塗抹して 27°C で 1~2 週間培養し、肉眼的に放線菌と思われるコロニーを釣菌し、増殖後 Yeast-starch 寒天培地に保存した。本実験で用いた分離培地は、ISP-2, 4, 5 および 7 である（International Streptomyces Project, Shirling and Gottlieb, 1966）。なお、ISP-4 培地のみ、人工

海水（Imada *et al.*, 1998）とイオン交換水で調製した。各培地には抗真菌剤としてシクロヘキシミド、および抗細菌剤としてナリジクス酸をそれぞれ終濃度 50 µg/ml となるように、培地の寒天が凝固する直前に添加した。

2.1.2. CHE 活性陽性株の探索

コレステロールエステルの一種であるパルミチン酸コレステロール（以下 CP: Cholesterol palmitate）を唯一の炭素源とした CP 培地（Kamei *et al.*, 1977）を調製し、滅菌後 24 穴マイクロプレート（Costar 3524: Corning, NY, USA）に 2 ml ずつ分注した。これに供試菌株をそれぞれ 1 白金耳ずつ接種後、ミニシェーカー（丸菱バイオエンジニアリング社、型式: MBSS-100）を用いて 27°C, 400 rpm で 4 日間振とう培養した。培養後、培養液を目視観察し、白濁した培地が透明に変色したものを CP 利用陽性株とした。次にパルミチン酸コレステロールを唯一の炭素源としたパルミチン酸培地（Kamei *et al.*, 1977）を調製し、バッフル付きの 100 ml 容三角フラスコに 20 ml を分注し、滅菌後、CP 利用陽性菌株を 1 白金耳接種し、27°C で回転振とう培養（160 rpm）した。

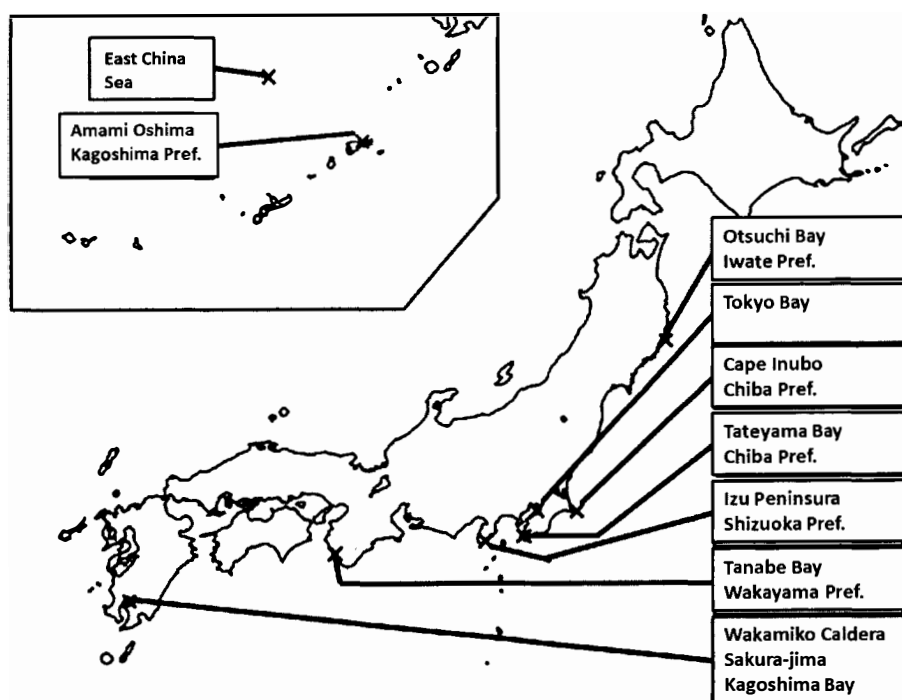


Fig. 1. Map of sampling stations of bottom sediments, biological samples, drift wood and sand for isolating actinomycetes from various marine environments.

培養5日目に遠心分離した培養上清中のCHE活性を測定し、活性が認められた菌株をCHE活性陽性株とした。

2.1.3. CHE 活性測定

CHE活性の測定は、文献 (<http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/product/product03.html>; 菅野, 1978) に従った。すなわち、発色液 80 μ l と基質液 160 μ l を混合し、37°C で 10 分間インキュベート後、酵素液 (培養液上清) 200 μ l を加えて 37°C で 90 分間インキュベートした。その後、遠心分離 (9,000 \times g, 10 分間, 4°C) し、上清の吸光度 (OD₅₀₀) を分光光度計 (島津製作所製, UV-2400PC UV-VIS) で測定した。本測定では、市販の CHE (*Pseudomonas* sp. 由来, フナコシ社) を標準液として検量線を作成し、37°C で (pH 7.0) 1 分間に 1 μ mol のリノール酸コレステロールを加水分解する酵素活性を 1 ユニット (U) と定義した。

2.2. CHE 有望産生株の DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子解析

グリシン 0.2% を添加した OA 培地 (グリセロール 2%, バクトソイトン 0.1%, pH 7.0) 20 ml 中で CHE 有望産生株を 5 日間、27°C で回転振とう培養 (160 rpm) した。その培養液 1 ml を遠心分離後 (17,700 \times g, 10 分間, 4°C), 菌体を TE Buffer 0.6 ml に懸濁した。その懸濁液を 2.0 ml 容チューブ (株式会社アシスト, 滅菌済) に移した後、直径約 0.1 mm の zirconia/silica beads (Bio Spec Products Inc., 11079-105Z) 5 g, Lysozyme 溶液 (Sigma-Aldrich Japan, 40 mg/ml) および Achromopeptidase 溶液 (Sigma-Aldrich Japan, 0.2 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l 添加し、時々攪拌しながら 37°C で 1 時間インキュベートした。次に、Proteinase K 溶液 (Sigma-Aldrich Japan, 20 mg/ml) 3 μ l と 10% Sodium dodecyl sulfate 溶液 (以下, SDS) 30 μ l を添加した後、同様に 37°C で 1 時間インキュベートした。さらに PCI (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) 溶液 0.6 ml を添加後、ビーズホモジェナイザー (TOMY 製, Micro Smash™

MS-100R) を用いて、3,000 rpm, 30 秒間で菌体を破碎した。菌体破碎後、CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) 溶液 100 μ l を添加し、5 分間振とうした。65°C で 10 分間インキュベート後、遠心分離 (20,300 \times g, 15 分間, 4°C), 得られた上清に CIA (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) 溶液 0.6 ml および SDS 溶液 30 μ l を加えて激しく振とうした。その後、遠心分離 (20,300 \times g, 5 分間, 4°C) により上清を再度分取した。その上清を 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 60 μ l およびイソプロピルアルコール 0.6 ml を用いてイソプロパノール沈殿処理後、得られた DNA を滅菌水 100 μ l に溶解した。これを鋳型として 16S rRNA 遺伝子をターゲットとし、PCR 反応を行った。反応液の組成はポリメラーゼ含有 2 \times Go Taq® Green Master Mix (Promega Co.) 125 μ l, 5 μ M プライマー各 1 μ l, 鋳型 DNA 2 μ l, 滅菌水 8.5 μ l とした。なお、プライマーは細菌のユニバーサルプライマーである 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いた。サーマルサイクラー (TaKaRa Bio Inc., Dice mini TP 100) を用いて、反応液を 94°C で 2 分間加熱後、94°C 1 分間・56°C 2 分 30 秒間・72°C 2 分 30 秒間を 35 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 7 分間の伸長反応をみた。得られた PCR 産物は 1.2% アガロースゲル電気泳動で確認後、Promega 製のキット (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) を用いて精製した。続いて、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) のプロトコールに準じてサイクルシーケンシング反応を行い、反応物を精製した。なお、サイクルシーケンシング反応のプライマーには上記の 27F と 1492R をそれぞれ用いた。シーケンサー (Applied Biosystems 3130xl, ジェネティックアナライザ 3130xl-100) を用いて塩基配列を解読後、得られた塩基配列をデータ処理ソフト Genetyx Ver. 7 で解析し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST 検索を用いてデータベースと照合して CHE 有望産生株の近縁種を特定した。

2.3. CHE 高活性保有株からの CHE の単離・精製

2.3.1 CHE 高活性保有株の培養液の調製

バッフル付きの3ℓ容三角フラスコにパルミチン酸コレステロール培地600 mlを分注後、高活性保有株を1白金耳接種し、27℃で7日間回転振とう培養し、遠心分離で得た上清をCHEの単離・精製に用いた。

2.3.2 CHE の単離・精製

パルミチン酸コレステロール培地でCHE高活性保有株を大量培養し、遠心分離した上清1,010 mlに90%飽和になるように硫酸アンモニウムを徐々に添加後、4℃で2日間攪拌放置し、培養上清中のタンパク質を塩析した。これを遠心分離(8,600×g, 40分間, 4℃)し、得られた沈殿に68 mlの20 mMリン酸バッファー(pH 7.0)を加え、沈殿物を溶解した。得られた溶解沈殿物液を遠心分離(13,400×g, 10分間, 4℃)した上清を透析膜(日本メディカルサイエンス製, Visking Cellulose Tubing MWCO:14,000)に分注後、同バッファーで一昼夜透析し(4℃), 82 mlの透析内液を得た。これをあらかじめ同バッファーで満たしたDEAE-Sephacryl S-200HR(φ1.6×85 cm)カラムに通し、未吸着画分を溶出させた(4℃, 流速0.5 ml/min)。次に同バッファーおよび1.0 M塩化ナトリウムを含む同バッファーを用いて、直線濃度勾配溶出を行い、CHE活性がみられた画分、76 mlを得た。これを遠心分離(13,400×g, 10分間, 4℃)したのち、限外濾過を行い(Millipore製, Ultra filtration Membrane, 分画分子量5,000), 53 mlに濃縮した。この濃縮液をあらかじめ50 mMリン酸バッファー(pH 7.2)を満たしたSephacryl S-200HR(φ1.6×85 cm)カラムに通し、溶出させた(4℃, 流速0.5 ml/min, 5 ml/tube)。このゲル濾過クロマトグラフィーにおいてCHE活性がみられた画分(No. 13~17)から、22.5 mlの精製酵素液を得た。

2.3.3 タンパク質量の測定

CHEの単離・精製の各ステップにおいて、サン

プル中のタンパク質量は、UV法にてOD₂₈₀を測定した(島津製作所製, UV-2400PC UV-VIS)。なお、検量線にはウシ血清アルブミン(BSA)を用いた(Nakashima *et al.*, 2009)。

2.3.4 ポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE)

2.3.2のゲル濾過クロマトグラフィーでCHE活性がみられた画分をそれぞれ電気泳動後、銀染色法でバンドを確認した。

2.3.5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

ゲル濾過クロマトグラフィーの画分No. 13~17のタンパク質を濃縮する目的で、サンプル900 μlに20%トリクロル酢酸100 μlを加えて生じた沈殿物を遠心分離(20,300×g, 5分間, 4℃)で集めたのち、エタノール800 μlを加え、再度遠心分離後(20,300×g, 5分間, 4℃), エタノールを除去し、室温でよく乾燥後、SDS-PAGEサンプルバッファー10 μlを加えて、タンパク質を溶解させた。次に、濃縮サンプルを10%ゲルで泳動するため、SDS-PAGEサンプルバッファーに溶解したタンパク質サンプルに染色液(アトー製, EzApply)をタンパク質サンプルと等量混合し、5分間煮沸した。このサンプルを20 mAで80分間電気泳動後、CBB染色法でバンドを確認した。

2.4. 高活性保有株由来 CHE の諸性状

2.4.1 精製 CHE の熱および pH 安定性

精製CHE溶液を35~80℃で30分間加温したのち速やかに冷却して、残存活性を測定し、CHEの熱安定性を調べた。

pH安定性は、CHE酵素液のpHを各種バッファーで3.5~10.0に調整後、37℃で60分間加温してからpH 7.0に再調整して残存活性を測定し、各pHにおけるCHEの安定性を調べた。なお、本実験には50 mM酢酸バッファー(pH 3.5~6.0)および50 mM Tris-HCl(pH 7~10)の2種類を用いた。

2.4.2 精製 CHE の基質特異性

人の血中に多いコレステロールエステルである CP, リノール酸コレステロール (以下 CL: Cholesterol linoleate), オレイン酸コレステロール (以下 CO: Cholesterol oleate) を基質として精製 CHE の基質特異性を調べた。

3. 結 果

日本列島の太平洋岸の岩手県から鹿児島県にいたる各地と沖縄県および東シナ海で採取した試料から分離した放線菌について CHE 生産菌を探索した結果を表 1 にまとめた。この表から明らかのように、岩手県大槌湾から 33 株、東京湾から 290 株、千葉県銚子市犬吠埼海岸から 18 株、千葉県館山湾から 35 株、静岡県伊豆半島から 82 株、和歌山県白浜町田辺湾から 21 株、鹿児島県若尊カルデラから 18 株、鹿児島県桜島から 48 株、奄美大島から 18 株および東シナ海から 48 株の合計 611 株の放線菌が得られた。この内訳は表 2 に示すように海底堆積物由来 384 株 (水深 200 m 以下 318 株, 200 m 以上 66 株), 海洋生物由来 114 株, 海岸の砂由来 90 株, マングローブ林周辺の砂由来 18 株および流木由来 5 株であった。

本スクリーニングにおけるヒット率 (供試菌株数に対する陽性菌数の割合) は, 49.1% (611 株中

300 株) であった。最もヒット率が高かった海域は千葉県館山湾由来の 74.3% (35 株中 26 株) であった。水深 200 m 以下の全サンプルのヒット率 55.6% (分離株数 545 株中 287 株) と比較すると, 水深 200 m 以上の全サンプルのヒット率 19.7% (分離株数 66 株中 13 株) は極めて低かった。一方, 表 2 に示すように分離源別でみると海岸の砂由来が最もヒット率が高く, 67.8% (90 株中 61 株) であった。また, 水深 200 m 以浅の全海底堆積物サンプルのヒット率 51.9% (分離株数 318 株中 165 株) と比較すると, 水深 200 m 以深の全サンプルのヒット率 19.7% (分離株数 66 株中 13 株) は極めて低かった。

これら 300 分離株について 2.1.3. に示す方法で CHE 高活性保有株の探索を行った結果, 3 株の有望株が得られた。これらの株は, 2009 年 5 月東京湾水深 5 m 海底堆積物由来 (A 株と命名, CHE 活性 6.8 mU/ml), 同年 11 月東京湾水深 20m 海底堆積物由来 (B 株と命名, CHE 活性 9.0 mU/ml) および同年 10 月東シナ海水深 300m 海底堆積物由来 (C 株と命名, CHE 活性 3.1 mU/ml) であった。これら 3 株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から種の同定を行った結果, 東京湾海底堆積物から分離された A 株および B 株はともに同一種の *Streptomyces rubrolavendulae* とそれぞれ 99.63% および 99.56% の高い相同性を示したが, 東シナ海海底堆積物から分離された C 株は先の 2 分離株とは異なった種の *Streptomyces glauciniger* と 99.78% の高い相同性を示した。これら 3 株のうち, *Streptomyces rubrolavendulae* と高い相同性を示した 2 分離株の中の B 株は活性が最も高く, しかも安定して CHE を生産していたことから, 以後の実験はこの株を用

Table 1. Numbers and hit rates of CHE-producing actinomycetes strains isolated from marine samples in various environments.

Depth (m)	Sampling sea area		No. of tested strains	No. of CHE active strains	Hit rate (%)
200<	Iwate Pref	Otsuchi Bay	33	16	48.5
	Tokyo	Tokyo Bay	290	144	49.7
	Chiba Pref	Cape Inubo	18	11	61.1
		Tateyama Bay	35	26	74.3
	Shizuoka Pref	Izu Peninsula	82	39	47.6
	Wakayama Pref	Tanabe Bay	21	9	42.9
	Kagoshima Pref	Sakura-jima	48	32	66.7
Amami Oshima		18	10	55.6	
Total			545	287	55.8
200>	Kagoshima Pref	Wakamiko Caldera	18	4	22.2
		East China Sea	48	9	18.8
	Total		66	13	19.7

Table 2. Numbers and hit rates of CHE-producing actinomycetes strains isolated from various marine samples.

Source	No. of tested strains	No. of CHE active strains	Hit rate (%)	
Marine sediment	200m<	318	165	51.9
	200m>	66	13	19.7
Marine organism	114	51	44.7	
Coastal sand	90	61	67.8	
Mangrove forest	18	10	55.6	
Driftwood	5	0	0	
Total	611	300	49.1	

いて行った。

図2に最終精製ステップのゲル濾過によるB株のCHEの溶出パターンを示した。この図の縦軸のOD₂₈₀は280 nmにおける吸光度で測定した総蛋白質質量を示す。CHE活性と総タンパク質量は共に溶出区分12から検出され、急速に高くなって共に溶出画分No.15で最大値を示した。CHE活性と総蛋白質質量共に、ピーク地を示したあとの溶出画分では値が急速に低下したが、CHE活性に比べると総蛋白質質量の低下がやや緩やかで、しかも溶出画分19で小さなピークを示した。CHE活性は、溶出画分19以降1 mU/ml以下のほぼ一様な極めて低い活性を示した。溶出画分No. 15をはさんで図中に矢印で示した溶出画分 (No. 13~17) を集めて合一した。

表3にB株からのCHEの精製結果を示した。本株の培養上清1,010 mlから総CHE活性として7.3 U、培養上清中の総タンパク質量として3,819 mgが得られ、したがって単位総タンパク質量当たりのCHE比活性として 0.2×10^{-2} U/mgが求められた。培養上清に硫酸アンモニウムを添加して得られた沈殿物からは、17.5%のタンパク質が回収され、CHE活性の回収率は59%で、培養上清あたりのCHE比

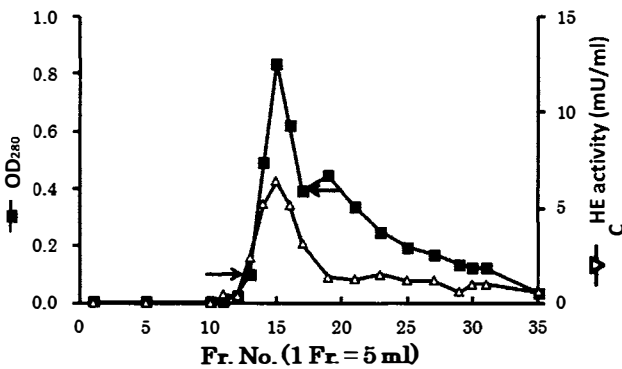


Fig. 2. Purification of CHE from strain B by gel filtration chromatography.

Table 3. Summary of purification of CHE from actinomycete strain B.

Sample	Total CHE activity (U)	Total protein quantity (mg)	Specific activity ($\times 10^{-2}$ U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	7.3	3819.4	0.2	1.0	100.0
Ammonium sulfate precipitation	4.3	667.4	0.6	2.6	59.0
Dialysis	3.5	343.8	1.0	4.1	48.1
Anion-exchange chromatography	2.2	66.9	3.2	16.9	29.6
Ultrafiltration	1.6	44.5	3.7	19.3	22.5
Gel filtration chromatography	0.9	14.9	5.8	30.3	11.8

活性が2.6倍に増加し、CHE活性を持ったタンパク質がある程度選択的に沈殿したことが伺われた。培養上清の半透膜透過処理で膜内に残った部分からは、48.1%のCHE活性が回収され、総タンパク質量当たりのCHE比活性として培養上清の4.1倍が得られた。陽イオン交換クロマトグラフと限外濾過ではCHE活性回収率はそれぞれ29.6%と22.5%に低下するが、総タンパク質量当たりのCHE比活性は各々16.9倍と19.3倍に大幅に高まった。上述したゲル濾過クロマトグラフの画分No.13~17からのCHE活性の回収は11.8%と低いものではあったが、総タンパク質量当たりのCHE比活性は培養上清の30.3倍といった高い精製倍率になった。この最終精製物 (ゲル濾過クロマトグラフのNo.13~17画分) についてNative-PAGEを実施したところ、単一バンドが確認され、CHEは単一物質に精製されたと判断した。このCHEについてSDS-PAGEを行った結果、22.7 kDa付近と39.5 kDa付近に濃いバンドがみられ、本酵素の分子量は622 kDaで、通常水溶液中では二量体の状態で存在していることが判明した。

本CHEの熱安定性を調べた結果を図3に示した。この図では30℃における本CHEの安定性を100として各々の温度における活性を相対値で示した。本CHEは30~60℃では全く安定であり、70℃でも91%の活性を示した。しかし75℃以上では急激に活性が低下した。次に本CHEのpH安定性を調べた結果を図4に示した。この図ではpH7における活性を100としてその他のpHでの活性を相対値で表した。その結果、本CHEはpH5~8において極めて安定であり、pH3.5でも90%、またpH

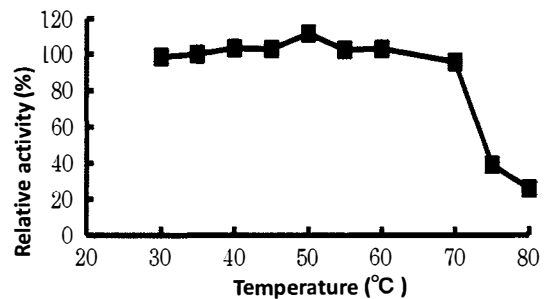


Fig. 3. Thermostability of CHE extracted from strain B.

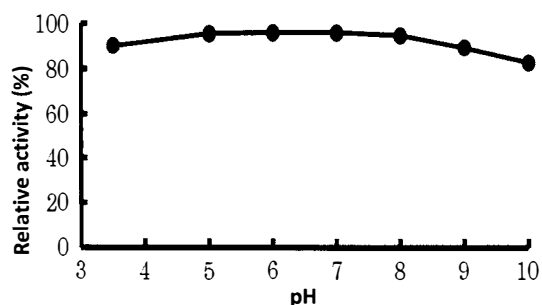


Fig. 4. pH stability of CHE extracted from strain B.

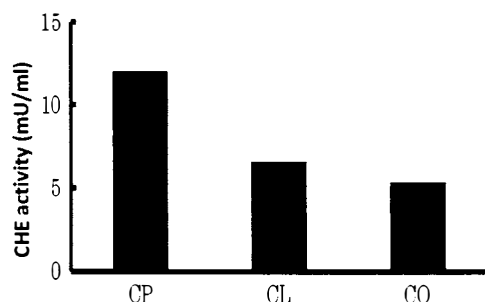


Fig. 5. Substrate specificity of CHE extracted from strain B. CP, Cholesterol palmitate; CL, Cholesterol linoleate; CO, Cholesterol oleate

10でも83%の相対活性が認められた。さらに基質特異性を調べた結果、図5にみられるように本CHEはCP、CLおよびCOを基質として分解することが判明した。

4. 考 察

CHEは自然界に広く存在する酵素であるが生理学的意義および基質特異性については依然として不明な点が多い。本研究の結果、CHE生産放線菌株が日本列島の太平洋側の内湾や沿岸、また東シナ海

外洋の、200 m以浅の浅海および200 m以深の深海の海底堆積物中に広く分布していることが確認された。また、海底堆積物だけでなく、岸辺の砂、流木、生物遺骸などにも分布することが明らかになった。ただ、ヒット率から判断すると、200 m以深の深海よりも、200 m以浅の浅海域でのヒット率が高いので、浅海域での普遍的な分布が考えられる。ただ、200 m以深の深海は、低温・高圧で著しい貧有機物環境なので、ユニークな性質のCHEが存在している可能性がある。

本研究におけるCHE生産陽性株のヒット率は、全体を通して49%であったが、Du *et al.* (2010)は、哺乳類の排泄物から分離した菌株から7.1% (126株中9株)のCHE生産菌株を分離しており、またKamei *et al.* (1977)は放線菌205株 (分離源は不明) から13株 (6.3%)の生産菌株を報告している。これらの報告と比較すると本研究のヒット率は極めて高いことから、海洋環境はCHE生産菌株の探索に有望であることが明らかとなった。表1および2に示すように200 m以深の海底堆積物からのヒット率は200 m以浅と比較すると必ずしも高くはなかった。しかし、東シナ海300 mの海底堆積物からCHE生産有望株 (C株と命名) が1株得られ、CHE生産有望株のヒット率の高い可能性が示唆された。今後C株からもCHEを単離精製して、諸性状を明らかにしたいと考えている。また、海洋に生息する魚体内などにはコレステロールが豊富に含まれていることから、海洋環境には多くのCHE活性を有する微生物の存在の可能性が考えられる。

表4に本株由来CHEとこれまでに報告されてい

Table 4. Comparison of thermo- and pH stability of CHE extracted from strain B with other CHE producing actinomycetes strains.

Strain	Thermostability (relative activity, %)	pH stability (relative activity, %)	Molecular weight (kDa)	References
Strain B	91	83	62.2	This study
<i>Streptomyces</i> sp. strain X9	60	60	23.6 & 163	Xiang <i>et al.</i> (2006)
<i>S. avermitilis</i> JCM 5070	40	90	19.7	Xiang <i>et al.</i> (2007)
<i>S. griseus</i> IFO 13350	40	90	25.7	"
<i>Acinetobacter</i> sp. strain CHE4-1	0	90	6.5	Du <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	100	580	Sugihara <i>et al.</i> (2002)

る微生物由来 CHE の熱安定性と pH 安定性を比較した結果を示した。この表からわかるように、他の微生物由来の CHE は 70°C における相対活性が 0～60% であったのに対し、本株は 91% であったため、最も熱安定性が高いことが判明した。しかし pH 10 における CHE の安定性は他の株と比較すると、あまり高いとは言えなかった (Xiang *et al.*, 2006, 2007; Du *et al.*, 2010; Sugihara *et al.*, 2002)。

本研究では人の血中に多い 3 種類のコレステロールエステルの分解を確認したが、今後、他のコレステロールエステルについても調べる必要がある。また、沿岸のみならず外洋海域の海水試料からも高い活性を有する CHE 生産放線菌の探索を行うとともに、放線菌以外の海洋微生物からの CHE 生産菌の分離を試みることを考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、田辺湾の海洋サンプルを提供いただいた近畿大学農学部水産学科水族環境学研究室 江口 充教授に深く感謝いたします。

参考文献

- Borja, C. R., G. V. Vahouny and C. R. Treadwell (1964) Role of bile and pancreatic juice in cholesterol absorption and esterification. *Amer. J. Physiol.*, 206, 223-228.
- Du, L., Y. Huo, F. Ge, J. Yu, W. Li, G. Cheng, B. Yong, L. Zeng and M. Huang (2010) Purification and characterization of novel extracellular cholesterol esterase from *Acinetobacter* sp. *J. Basic Microbiol.*, 50, 1-7.
- Gallo, L., T. Newbill, J. Hyun, G. V. Vahouny and C. R. Treadwell (1977) Role of pancreatic cholesterol esterase in the uptake and esterification of cholesterol by isolated intestinal cells. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 156, 277-281.
- 五島雄一郎 (1971) 脂質代謝異常の臨床, 南山堂, pp. 25-30.
- 今田千秋 (2009) 海の微生物の利用 - 未知なる宝探し -, 成山堂書店, pp. 73-79.
- Imada, C., K. Hotta and Y. Okami (1998) A novel marine *Bacillus* with multiple amino acid analog resistance and selenomethionine-dependent antibiotic activity. *J. Mar. Biotechnol.*, 6, 189-192.
- Kamei, T., H. Suzuki, M. Matsuzaki, T. Otani, H. Kondo and S. Nakamura (1977) Cholesterol esterase produced by *Streptomyces lavendulae*. *Chem. Pharmaceut. Bull.*, 25, 3190-3197.
- 菅野剛史 (1978) 日常検査の基礎シリーズ 11 血清脂質検査, 医学書院, pp. 8-16.
- Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli (2006) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 399-405.
- Maita, M., J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami and S. Satoh (2006) Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fish. Sci.*, 72, 513-519.
- Momsen, W. E. and H. L. Brockman (1976) Purification and characterization of cholesterol esterase from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, 486, 103-113.
- Nakashima, T., K. Anzai, R. Suzuki, N. Kuwahara, S. Takeshita, A. Kanamoto and K. Ando (2009) Productivity of bioactive compounds in *Streptomyces* species isolated from Nagasaki marine environments. *Actinomycetologica*, 23, 16-20.
- Okami, Y. and K. Hotta (1988) Search and discovery of new antibiotics. *In Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited*, pp. 33-67, London.
- Shirling, E. B. and D. Gottlieb (2006) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313-340.
- Sugihara, A., Y. Shimada, A. Nomura, T. Terai, M. Imayasu, Y. Nagai, T. Nagao, Y. Watanabe and Y. Tominaga (2002) Purification and characterization of a novel cholesterol esterase from *Pseudomonas aeruginosa*, with its application to cleaning lipid-stained contact lenses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2347-2355.
- Suzuki, K., K. Nagai, Y. Shimizu and Y. Suzuki (1994) Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8, 122-127.
- Takizawa, M., R. R. Colwell and R. T. Hill (1993) Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 997-1002.
- Watve, M. G., R. Tickoo, M. M. Jog and B. D. Bhole (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, 176, 386-390.
- Xiang, H., N. Takaya and T. Hoshino (2006) Novel cholesterol esterase secreted by *Streptomyces* per-

- sists during aqueous long-term storage. *J. Biosci. Bioeng.*, 10, 19-25.
- Xiang, H., S. Masuo, T. Hoshino and N. Takaya (2007) Novel family of cholesterol esterases produced by actinomycetes bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1774, 112-120.
- <http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/product/product03.html> Assay method of cholesterol esterase "Amano"
(2012年12月19日受付；2013年7月23日受理)