

Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica が生産する菌体外 リパーゼの新しい精製法とリパーゼAの化学的性質

久野 斉・太田 安英

広島大学生物生産学部, 東広島市 739
1996年10月31日 受付

要 旨 酵母の *Yarrowia lipolytica* が, オリーブ油とカゼインを含む培地中で菌体外に生産するリパーゼのうち, 主成分であるリパーゼAを SDS-アクリルアミドゲル電気泳動で単一なまで精製した。精製酵素の分子量は39,000, 糖の含有量はマンノースとして10%, N末端のアミノ酸配列は, VYTSTET(A)XIDDE(A)YXFF-であった。これらのデータは, オリーブ油を含み, カゼインを含まない培地で培養したとき生産される菌体結合リパーゼのうち, リパーゼIのそれに極めて近い。しかし, アミノ酸組成を比較したところ, リパーゼAでは疎水性アミノ酸残基が少なく, 両者が同一のタンパク質とは考えられなかった。従って, カゼインの有無によって, よく似ているが異なったリパーゼが誘導されたと推定される。

キーワード: カゼイン, 酵母, *Yarrowia lipolytica*, リパーゼ

緒 言

酵母の1種である *Yarrowia lipolytica* (以前は *Saccharomycopsis lipolytica* と言った) は, 極めて特異なリパーゼを生産する微生物である。この菌のリパーゼは, どれもアクチベーターが共存しないと, 活性が全く発現しない。これらの酵素は, 動物の胆汁酸で活性化されるので (山田と太田, 1963; OTA and YAMADA, 1966; 1967), 哺乳類の乳や消化管, あるいは魚類の消化管に認められる, 胆汁酸活性化リパーゼと似ているが, この酵母はアクチベーターとして, 高級脂肪酸の3, 5-ジヒドロキソ誘導体を自ら生合成するので (OTA *et al.*, 1973; GOMI *et al.*, 1986A; 1986B), その点では異なっている。

Y. lipolytica を脂質が全く含まれない培地で培養すると, 菌体外にリパーゼ活性が認められない。しかし, この菌体とオリーブ油を緩衝液中で振とうすれば, わずかながら脂肪酸の遊離がみられる。培地にオリーブ油のような油脂やオレイン酸のような脂肪酸を添加するとリパーゼの誘導がみられ, オリーブ油の場合で約800倍の活性になった。(OTA *et al.*, 1968; SUGIURA *et al.*, 1975)。このリパーゼは菌体外に出ないで細胞に留まるので, 菌体結合 (cell-bound) リパーゼと呼ばれた (SUGIURA *et al.*, 1976)。五味ら (OTA *et al.*, 1982; GOMI *et al.*, 1984) が菌体結合リパーゼを精製したところ, 2つの活性画分が検出され, リパーゼIおよびリパーゼIIと命名された。リパーゼIとIIの酵素化学的性質は, すでにいろいろ検討されている。

培地にリパーゼ誘導脂質とともに, 大豆抽出物やカゼインなどを入れて培養すると, ほとんど (約90%) のリパーゼ活性は菌体外に見いだされる (OTA *et al.*, 1978)。この現象は大豆抽出物などで, リパーゼが菌体外に離脱されたように見えるので, これらを離脱因子と呼んだ。大豆培地を用いた菌体外 (extracellular) リパーゼの精製はすでに行われ, 酵素学的性質は調べられている (OTA *et al.*, 1970; 1972)。しかし, その後菌体結合リパーゼが精製されてみると, 菌体外リパーゼの比活性の低さが指摘された。また, 精製カゼインのようなリパーゼの精製を容易にする離脱因子も見つかったので, 菌体外リパーゼの精製法を再検討し, 2, 3の化学的性質とともに報告する。

実 験 方 法

リパーゼ活性の測定 (山田ら, 1962) ポリビニルアルコール (PVA) を乳化剤としたオリーブ油エマルジョンを, リパーゼの基質として反応させ, 終了後遊離した脂肪酸を 0.05 N 水酸化ナトリウムで滴定し

た。PVA には、(株)クラレが製造したポバール117とポバール205を9:1の割合で、緩衝液には、0.2 M トリス-マレイン酸緩衝液 (pH8.2) を用い、また本酵母のリパーゼはアクチベーターを要求するので、0.2 % (w/v) のタウロコール酸ナトリウムを反応液に添加した。この条件で毎分 1 μ mole の脂肪酸を遊離するリパーゼ量を 1U と定義した。

Y. lipolytica の培養 リパーゼを生産させる株として、山田と太田 (1963) が土壌から分離した株 (3カ所に寄託、寄託番号 CBS6303, ATCC48436, および IFO10073) を使用した。培地 (OC 培地) は次の組成で調製した。グルコース2.0%, 尿素0.2%, KH_2PO_4 0.6%, K_2HPO_4 0.2%, KCl 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 ppm, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 ppm, カゼイン (nach Hammarsten) 0.5%, オリーブ油 1.0%, チアミン塩酸塩 400 $\mu\text{g/L}$ (pH 6.1)。この培地に、同じ培地で16時間培養した種母を約10%加え、さらに18時間振とう培養した。培養温度30°C, 振とう条件 130 rpm/min。培養液を冷却遠心後、上清のリパーゼを精製実験に用いた。

N末端のアミノ酸配列の分析 タンパク質試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、セミドライブロットング装置を用いて、分離試料をポリビニリデンジフルオリド膜 (PVDF; pore size, 0.2 μm ; BIO-RAD) に転写した (MATSUDAIRA *et al.*, 1987)。クマシーブリリアントブルーで染色してリパーゼAの位置を確認し、はさみで切り出して、プロテインシーケンサー (Applied Biosystem, 477A/120A) の試料とした。分析はエドマン分解法によって行われた。

アミノ酸組成の分析 前述のようにリパーゼAを PDVF 膜に転写後、バンドを切り出し、3% (W/V) フェノールを含む 6N 塩酸で、166°C, 20分間タンパク質を加水分解した。塩酸を減圧乾固して除き、Stocchi と Piccoli の方法 (1989) に従って、ダンシル化反応を行った。得られたダンシルアミノ酸を HPLC 分析に供した。

糖含有量の測定 リパーゼAの糖含有量の測定は、フェノール-硫酸法によって行った。吸光度を 490 nm で測定し、マンノース当量を求めた。

結 果

菌体外リパーゼの新しい精製法

① アセトン沈澱 培養上清を寒剤 (氷と塩化ナトリウム) で冷やしながら、フリーザーで冷却したアセトンを徐々に滴下し、アセトンの終濃度を50% (v/v) にした。30分間攪拌し、遠心分離で沈澱を集めた。アセトンで脱水しながら、沈澱物を乳鉢で粉末化した (アセトン粉末)。

② イオン交換クロマトグラフィー アセトン粉末を 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) とともに一晩攪拌して溶解後、不溶物を除去し、DEAE-Toyopearl 650M イオン交換クロマトグラフィーの試料とした。DEAE-Toyopearl のカラムサイズ 2.5×40 cm, 流速 30 ml/h。吸着したリパーゼの溶出は、緩衝液中の塩化ナトリウムの濃度を直線的に増加させて (0~0.3 M) 行った。Fig. 1 に示すように、2つの活性ピークが溶出し、溶出順にリパーゼAおよびリパーゼBと命名した。リパーゼAの方が圧倒的に活性の合計量が大きいため、以後リパーゼAのみを精製した。

③ 疎水クロマトグラフィー イオン交換クロマトグラフィーにおけるリパーゼA画分 (フラクション No. 42~60) を、限外ろ過膜で 10 ml まで濃縮、脱塩した。これに、0.9M の硫酸アンモニウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) 150 ml を加え、Phenyl-Toyopearl 650M 疎水クロマトグラフィーの試料とした。Phenyl-Toyopearl のカラムサイズ 2.0×20 cm, 流速 30 ml/h。吸着したリパーゼは、硫酸アンモニウムの濃度を 0.9M から 0 まで低下させることで溶出した。硫酸アンモニウム濃度の低いところで、小さい肩のあるピークとしてリパーゼ活性が認められた (Fig. 2)。フラクション No. 60 から No. 72 までを、次のクロマトグラフィーの試料とした。

④ 分子ふるいクロマトグラフィー 疎水クロマトグラフィーで得られた画分を、限外ろ過膜で 5 ml まで濃縮し、Sephadex G-100 によるゲルろ過を行った。溶離液は 0.5M 塩化ナトリウムを含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.0), カラムサイズ 1.5×100 cm, 流速 15 ml/h。Fig. 3 のフラクション No. 19~22 を濃縮し、以下の実験に供した。

⑤ SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 精製リパーゼAを SDS-PAGE で調べたと

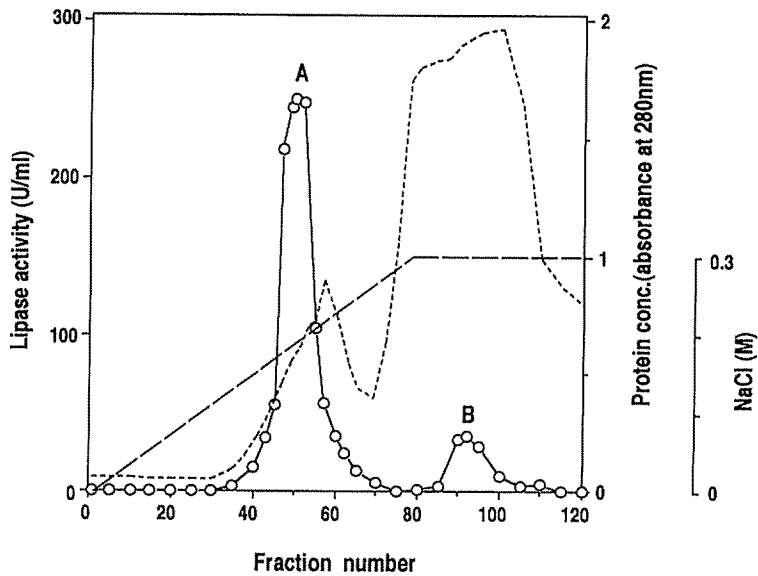


Fig. 1. DEAE-Toyopearl 650M Column Chromatography of Extracellular Lipases from *Yarrowia lipolytica*. Column size, 2.5 x 40 cm; buffer used, 10 mM phosphate buffer at pH 6.0; flow rate, 30 ml/h; fraction size, 5 ml. Lipase activity, —○—; protein concentration, ·····; NaCl concentration in the buffer, - - -. Two lipase peaks were termed Lipases A and B in order of elution.

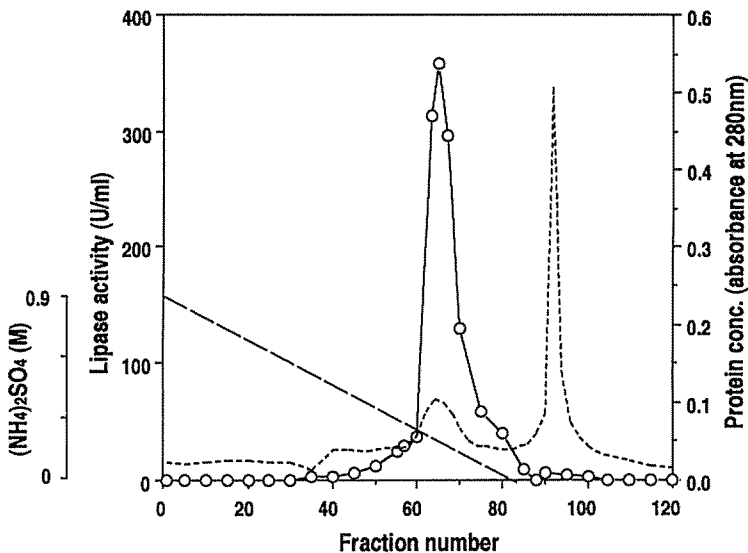


Fig. 2. Phenyl-Toyopearl 650M Column Chromatography of Lipase A from *Yarrowia lipolytica*. Column size, 2.0 x 20 cm; buffer used, 10 mM phosphate buffer at pH 6.0; flow rate, 30 ml/h; fraction size, 5 ml. Lipase activity, —○—; protein concentration, ·····; ammonium sulfate concentration, - - -. Fractions from 60 to 72 were collected as Lipase A.

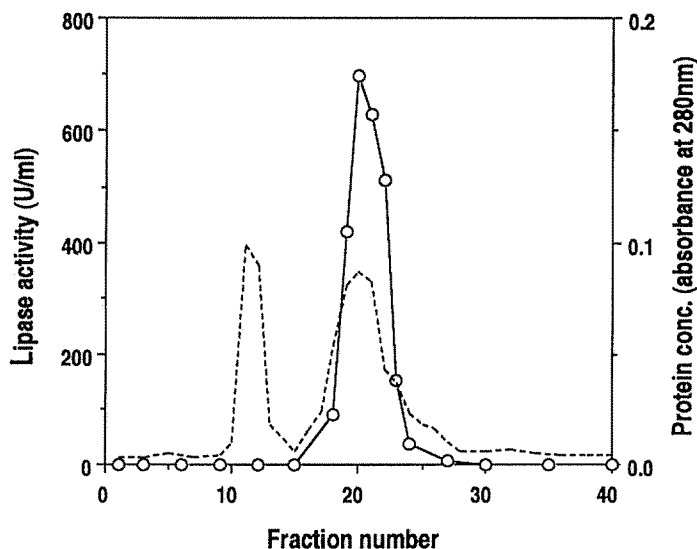


Fig. 3. Sephadex G-100 Column Chromatography of Lipase A from *Yarrowia lipolytica*. Column size, 1.5 x 100 cm; buffer used, 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.0 containing 0.5 M NaCl; flow rate, 15 ml/h; fraction size, 5 ml. Lipase activity, —○—; protein concentration, Fractions from 19 to 22 were collected as purified Lipase A.

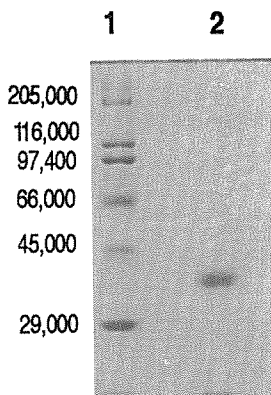


Fig. 4. SDS-PAGE of Lipase A from *Yarrowia lipolytica*.

Lane 1, maker proteins. They are anhydrase, egg albumin, bovine albumin, phosphorylase, β -galactosidase, and myosin in order of molecular size.

Lane 2, purified Lipase A.

ころ、単一なバンドとして検出され、分子量は39,000と推定された (Fig. 4)。

Y. lipolytica が生産する菌体外リパーゼAの精製の概要を Table 1 にまとめた。

リパーゼAの化学的性質

① N末端のアミノ酸配列 得られた配列は、VYTSTET(A)XIDDE(A)YXFFであった。ホルミル化やアセチル化のような、N末端の修飾は見られなかった。

② アミノ酸組成 得られた結果を Table 2 に示す。なお、グルタミンとグルタミン酸、アスパラギンとアスパラギン酸は、それぞれグルタミン酸、アスパラギン酸としてまとめて表記し、システインは定量されていない。

③ 糖の含有量 マンノースに換算した糖の含有量は、約10%であった。

考 察

本論文で報告した *Y. lipolytica* の菌体外リパーゼの精製法は、1970年の方法 (OTA *et al.*) に比べ、いくつかの点で優れている。その第1は、合成培地を基本とし、それにオリーブ油と精製カゼインを加えて菌体外リパーゼを生産させたので、酵素の精製が容易になったことである。旧法の培地には、大豆粉末とコー

Table 1. Purification of Extracellular Lipase A from *Yarrowia lipolytica*.

Step	Activity yield (%)	Specific activity (U/ml/A ₂₈₀)	Purification (fold)
Acetone powder	100	11	1.0
DEAE-Toyopearl	84	315	28.6
Phenyl-Toyopearl	63	3368	306.2
Sephadex G-100	35	7687	698.8

Table 2. Amino Acid Composition of Lipase A and Cell-bound Lipases I and II from *Yarrowia lipolytica*.

	Lipase A	Lipase I ¹⁾	Lipase II ¹⁾
Asx	35	40	40
Thr	16	16	19
Ser	43	17	22
Glx	34	27	32
Pro	16	16	16
Gly	42	27	30
Ala	36	19	20
Val	18	26	27
Met	2	2	2
Ile	11	23	23
Leu	18	26	26
Tyr	5	17	17
Phe	8	17	16
Lys	10	12	12
His	5	15	15
Arg	8	8	8
Try	2	2	4

1) Cited from the previous paper by Gomi *et al.* (1984).

ンスチープリカーが入っていたので、得られた培養液には様々な物質が混じっていたと想像される。第2に、精製に使われた主な操作の段数が、7段から4段へと、大幅に減らされたことである。それにもかかわらず、クロマトグラフィーについては、旧法ではイオン交換クロマトグラフィーのみであったのが、本報告の方法では、原理の異なる3種のクロマトグラフィーが採用された。第3に、精製酵素の比活性が非常に上昇したことである。旧法のそれが3,430 U/ml/A₂₈₀であったのが、新法ではリパーゼAの値で7,690 U/ml/A₂₈₀に達したので、2.24倍になったことになる。さらに、リパーゼAの比活性を菌体結合リパーゼと比べてみると、リパーゼIとIIの比活性がそれぞれ10,200と8,580 U/ml/A₂₈₀であったので、これに匹敵するレベルまで精製されたと考えられる。

菌体外リパーゼと菌体結合リパーゼの精製法を比較したとき、後者に特徴的なことが1つある。それは緩衝液などに、Triton X-100やEmulgen 950のような非イオン性界面活性剤を添加しないと、精製を再現性よく実行できないことで、これは菌体結合リパーゼの溶解性の低さを界面活性剤が助けていることを示唆している。したがって、*Y. lipolytica*のリパーゼ研究をさらに進めるためには、まず溶解性の高い菌体外リパーゼを選ぶ方がよいと考えられる。

次に、菌体外リパーゼAと菌体結合リパーゼI、IIの化学的性質の比較を行う。

① リパーゼIとIIの分子量はそれぞれ39,200と44,300で、リパーゼIの値がリパーゼAのそれに非常に

近い。したがって、リパーゼAとリパーゼIが同一の酵素である可能性がある。

② 糖の含有量は、リパーゼIとIIの8%と16%に対して、リパーゼAは10%である。①と同様に、リパーゼAはリパーゼIに近い。糖を差し引いたペプチド部分の分子量を計算すると、リパーゼI、リパーゼII、リパーゼAについて、それぞれ36,100、37,200、35,100である。

③ N末端アミノ酸と2番目のアミノ酸についてみると、3つのリパーゼとも Val と Tyr で同一である。リパーゼIIに何らかの酵素が作用してリパーゼIが生じ、これが“離脱因子”によって菌体外に出たという仮説が、従来から考えられてきたが、分子量および糖の結果とともに、この仮説には矛盾しない。

④ しかし、アミノ酸分析の結果を見ると、難溶性であると推定されているリパーゼIとIIに比べ、リパーゼAでは疎水性アミノ酸がかなり少ないことが分かる。Hatch (1965)に従って極性アミノ酸と非極性アミノ酸の比を計算すると、リパーゼIとIIの値はそれぞれ1.09と1.21で、菌体結合リパーゼは両者とも疎水性アミノ酸に富んだタンパク質であると考えられる。これに対して、菌体外リパーゼAの値は1.77で、かなり親水性である。

以上を整理すると、リパーゼAとリパーゼIは分子量の点などで非常に似ているが、アミノ酸組成は明らかに異なり、同一のリパーゼとは考えられない。もしこの結論が正しいとすれば、興味ある次のことが推定される。*Y. lipolytica*の培地にオリーブ油を添加して培養すれば、菌体結合型のリパーゼI、IIが誘導されるが、培地にさらにカゼインを添加すれば、遊離型のリパーゼAなどが誘導される。ちなみに、カゼインだけでは遊離型のリパーゼがほとんど誘導されないことが知られている。

引用文献

- GOMI, K., OTA, Y. and MINODA, Y., 1984. Physical and chemical characterization of cell-bound lipases from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 1061-1062.
- GOMI, K., OTA, Y. and MINODA, Y., 1986A. Isolation and identification of lipase activators from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 2525-2530.
- GOMI, K., OTA, Y. and MINODA, Y., 1986B. Role of lipase activators produced by *Saccharomycopsis lipolytica* and calcium ion in its lipase reaction. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 2531-2536.
- HATCH, F. T., 1965. Correlation of amino-acid composition with certain characteristics of proteins. *Nature*, 206: 777-779.
- MATSUDAIRA, P., 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electro-blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, 262: 10035-10038.
- OTA, Y. and YAMADA, K., 1966. Lipase from *Candida paraliipolytica*. Part I. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinylalcohol. *Agric. Biol. Chem.*, 30: 351-358.
- OTA, Y. and YAMADA, K., 1967. Lipase from *Candida paraliipolytica*. Part III. Further studies on the activation of the enzyme systems with bile or calcium salts. *Agric. Biol. Chem.*, 31: 809-816.
- OTA, Y., SUZUKI, M. and YAMADA, K., 1968. Lipid and related substances inducing the lipase production by *Candida paraliipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 32: 390-391.
- OTA, Y., NAKAMIYA, T. and YAMADA, K., 1970. Lipase from *Candida paraliipolytica*. Part IV. Purification, some properties and modification of the purified enzyme with the concentrated solution of sodium chloride. *Agric. Biol. Chem.*, 34: 1368-1374.
- OTA, Y., NAKAMIYA, T. and YAMADA, K., 1972. On the substrate specificity of the lipase produced by *Candida paraliipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 36: 1895-1898.
- OTA, Y., YOSHIOKA, K., MINODA, Y. and YAMADA, K., 1973. Demonstration of the lipid lipase activators produced by *Candida paraliipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 2879-2883.
- OTA, Y., MORIMOTO, Y., SUGIURA, T. and MINODA, Y., 1978. Soybean fraction increasing the extracellular lipase production by *Saccharomycopsis lipolytica* (*Candida paraliipolytica*). *Agric. Biol. Chem.*, 42: 1937-1938.
- OTA, Y., GOMI, K., KATO, S., SUGIURA, T. and MINODA, Y., 1982. Purification and some properties of

- cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 46: 2885-2893.
- STOCCHI, V., PICCOLI, G., MAGNANI, M., PALMA, F. and BIAGIARELLI, B., 1989. Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of dimethylaminoazobenzene sulfonyl- and dimethylaminoazobenzene thiohydantoin-amino acid derivatives for amino acid analysis and microsequencing studies at the picomole level. *Anal. Biochem.*, 178: 107-117.
- SUGIURA, T., OTA, Y. and MINODA, Y., 1975. Effects of fatty acids, lipase activator, phospholipids and related substances on the lipase production by *Candida parailipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 1689-1694.
- SUGIURA, T., OTA, Y. and MINODA, Y., 1976. Partial characterization of cell-bound lipase of *Candida parailipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 40: 2479-2480.
- 山田浩一・太田安英・町田晴夫, 1962. 微生物によるリパーゼの生産 (第2報) リパーゼ定量法. 農化, 36: 860-864.
- 山田浩一・太田安英, 1963. 微生物によるリパーゼの生産 (第4報) 一新菌の同定とその菌株が生産するリパーゼの定量について. 農化, 37: 649-652.

The New Method for the Purification of Extracellular Lipases from *Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica* and Some Properties of Lipase A

Hitoshi KUNO and Yasuhide OTA

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739, Japan*

Yarrowia lipolytica, a species of yeast, produced extracellular lipases, when it was grown in liquid media containing both olive oil and casein. The major part of the extracellular lipases, termed Lipase A, was purified and showed a single band with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight and sugar content of Lipase A were estimated to be 39,000 and 10% as mannose, respectively. The amino acid sequence of the N-terminal was demonstrated to be VYTSTET(A)XIDDE(A)YXFF-. These data are similar to those of Lipase I, one of the cell-bound lipases, which was produced by the same yeast with the media containing olive oil, but casein being omitted; however, Lipase A is considered to be different from Lipase I, because Lipase A contained significantly a less amount of hydrophobic amino acids than Lipase I.

Key words: casein, lipase, *Yarrowia lipolytica*, yeast.