

論文目録

氏名 新保喜久雄

学位論文

題目 ホスホリパーゼDによるリン脂質の酵素的変換と
その応用に関する研究

学位論文の基礎となる学術論文

題目 Two *Streptomyces* Strains that Produce Phospholipase D
with High Transphosphatidylolation Activity

著者名 Kikuo SHIMBO, Hideki YANO and Yutaka MIYAMOTO

学術雑誌名 Agricultural and Biological Chemistry に発表

(巻・号・頁) (53 ・ 11 ・ 3083 ~ 3085)

発行年月 1989 年 11 月

題目 Purification and Properties of Phospholipase D
from *Streptomyces lydicus*

著者名 Kikuo SHIMBO, Hideki YANO and Yutaka MIYAMOTO

学術雑誌名 Agricultural and Biological Chemistry に発表

(巻・号・頁) (54 ・ 5 ・ 1189 ~ 1193)

発行年月 1990 年 5 月

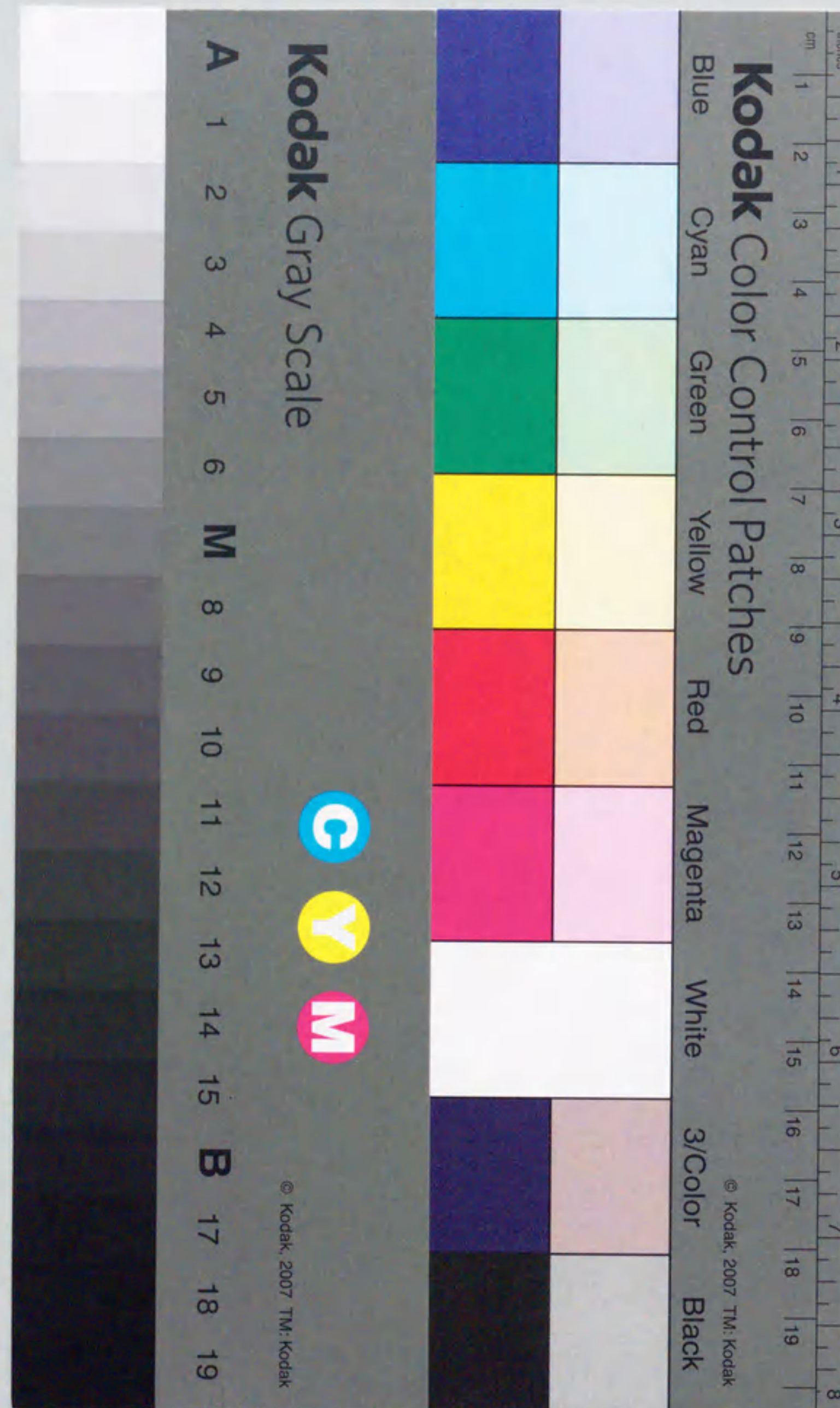
題目 Purification and Properties of Phospholipase D
from *Streptomyces antibioticus*

著者名 Kikuo SHIMBO, Yugo IWASAKI, Tsuneo YAMANE and Kazuo INA

学術雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry に発表

(巻・号・頁) (57 ・ 11 ・ 1946 ~ 1948)

発行年月 1993 年 11 月



学位論文の基礎となる学術論文 (続)

題 目 酵素的合成したリン脂質誘導体の乳化特性

著 者 名 新保喜久雄, 合谷祥一, 山野善正義, 伊奈和夫

学術雑誌名 日本食品工業学会誌 に発表

(巻・号・頁) (40 ・ 11 ・ 755 ~ 763)

発行年月 1993 年 11 月

既発表学術論文

題 目 High Performance Liquid Chromatography of Phospholipids
on Aminopropyl Silica Column

著 者 名 Kikuo SHIMBO

学術雑誌名 Agricultural and Biological Chemistry に発表

(巻・号・頁) (50 ・ 10 ・ 2643 ~ 2645)

発行年月 1986 年 10 月

題 目 二次元薄層クロマトグラフィー—脂質リン測定による
リン脂質の定量分析

著 者 名 渡辺睦人, 伊藤俊洋, 飯田雅昭, 岡部篤宣, 新保喜久雄 他

学術雑誌名 油化学 に発表

(巻・号・頁) (35 ・ 12 ・ 1018 ~ 1024)

発行年月 1986 年 12 月

題 目

著 者 名

学術雑誌名

(巻・号・頁) (・ ・ ~)

発行年月 年 月

題 目

著 者 名

学術雑誌名

(巻・号・頁) (・ ・ ~)

発行年月 年 月

ホスホリパーゼDによるリン脂質の
酵素的変換とその応用に関する研究

1993年

岐阜大学大学院連合農学研究科
生物資源科学
(静岡大学)

新保喜久雄

②

ホスホリパーゼDによるリン脂質の
酵素の変換とその応用に関する研究

1993年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(静岡大学)

新保喜久雄

	[目 次]	(page)
序論		(1)
本論		
第1編 新規 phospholipase D の発見		(5)
要旨		(5)
第1章 高ホスファチジル基転移活性 phospholipase D の探索		(6)
1-1. 実験方法		(6)
1-1-a. 試薬および実験材料		(6)
1-1-b. Phospholipase D 活性測定法		(8)
1-1-c. リン脂質組成分析法		(9)
1-1-d. ホスファチジル基転移活性測定法		(10)
1-2. 結果と考察		(11)
1-2-a. Phospholipase D を生産する土壌微生物のスクリーニング		(11)
1-2-b. 選択された菌株の同定		(13)
1-2-c. 起源の異なる phospholipase D とのホスファチジル基転移活性の比較		(13)
第2章 高ホスファチジル基転移活性 phospholipase D の精製とその性質		(19)
2-1. 実験方法		(19)
2-1-a. 試薬		(19)
2-1-b. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動		(19)
2-1-c. 等電点電気泳動		(20)
2-1-d. 改良 phospholipase D 活性測定法		(20)
2-1-e. 基質特異性		(20)
2-2. 結果と考察		(21)
2-2-a. <i>Streptomyces lydicus</i> D-121 が生産する phospholipase D の精製とその性質		(21)
2-2-b. <i>Streptomyces antibioticus</i> S-170 が生産する phospholipase D の精製とその性質		(27)

第3章 <i>Streptomyces lydicus</i> と <i>Streptomyces antibioticus</i> の phospholipase D のホスファチジル基転移反応に関する 諸性質	(33)
3-1. 実験方法	(33)
3-1-a. 試薬	(33)
3-1-b. ホスファチジル基転移反応によるPEからPCへの 変換反応	(33)
3-1-c. 転移反応のアクセプターに関する特異性	(34)
3-1-d. その他	(34)
3-2. 結果と考察	(35)
3-2-a. phospholipase D の加水分解活性とホスファ チジル基転移活性の関係	(35)
3-2-b. ホスファチジル基転移反応の至適 pH	(37)
3-2-c. 有機溶媒の種類がホスファチジル基転移反応 に与える影響	(37)
3-2-d. ホスファチジル基転移反応のアクセプターに 関する特異性	(40)
第2編 ホスファチジル基転移反応の応用	(44)
要旨	(44)
第1章 ホスファチジル基転移反応によるリン脂質型乳化剤の合成と その性質	(46)
1-1. 実験方法	(46)
1-1-a. 試薬	(46)
1-1-b. 各種溶媒に対する溶解性試験	(47)
1-1-c. リン脂質誘導体のケロシンへの分散方法	(47)
1-1-d. 乳化方法	(47)
1-1-e. 乳化型の決定	(48)
1-1-f. 静置法による相分離測定	(48)
1-1-g. 遠心分離法による油相分離測定	(48)
1-1-h. 界面張力の測定	(49)
1-2. 結果と考察	(50)
1-2-a. リン脂質誘導体の合成	(50)
1-2-b. 各種溶媒に対する溶解性	(54)

1-2-c. エマルションの乳化型	(54)
1-2-d. エマルションの乳化安定性	(56)
1-2-e. 界面張力	(60)
第2章 ホスファチジル化コウジ酸の合成とその性質	(64)
2-1. 実験方法	(64)
2-1-a. 試薬	(64)
2-1-b. ミトコンドリア膜膨潤試験	(64)
2-1-c. 抗菌性試験	(65)
2-1-d. Tyrosinase 阻害活性試験	(65)
2-1-e. 抗酸化性試験	(65)
2-2. 結果と考察	(67)
2-2-a. 7-phosphatidyl kojic acid (PK) の合成	(67)
2-2-b. 7-phosphatidyl kojic acid による ミトコンドリア膜の膨潤	(67)
2-2-c. 7-phosphatidyl kojic acid の抗菌性	(73)
2-2-d. 7-phosphatidyl kojic acid の tyrosinase 阻害活性	(73)
2-2-e. 7-phosphatidyl kojic acid の抗酸化性	(78)
要約	(80)
謝辞	(84)
引用文献	(85)

使用した略号と、物質名の表記について

* 略号表 LIST OF ABBREVIATIONS

CSL	corn steep liquor
EDTA	ethylenediamine tetraacetate
FAB-MS	Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
GTA buffer	equimolar mixture of 3,3-dimethyl-glutaric acid, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol and 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol
KA	kojic acid
LPC	lysophosphatidylcholine
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PA	phosphatidic acid
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PEG	phosphatidylethyleneglycol
P2EG	phosphatidyldiethyleneglycol
P3EG	phosphatidyltriethyleneglycol
PG	phosphatidylglycerol
PGlc	phosphatidylglucose
PI	phosphatidylinositol
PK	phosphatidylated kojic acid
PLD	phospholipase D
PS	phosphatidylserine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPH	sphingomyelin
TLC	thin layer chromatography

* 物質名の表記について

本論文では、溶媒、酸、塩基など汎用試薬については日本語表記としたが、論文題目や見出しを除く叙述中では、その他の化合物名や酵素名を英語表記とした。

序論

グリセロリン脂質

リン脂質は、アルコール類に脂肪酸、リン酸、塩基などが結合した複合脂質の1種である。アルコールがグリセロールであるものをグリセロリン脂質、長鎖アミノアルコールであるものをスフィンゴリン脂質と呼ぶ。国際純正および応用化学連合と国際生化学連合が定めたグリセリン誘導体命名法によって、1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphate と記述される化合物はホスファチジン酸と呼ばれ、最も簡単なグリセロリン脂質であり、グリセロリン脂質の基本構造である。このリン酸基から水素の取れた構造をホスファチジル基と呼ぶ。すなわちホスファチジル基に各種の塩基、ポリオール、アミノ酸などがリン酸エステル結合した化合物群がグリセロリン脂質であるが、これらの極性基の多様性に加えて、2つの脂肪酸の種類により、自然界には様々なグリセロリン脂質が存在することになる。グリセロリン脂質は生体膜の主要な構成物質として生物組織に広く分布しており、生命現象に深く関わっている。また、その物性の産業的な利用が、食品、医薬などの諸分野で行われている。

大豆レシチン

昭和30年代、我国の高度経済成長期においては、諸工業は生産規模の拡大と効率の追求を第一義として発展を続けた。この過程で深刻な公害問題を生じ、昭和40年代はその反省期であったといえよう。その後、昭和50年代以降は省資源、省エネルギーが合言葉となり、近年に至っては「環境」というキーワードが最重要視されるようになった。このようなトレンドの中で、食品工業諸分野においても、資源を有効に活用し、産業廃棄物を減少させようという努力が続けられている。製油産業はその中でも比較的、資源利用度が高く、例えば大豆搾油では投入原料の殆ど全量が製品化されている。しかし製品の付加価値という観点からすれば、まだ十分に活用されているとはいえない。その代表的なものが大豆レシチンである。

レシチンという慣用名は、ギリシャ語の卵黄 (Lekithos) に由来し、古くは卵黄に多く含まれるグリセロリン脂質である phosphatidylcholine を指した。脂質科学の進展に伴い、純物質の phosphatidylcholine に対してはレシチンと呼ばなくなっている。しかし産業界においては、工業製品である大豆や卵黄の混合リン脂質を、いまだに大豆レシチン、卵黄レシチンと呼んでいる。

大豆レシチンは大豆油製造工程の副産物である。圧偏した大豆をヘキサンで抽出して得た粗大豆油を熱水または水蒸気で処理すると、不純物を含むリン脂質混合物が凝集沈降し、これを大豆ガム質と呼ぶ。大豆ガム質を減圧下に加熱乾燥したものが大豆レシチンである。成分的には、グリセロリン脂質の phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA), 脂肪酸を1つ失った構造 (リゾ体と呼ぶ) の lysophosphatidylcholine (LPC) が大部分を占める。その他の成分としては脂肪酸やトリグリセリドやステロール誘導体などがある。

大豆レシチンの用途については、食品分野ではチョコレートなどの製菓工業において分散剤として、また加工油脂工業においてマーガリンやショートニングに乳化剤として利用されている。非食品分野では、インキ、塗料、化粧品などに用いられている他、医薬品製造分野でリポソーム素材としての可能性が検討されており、用途は極めて広範である。しかし実際の需要はあまり伸びていない。原料の大豆からは約 0.4% のレシチンが得られるが、1989/90 年における世界の全大豆供給量は 12,840 万トンで、大豆レシチンの生産可能量は約 36 万トンである。しかし需要は年間 13 万トンに過ぎない。日本においては、生産可能量は14,700トンであるが、実際大豆レシチン市場規模は 5,400トンと推定されている。すなわち商品として利用されている大豆レシチンは生産可能量の 1/3程度であり、食品工業における未活用資源の一つである。この現状に対して、大豆レシチンに種々の加工を施して付加価値を高め、有効利用を図ろうという研究がなされてきた。

大豆レシチンの加工法には種々あるが、大別すると溶剤分別法と化学的処理に分けられる。溶剤分別に用いられる溶剤はアセトンとエタノールである。アセトンで処理すると脂

肪酸やトリグリセリドは可溶性成分として除去され、リン脂質混合物が吸湿性の粉末状に得られる。これは脱油レシチンと呼ばれ、リン脂質含量が高く、健康食品や化粧品素材に使用されている。エタノールで大豆レシチンを抽出すると可溶部に phosphatidylcholine が濃縮され、これは乳化剤としての用途がある。化学的処理には、アセチル化、ヒドロキシル化、ハロゲン化、スルホン化、水素添加などがあり、それぞれ品質安定性や機能に特徴がある。以上の他に近年、酵素処理による改質が注目されている。

リン脂質分解酵素

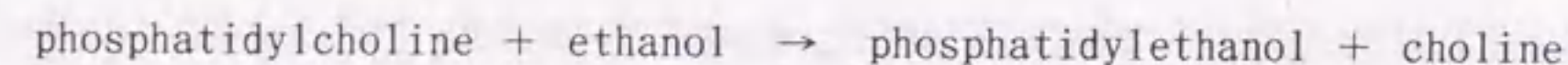
グリセロリン脂質を加水分解する酵素には、切断部位や基質特異性の違いにより様々なものがあるが、大豆レシチンの酵素処理に使用されるのは、phospholipase A₂ (PLA₂) と phospholipase D (PLD) である。Phospholipase C による加水分解物はジグリセリド、および choline のリン酸エステルであるが、ジグリセリドはトリグリセリドから容易に得られ、実用的な意味がない。PLA₂ で大豆レシチンを処理すると、そのグリセロリン脂質がリゾ体となり、親水性が高くなる。また通常大豆レシチンが二価陽イオンの影響で乳化力が低下するのに対し、これらの陽イオンの影響を受けにくくなる他、乳化力がpHや温度の影響を受けにくいなどの特徴がある。これは工業製品として実用化されており、リゾレシチンなどと呼ばれている。

PLD (phosphatidylcholine phosphatidohydrolase, EC3.1.4.4) は、グリセロリン脂質を PA と choline や ethanolamine などに加水分解する酵素である。PLD は、キャベツやニンジンなど多くの植物組織から見出だされている⁽¹⁷⁾ 他に、動物組織に存在⁽¹⁸⁾ することも知られている。微生物界にも PLD は存在し、*Streptoverticillium hachijoense*, *Streptomyces chromofuscus*, *Streptomyces prunicolor*, *Kitasatosporia chromogena*, *Actinomadura* sp. No. 362, *Nocardiosis* sp. No. 779, *Streptomyces* sp. No. AA586, *Micromonospora chalybeata* などの PLD^(3, 4, 8, 9, 14, 19, 20, 28) に関する報告、特許がある。

ホスファチジル基転移反応

PLD は、次式に示すようにグリセロリン脂質のホスファチジル基を、他のアルコール性

水酸基を有する化合物に転移させる反応 (transphosphatidylation, ホスファチジル基転移反応) を触媒する.



上式における phosphatidylcholine は PLD の基質であり, ethanol を転移反応の受容体またはアクセプターと呼ぶ. これは Yang ら⁽³⁰⁾ によって最初に発見された反応であるが, 以後その合成的応用が幾つか報告されている. 例えば, phosphatidyl-D-serine⁽¹⁰⁾, phosphatidyl-DL-glycerol⁽²⁰⁾, phosphatidyl nucleosides⁽²⁵⁾ などがホスファチジル基転移反応を用いて合成されている.

実験室的な反応方法は次のように行う. すなわち, アクセプターは通常水に可溶なものが選ばれ, 最適な pH の緩衝液に PLD とアクセプターを溶解する. 基質のリン脂質は水に難溶であるから最適な有機溶媒に溶かす. 両者を混合, 攪拌し, 2 相系の反応を行う. 反応は水と有機溶媒の界面で行われる. ホスファチジル基転移反応と加水分解反応とは, 競争反応であると考えられ, 収率よく転移反応を行うには, 基質とアクセプターの比率, それぞれの溶液の濃度などを実験的に定めなければならない.

本研究の目的

以上に述べたように, 大豆レシチンは潜在的生産可能量が大きいにもかかわらず実際の需要は少なく, 未利用資源の一つである. その有効活用には, 種々の加工を施して新たな機能を付加して高付加価値化することが必要である. そのための方法として PLD によるホスファチジル基転移反応が有力である. なぜなら, グリセロリン脂質の親水性基を種々の化合物に変換することで, 天然物としては存在しない新規なリン脂質誘導体とし, もとのリン脂質とは全く別の機能を付与できる可能性があるからである. 本研究は, リン脂質の酵素変換に使用し得るような高いホスファチジル基転移活性を有する PLD を探索し, それを用いた新規な機能を持つリン脂質誘導体の合成を試みたものである.

第 1 編 新規 phospholipase D の発見

要旨

Phospholipase D (PLD) によるリン脂質の酵素変換の研究を行うに際して, 先ず研究に使用する酵素の給源として土壌微生物を考え, スクリーニングによる探索を行った. すなわち大豆レシチンを炭素源とする制限培地を用いて, 神奈川県を中心とする各地の土壌試料から 831 株の微生物を得た. これらの中から, PLD の加水分解活性とホスファチジル基転移活性を指標として, 29 菌株が選別された. そのうちの 2 菌株の培養液は, 高いホスファチジル基転移活性を示し, かつ PLD 生産菌としては未報告であると思われた. 菌学的諸性質を検討した結果, 2 種の微生物は *Streptomyces lydicus* および *Streptomyces antibioticus* であると同定された.

この 2 つの放線菌の培養液から, 各種のクロマトグラフィー等の手段により PLD の精製を行った. それぞれの酵素を電気泳動的に単一なまでに精製し, 分子量, 等電点を測定した. さらに至適 pH, 至適温度および種々の物質が活性に与える影響を検討した.

精製された酵素について, ホスファチジル基転移反応に関する幾つかの性質を調べた.

第1章 高ホスファチジル基転移活性

phospholipase D の探索

脂質分解酵素 phospholipase D (PLD) が触媒するホスファチジル基転移反応の、合成的応用を検討するにあたり、まず使用する PLD を選定しなければならない。試薬として入手可能なものとしてはキャベツの葉などの植物および *Streptomyces chromofuscus* に由来する PLD がある。しかし、*S. chromofuscus* の PLD は加水分解反応は行いが転移反応の活性は著しく低く、キャベツなど植物由来の PLD も転移反応収率に関して十分とはいえない。菌株として入手できる *Streptoverticillium hachijoense* の PLD もキャベツと同様である。他にも種々の微生物由来の PLD が知られてはいるが、特許微生物であり入手が困難である。そこでホスファチジル基転移反応活性の高い PLD を、土壤微生物を対象としてスクリーニングすることにした。

1-1. 実験方法

1-1-a. 試薬および実験材料

試薬

微生物スクリーニング培地用の大豆レシチンはホーネンコーポレーション製、AYレシチンを使用した。酵素活性の測定に使用した卵黄レシチンは和光純薬（生化学用、PC 95%）から、choline oxidase はフナコシ薬品(株)から、peroxidase は東洋紡(株)から購入した。ホスファチジル基転移活性測定に使用した大豆 PC（純度 99%）および転移反応収率の比較に用いた大豆 PE は(株)ホーネンコーポレーションから購入した。

土壤試料

神奈川県を中心に、田、畑、山林、海岸など様々な環境の80地点から土壤試料を採取した。サンプリングは、地表から 1~5cm 程度の深さの部分を 5~10g 採り、微生物の分離に供した。遠隔地点の場合は土壤を暗所にて風乾したものをを用いたが、その他はすみやかに実験に使用した。

大豆レシチンのみを炭素源とした制限培地（培地 A）

培地組成：	soybean lecithin	2.0 %
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.0 %
	K_2HPO_4	0.2 %
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 %
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 %
	agar	2.0 %

培地調製方法

常法により無機塩と寒天を水に溶かした後、水浴中で60℃に保温した。これに大豆レシチンを添加し、乾熱滅菌したホモジナイザーを用い、11,000rpm で5分間攪拌した。希水酸化ナトリウム溶液で pH 7.2 に調整した。これをシャーレに 12ml ずつ分注して平板プレートを作製した。以上の操作はクリーンベンチ内で行った。

土壤試料液の調製

30ml容試験管に水を 7ml ずつ分注して滅菌した。これに土壤1gを入れて攪拌した（土壤試料原液）。土壤試料原液 2白金耳を別の滅菌水に移して 1次希釈液とした。同様の操作により、2次希釈液と 3次希釈液を調製した。

菌株保存用培地 (培地B)

培地組成:	yeast extract	0.4 %
	malt extract	1.0 %
	dextrose	0.4 %
	agar	2.0 %
	distilled water	1.0 liter

常法により作製し, pH 7.3に調整して用いた.

PLD アッセイ用培地 (培地C)

培地組成:	glucose	0.5 %
	corn steep liquor	1.0 %
	peptone	0.5 %
	yeast extract	0.5 %
	K ₂ HPO ₄	0.2 %
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 %

常法により作製し, pH 7.0に調整して用いた.

1-1-b. Phospholipase D 活性測定法⁽⁶⁾

卵黄レシチン 500mgをジエチルエーテル 1mlに溶解し, 水 10ml を加えて超音波処理してレシチンエマルジョンを調製した. レシチンエマルジョン 1mlに, 0.1M Tris-Maleate-NaOH緩衝液 (pH 5.5) 0.1ml, 0.1M CaCl₂ 溶液 0.05ml, 7.5% Triton X-100水溶液 0.15ml, 試料溶液 0.1mlを加え, 37℃で10分間反応させた. 所定時間後, 50mMのEDTAを含む 1.0M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 0.2ml を加え, 直ちに沸騰水浴中にて 5分間加熱し, 反応を停止させた. 以上の加水分解反応により PC から遊離した choline を, 以下の方法で定量した. すなわち上記の反応液に, 4-aminoantipyrine 2mg, choline oxidase 4

unit, peroxidase 4unit, phenol 1mg, およびTriton X-100 20mg を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 4mlを加え, 37℃で20分間反応させた. 発色した反応液の 500nmにおける吸光度を測定した. 対照には, 上記の操作において酵素試料溶液の代りに水を用いたものを使用した. 予め既知量の choline chloride を用いて作製した検量線から遊離 choline 量を求めた. PLD 1unit は上記の反応条件下に, 1分間に 1μmol の choline を遊離させる酵素量として定義した.

本測定法の原理は, choline 含有リン脂質の加水分解により生じる遊離の choline を, choline oxidase で酸化するときに発生する過酸化水素を定量するものである. 実際には peroxidase の存在下, 過酸化水素, 4-aminoantipyrine と phenol から生じるキノン色素を定量する.

1-1-c. リン脂質組成分析法

著者らによって報告された方法⁽²⁶⁾を一部改変して用いた. Silica gel TLC plate (Merck 社製 Art. 5631, 10×10cm) に, マイクロシリンジを使用してリン脂質溶液をスポットし, 各リン脂質成分が完全に分離するような展開溶媒を用いて, 一次元または二次元展開した. 減圧下に溶媒を除去した後, ヨウ素で発色させた. 各成分のスポットをかき取って25ml容試験管に入れ, 70% 過塩素酸 1mlと濃硝酸 2滴を加え, アルミブロックヒーター (大洋科学製) を用いて 160℃で90分間加熱した. 放冷後, 分解液を15mlに希釈し, 希釈液 5mlを10ml容共栓試験管に採り, これにモリブデン酸試薬* 0.5mlを加えて 1分間振とうした. さらに酢酸ブチル 2.5mlを加え, 再び 1分間振とうした. 3000rpm で10分間, 遠心分離した後, 310nm における上相の吸光度を測定した. 予め既知量のKH₂PO₄を用いて作製した検量線から各リン脂質成分に由来するリン量を計算し, その相対比率をもってリン脂質組成とした.

*モリブデン酸試薬; ammonium molybdate tetrahydrate 5.8g を 20ml の濃塩酸に溶解し, 水で 100mlに希釈する.

1-1-d. ホスファチジル基転移活性測定法⁽²¹⁾

15ml容共栓試験管に、予め前項 1-1-c. の湿式分解リン定量法により純度を検定した大豆 PC の 10mM ヘキサン溶液を 0.1ml採り、窒素ガスを吹付けて濃縮した。これに 0.4M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 0.2ml, 0.2M CaCl₂ 0.2ml, 50% glycerol水溶液 0.08ml, 水 0.32ml, ジエチルエーテル 0.5ml, 酵素溶液 0.2mlを加えて密栓し、軽く振とうしながら、25℃で30分間、反応させた。1.6M citric acid 0.1ml を加えて反応を停止し、反応液にジエチルエーテル・エタノール混液 (4:1) 2mlを加えて脂質を抽出し、上相を濃縮乾固した。この濃縮物 (PC, PG, PAの混合物) につき、前項 1-1-c. の方法によりリン脂質組成を分析した。その結果から、ホスファチジル基転移活性を以下のように定義した。

$$\text{ホスファチジル基転移活性 (\%)} = [\text{PG}] \times 100 / \{ [\text{PG}] + [\text{PC}] + [\text{PA}] \}$$

1-2. 結果と考察

1-2-a. Phospholipase D を生産する土壌微生物のスクリーニング

自然界から特定の性質を有する微生物を選択するに際しては、アッセイ法の確立が重要となる。PLD 生産菌の場合においては、リン脂質を資化しないような微生物は PLD を生産する可能性が小さいと考え、第 1次スクリーニングとして、大豆レシチンのみを炭素源とする制限培地を使用することにした。リン脂質として大豆レシチンを用いたのは、脂肪酸やステロールエステル等の不純物を含んではいるが、費用対効果が大であると判断したことによる。制限培地 (培地 A) の調製にあたっては、滅菌操作による大豆レシチンの変質を避けるため、無機塩と寒天を滅菌した後に大豆レシチンを混合することにした。また微生物源としては、微生物種が豊かであると考えられる土壌を用いることにした。採取地は、北海道千歳空港周辺、栃木県那須、群馬県前橋市、山梨県甲斐駒岳、同山中湖畔、千葉県佐原市、茨城県つくば市、東京都伊豆大島、同世田谷区、同足立区、同小金井市、神奈川県横浜市、同川崎市、同藤沢市、同鎌倉市、同伊勢原市、同平塚市、同大磯町、同二宮町、同箱根町、静岡県伊豆、同菊川町、同大東町、愛知県一宮市、岐阜県本巣郡、同岐阜羽島駅周辺などであった。

採集した試料から常法通り、土壌試料原液と希釈液を作り、それぞれ別のシャーレの培地に散布し、30℃で 4~12日間培養した。生育したコロニーから釣菌して培地 B のスラントに移し、十分に生育するまで更に培養した後、冷蔵庫で保存した。以上の結果から、合計 831菌株の微生物を得た。

第 2次スクリーニングとして、獲得した全菌株を、30ml容試験管に 7mlずつ分注した培地 C に植菌し、26℃で 2日間振とう培養した。この培養液を、3000rpm, 10 分間遠心分離し、培養上清を得た。この培養上清につき、PLD 力価 (unit/ml) とホスファチジル基転移活性を測定した。この結果から、PLD 生産微生物として選択された 29 菌株の、培養上清の PLD 力価 (unit/ml) とそのホスファチジル基転移活性をプロットすると、Fig. 1のよ

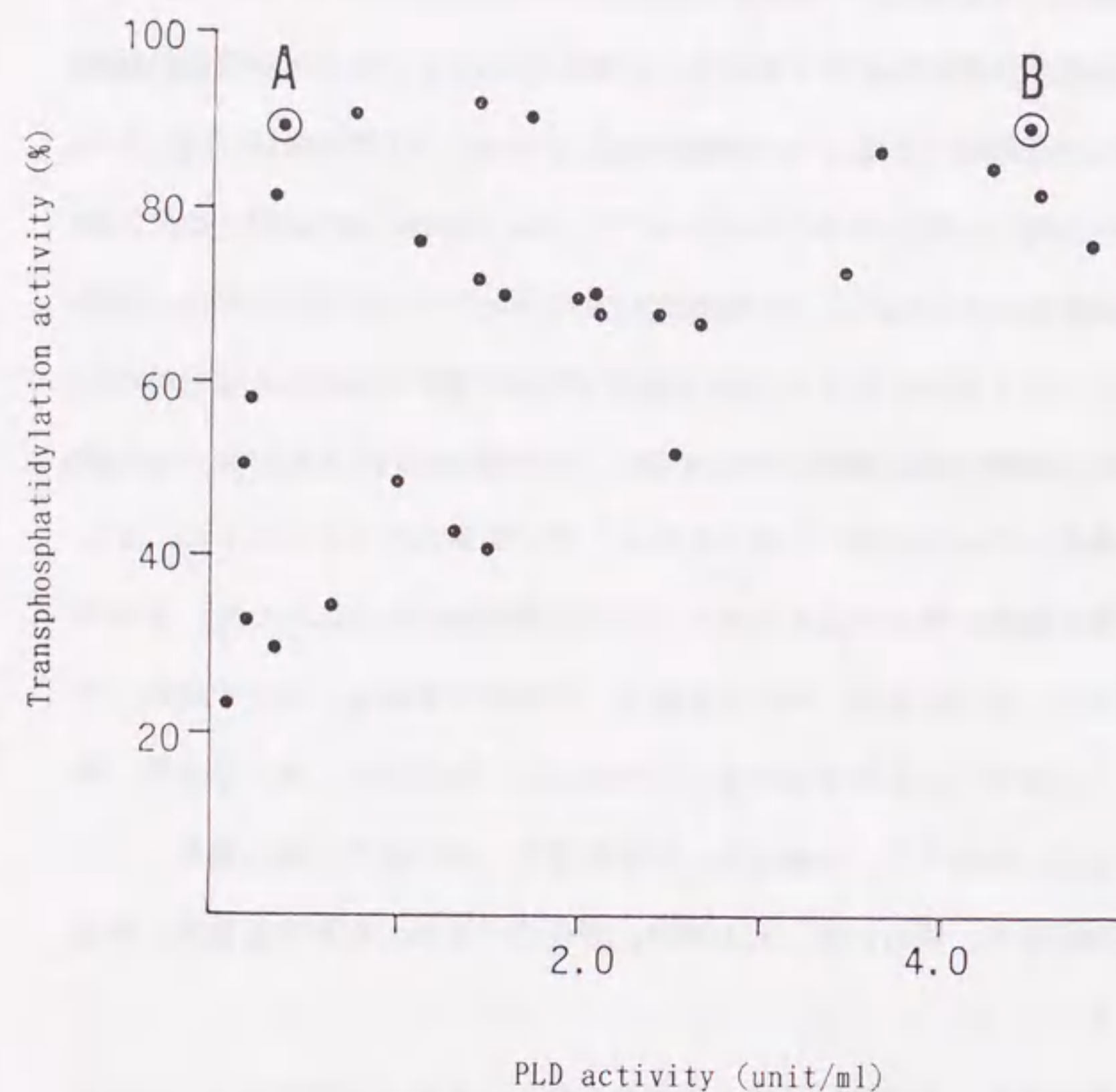


Fig. 1. Relation between PLD Activity and Transphosphatidylase Activity in the Culture Supernatants of PLD Producing Bacteria
A; Strain No. S-170, B; Strain No. D-121.

うであった。外観の観察から、これらの菌株はすべて放線菌であると判断された。Fig. 1において、高いホスファチジル基転移活性を示したもののうち、菌株 D-121と菌株 S-170は、これまでに知られている PLD 生産菌と異なると考えられたので、次に菌の同定を行った。

1-2-b. 選択された菌株の同定

D-121株と S-170株の同定は The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Scotland, UK) 社に依頼した。両株の生化学的指標を Table I に示す。

この結果から両株とも *Streptomyces* に属することが明らかとなり、続いて各種の菌学的諸性質に基づく計数分類学的方法⁽²⁷⁾を用いて種の同定を行った。両株の菌学的諸性質を Table II にまとめて示す。その結果、D-121 株は *Streptomyces lydicus*、S-170 株は *Streptomyces antibioticus* であると同定された。同定結果の確実性に関する指標である Willcox probability score は、それぞれ 0.999および 0.943であった。

S. lydicus D-121 株は神奈川県横浜市緑区の「こどもの国」公園内で採取した土壌から、*S. antibioticus* S-170 株は神奈川県川崎市の中央公園内で採取した土壌から、それぞれ得られたものである。また両菌とも、PLD 生産菌としてはこれまで文献的に未報告のものであった。

1-2-c. 起源の異なる phospholipase D とのホスファチジル基転移活性の比較

前項までに述べたように、土壌微生物のスクリーニングによって、高いホスファチジル基転移活性を有する PLD を生産する2種類の放線菌を得た。次に、それらの PLD のホスファチジル基転移活性を、他の起源の PLD と比較した。*S. lydicus* D-121および *S. antibioticus* S-170 の PLD は、硫酸アンモニウムによる塩析と CM-Toyopearl 650Mを用いた吸脱着操作によって部分的に精製したものを使用した。*Streptoverticillium*

Table I. Chemotaxonomic Analysis of Strains No. D-121 and No. S-170

	D-121	S-170
Presence of mycolic acid	Negative	Negative
Cell wall diamino acid	LL-DAP*	LL-DAP*
Major fatty acids present	iso C _{15:0}	iso C _{15:0}
	anteiso C _{15:0}	anteiso C _{15:0}
	iso C _{16:0}	iso C _{16:0}
	iso C _{17:0}	iso C _{17:0}
	anteiso C _{17:0}	anteiso C _{17:0}

* DAP; diaminopimelic acid.

Table II. Characteristics of Strain No. D-121 and No. S-170

	D-121	S-170
Spore chain, Rectiflexibiles	+	-
Spirales	-	+
Spore mass color, red	-	-
gray	+	+
Mycelial pigment, red/orange	+	-
Diffusible pigment produced	-	-
Melanin produced on		
peptone/yeast/iron agar	-	-
tyrosine agar	-	-
Utilization of		
DL- α -amino- <i>n</i> -butyric acid	+	-
L-cystein	-	-
L-valine	-	-
L-phenylalanine	+	+
L-histidine	+	+
L-hydroxyproline	+	+
sucrose	-	+
L-rhamnose	-	-
raffinose	+	+
meso-inositol	+	+
mannitol	+	+
adonitol	-	-
xylitol	-	+
Lecithinase activity	+	-
Lipolysis	+	+
Pectin hydrolysis	-	-
Elastin degradation	-	-
Xanthine degradation	+	+
Arbutin degradation	+	+
Nitrate reduction	-	-
Hydrogen sulfide production	-	-
growth, at 45 °C	-	-
with NaCl (7% w/v)	-	+
with sodium azide (0.01% w/v)	(+)	+
with phenol (0.1% w/v)	+	(+)
Resistance to		
Neomycin (50 μ g/ml)	-	-
Rifampicin (50 μ g/ml)	+	-
Oleandomycin (100 μ g/ml)	-	-
Antibiosis against		
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> NCIB 196	-	+
<i>Candida albicans</i> CBS 562	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1171	+	+
<i>Streptomyces murinus</i> ISP 5091	-	+
<i>Aspergillus niger</i> LIV 131	+	+

+ ; positive , - ; negative , (+) ; poor growth.

hachijoense の PLD は Okawa and Yamaguchi⁽¹⁵⁾に従って調製した。 *S. chromofuscus* およびキャベツの PLD は、それぞれ Boehringer Mannheim 社、 Sigma Chemical 社のものを使用した。

微生物スクリーニングの過程で、 *S. lydicus* D-121, *S. antibioticus* S-170 両菌株の PLD とともに PC から PG を合成する転移反応においては 100% 近い収率であることが判明していたので、比較検討は PE を基質、 glycerol をアクセプターとし、 PE から PG を合成する転移反応に関して行った。

[反応条件]	PLD	1 unit in 0.835ml of 0.1% bovine serum albumin* solution (* stabilizer for PLD)
	PE (from soybean, purity 99%)	25mg
	0.8M acetate buffer (pH 5.6)	0.17ml
	1M CaCl ₂	0.068ml
	glycerol	790mg
	diethylether	1.7ml
incubation; 12hr at room temperature.		

反応終了後、ジエチルエーテル・エタノール混液 (3:2)を加えて上層に抽出された脂質を回収し、前記 1-1-d. 項のホスファチジル基転移活性測定法に準じて反応生成物のリン脂質組成を分析した。その結果を Table III に示す。

Table IIIに示したように、ホスファチジル基転移による PE から PG への変換反応においても、 *S. lydicus* D-121 の PLD と *S. antibioticus* S-170の PLD は、従来からホスファチジル基転移反応用の酵素としてよく用いられてきたキャベツの PLD や、菌株保存機関から入手可能な *Streptoverticillium hachijoense* の PLD、試薬として市販されている *S. chromofuscus* の PLD に比較して高い変換収率を示した。 Juneja⁽⁵⁾らは、著者および他の研究者から分譲された幾つかの PLD に関して、ホスファチジル基転移反応による PC から PE への変換反応の速度論的研究を行った。その結果においても PLD-121

Table III. Comparison of Several PLDs as to the Conversion from PE to PG

Origin of enzyme	Phospholipid composition (%)			
	PG	PA	PE	Others
<i>Streptomyces lydicus</i> D-121	97.3	0.4	1.1	1.2
<i>Streptomyces antibioticus</i> S-170	96.2	1.0	1.6	1.1
Cabbage	82.6	8.2	7.7	1.5
<i>Streptoverticillium hachijoense</i>	72.8	15.4	10.6	1.1
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	0.7	96.9	1.6	0.7

と PLD-170 は他に比較して高い変換収率を与えることが示された。

以上に述べたように、ホスファチジル基転移反応を用いて有用な化合物を合成するという目的に使用する酵素として、*S. lydicus* D-121 の PLD と *S. antibioticus* S-170 の PLD は実用に耐え得るものと考えられた。また全部で80の土壌サンプルという比較的小規模なスクリーニングで、2種類の高活性の PLD が得られたことは、制限培地の使用など、実験に用いたアッセイ法の妥当性を裏付けていると考えられる。

第2章 高ホスファチジル基転移活性

phospholipase D の精製と

その性質

前章に述べたように、土壌微生物のスクリーニングにより、高いホスファチジル基転移活性を有する2つの PLD を獲得することができた。次にこれらの PLD を精製し、基礎的な諸性質を調べることを目的として以下の実験を行った。

2-1. 実験方法

2-1-a. 試薬

酵素の各種クロマトグラフィーには、(株)東ソーの Butyl-Toyopearl, CM-Toyopearl 650M, DEAE-Toyopearl 650M, Toyopearl HW50F, Toyopearl HW55F を使用した。クロマトフォーカシングに使用した Polybuffer 96, Polybuffer 74, PBE 94, 電気泳動に用いた Ampholine (pH 3.5~10.0) と分子量マーカーは Pharmacia社から購入した。タンパク量測定には、Bio-Rad 社の Protein assay kit I を使用した。その他の試薬は第1章と同様である。基質特異性の検討に使用したリン脂質のうち sphingomyelin (SPH, 卵黄製) は Sigma Chemical 社から購入し、その他は(株)ホーネンコーポレーションのものを使用した。

2-1-b. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製した酵素の分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動により測定した。試料30 μ g を SDS (2%) と 2-mercaptoethanol (5%) を含む 0.5M Tris-HCl緩衝液 (pH 6.8)で100 $^{\circ}$ C, 3分間処理した。濃縮ゲルと分離ゲルのポリアクリルアミド濃度は、それぞれ4.5%, 10% とした。通電条件は 20mA 定電流, 4 $^{\circ}$ C, 100分間とした。分子量マ

ーカーには, bovine serum albumin (分子量 67,000), catalase (60,000), lactate dehydrogenase (36,000) を使用し, 泳動したゲルの染色は Coomassie brilliant blue R-250 で行った.

2-1-c. 等電点電気泳動

精製した酵素の等電点は, 2%の Ampholine (pH 3.5-10.0) を含むポリアクリルアミドゲル (ゲル濃度 4.0%) を用いた等電点ディスク電気泳動により測定した. 陽極および陰極液には, それぞれ 20mM リン酸と 1M 水酸化ナトリウムを使用した. 通電条件は, 150Vで 2時間泳動した後, 200Vで10時間, さらに400Vで 1時間であった. 泳動終了後, ゲルディスクを 5mm幅に切断し, 各ゲルに 1mlの蒸留水を加えて 2時間振とうして両性担体と酵素を抽出し, 抽出液の酵素活性と pH を測定する方法で等電点を測定した.

2-1-d. 改良 phospholipase D 活性測定法

PLD 活性測定は, 微生物スクリーニング時の条件を一部変更して行った. すなわち前章記載の方法では検液中の基質として PC エマルジョンを 1ml使用したが, 使用量を減少しても支障なく, かつ精度よく測定可能であったので, 0.1ml に変更した.

2-1-e. 基質特異性

大豆製 PC, PE, LPC および卵黄製 SPH を用いて基質特異性を調べた. 前項 2-1-d. の改良 PLD 活性測定法における PC エマルジョンの代わりに, 各リン脂質を 5 μ mol 含む 0.1mlのエマルジョンを使用して反応させた. PC, LPC および SPH は, PLD 活性測定法に準じた choline 定量により反応を追跡した. PE の加水分解については, 一定時間ごとに反応溶液を TLC で定性的に観察した.

2-2. 結果と考察

2-2-a. *S. lydicus* D-121 が生産する phospholipase D の精製とその性質⁽²²⁾

培養条件の検討

酵素の精製を容易にするためには, タンパク含有量のできるだけ少ない培地を使用し, かつ培養物中の酵素活性 (unit/ml) および比活性 (unit/mg protein) が高くなるような条件を設定しなければならない. *S. lydicus* D-121 は前章記載の培地 C だけでなく, 放線菌の一般的な培地である YD 培地 (yeast extract 1%, glucose 1%) においても良好に生育するが, これに corn steep liquor (CSL) を添加すると, さらに培養物中の酵素活性が上昇することが予備試験で見出された. CSL に含まれる, 培養物酵素活性向上に無関係のタンパク質などの成分が培地に加えられるのを避けるために, CSL の前処理を検討した. まず CSL を 10% (W/V) 濃度で水に懸濁させた. CSL 懸濁液を, pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0 にそれぞれ調整し遠心して不溶物を除去したものを調製した. また CSL 懸濁液に 2 倍容のアセトンを加えて不溶物を除去し, 減圧下でアセトン除去したものを調製した. これらの処理を施した CSL 溶液を 1/2 YD 培地 (yeast extract 0.5%, glucose 0.5%) に 1/9 容または 1/4 容加えた後, 培地の pH を 7.0 に調整した. これらの培地と YD 培地, 1/2 YD 培地に植菌して 30°C で 2 日間培養後, 培地上清の酵素活性を測定した. 1/2 YD 培地では全く生育しなかったが, その他の培地では, pH 7.0 で沈殿除去処理した CSL を 1/2 YD 培地に対して 1/4 容加えたもの (以下, YDC 培地) が最良の結果を与え, 酵素活性 3.30 unit/ml (対 YD 培地 83 倍), 比活性 4.72 unit/mg protein (対 YD 培地 67 倍) であった. YDC 培地を用いた場合, 培養日数 3 日で酵素生産量は定常状態となり, 菌体あたりの酵素生産量は YD 培地の 5.6 倍となった.

酵素の精製

酵素精製に一般的に用いられる各種の精製単位操作について予備的な検討を行った結果、硫酸アンモニウムによる塩析はあまり有効でなく、Butyl-Toyopearl 650Mを用いる疎水性クロマトは酵素活性回収率が低い難点があり、ヒドロキシアパタイトを用いる吸着クロマトは比活性上昇に無効であった。これらに比較して、CM-Toyopearl 650Mによる吸着・脱離操作、DEAE-Toyopearl 650Mによる陰イオン交換クロマト、クロマトフォーカシング、Toyopearl HW50Fによるゲル濾過は比活性上昇に有効で活性回収率も良好であった。従って以下の操作で精製を行った。

YDC培地 6000mlに前培養液を接種し、30℃で72時間振とう培養した。菌塊を濾別した後、培養濾液のpHを4.0に調整した。遠心分離(8000rpm, 10分間, 4℃)した上清 5700mlを水で2倍に希釈した。予め10mM酢酸緩衝液(pH 4.0)で平衡化したCM-Toyopearl 650Mを、2倍希釈培養上清 1000mlに対して湿重量で2.5gの割合で添加し、30分間攪拌した。CM-Toyopearl 650Mを濾別し、濾液に再び同量のCM-Toyopearl 650Mを加え、上記の操作を繰り返した。回収したCM-Toyopearl 650Mをクロマト管に充填し、10mM酢酸緩衝液(pH 4.0)を流して樹脂を洗浄した。洗浄の終了は、クロマト管に接続したUV吸収モニター(280nm)で確認した。続いて、10mM酢酸緩衝液(pH 4.0)に溶かした300mMの塩化ナトリウム水溶液を通液し、活性画分を溶出、回収した。

限外濾過により活性画分の緩衝液を10mMリン酸緩衝液(pH 6.8)に置換し、同じ緩衝液で予め平衡化したDEAE-Toyopearl 650Mのカラム(1.6cm × 10cm)に負荷し、同じ緩衝液を通液して活性画分を集めた。吸着画分は、緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を0から0.5Mまで上昇させる勾配溶出により溶出したが、この部分は酵素活性を示さなかった。

再び限外濾過により、活性画分の緩衝液を14倍に希釈したPolybuffer 96(pH 6.0)に置換し、濃縮した。予め25mM Tris-酢酸緩衝液(pH 8.3)で平衡化したPBE-94のカラム(1.0cm × 20cm)に試料を負荷し、14倍に希釈したPolybuffer 96(pH 6.0)を通液してクロマトフォーカシングを行った。活性画分を集めて濃縮し、10mMのリン酸緩衝液

(pH 6.0)で平衡化したToyopearl HW 50Fのカラムでゲル濾過を行った。活性は単一ピークとして溶出した。以上の精製操作の結果をTable IVに示す。

Okawa and Yamaguchi⁽¹⁵⁾による*Streptoverticillium hachijoense*のPLDが631unit/mg、Imamura and Horiuti⁽³⁾による*S. chromofuscus*のPLDが152unit/mgであるが、本酵素は最終的に比活性2390unit/mgにまで精製された。これは採用した精製単離操作の組み合わせが適切であったことを示すものであろう。

精製酵素による加水分解生成物の確認

酵素の精製操作において、活性画分の確認はPLD活性測定法によって行った。この測定法はcholineの呈色反応に基づくものであるが、PCが加水分解されてcholineを生成する反応には、PLD以外に、酵素がphospholipase Cとcholine esteraseの混合物である場合が考えられる。そこで以下の確認試験を行った。

PLD活性測定法の条件下にPCを完全に加水分解し、反応溶液をジエチルエーテルで抽出した。抽出物をTLCで分析するとPAのみが検出され、ジグリセライドは認められなかった。抽出後の水相のTLC⁽⁶⁾では、Dragendorff試薬陽性の単一スポットが認められ、これはcholine標品とRf値が一致した。またこの水相を、ホスファチジル基転移反応測定法中のリン定量法に従って分析した結果、リンは検出されなかった。以上から、生成された酵素は定義の通りPLDであることが確認された。

分子量および等電点

精製されたPLDはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、単一のバンドを与え、その分子量は56,000であった。等電点は約pH 7.4であった。

Table IV. Purification of Phospholipase D from *Streptomyces lydicus* D-121

Steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	yield (%)
Culture supernatant	1610	11,184	6.9	100
CM-Toyoparl 650M	65.8	9681	147	87
DEAE-Toyoparl 650M	27.5	8930	325	80
Chromatofocusing	3.9	7121	1820	64
Toyoparl HW50F	1.5	3536	2390	32

酵素活性と安定性に対する pH と温度の影響

結果を Fig. 2 に示す. 至適 pH は約 6.0, 至適温度は 55 °C であった. 安定な pH 域は, 37°C で 2 時間保温した場合, pH 4~7 であり, 安定温度域は, pH 6.0 で 30 分間加熱した場合, 60°C 以下であった.

酵素活性に対する各種の金属イオンと化合物の影響

PLD 活性測定法において CaCl₂ 溶液の代わりに各種の化合物を, 反応系中の濃度が 1mM となるように加え, 無添加の場合に対する比率 (相対活性 %) を測定した. 各種金属塩を加えて金属イオンの影響を調べた結果, Na⁺ (相対活性 88%, 以下同様), K⁺ (88%), Ca⁺⁺ (98%), Mg⁺⁺ (88%), Ba⁺⁺ (88%), Fe⁺⁺ (85%), Mn⁺⁺ (94%), Cu⁺⁺ (88%), Co⁺⁺ (88%), Zn⁺⁺ (88%), Sn⁺⁺ (85%), Fe⁺⁺⁺ (91%), Al⁺⁺⁺ (91%) となり, その効果は小さかった. EDTA および界面活性剤の影響については, EDTA (102%), sodium cholate (85%) および sodium deoxycholate (85%) であり, これらの効果は小さかったが, cetylpyridinium chloride (61%) は部分的阻害効果を示した.

PLD 活性測定法において CaCl₂ 溶液を反応系に加えているのは, 活性発現に Ca⁺⁺ を要求する PLD の存在が知られていることを考慮したものであるが, 本酵素の場合には不要であることが判明した. また EDTA が影響しないことから, 活性発現にその他の金属も要求しないと推定される.

基質特異性

ホスファチジル基転移反応の合成的応用において, 基質としては大豆レシチンや卵黄レシチンから大量調製が容易な PC と PE が適当である. これらと, 大豆レシチンや卵黄レシチンに含まれる choline 含有リン脂質である LPC および SPH を用いて基質特異性を調べた.

PE は PC と同程度の速さで加水分解されて PA を生じた. LPC と SPH の加水分解速

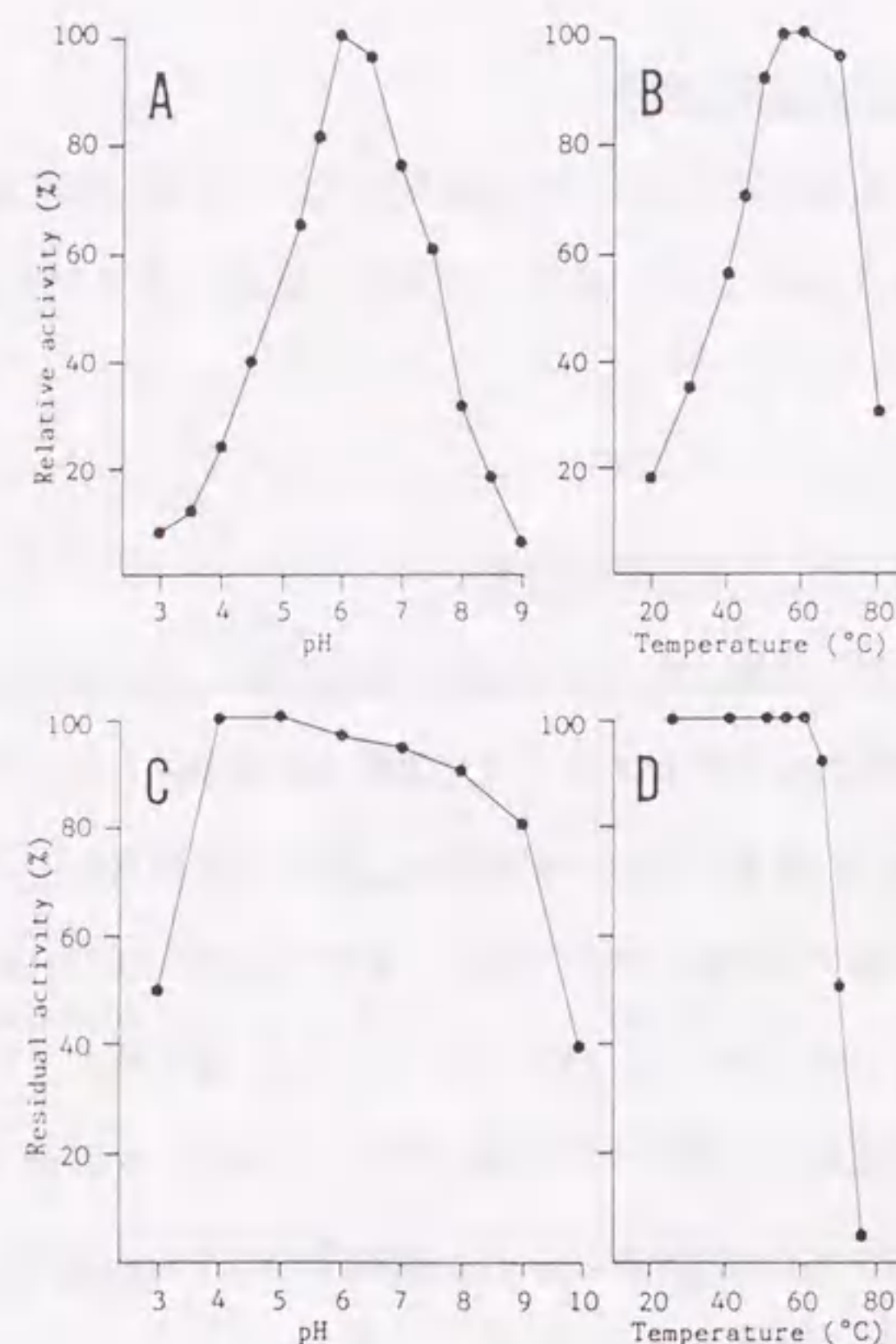


Fig. 2. Effects of pH and Temperature on the Activity and Stability of PLD from *Streptomyces lydicus* D-121

A ; Effects of pH on the enzyme activity. The enzyme reaction was done at various pH in 100mM GTA buffer. The other conditions were the same as the PLD activity assay. The results were depicted with relative activity (%) on the vertical axis.

B ; Effects of temperature on the enzyme activity. The enzyme reaction was done at various temperatures. The other conditions were the same as the PLD activity assay. The results were depicted with relative activity (%) on the vertical axis.

C ; Effects of pH on the enzyme stability. The enzyme in 100mM GTA buffer of various pH was incubated at 37 °C for 2 hours, and the remaining activity was assayed. The results were depicted with residual activity (%) on the vertical axis.

D ; Effects of temperature on the enzyme stability. The enzyme in 50mM sodium citrate buffer (pH 6.0) was incubated at various temperatures for 30min, and the remaining activity was assayed. The results were depicted with relative activity (%) on the vertical axis.

度は、それぞれ PC に対して 1/44 , 1/112 であり、ほとんど基質とならないと考えられる。PC, PE がともに良い基質であることは、実用上の反応原料として高価な卵黄レシチンだけでなく大豆レシチンを使用する上で有利な条件である。

2-2-b. *S. antibioticus* S-170 が生産する phospholipase D の精製とその性質⁽²³⁾

培養条件の検討

S. antibioticus S-170 の PLD は、微生物スクリーニングに使用した培地 C を用いて大量培養すると、その後の酵素精製が著しく困難であった。そこで *S. lydicus* D-121 と同様に、タンパク質含有量のできるだけ少ない培地と、培養物中の酵素活性 (unit/ml) と比活性 (unit/mg protein) が高くなるような条件を検討することにした。*S. antibioticus* S-170 も YD 培地中で良好に生育するが、これに pH 7.0 で沈殿除去処理した CSL を添加すると、培養物中の酵素活性が上昇することも *S. lydicus* D-121 と同様であった。予備的検討から *S. lydicus* D-121 の場合よりも精製が困難であると考えられたので、さらに培地中のタンパク質量を減らすために、合成培地である Krinsky 培地 (glucose 1%, asparagine 0.05%, K_2HPO_4 0.05%) の使用を検討した。Krinsky 培地に酵母エキス (0.5% または 0.7%) および前処理 CSL (1% または 2%) を加えて培養したところ、Krinsky 培地に酵母エキス 0.7%、前処理 CSL 1% を加えた培地 (KYC 培地) を用いると、酵素生産性は培地 C に劣らず、タンパク質量は培地 C の約 1/3 に抑えることができた。培養日数は酵素生産量が定常状態となる 3 日とした。

酵素の精製

酵素精製に一般的に用いられる各種の精製単位操作について予備的な検討を行った結果ヒドロキシアパタイトを用いる吸着クロマトは比活性上昇に無効であったが、硫酸アンモニウムによる塩析、Butyl-Toyopearl 650M を用いる疎水性クロマト、CM-Toyopearl 650M

による吸着・脱離操作, DEAE-Toyopearl 650M による陰イオン交換クロマト, クロマトフォーカシング, Toyopearl HW55F によるゲル濾過は比活性上昇に有効で活性回収率も良好であった。従って以下の操作で精製を行った。

KYC 培地 6000ml に前培養液を接種し, 28℃で72時間振とう培養した。菌塊を濾別した後, 培養濾液を遠心分離 (8000rpm, 20分間, 4℃) した上清 5600ml の pH を 7.0 に調整した。これに硫酸アンモニウムを 85%飽和濃度になるように加え, 4℃で1夜放置した。沈殿物を遠心分離して回収し, 10mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶かし, 同じ緩衝液で透析して硫酸アンモニウムを除いた。この透析した粗酵素溶液 (600ml) に, 予め 10mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した CM-Toyopearl 650M を 60g 加え, 2時間攪拌し活性を完全に吸着させた。この時, *S. lydicus* D-121 の場合と同じ pH 4.0 で吸着させると失活と思われる回収率の低下が起こる。CM-Toyopearl 650M を遠心分離して集め, 10mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で洗浄した後, 10mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に溶かした 500mM の塩化ナトリウム水溶液を用いて活性を溶出, 回収した。この酵素液に硫酸アンモニウムを 25%飽和濃度になるように加え, 予め 25%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Butyl-Toyopearl 650M のカラムに負荷した。20mM Tris-HCl 緩衝液中の硫酸アンモニウム濃度を段階的に減らして溶出を続けると, 硫酸アンモニウム濃度 0% の画分に活性が溶出した。限外濾過により活性画分の緩衝液を 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に置換し, 同じ緩衝液で予め平衡化した DEAE-Toyopearl 650M のカラム (2.6cm × 20cm) に負荷した。同じ緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.3M まで上昇させる直線濃度勾配溶出を行った。活性画分を集め限外濾過により濃縮し, 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Toyopearl HW 55F のカラム (2.6cm × 70cm) でゲル濾過を行った。活性画分を集め, 25mM imidazole-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で透析を行った。透析した酵素溶液を, 同じ緩衝液で平衡化した PBE-94 のカラム (1.0cm × 20cm) に負荷し, 9倍に希釈した Polybuffer 74 (pH 5.0) を通液してクロマトフォーカシングを行った。最後に再び Toyopearl HW 55F のカラムでゲル濾過を行って Polybuffer

を除去した。活性は単一ピークとして溶出した。以上の精製操作の結果を Table V に示す。本酵素は, 最終的に比活性 1437unit/mg にまで精製された。*S. lydicus* D-121 の PLD (2390unit/ml) には及ばなかったものの, *Streptoverticillium hachijoense* の PLD⁽¹⁵⁾ (631unit/ml) や, *S. chromofuscus* の PLD (152unit/mg)⁽³⁾ よりも高く, 精製単離操作の組み合わせが適切であったと思われる。

精製酵素による加水分解生成物の確認

S. lydicus D-121 の PLD と同様, 精製された酵素が PLD であることの確認試験を行った。PLD 活性測定法の条件下に PC を完全に加水分解し, 反応溶液をジエチルエーテルで抽出した。抽出物を TLC で分析すると PA のみが検出され, ジグリセライドは認められなかった抽出後の水相の TLC⁽⁶⁾ では, Dragendorff 試薬陽性の単一スポットが認められ, これは choline 標品と Rf 値が一致した。またこの水相を, ホスファチジル基転移反応測定法中のリン定量法に従って分析した結果, リンは検出されなかった。以上から, 生成された酵素は定義の通り PLD であることが確認された。

分子量および等電点

精製された PLD は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上, 単一のバンドを与え, その分子量は 64,000 であった。等電点は約 pH 6.5 であった。

酵素活性と安定性に対する pH と温度の影響

結果を Fig. 3 に示す。至適 pH は約 5.5, 至適温度は 60℃であった。安定な pH 域は, 37℃で2時間保温した場合, pH 4~8 であり, 安定温度域は, pH 5.5 で30分間加熱した場合 50℃以下であった。

Table V. Purification of Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus* S-170

Steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	yield (%)
Culture supernatant	1715	19,200	11.2	100
Salting out	1556	17,514	11.3	91
CM-Toyopearl 650M	652.7	15,119	23.2	79
Butyl-Toyopearl 650M	126.1	12,549	99.5	65
DEAE-Toyopearl 650M	10.4	10,290	986.6	54
Toyopearl HW55F	9.0	9981	1107.8	52
Chromatofocusing	5.2	7486	1436.8	39

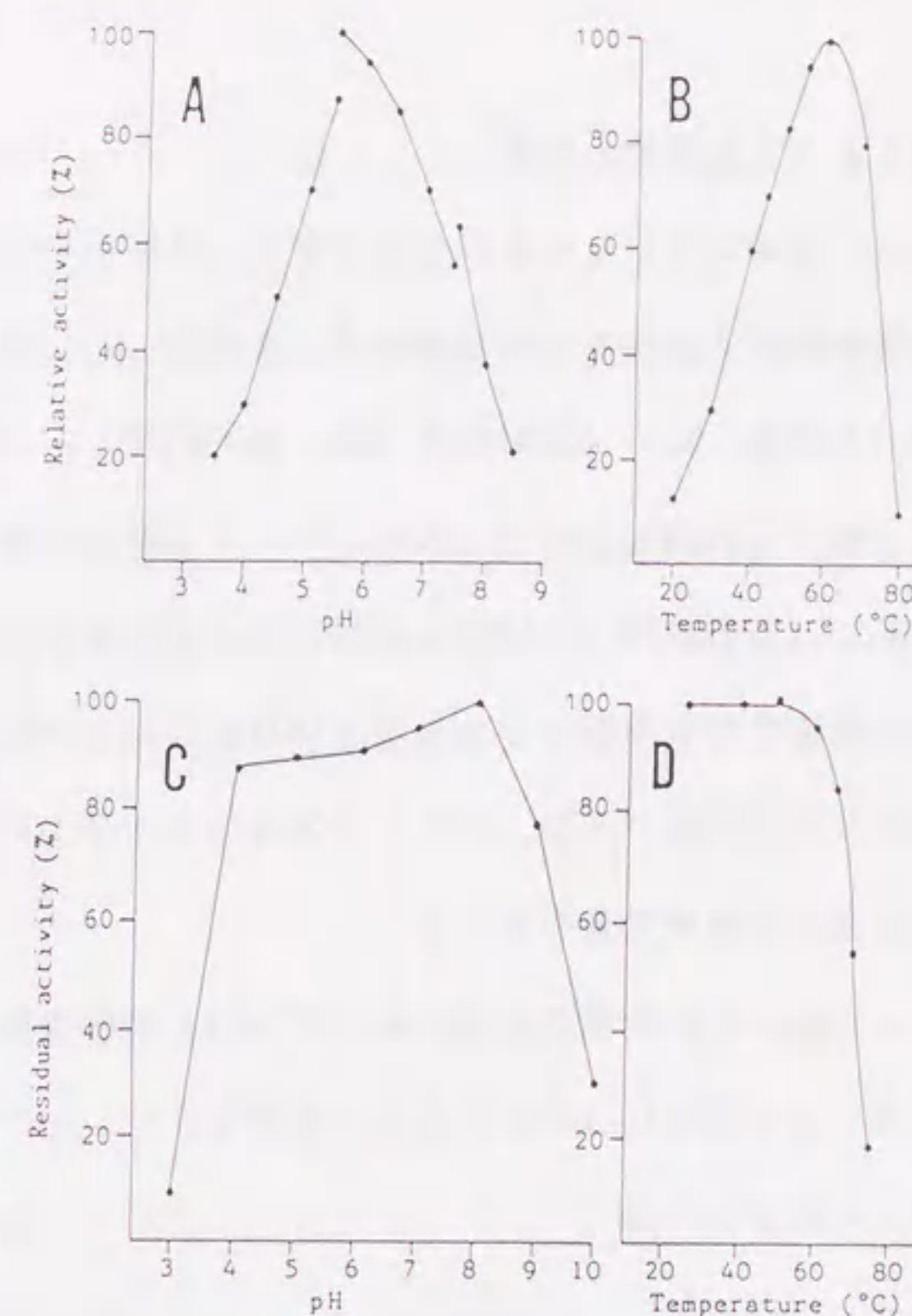


Fig. 3. Effects of pH and Temperature on the Activity and Stability of PLD from *Streptomyces antibioticus* S-170

A : Effects of pH on the enzyme activity. The enzyme reaction was done at various pH in 100mM acetate buffer (pH 3.6~5.5), 100mM Tris-maleate buffer (pH 5.5 ~7.5), 100mM Tris-HCl buffer (pH 7.5 ~8.5), and 100mM KCl-borate buffer (pH 8.5~10). The other conditions were the same as the PLD activity assay. The results were depicted with relative activity (%) on the vertical axis.

B : Effects of temperature on the enzyme activity. The enzyme reaction was done at various temperatures. The other conditions were the same as the PLD activity assay. The results were depicted with relative activity (%) on the vertical axis.

C : Effects of pH on the enzyme stability. The enzyme in 100mM GTA buffer of various pH was incubated at 37 °C for 2 hours, and the remaining activity was assayed. The results were depicted with residual activity (%) on the vertical axis.

D : Effects of temperature on the enzyme stability. The enzyme in 50mM Tris-maleate buffer (pH 5.5) was incubated at various temperatures for 30min, and the remaining activity was assayed. The results were depicted with relative activity (%) on the vertical axis.

酵素活性に対する各種の金属イオンと化合物の影響

PLD 活性測定法においてCaCl₂ 溶液の代わりに各種の化合物を、反応系中の濃度が 1mM となるように加え、無添加の場合に対する比率（相対活性 %）を測定した。各種金属塩を加えて金属イオンの影響を調べた結果、Na⁺（相対活性 98%，以下同様）、K⁺（99%）、Ca⁺⁺（102%）、Mg⁺⁺（98%）、Ba⁺⁺（105%）、Fe⁺⁺（96%）、Mn⁺⁺（109%）、Cu⁺⁺（76%）、Co⁺⁺（100%）、Zn⁺⁺（94%）、Sn⁺⁺（83%）、Fe⁺⁺⁺（94%）、Al⁺⁺⁺（106%）となり、その効果は小さかった。EDTA および界面活性剤の影響については、EDTA（99%）、sodium cholate（97%）および sodium deoxycholate（95%）であり、これらの効果は小さかったが、cetylpyridinium chloride（74%）は部分的阻害効果を示した。

S. lydicus D-121の PLD と同様、PLD 活性測定法においてCaCl₂ 溶液を反応系中に加える必要はないことが判明した。また同様に EDTA が活性に影響しないことから、活性発現にその他の金属も要求しないと推定される。

基質特異性

S. lydicus D-121の PLD の場合と同様に、PC、PE、LPC、SPH を用いて基質特異性を調べた。PE は PC と同程度の速さで加水分解されて PA を生じた。LPC と SPH の加水分解速度は、それぞれ PC に対して約 1/50、1/100 であり、ほとんど基質とならないと考えられる。PC、PE がともに良い基質であることは、実用上の反応原料として高価な卵黄レシチンだけでなく大豆レシチンを使用する上で有利な条件である。

第3章 *S. lydicus* と *S. antibioticus* の phospholipase D のホスファチジル 基転移反応に関する諸性質

第1章、第2章でホスファチジル基転移反応の合成的応用に用いる PLD のスクリーニング、精製法と諸性質について述べた。次に、使用する PLD のホスファチジル基転移反応に関する幾つかの基礎的知見を得ることを目的として、以下の実験を行った。

3-1. 実験方法

3-1-a. 試薬

キャベツの PLD および *S. chromofuscus* の PLD は Sigma Chemical 社の製品を使用した。*Streptoverticillium hachijoense* の PLD は第1章で調製したものを使用した。大豆製 PC と PE（純度 99%）は(株)ホーネンコーポレーションから購入した。

3-1-b. ホスファチジル基転移反応によるPEからPCへの変換反応

[反応条件]

PLD	(*)
PE (from soybean, purity 99%)	1 μ mol
buffer(**)	0.20ml
choline chloride	400 μ mol
water	0.76ml
diethylether	0.50ml

* PLD 量, ** pH ; 3-2 以下の各実験の項目で述べる。

反応終了後、ジエチルエーテル・エタノール混液 (4:1) を加えて上層に抽出された脂質を回収し、前記 1-1-d. 項のホスファチジル基転移活性測定法に準じて反応生成物のリン脂質組成を分析した。

3-1-c. 転移反応のアクセプターに関する特異性

精製した酵素 5unit に、酵素の至適 pH に調製した 0.2M 緩衝液 500 μ l, ジエチルエーテル 500 μ l, 基質 PC 6.4 μ mol, アクセプター化合物 1.28mmol を加え、室温で 1 時間反応させ、反応液を TLC で観察した。緩衝液の pH は各 PLD の至適 pH とした。

TLC conditions: TLC plate, Silica gel (Merck Art 5553)

developing solvent, chloroform/methanol/acetic acid/water
= 85/12.5/12.5/3

detection, Dittmer reagent and 50% sulfuric acid

3-1-d. その他

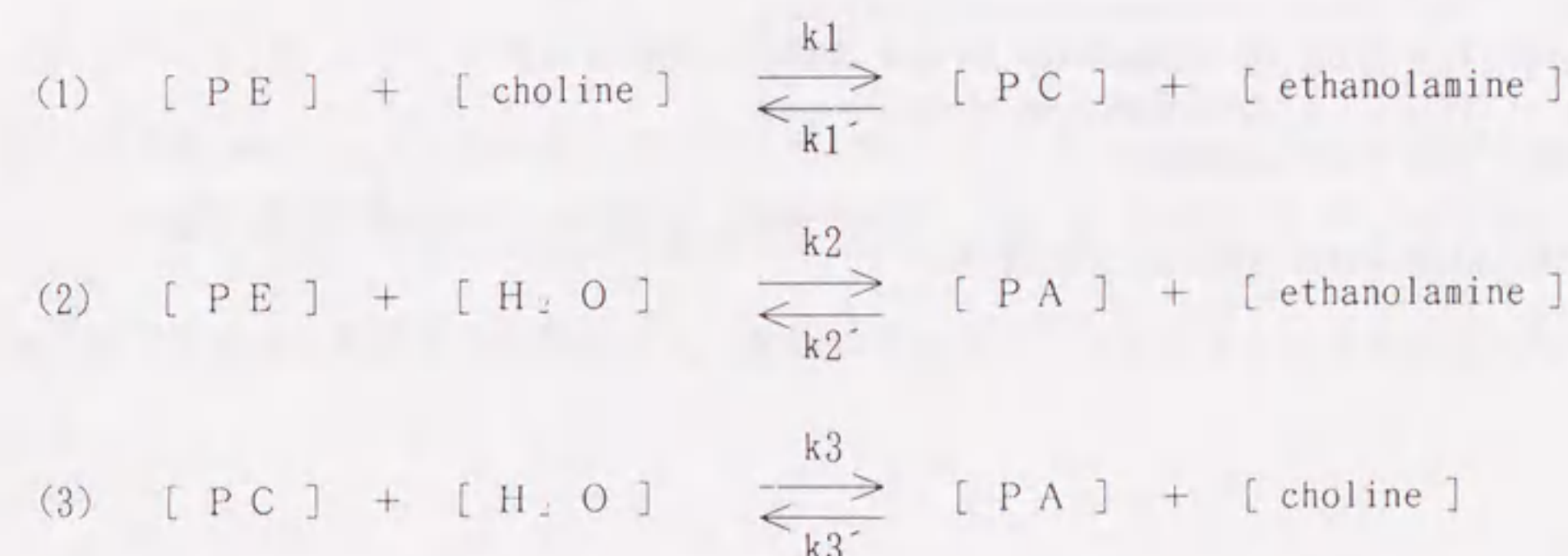
リン脂質組成分析、ホスファチジル基転移活性測定は既に述べた方法で行い、PLD 活性測定は前章に記載した改良法を用いた。

3-2. 結果と考察

3-2-a. Phospholipase D の加水分解活性とホスファチジル基転移活性の関係

キャベツ, *S. lydicus*, *S. antibioticus*, *Streptoverticillium hachijoense* および *S. chromofuscus* に由来する PLD を用いて、加水分解活性とホスファチジル基転移活性の関係について簡単な検討を行った。PE のホスファチジル基をグリセロールに転移させる反応、すなわち PE を PG に変換する反応の結果は、既に第 1 章 Table III に記載したので、ここでは PE を PC に変換する反応について述べる。3-1-b. 項の条件において、PLD 量を 3unit, 反応液の pH を 6.0 としたときの反応中の状態を、定性的に TLC 図として Fig. 4 に示す。キャベツおよび *Streptoverticillium hachijoense* の PLD は転移反応生成物である PC も生成したが、加水分解生成物である PA がかなり生成していることがわかる。

S. chromofuscus の場合は、PC が生成せず PA のみが検出された。これに対して、*S. lydicus*, *S. antibioticus* の PLD では見掛け上、転移反応だけが進行した。PC は PLD の良い基質であり、速やかに加水分解されて PA を生成するはずである。*S. lydicus*, *S. antibioticus* の PLD の場合に PA が生成しない理由は、概念的には



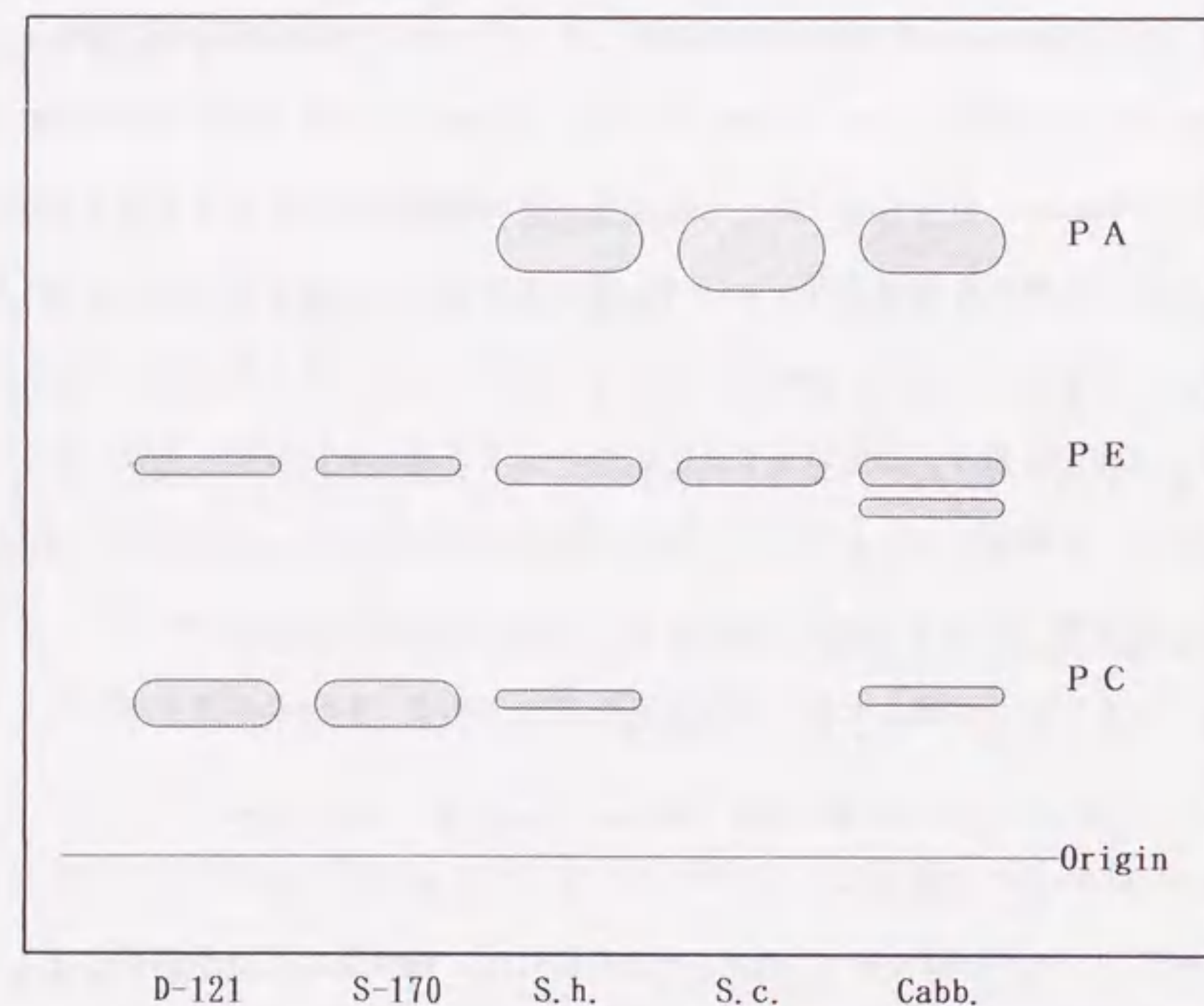


Fig. 4. Comparison of Some PLDs in Transphosphatidyl transfer Reaction from PE to PC by TLC

D-121; PLD from *Streptomyces lydicus*.

S-170; PLD from *Streptomyces antibioticus*.

S. h.; PLD from *Streptomyces hachijoense*.

S. c.; PLD from *Streptomyces chromofuscus*.

Cabb.; PLD from cabbage.

TLC was done on silicagel plate. Developing solvent; chloroform-methanol-acetic acid-water=85:12.5:12.5:3.

(1) 式で PE に対する転移反応のアクセプターとして反応系に加えた choline が, (3) 式において PC 加水分解の逆反応速度を増大させ, 見掛け上転移反応生成物 PC の加水分解を抑制することによって考えられる. 他の PLD の場合に PA 生成量が多いことの理由としては, *S. antibioticus* や *S. lydicus* の PLD に比較して (a) k_1/k_1' が小さい, (b) k_2/k_2' が大きい, (c) k_3/k_3' が大きい, 等の理由が考えられる. 加水分解反応と転移反応とで酵素の活性点が異なり, かつ *S. chromofuscus* の PLD は転移反応の活性点を持たないと仮定することも可能ではあるが, その場合, コリンと水は1つの活性点に関して競合しないことになり, (3) 式に矛盾するのでその可能性は小さい. 従って加水分解反応と転移反応とで酵素の活性点は同じであり, 水は転移反応アクセプターの1つであると考えられる.

次に *S. lydicus* と *S. antibioticus* の PLD について, 転移活性と加水分解活性の相関を調べた. ホスファチジル基転移活性測定法 (PC→PG変換) において酵素量を 2.0, 3.0, 4.0 unit/ml とした時の結果を Fig. 5 に示す. それぞれのプロットは接近しており, 単位酵素量あたりの転移活性という点で, これらの PLD は似た性質を有している.

3-2-b. ホスファチジル基転移反応の至適 pH⁽²³⁾

S. lydicus と *S. antibioticus* の PLD について, 各酵素 1 unit を使用し反応系の pH を変えて PE → PC 変換反応を行った結果を Fig. 6 に示す. ホスファチジル基転移反応の至適 pH は, *S. lydicus* の PLD が pH 6.0, *S. antibioticus* の PLD が pH 5.5 で, それぞれ, それらの加水分解反応における至適 pH と一致した. このことは, 前項で述べた加水分解反応と転移反応とで酵素の活性点が同じであるという推定を支持している.

3-2-c. 有機溶媒の種類がホスファチジル基転移反応に与える影響

ホスファチジル基転移反応は, 親油性に修飾した PLD でなく, そのままの酵素を使用

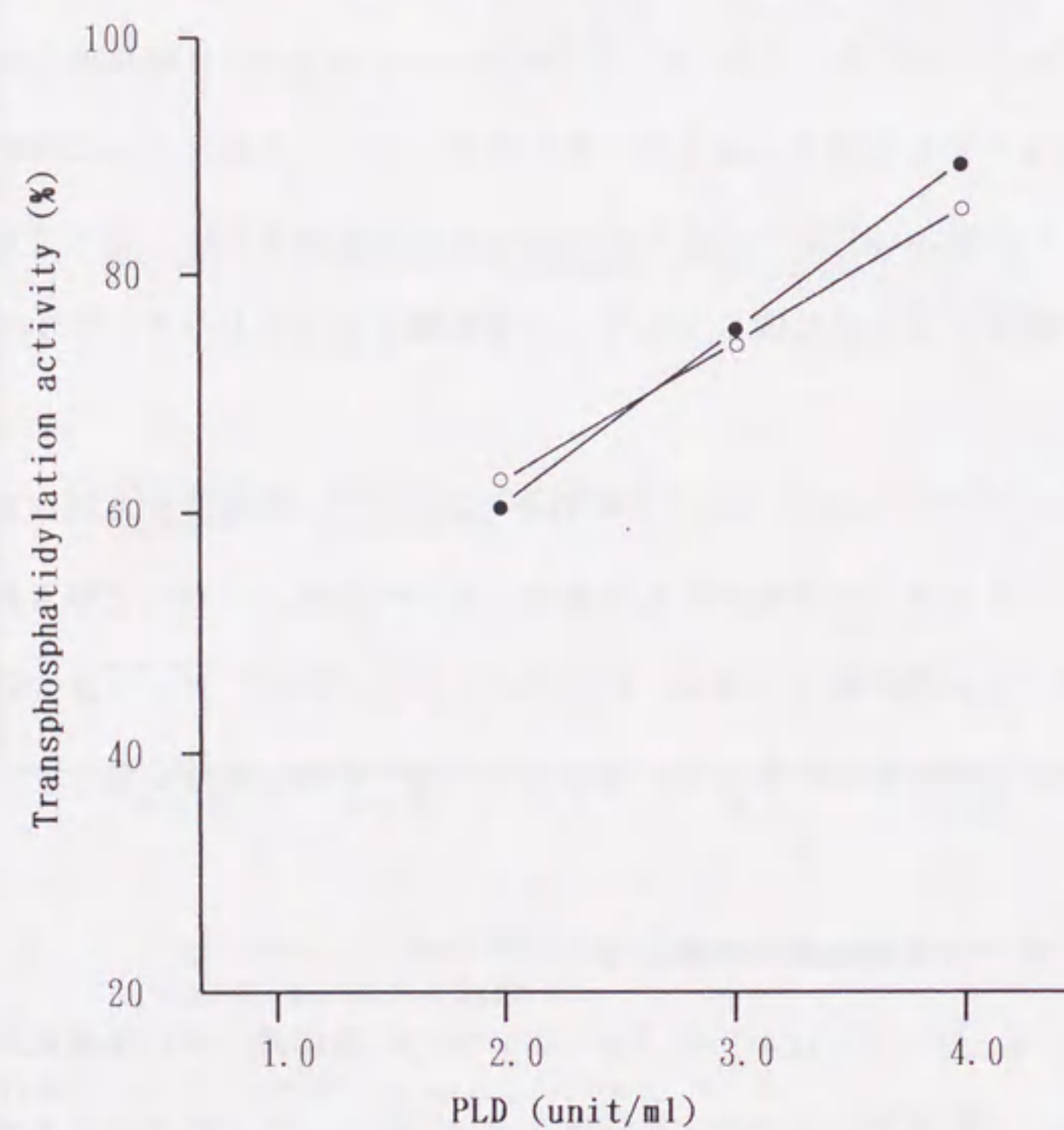


Fig. 5. Relation between PLD Activity and Transphosphatidyl Activity of the PLDs from *S. lydicus* and *S. antibioticus*
 ● ; PLD from *S. antibioticus*. ○ ; PLD from *S. lydicus*.

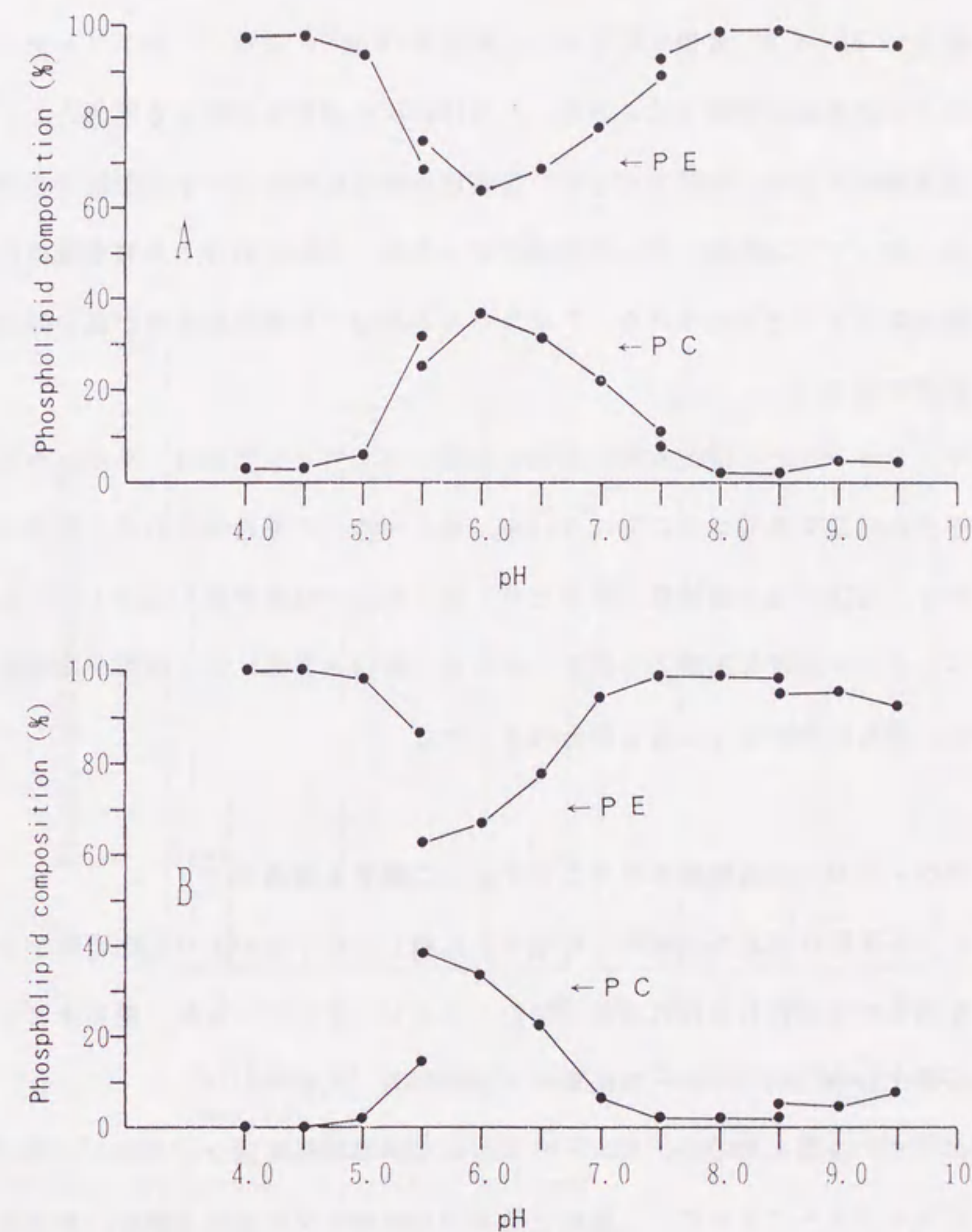


Fig. 6. Transphosphatidyl Reaction Profile of the PLDs at different pH values

A ; PLD from *Streptomyces lydicus*. B ; PLD from *Streptomyces antibioticus*.

する限りにおいては基質のリン脂質が有機溶媒可溶性であるため、二相反応系となる。

S. lydicus の PLD について、前記 3-2-a. 項と同じ反応条件下に、反応系の有機溶媒の種類を変えて PE → PC 変換反応を行った結果を Fig. 7 に示す。ホスファチジル基転移反応は水／有機溶媒の界面で起こるが、この時に反応速度を支配する要因として、界面における基質濃度がある。基質であるリン脂質は両親媒性であるが水に難溶で有機溶媒によく溶ける。従ってリン脂質に対して良溶媒である程、界面における基質濃度は低くなり、反応速度は低下すると考えられる。クロロホルムを用いた場合に収率が低い理由は、このように解釈できる。

ヘキサンやベンゼンなどの炭化水素系無極性溶媒に対してリン脂質は、クロロホルムのように単分子分散状態で溶解するのではないが、逆ミセル状の集合体を形成して溶けると考えられており、見掛け上は良溶媒であるため、同じ理由で収率が低くなると思われる。

ジェチルエーテルが適度な溶解力を持ち、かつ水／溶媒の界面にリン脂質が高密度に配列するために、最も収率が高くなるものと考えられる。

3-2-d. ホスファチジル基転移反応のアクセプターに関する特異性⁽²³⁾

ホスファチジル基転移反応を合成的に応用するに際しては、どのような化合物がアクセプターになり得るかを検討しなければならない。エチレングリコール類、糖およびその誘導体などの各種化合物について調べた結果を Table VI に示す。

エチレングリコール類とそのメチルエーテル、および単糖類は完全にホスファチジル化され、良いアクセプターであった。二糖類と糖アルコールの反応速度は遅く、加水分解産物である PA の生成が見られた。糖誘導体については *S. lydicus* と *S. antibioticus* の PLD とで違いがあった。

Table VI には記載していないが、両 PLD とも一級水酸基にしかホスファチジル基転移を行わず、また retinol など水に不溶の高級アルコールもアクセプターにならなかった。二級および三級水酸基を持つ化合物がアクセプターにならない理由は不明であるが、高級

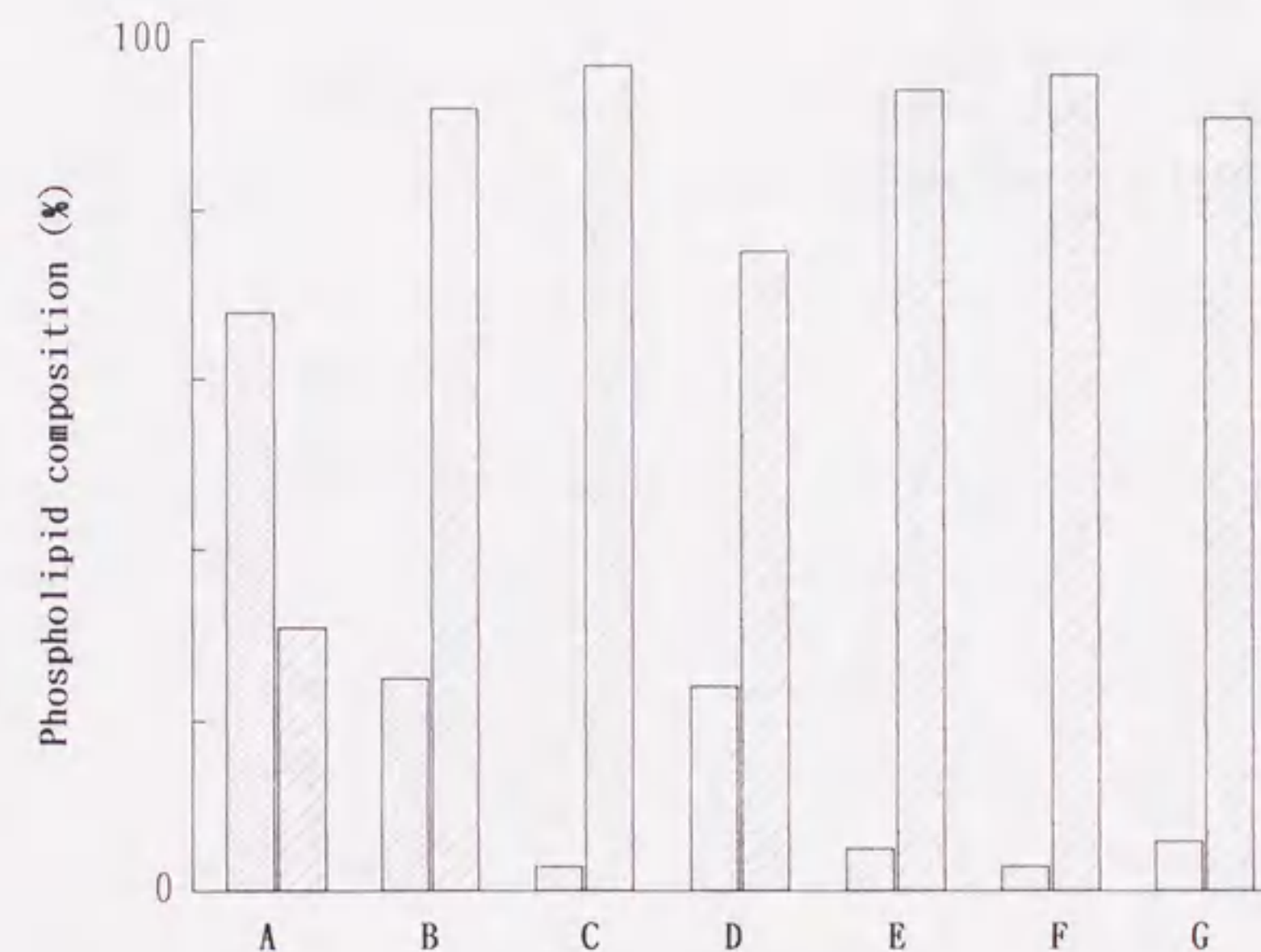


Fig. 7. Influence of Organic Solvent on Transphosphatidyl Reaction

A; diethyl ether. B; diisopropyl ether. C; chloroform. D; ethyl acetate. E; benzene. F; hexane. G; without solvent.

; resulting PC. //; residual PE.

Table VI. Influence of the Type of Acceptor Compound on Transphosphatidylatation Reaction

Compound	Reactability *	
	D-121 **	S-170 ***
Ethyleneglycol	++	++
Diethyleneglycol	++	++
Triethyleneglycol	++	++
Ethyleneglycol monomethylether	++	++
Diethyleneglycol monomethylether	++	++
Triethyleneglycol monomethylether	++	++
D-Glucose	++	++
D-Galactose	++	++
D-Mannose	++	++
D-Fructose	++	++
D-Xylose	++	++
D-Arabinose	++	++
L-Sorbose	++	++
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
D-Sorbitol	+	+
D-Mannitol	+	+
D-Galactosamine	+	-
N-Acetyl-D-galactosamine	+	-
D-Galacturonic acid	-	-
Kojic acid	+	+

* ++; the acceptor was almost completely phosphatidylated. +; the reaction was slow and a small amount of phosphatidic acid was formed as a by-product. -; the compound was unreactive.

** D-121; PLD from *Streptomyces lydicus*.

*** S-170; PLD from *Streptomyces antibioticus*.

アルコールの場合は、水に不溶であるため界面に存在しないからであると考えられる。

これらの化合物のうち、エチレングリコール類、糖、kojic acidのホスファチジル化物の合成とその機能については、第2編において述べる。

第2編 ホスファチジル基転移反応の応用

要旨

第1編において、ホスファチジル基転移反応の良いアクセプターであることが確かめられた化合物について反応を行い、その性質を検討した。

糖や ethyleneglycol 類のホスファチジル化物は高い両親媒性を持つことが予想されたので、その乳化特性をその他のリン脂質と比較した。合成したものは、phosphatidyl-ethyleneglycol, phosphatidyl-diethyleneglycol, phosphatidyl-triethyleneglycol, 6-phosphatidylglucose, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, および phosphatidylserine である。

各種溶媒に対する溶解性は、全試料ともクロロホルムに可溶、水および大豆白絞油に不溶であった。ケロシンには、phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, 6-phosphatidylglucose が不溶であった。

各試料のエマルションの乳化型は、phosphatidylserine 1.0% 濃度のとき W/O 型であったが、他はすべて O/W 型であった。

静置法によるエマルションの安定性は、phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyl-diethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol, 6-phosphatidylglucose, phosphatidylglycerol および phosphatidylserine のエマルションが、天然物である phosphatidylcholine の場合に比較して分離率、分離速度ともに小さく、安定であった。

遠心分離法によるエマルションの安定性は、phosphatidylserine の場合を除き、リン脂質誘導体濃度の影響を受けにくかった。また phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol および phosphatidylglucose の油層分離率が低く、安定であった。

界面張力は、各試料とも時間の経過に従い徐々に低下し、phosphatidyl-diethylenegly-

col, phosphatidyltriethyleneglycol および 6-phosphatidylglucose が比較的低い値を示した。

酵素阻害など生理活性を持つ化合物のホスファチジル化の例として、kajic acid をアクセプターとする反応を行った。

合成した 7-phosphahtidyl kajic acid はミトコンドリア膜を膨潤させ、生体膜に親和性を持つことが示された。そこで 7-phosphahtidyl kajic acid の抗菌試験を行ったところ、*Escherichia coli* に対して kajic acid よりも強い抗菌性を示した。

Kajic acid は tyrosinase を阻害するが、7-phosphahtidyl kajic acid も阻害活性を保持していた。Kajic acid の tyrosinase 阻害は、酵素活性部位の銅とのキレーションによるものとされることから、7-phosphahtidyl kajic acid は油脂の酸化を促進する微量金属に対して不活化する作用を持つと考え、酸化試験を行ったところ、長鎖脂肪酸のホスファチジル基を持つ 7-phosphahtidyl kajic acid は抗酸化性を示した。

第1章 ホスファチジル基転移反応によるリン脂質型乳化剤の合成とその性質

第1編・第3章において、エチレングリコール類や単糖類が、ホスファチジル基転移反応の良いアクセプターであることを示した。これらは親水性の強い化合物であり、従ってそのホスファチジル化物は高い両親媒性を持つと考えられた。両親媒性であることは、乳化剤としての必要条件である。本章では、PCを基質に用いたホスファチジル基転移反応の応用として、phosphatidylethylene glycol (PEG), phosphatidyl diethylene glycol (P2EG), phosphatidyl triethylene glycol (P3EG) および 6-phosphatidyl glucose (PGlc) を合成し、それらの乳化特性について検討した結果を述べる⁽²⁴⁾。対照物質としては、基質に用いた PC, および PC から同じくホスファチジル基転移反応により合成した phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidyl glycerol (PG), phosphatidyl serine (PS) を使用した。

1-1. 実験方法

1-1-a. 試薬

実験に使用した PLD は、本論文の第1編で述べた放線菌 *S. lydicus* D-121 株または *S. antibioticus* s-170 株が生産する、強いホスファチジル基転移活性を有する酵素（以下、PLD-170 および PLD-121 とする）である。カラムクロマト用シリカゲルは Merck 社製 silica gel 60 を、大豆 PC はホーネンコーポレーション製（純度95%以上）を、合成物の同定に用いた PE, PG および PS の標品は Sigma Chemical 社のものを、その他の試薬は市販特級品を使用した。

1-1-b. 各種溶媒に対する溶解性試験

水、エタノール、クロロホルム、*n*-ヘキサン、ケロシン、および大豆白絞油、各 3g に対して、PC, PE, および合成したリン脂質誘導体を 0.5%(W/W)添加し、(a) タッチミキサーによる攪拌 2分間、(b) 45℃で30分間加温した後、タッチミキサーによる攪拌 2分間、(c) 超音波洗浄機 (BRANSONIC B-220)による超音波処理10分間、の3方法により、その溶解性を検討した。

1-1-c. リン脂質誘導体のケロシンへの分散方法

[PC, PG, PEG, P2EG, P3EG の場合]

0.02g, 0.06g, 0.10g の試料を標本管（内径 2.8cm, 長さ 7cm）に秤量し、乳化後にエマルジョン中の PC およびリン脂質誘導体濃度が 0.2, 0.6, 1.0%(W/W)となるように、これにそれぞれケロシン 4.99g, 4.97g, 4.95g を加え、30~60分間超音波処理後、タッチミキサーを用いて攪拌することによりケロシンに分散させた。

[PE, PS, PGlcの場合]

PEおよびこれらのリン脂質誘導体は、直接ケロシンに溶解しないので、まずクロロホルムに溶解してからケロシンを加え、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを減圧除去することによりケロシンに分散させた。

1-1-d. 乳化方法

山野らの方法⁽²⁹⁾を改良して行った。すなわち、水とケロシンの重量比が 1:1になるように標本管に秤量し、25℃に加温した後に、ULTA TURRAX TP 18/2N 型高性能ディスペーサー (IKA-WERK K.K.)により15000rpmで乳化を行った。

1-1-e. 乳化型の決定

水およびケロシンによる溶媒希釈法⁽⁷⁾によった。すなわち水で希釈できるエマルジョンをO/W型、ケロシンで希釈できるエマルジョンをW/O型とした。

1-1-f. 静置法による相分離測定

O/W型エマルジョンは、クリーミングが起これると濃縮のために水相が分離し、さらに凝集、合一、破壊へと進むと油相が分離する。前述の方法により、1分間乳化を行った全量10gのエマルジョンを標本管（内径0.8cm、長さ5cm）に移して密封した後、25℃の恒温槽中で静置し、30分毎に3時間までと、24時間後に、分離した水相および分離した油相の高さを測定し、その分離率を次式により求めた。

$$\text{水相（油相）分離率} = \{ \text{分離水相（油相）の高さ} / \text{全相の高さ} \} \times 100 \%$$

この値により、クリーミングおよび破壊の程度を評価した。

1-1-g. 遠心分離法による油相分離測定

前述の方法により2分間乳化を行った全量30gのエマルジョンを、あらかじめ重量を測定した遠沈管（内径2.5cm、長さ9cm）に深さ7cmまで入れ、重量を測定し、これを3000G、25℃の条件下に30分間遠心分離を行い、次式により油相分離率を求めた。

$$\text{油相分離率} = (\text{分離した油相の重量} / \text{全相の重量}) \times 100 \%$$

この値を機械的な力による界面膜破壊に対する粒子の安定性の指標とした。

1-1-h. 界面張力の測定

Wilhelmy 平板法である CBVP 式界面張力計（協和科学社製、A3 型）を用いて測定した。界面張力測定用ビーカー（内径 5cm、高さ 5cm）に、水 20 ml とリン脂質誘導体試料 0.0002%(W/W) を含むケロシン 60 ml を入れ、ガラスプレートにより 25℃ で 24 時間、界面張力の経時変化を測定した。

1-2. 結果と考察

1-2-a. リン脂質誘導体の合成

以下に述べる各化合物の合成条件（基質対アクセプター比、溶媒量、PLDの種類など）は予備試験を行って決定した。

*ホスファチジルエチレングリコール (phosphatidylethylene glycol, PEG)

合成：大豆製 PC 8g, ジエチルエーテル 280ml, ethyleneglycol 144ml, 0.4M Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.0) 56ml, PLD-121 3200unit, 水（イオン交換水、以下同様）80 mlを混合し、室温で攪拌しながら20時間反応させた。エーテル層を回収し、さらに水層をエーテル抽出した。エーテル層を合し、飽和食塩水で洗浄後、濃縮乾固した。この濃縮物を300mlのクロロホルムに溶かし、メタノール 300mlと水 270mlを加えて分配した後、クロロホルム層を濃縮乾固した。シリカゲル 220g をメタノールで 5回、クロロホルムで数回、デカンテーションして浮遊微粒子を除去し、スラリーをガラス製クロマト管（4.0cm × 50cm）に充填してカラムを作製した。粗反応生成物を少量のクロロホルムに溶かしてカラムに負荷し、クロロホルムで溶出を開始した。クロロホルム・メタノール系溶媒で段階溶出を行い、TLC で溶出液を観察しながら Dittmer試薬陽性の主生成物フラクションを集めた。精製物の収量は、6.02g であった。

確認：精製された反応生成物を、PLD-121 を用い PLD 活性測定法の条件下で加水分解した。加水分解液をジエチルエーテル抽出し二次元 TLC で分析した。脂溶性分解物は PA であった。抽出残液を煮沸後、濾過し、濾液を濃縮乾燥した。これを常法に従い無水酢酸・ピリジン混液でアセチル化した。試薬の ethyleneglycol を同様にアセチル化して得た ethyleneglycol diacetate を標品としてガスクロマト分析を行い、保持時間が一致したことから水溶性分解物は ethyleneglycol であると確認された。さらに精製反応生成

物そのものを無水酢酸・ピリジン混液でアセチル化したところ、TLC 分析で、より大きな Rf値を示す化合物に変化した。これは ethyleneglycol の水酸基の1つが遊離のままであること、すなわち前項で得た反応生成物が diphosphatidylethylene glycol ではないことを示している。以上の結果から得られた化合物は PEG であると確認された。

定量：第1部 1-1-c. 項の方法に従い、試料のリン脂質組成を測定した。常法により試料の脂肪酸組成を分析して平均分子量を算出し、PEG に由来するリン量に乗じて重量 % とした。その結果、合成した PEG の純度は 97.3% (W/W)であった。以下に述べる各物質についても純度は同じ方法で算出した。

*ホスファチジルジエチレングリコール (phosphatidyl diethylene glycol, P2EG)

合成：大豆製 PC 10g, ジエチルエーテル 400ml, diethyleneglycol 306ml, 0.4M Tris-maleate緩衝液 (pH 6.0) 80ml, PLD-121 (4000unit), 水 14 mlを混合し、攪拌しながら室温で20時間反応させた。以下、PEG の場合と同様の操作により、最終精製物 3.81g を得た。

確認と定量：PEG の場合と同じ方法により、反応生成物が P2EG であることを確認した。純度は 97.5% (W/W)であった。

*ホスファチジルトリエチレングリコール (phosphatidyl triethylene glycol, P3EG)

合成：大豆製 PC 10g, ジエチルエーテル 1100 ml, triethyleneglycol 862 ml, 0.4M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 220 ml, PLD-170 (4000unit), 水 18 mlを混合し、攪拌しながら室温で 8時間反応させた。以下、PEG の場合と同様の操作により、最終精製物 3.50g を得た。

確認と定量：PEG の場合と同じ方法により、反応生成物が P3EG であることを確認した。純度は 96.1% (W/W)であった。

*ホスファチジルグルコース (phosphatidylglucose, PGlc)

合成： 大豆製 PC 10g, ジエチルエーテル 2000ml, glucose 1188g, 0.8M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 240ml, PLD-170 (4000unit), 水 1350ml を混合し, 室温で20時間反応させた. PEG の場合と同様に処理した粗反応生成物に対し, シリカゲルカラムクロマトを行った. 溶出は, (1) クロロホルム(100) / メタノール(10) / 酢酸(5) / 水(1.5), (2) クロロホルム(100) / メタノール(15) / 酢酸(5) / 水(2.5) の2段階溶出で行い, TLC で溶出液を観察しながら Dittmer試薬陽性の主生成物フラクションを集めた. 精製物の収量は 2.90g であった.

確認と定量： 得られた化合物を, PLD-170 を用い PLD 活性測定法の条件下で加水分解すると, 脂溶性分解物として PA が生成した. TLC のRf値, 高速液体クロマト分析の保持時間を比較した結果, 水溶性分解物は glucose に一致した. PLD-170 は2級水酸基にはホスファチジル基を転移しないことから, 得られた化合物は PGlc であることが確認された. 純度は96.1% (W/W) であった.

*ホスファチジルグリセロール (phosphatidylglycerol, PG)

合成： 大豆製 PC 10g, ジエチルエーテル 650ml, glycerol 478ml, 0.4M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 130ml, PLD-170 (4000unit), 水 42ml を混合し, 攪拌しながら室温で 8時間反応させた. 以下, PEG の場合と同様の操作により, 最終精製物3.02g を得た.

確認と定量： TLC により, 反応生成物は PG 標品と一致した. PLD-170 を用いて PLD 活性測定法の条件下で加水分解すると, 脂溶性分解物として PA が生成した. 水溶性分解物は, 無水酢酸・ピリジン混液でアセチル化物とした. このアセチル化物は赤外スペクトルとガスクロマト分析の保持時間を比較した結果, triacetin に一致した. 以上により, 得られた反応生成物は PG であることが確認された. 純度は 96.0% (W/W) であった.

*ホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS)

合成： 大豆製 PC 10g, ジエチルエーテル 800ml, 0.4M 酢酸-酢酸カルシウム緩衝液 (pH 5.6) 40ml, L-セリン 40g, PLD-170 (4000unit), 水 160mlを混合し, 攪拌しながら室温で 6時間反応させた. 予備試験の結果, 緩衝液にナトリウムではなくカルシウムを使用すると収率が高いことが判明した. これは酸性リン脂質である PS のカルシウム塩のジエチルエーテルに対する溶解度が著しく高く, そのため水と溶媒の界面における濃度が減少し反応系外に去ることによるものと考えられた. 反応液から水層を分け採り, クロロホルム 225mlとメタノール 225mlを加えて振とうし, クロロホルム層と反応液のエーテル層を合わせて濃縮乾固した. 抽出物をクロロホルム 300mlに溶解し, メタノール 300ml, 純水 70ml および 2N 硫酸 200mlを加え攪拌した後, クロロホルム層を回収した. このクロロホルム溶液を, クロロホルム (1) / メタノール (1) / 水 (0.9)混液の上層で2回洗浄し, 濃縮乾固した. これをクロロホルム 40ml に溶解し, 氷冷しながら 400mlの冷アセトンを徐々に加えた. 析出物を遠沈して回収し, 同じ操作を 4回繰り返した. 沈殿をクロロホルム 300mlに溶解し, メタノール 300mlと 0.4M 酢酸ナトリウム水溶液 270mlを加えて振とうした後, クロロホルム層を回収した. クロロホルム層を, クロロホルム (1) / メタノール (1) / 水 (0.9)混液の上層で 2回洗浄し, 濃縮乾固した. この濃縮物をクロロホルム 70ml に溶解し, 不溶物を遠心分離で除去した後, 約 2mlにまで濃縮した. 濃縮液に水 30ml を加え, 超音波処理して乳化させた後, 凍結乾燥した. 最終精製物は 5.60gであった.

確認と定量： TLC により, 反応生成物は PS 標品と一致した. PLD-170 を用いて PLD 活性測定法の条件下で加水分解すると, 脂溶性分解物として PA が生成した. 水溶性分解物は, 高速液体クロマト分析の結果, L-セリンであった. 以上により, 得られた反応生成物は PS であることが確認された. 純度は 99.1% (W/W) であった.

*ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine, PE)

合成：大豆製 PC 10g, ジエチルエーテル 800ml, 0.4M Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.0) 40 ml, ethanolamine hydrochloride 20g, PLD-121 (4000unit), 水 160mlを混合し攪拌しながら室温で 3時間反応させた。PS の場合と同様な抽出と洗浄操作を行った後、濃縮乾固した。濃縮物をクロロホルム 6mlとアセトン 18 mlの混液に溶解し、氷冷しながら冷アセトン 240mlを徐々に加え、析出物を遠沈して回収した。同じ操作を 4回繰り返した後、減圧下に乾燥した。最終精製物は 8.21gであった。

確認と定量：反応生成物はニンヒドリン反応陽性で、TLC により PE 標品と一致した。PLD-121 を用いて PLD 活性測定法の条件下で加水分解すると、脂溶性分解物として PA が生成した。以上により、得られた反応生成物は PE であることが確認された。純度は 98.5% (W/W) であった。

1-2-b. 各種溶媒に対する溶解性

溶解性試験の結果を Table VII に示す。PC, PG, P2EG, P3EG は疎水性溶媒 (n-ヘキサン, ケロシン) と親水性溶媒 (エタノール) の両方に溶解することから、高い両親媒性を持つと考えられる。PEG は親水性よりも親油性が高く、PE は親水性が優勢である。

1-2-c. エマルションの乳化型

溶媒希釈法により決定されたエマルションの乳化型は、PS の濃度 1.0% (W/W) の場合に W/O 型であったことを除き、すべて O/W 型であった。一般にエマルションの乳化型を決める因子の一つに溶媒に対する溶解性がある。すなわち油溶性乳化剤は W/O 型エマルションを、水溶性乳化剤は O/W 型エマルションを作りやすい^(11, 13)。PS を除く全リン脂質誘導体によるエマルションが O/W 型を示したことから、これらは親水性が高いものと考えられる。

この結果と溶解性試験の結果とを比較、考察すると、PC, PG, P2EG, P3EG は親油性、

Table VII. Solubility Test

Sample	Method*	Water	EtOH	Chl	Hexane	Kerosine	SBO
PC	A	×	○	○	○	○	×
	B	×	○	○	○	○	×
	C	×	○	○	○	○	×
PEG	A	×	×	○	○	○	×
	B	×	○	○	○	○	×
	C	×	×	○	○	○	×
P2EG	A	×	○	○	○	×	×
	B	×	○	○	○	○	×
	C	×	○	○	○	○	×
P3EG	A	×	○	○	○	○	×
	B	×	○	○	○	○	×
	C	×	○	○	○	○	×
PG1c	A	×	×	○	×	×	×
	B	×	×	○	×	×	×
	C	×	×	○	×	×	×
PG	A	×	×	○	○	○	×
	B	×	○	○	○	○	×
	C	×	○	○	○	○	×
PS	A	×	×	○	×	×	×
	B	×	×	○	×	×	×
	C	×	×	○	×	×	×
PE	A	×	○	○	×	×	×
	B	×	○	○	○	○	×
	C	×	○	○	×	×	×

○; soluble, ×; insoluble.

* A; mechanical shaking (2min).

B; heat (45°C, 30min) and mechanical shaking (2min).

C; ultrasonication (10min).

Abbreviations: EtOH; ethanol, Chl; chloroform, SBO; soybean oil.

親水性とも高く両親媒性を示すが、親水性の方が優勢であると考えられる。PE は溶解性試験の結果と一致して親水性が高い。PEG は乳化型の結果からは親水性が高いと考えられ、溶解性試験の結果と一致しなかった。乳化型には、界面活性物質の親水性、親油性のバランスだけでなく、くさびがた理論等、立体的な構造も影響する。今回の結果は、PEG の立体構造がO/W 型のエマルションを形成しやすいことを表していると考えられる。

PS の場合、濃度が高くなると乳化型が逆転したが、これは PS の会合状態に変化が生じることによると思われる。

1-2-d. エマルションの乳化安定性

* 静置法による相分離

PS を除く各リン脂質誘導体試料とも、エマルション中の濃度が相分離に与える影響は小さかった。

PC エマルションでは、水相、油相ともに分離は30分経過で既に一定の値を示した。水相分離率は PC 濃度が高いとわずかに低くなるものの 35 ~38% であり、油相分離率は約 54% と、高い値であった。これはクリーミングや凝集、合一の速度が大きいためと考えられる。

PE エマルションでは徐々に分離が進行し、いずれの PE 濃度でも 3時間経過後に水相分離率が約45%、油相分離率が約50% となった。24時間経過後も分離率はほとんど変化しなかったことから、3時間ではほぼ完全に分離したと考えられる。

PG エマルションは、各 PG 濃度においても水相は分離したが油相は全く分離しなかった。水相の分離は24時間経過まで徐々に進行し、24時間後に約26% になった。水相のみが分離するのは、クリーミングが生じ凝集は起きているかもしれないが、合一は起こらないことを示している。

PEG エマルションも PG と同様に油相は分離しなかった。水相の分離は24時間経過まで

徐々に進行し、24時間後に約22% になった。この場合もクリーミングが生じるが合一は起こらないことを示している。

P2EG エマルションでは、P2EG の濃度が 0.2, 0.6% (W/W)のときに水相、油相ともに分離したが、1.0% (W/W)では水相のみの分離がみられた。水相の分離に関しては P2EG の濃度による差はなく、24時間後で約31% であった。油相の分離は 0.2, 0.6% (W/W)で30分経過後に 2% で一定値となり、わずかに合一が起きた。

P3EG エマルションでは各 P3EG 濃度において水相のみが徐々に分離し、いずれも24時間経過後に約23% 分離した。PG, PEG の場合と同様に、P3EG エマルションもクリーミングは起こるが合一せず、油相は分離しなかった。

PS エマルションでは、PS 濃度 0.2, 0.6% (W/W)の場合に水相、油相とも分離し、24時間経過後の水相分離率は約23%、油相分離率は約 6% であった。クリーミングにより水相は分離するが、合一はあまり起こらなかったために油相の分離率が低いと考えられる。1.0%(W/W) のときには油相のみが分離し、水相は全く分離しなかった。これは前述したようにエマルションがW/O 型になっているためで、クリーミングによりO/W 型とは逆に油相が分離し、合一はしなかったために水相は分離しなかったと考えられる。

PG1c エマルションでは、いずれの濃度においても油相は分離しなかった。水相分離は各濃度はほぼ同じ値で徐々に進行し、24時間経過後に約26% となった。PG1c エマルションではクリーミングは起こるが合一せず、油相は分離しなかった。

以上の結果から、1.0% (W/W)の PS エマルションを除き、リン脂質誘導体濃度が分離率に与える影響は小さかったので、各試料の 0.6% (W/W) の場合の水相分離率を Fig. 8 に、油相分離率を Fig. 9 に示す。各エマルションの水相分離率を比較すると、PC と PE は他のものより分離速度が大きく、分離率も高かった。油相分離率を比較すると、P2EG と PS はわずかに分離し、PG, PEG, P3EG, PG1c は全く分離しなかった。これに対し PC と PE は分離速度が大きく、分離率も約50% であった。PC と PE の油相分離速度が速いのは、エマルション液滴の合一が急激に起こっていることを表している。液滴の合一には界

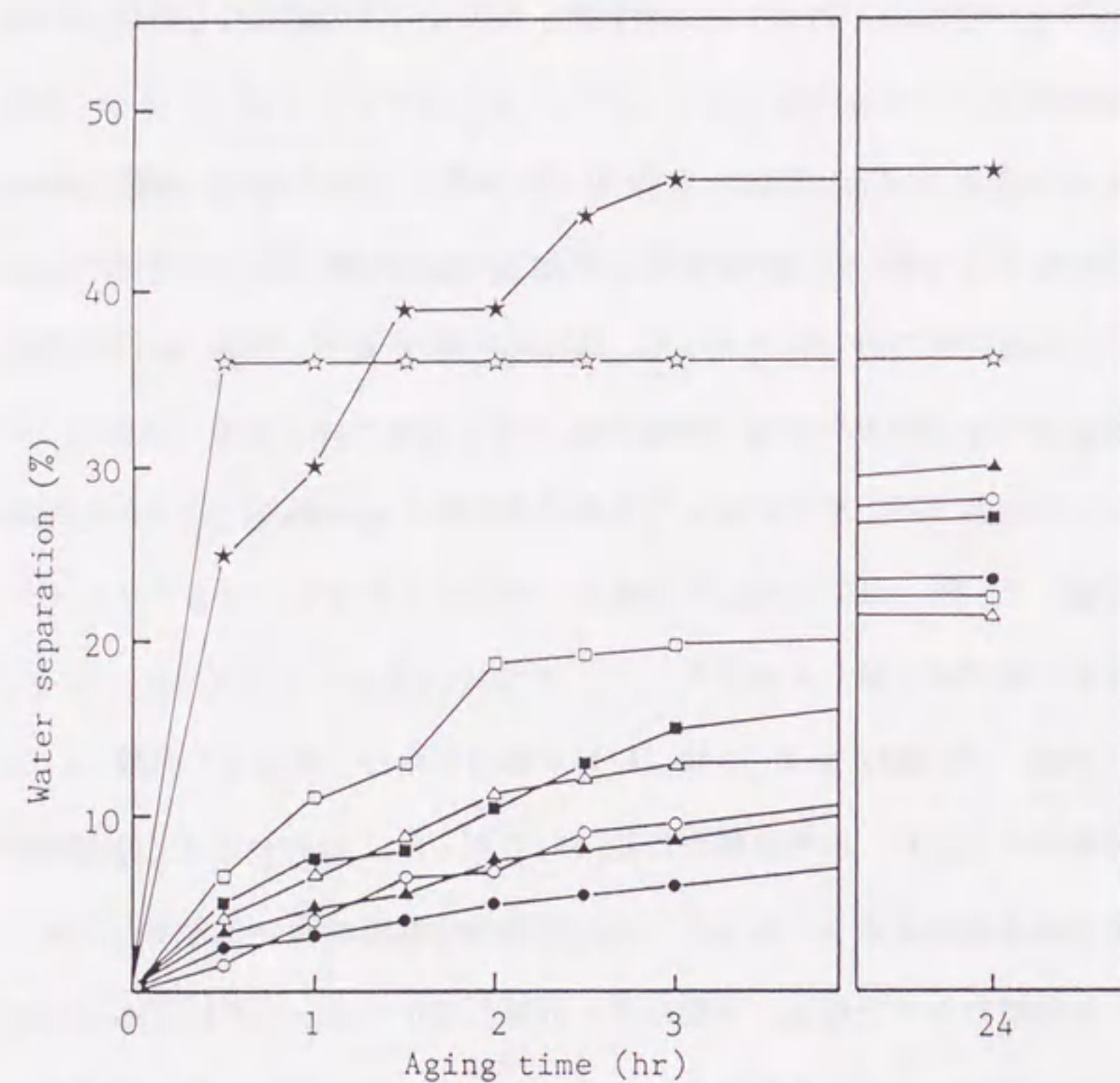


Fig. 8. Water Separation from Modified Phospholipid Emulsions on Standing

Concentration of modified phospholipid; 0.6% w/w.

Aging temperature; 25 °C.

☆; phosphatidylcholine.

★; phosphatidylethanolamine.

△; phosphatidylethyleneglycol.

▲; phosphatidyltriethyleneglycol.

●; phosphatidylglucose.

○; phosphatidylglycerol.

■; phosphatidylserine.

□; phosphatidylserine.

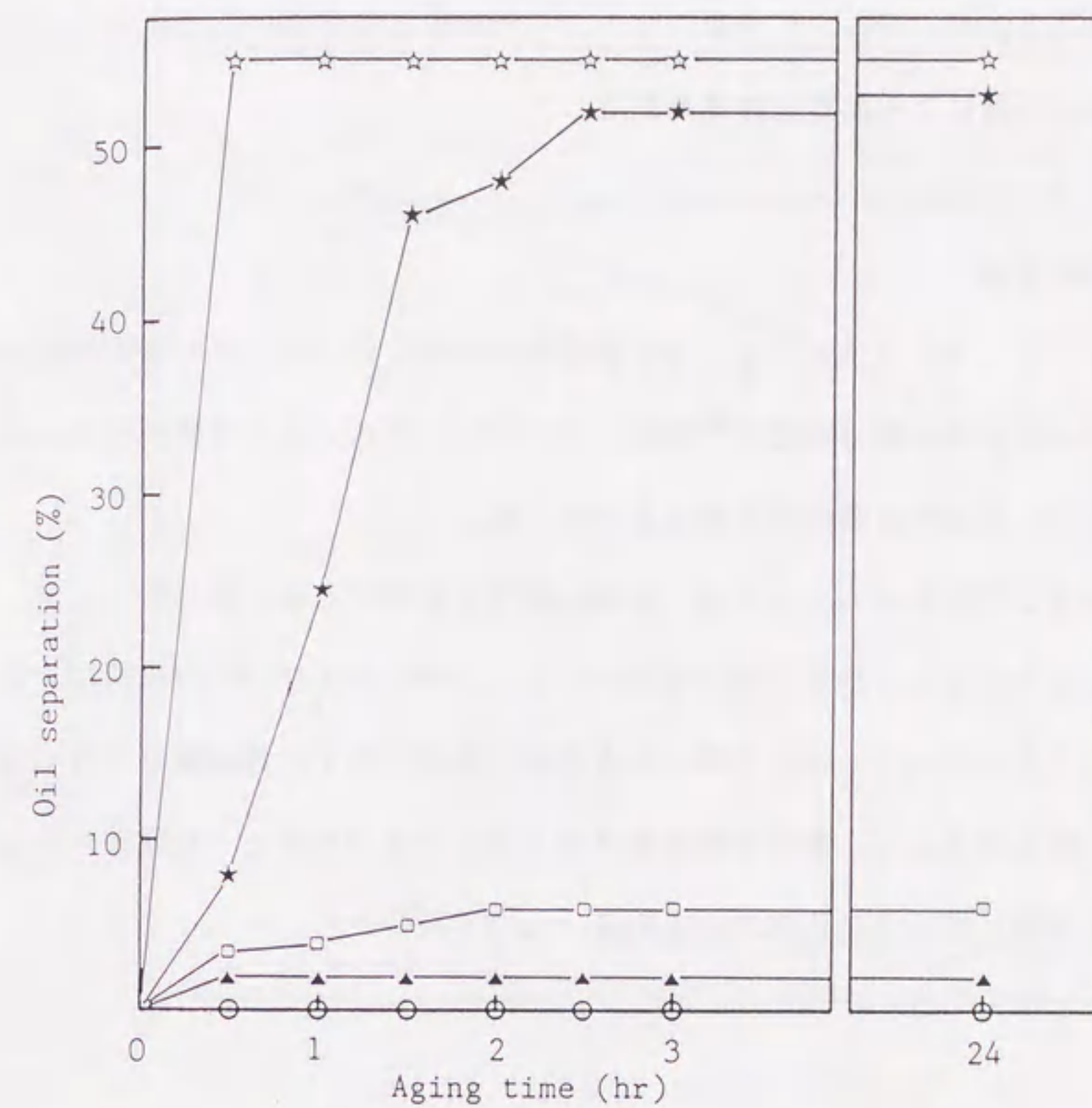


Fig. 9. Oil Separation from Modified Phospholipid Emulsions on Standing

Concentration of modified phospholipid; 0.6% w/w.

Aging temperature; 25 °C.

☆; phosphatidylcholine.

★; phosphatidylethanolamine.

▲; phosphatidyltriethyleneglycol.

○; phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol, phosphatidylglucose and phosphatidylglycerol.

□; phosphatidylserine.

面膜強度が影響を与えるため、PC、PE は他のものより界面膜強度が弱いことが考えられる。そこで次に、遠心分離による油相分離率を測定した。

*遠心分離による油相分離

Fig. 10 に結果を示す。PC エマルジョンでは静置法の結果で述べたように相の分離が速すぎて遠心分離による油相分離は測定できなかった。PS エマルジョンは濃度が高いほど分離率は低下したが、その他は濃度の影響は小さかった。

PE、PG、P2EG および PS エマルジョンは、油相分離率は約45% と高い値であったが、PEG、P3EG、PGlc エマルジョンの油相分離率は低かった。P2EG および PS は静置による油相分離率が低いにもかかわらず、遠心分離による油相分離率が高く、界面膜がかならずしも強くないという結果を示した。静置状態におけるこれらのエマルジョンの安定性には、界面膜以外の要素が影響していることが考えられる。

1-2-e. 界面張力

各試料とも時間経過に従い徐々に界面張力は低下した。各試料の界面張力を比較すると、3時間経過後では PC の場合に 29.4mN/m と少し高く、次いで PEG、PG、PS、PE、P3EG、P2EG の順で低くなり、PGlc は 19.7mN/m と少し低い値を示した。24時間経過後には、PC、PE、PG、PEG、PS はほぼ同じ値を示した。P2EG、P3EG および PGlc は、それらより低かった。PC と P2EG、P3EG、PGlc の比較を Fig. 11に示す。P2EG の界面張力低下作用は、PC より大きく、PGlc より小さかったが、遠心分離したときの油相分離率は PC の分離率とほとんど同じであった。界面張力の低下は界面活性の強さの表れであり、前述したように遠心分離の油相分離率は界面膜の強さを反映していると考えられ、P2EG は強い界面活性を持つが界面膜強度は弱いことが分かる。この理由は明確でないが、極性基部分の構造の影響と考えられる。P3EG および PGlc はどちらも界面活性が高く、また界面膜強度も強いことが分かり、食品用乳化剤として高い乳化性、乳化安定性を有することが

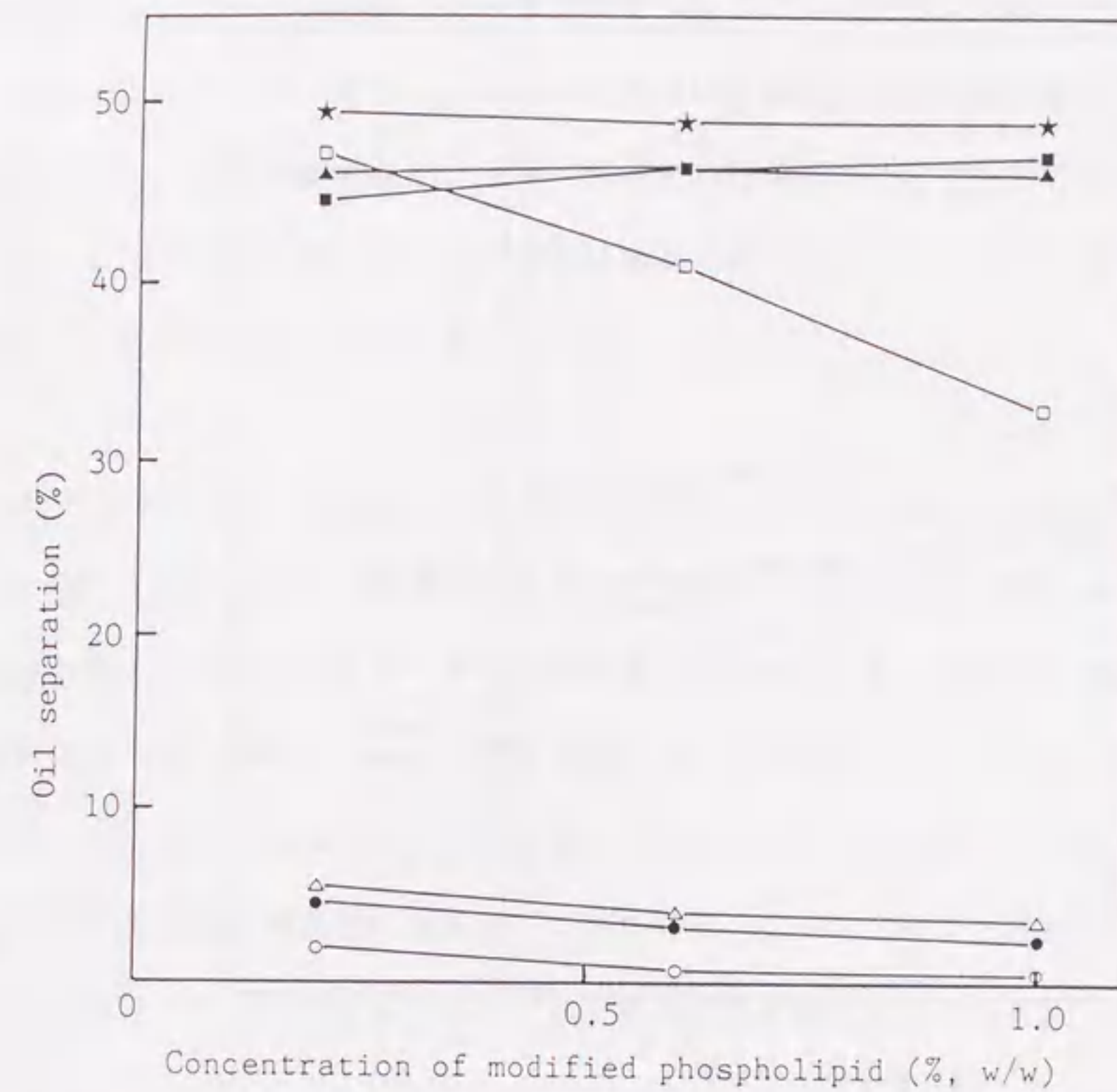


Fig. 10. Oil Separation from Modified Phospholipid Emulsions by Centrifugation

Conditions: 3000G, 30min, 25°C.

- ★; phosphatidylethanolamine,
- △; phosphatidylethylene glycol,
- ▲; phosphatidyltriethylene glycol,
- ; phosphatidyltriethylene glycol,
- ; phosphatidylglucose,
- ; phosphatidylglycerol,
- ; phosphatidylserine.

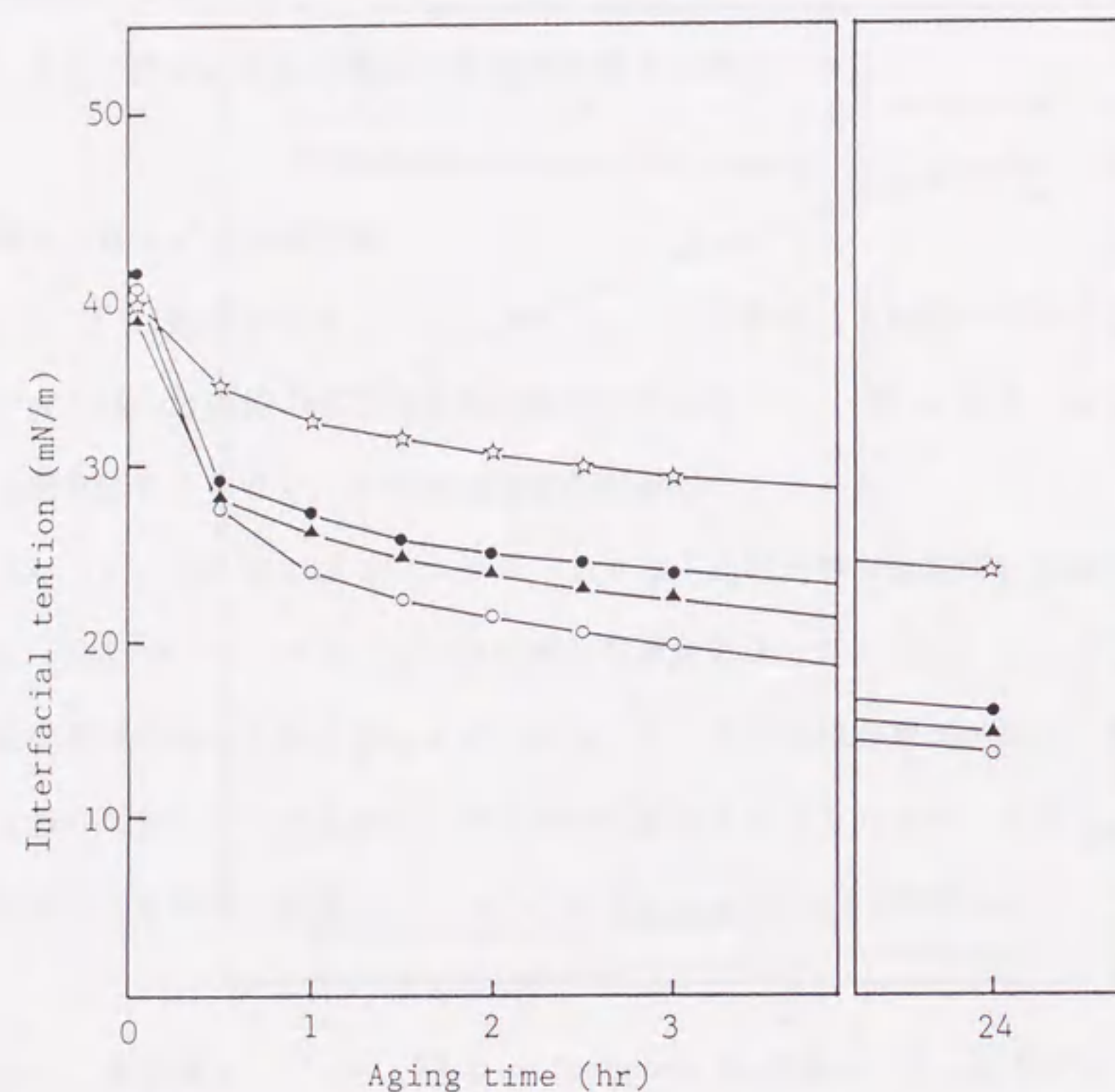


Fig. 11. Interfacial Tension Decrease by Modified Phospholipids at Water-kerosine Interface(25°C)

- ☆; phosphatidylcholine,
- ▲; phosphatidylglycerol,
- ; phosphatidyltriethyleneglycol,
- ; phosphatidylglucose.

期待される。なお、界面張力が平衡に達するまでに比較的長い時間を要したことの理由は現在のところ不明であるが、巨視的には界面に液晶相の生成は観察されなかった。しかし微視的には、界面の配列状態が平衡に達するのに時間を要していると考えられる。これを含め、今回の実験で見いだされた界面科学的に興味のあるいくつかの現象については、今後さらに詳細に検討したいと考えている。

本実験では PLD の基質として PC を用いたが、PE もまた基質となりうる。それらのリン脂質と他の脂質との混合物である大豆レシチンを反応原料として用いた場合も、精製基質の場合と同様にホスファチジル基転移反応は進行する。本報告で述べた各リン脂質誘導体の中でも P3EG と PGlc の乳化特性は PC とかなり異なっており、ホスファチジル基転移反応によって大豆レシチンの改質が可能であることを示唆している。ホスファチジル基を転移させ得る親水性化合物として他にも様々なものがあり、大豆レシチンの改質に関してホスファチジル基転移反応は有効であると考えられる。

第2章 ホスファチジル化コウジ酸の合成と その性質

第1編・第3章において, kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)- γ -pyrone] がホスファチジル基転移反応のアクセプター化合物となることを示した. kojic acid (KA) は抗菌性や tyrosinase 阻害活性を有することが知られている. ホスファチジル化することによって, その性質がどのように変化するかを検討した.

2-1. 実験方法

2-1-a. 試薬

転移反応によるホスファチジル化コウジ酸 (phosphatidylated kojic acid, PK) の合成には酵素として PLD-121 を, kojic acid は関東化学製を使用した. 基質の PC としては, 長鎖脂肪酸を有する大豆 PC は(株)ホーネンコーポレーション製を, 短鎖脂肪酸を有する PC は Avanti Polar Lipids 社製を使用した. 抗菌性試験用の標準寒天培地は栄研製を用い, 酵素活性阻害試験用の tyrosinase は Sigma chemical 社製 (マッシュルूम由来) を使用した.

2-1-b. ミトコンドリア膜膨潤試験⁽²⁾

Myers and Slater⁽¹²⁾の方法により, ウィスター系雄ラットの肝臓からミトコンドリアを調製した. Bradford⁽¹⁾の方法により, bovine serum albumin を標準としてミトコンドリア原液のタンパク質量を測定し, 濃度 0.7mg protein/ml に調整した. このミトコンドリア液に, 50mM の試料を一定量加え, 540nm の吸光度変化から, ミトコンドリア膜の膨潤を測定した.

2-1-c. 抗菌性試験

培地 (yeast extract 250mg, triptone 500mg, glucose 100mg, 蒸留水 100ml) に *Escherichia coli* を接種し, 37°C で1夜培養した. この菌液 30 μ l を標準寒天培地上に均一に塗布し, 試料 (2.8, 8.4, 14 μ mol) をしみ込ませた市販の抗菌性試験用濾紙ディスクを置いて 35°C で1夜培養した. 培養後阻止円の形成を観察した.

2-1-d. Tyrosinase 阻害活性試験

A法: 試料 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μ mol を, 3.9% の Triton X-100 を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 3.85ml に溶かし, これに 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした tyrosinase 溶液 (1000unit/ml) 150 μ l を加えて混合し, 25°C で10分間, インキュベートした. 続いて 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした 0.1mM dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine) 溶液 1.0ml を加え, さらに 25°C で10分間インキュベートした後, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を対照として 475nm の吸光度を測定した.

B法: TLC プレート (Merck, silica gel 60F254) に一定モル量の試料をスポットしクロロホルム・メタノール・アンモニア=75:30:4 で展開した. 展開終了した TLC プレーートを直ちに10分間, 減圧乾燥した. これに 10mM の dopa を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を噴霧し室温で10分間, 放置した. 続いて 1000unit/ml の tyrosinase を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を噴霧し, 乾燥しないようにポリ袋に密封して30分間, インキュベートした. 阻害物質のスポットは, 暗灰色のバックグラウンドに黄色のスポットとして検出される.

2-1-e. 抗酸化性試験

銅イオンの存在下における油脂の過酸化価 (POV) 上昇を, 日本油化学協会・基準油脂分析試験法の方法に従って測定した. 油脂として triolein 5g を採り, 50 μ l の 3.14% (w/v) 酢酸銅メタノール溶液を加え, 銅イオン濃度 10 ppm とした. これに試料のメタノ

ール溶液を、銅に対する試料のモル比が20倍になるように加え、溶媒を減圧下に除去した。
これを40℃で保存して POVの変化を経時的に測定した。

2-2. 結果と考察

2-2-a. 7-phosphatidyl kojic acid (PK) の合成

ホスファチジル基の脂肪酸鎖長が異なる5種類の PC, すなわち PC を 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine と表記したときにアシル基の炭素数が 4であるもの (1,2-dibutyroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PC4: 以下同様に略), 6であるもの (PC6), 8であるもの (PC8), 10であるもの (PC10), および炭素数が18の混合脂肪酸であるもの (大豆製, PC18) を基質とし, PLD-121 の存在下に KA と反応させ, それぞれに対応する PK, すなわち PK4 [5-hydroxy-2-(1,2-dibutyroyl-*sn*-glycero-3-phosphorylmethyl)- γ -pyrone, 以下同様], PK6, PK8, PK10, PK18 を合成した。予備試験により決定した反応条件を一括して Table VIII に示す。PK18 の場合には反応溶媒としてエーテルを用いたが, PK4, PK6, PK8, PK10 ではクロロホルムを使用すると収率が高かった。第1編第3章で述べたように, 転移反応の至適 pH は加水分解反応の至適 pH と等しいが, kojic acid の場合, pH 8.0 で反応を行った。これは, 遊離の kojic acid の水への溶解度が低く, Na 塩として反応系に加えなければならないからである。反応後の各 PK の精製方法を, Fig. 12, 13, 14 に示す。精製した PK4, PK6, PK8, PK10 の NMR スペクトルデータを Table IX に示す。FAB-MS の測定結果を Table X に示す。

2-2-b. 7-phosphatidyl kojic acid によるミトコンドリア膜の膨潤

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり, リン脂質型化合物は生体膜に対して親和性が高いと考えられる。生体膜に対する親和性は, ラット肝から調製したミトコンドリア膜の膨潤を観察することにより定量的に確認することができる。すなわちミトコンドリア膜に親和性を有する化合物は膜中に侵入し, その構造を乱して膨潤させる。膨潤度は, ミトコンドリア液の吸光度変化として測定できる。KA, PK4 および対照の PC4, PC8, PC10 は, 200, 400 μ M 濃度で活性を示さなかったが, PK6, PK8, PK10 は膜を膨潤させた。その結

Table VII. Preparation of Phosphatidyl Kojic Acid

Compound	Substrate (mg)	PLD (unit)	Aqueous phase (ml)	Organic phase (ml)	Yield (%)
PK4	PC4	100	pH 8.0	5.0	46
PK6	PC6	200	pH 8.0	10.0	18
PK8	PC8	200	pH 8.0	10.0	19
PK10	PC10	50	pH 8.0	5.0	34
PK18	PC18	100	pH 8.0	10.0	

PC4 ; 1,2-dibutyryl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.
 PC6 ; 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.
 PC8 ; 1,2-diocetanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.
 PC10 ; 1,2-didecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.
 PC18 ; soybean phosphatidylcholine.
 PK4 ; 5-hydroxy-2-(1,2-dibutyryl-*sn*-glycero-3-phosphorylmethyl)- γ -pyrone.
 PK6 ; 5-hydroxy-2-(1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylmethyl)- γ -pyrone.
 PK8 ; 5-hydroxy-2-(1,2-diocetanoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylmethyl)- γ -pyrone.
 PK10 ; 5-hydroxy-2-(1,2-didecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylmethyl)- γ -pyrone.
 PK18 ; phosphatidyl kojic acid synthesized from soybean phosphatidylcholine.

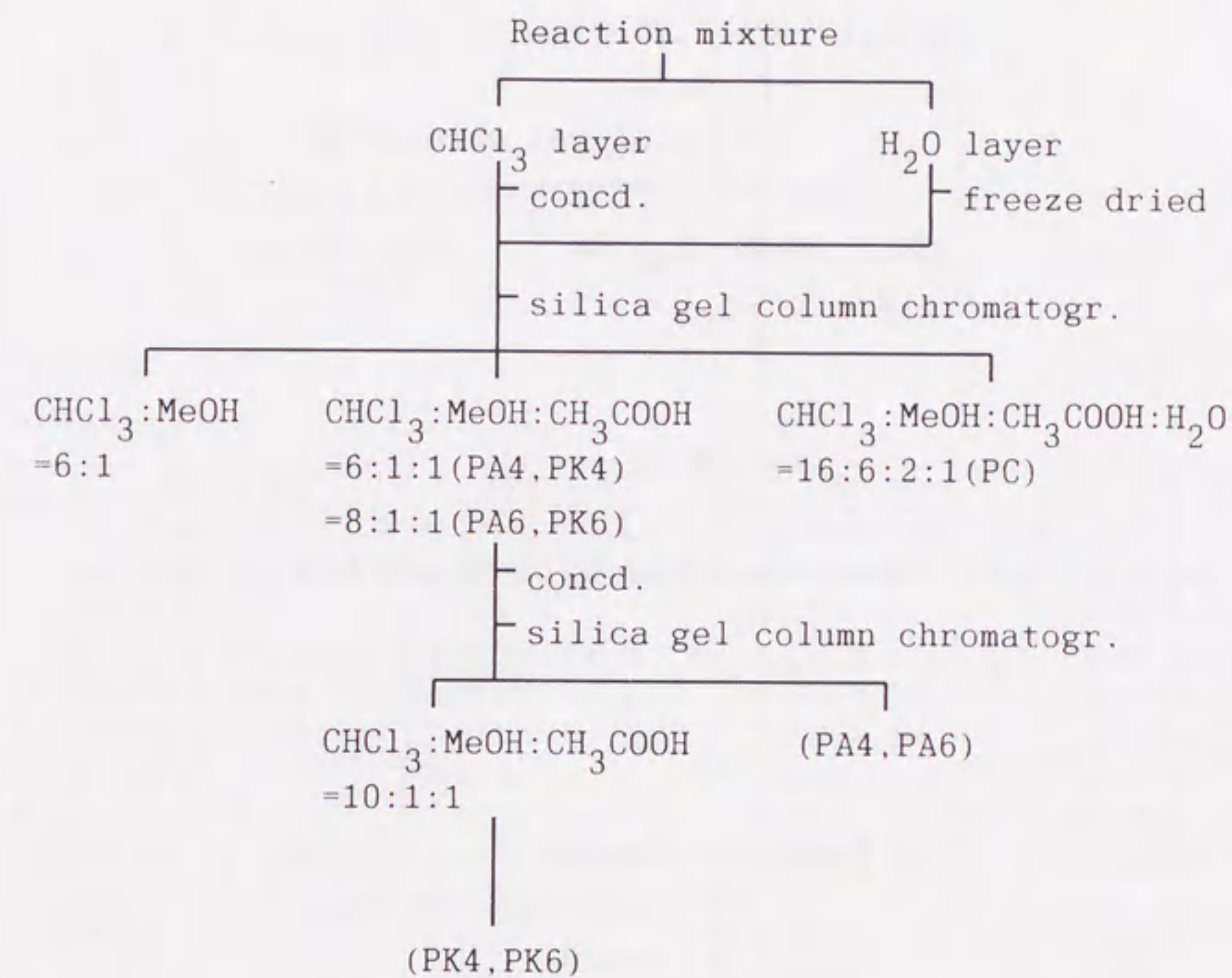


Fig. 12. Isolation Procedure of PK4 and PK6

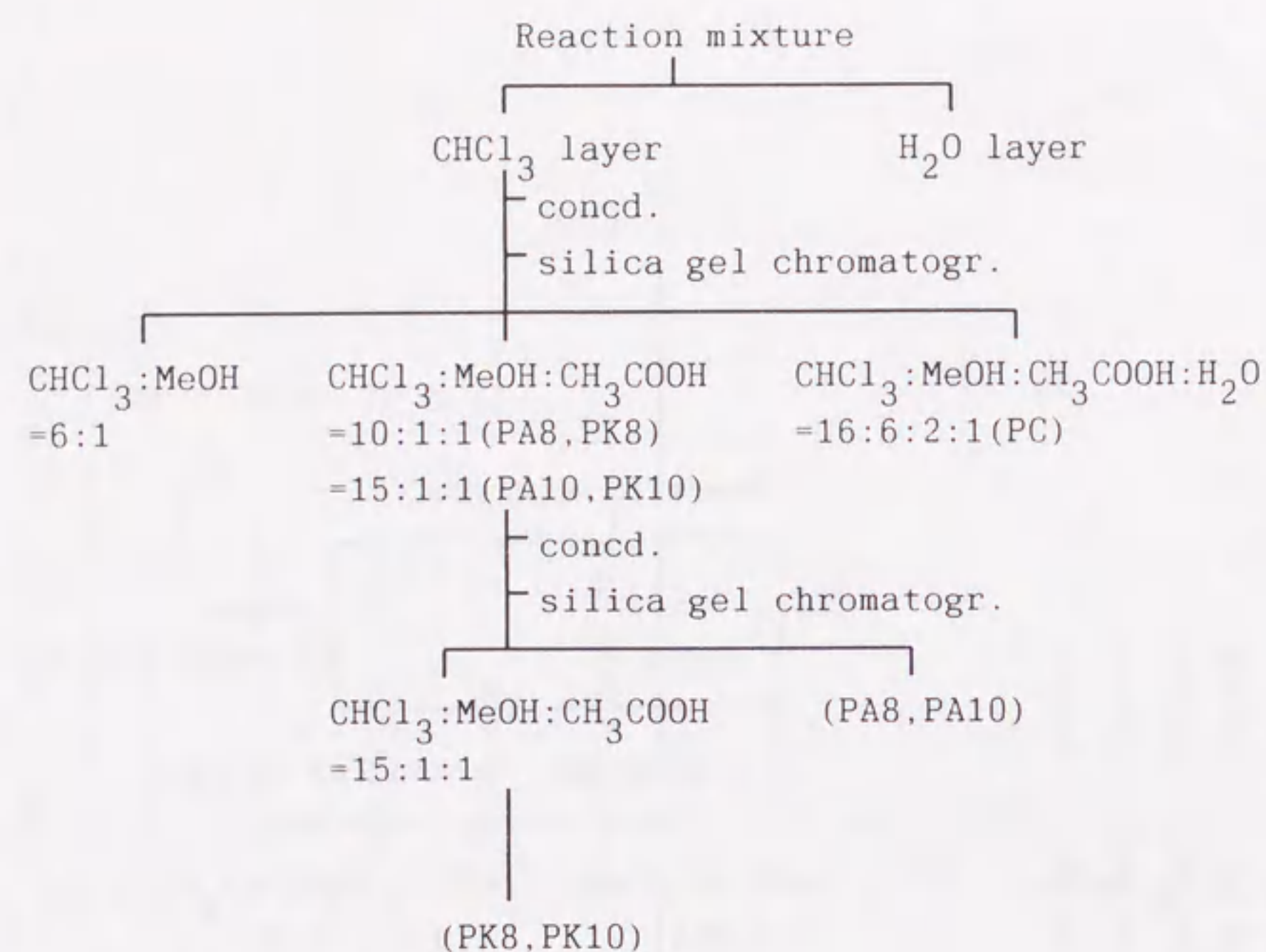


Fig. 13. Isolation Procedure of PK8 and PK10

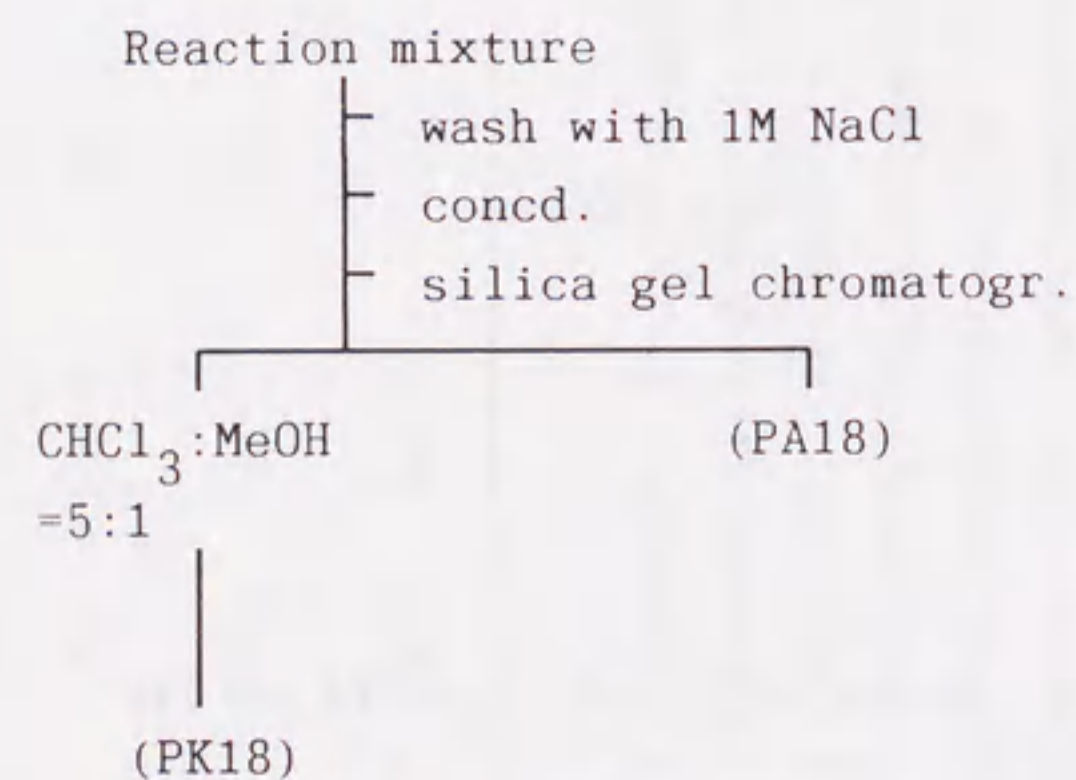
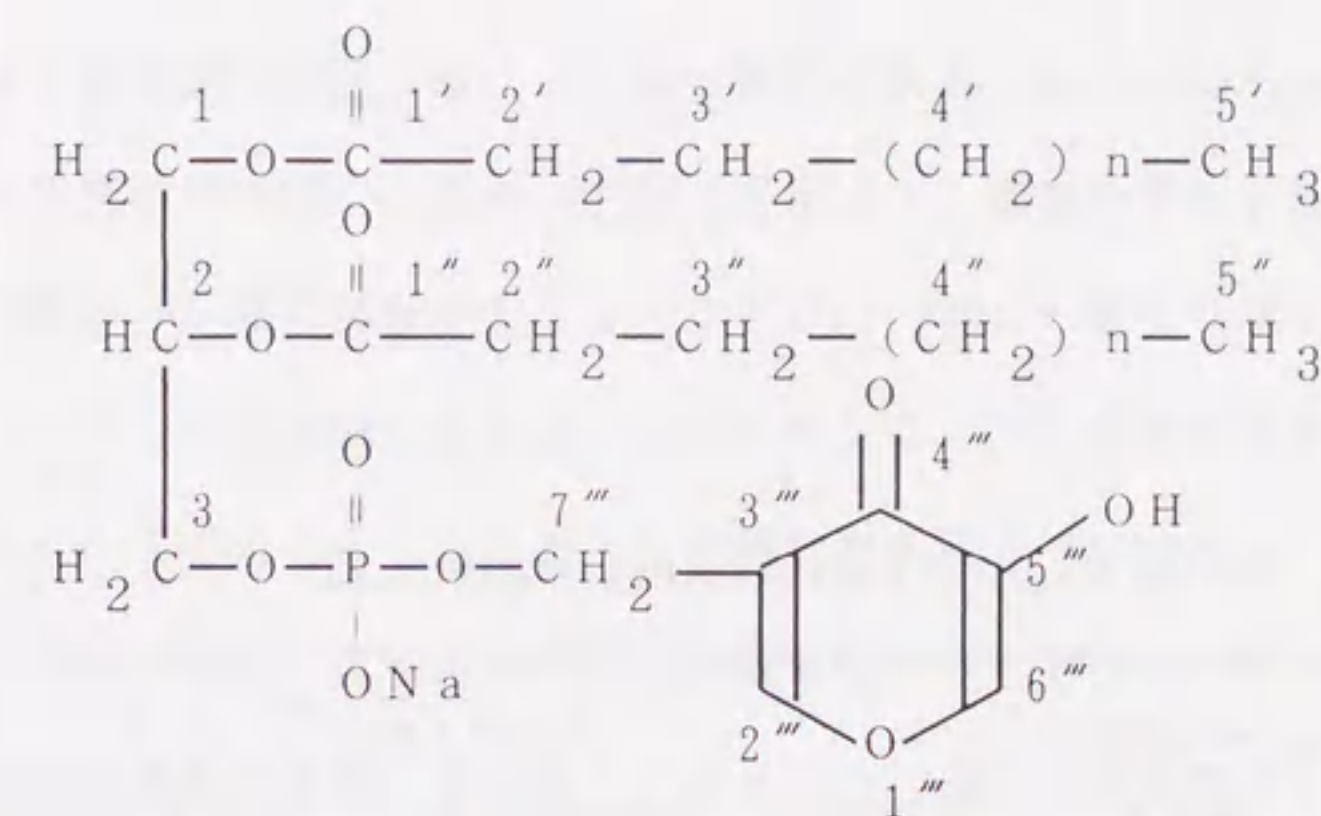


Fig. 14. Isolation Procedure of PK18

Table IX. ¹H-NMR Spectral Data of PK4, PK6, PK8, and PK10 in CDCl₃ : CD₃OD (3:1) (270MHz, δ value, TMS)



	PK4 (n=0)	PK6 (n=2)	PK8 (n=4)	PK10 (n=6)
H-1	4.20 dd J=6.3, 12.0 4.42 dd J=3.1, 12.0	4.20 dd J=6.2, 12.0 4.43 dd J=3.8, 12.0	4.19 dd J=6.6, 11.9 4.42 dd J=3.3, 11.9	4.19 dd J=6.5, 12.1 4.43 dd J=3.6, 12.1
2	5.24 m	5.23 m	5.22 m	5.24 m
3	4.02 dd J=5.8, 5.8	4.01 dd J=5.8, 5.8	4.02 dd J=5.6, 5.6	4.02 dd J=5.7, 5.8
2', 2''	2.315 t J=6.4 2.309 t J=6.4	2.324 t J=7.7 2.320 t J=7.7	2.324 t J=7.6 2.318 t J=7.6	2.326 t J=7.5 2.319 t J=7.5
3', 3''	1.65 m	1.62 m	1.60 m	1.61 m
4', 4''	—	1.32 m	1.29 m	1.28 m
5', 5''	0.954 t J=7.4 0.947 t J=7.4	0.909 t J=6.3 0.905 t J=6.3	0.890 t J=6.7	0.890 t J=6.7
3'''	6.60 s	6.60 s	6.60 s	6.60 s
6'''	7.91 s	7.89 s	7.86 s	7.89 s
7'''	4.72 d (overlapped with H ₂ O signal)	4.71 d (overlapped with H ₂ O signal)	4.73 d J=7.3	4.72 d J=7.3

Table X. FAB-MS Data of Phosphatidyl Kojic Acid

	Molecular weight calcd.	Found (m/z)*	
		positive	negative
PK6	514	515 [M+H] ⁺ , 537 [M+Na] ⁺	491 [M-Na] ⁻
PK8	570	571 [M+H] ⁺ , 593 [M+Na] ⁺	547 [M-Na] ⁻
PK10	626	627 [M+H] ⁺ , 649 [M+Na] ⁺	603 [M-Na] ⁻

* Matrix ; NOBA.

果を Fig. 15 に示す.

膜を構成する脂質分子同士は疎水的結合で集合しており、かつ流動性を持っているため、非極性基を持つ化合物は脂質2分子膜の非極性部にもぐり込むことができる。膜に組み込まれた物質と膜脂質の相互作用により膜の構造が乱れ (perturbation)、膜の崩壊に至る。このような物質の代表例が、短鎖脂肪酸を有するリン脂質や界面活性剤である。この実験において対照の PC 類に活性がなかったことは、400 μ M 程度の濃度では perturbation が小さいということを意味している。これに対して、同じ脂肪酸鎖を持つ PK8, PK10 が perturbation を与えたということから、極性基も膜の integrity に影響することがわかる。また PK8, PK10 よりも PK6 の活性は弱く、ミトコンドリア膜に対する親和性には PK の脂肪酸鎖長が影響していることがわかる。KA は非極性基を持たず、膜に侵入できないが、PK は膜に取り込まれやすいということが明らかになった。

2-2-c. 7-phosphatidyl kojic acid の抗菌性

KA は抗菌性を示すが、前項の結果から、ホスファチジル基が結合することにより膜透過性が良くなり、抗菌性が強められるのではないかと予想された。抗菌性試験には KA と PK4, PK8 を用いた。その結果、KA の場合、14 μ mol/ディスク で阻止円の形成が認められたのに対し、PK4, PK8 では 8.4 μ mol/ディスク で阻止円が形成され、半定量的であるが推定が裏付けられた。E. coli 以外の微生物に対する抗菌性や、あるいは強い抗菌力を持つ抗生物質をホスファチジル化した場合の効果などが今後の課題である。

2-2-d. 7-phosphatidyl kojic acid の tyrosinase 阻害活性

Tyrosinase は動植物中に広く存在し、メラニン形成に関与する酵素である。例えば、脊椎動物のメラニン細胞において、tyrosinase によって tyrosin が酸化され、dopa, dopaquinone, dopachrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone を経て重合し、メラニンが生合成される。Tyrosinase は KA によって酵素活性が阻害されるが、その阻

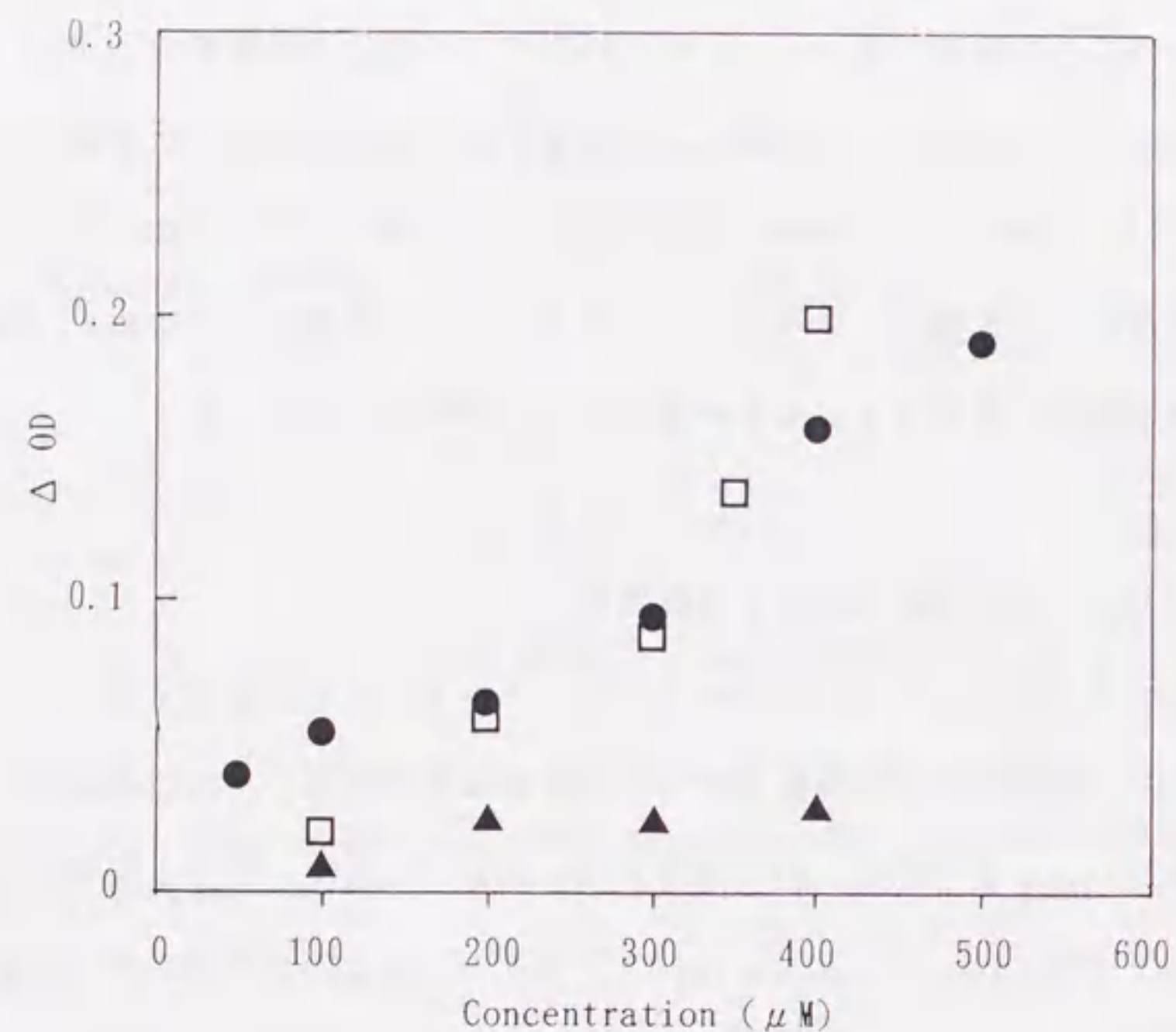


Fig. 15. Swelling Test of Mitochondrial Membrane

▲; PK6. □; PK8. ●; PK10.

害作用の機序は次のように考えられている。

基質として dopa を用い、黒色モルモット皮膚ホモジネートから調製した tyrosinase 液を加えた反応液に KA を添加すると、添加濃度に依存して dopachrome の生成が抑制されるが、この反応系に酢酸銅を添加すると、添加濃度に依存して tyrosinase 活性が回復する。この事実と、KA が各種の二価金属イオンに対してキレート作用を示すことから、

KA の tyrosinase 阻害作用は酵素活性部位の銅原子とのキレーションによるものとされ、その阻害活性には、各種誘導体の検討から KA の 5 位の水酸基が関与⁽¹⁶⁾している。

皮膚のメラニン色素沈着防止を目的とする化粧品に KA が使用されているが、これをリン脂質誘導体とした PK は皮膚細胞に対して KA より高い親和性が期待される。また KA は食品の褐変防止にも使用されている。長鎖脂肪酸を持つホスファチジル基は全体として親油性基であるが、後述するように短鎖脂肪酸のホスファチジル基は極性基であり、KA の親水性を強めることができる。このように KA の物性を変化させることが複雑な食品系にどのような効果を及ぼすか興味あるところである。

合成した PK4, PK6, PK8 の tyrosinase 阻害活性試験 A 法による結果を Fig. 16 に示す。PK の構造は、キレート作用に関与する 5 位の水酸基が保持されており、KA と同様の阻害活性を持つと考えられるが、実測値的には KA よりも弱い阻害活性を示した。この理由は明らかでないが、水系における微視的な溶解状態（例えばミセル形成など）の影響によって見掛け上の濃度が低くなっていることが考えられる。PK10, PK18 は試験液に乳濁してしまい、測定不能であった。PK に対してこの測定法が不適切であるという可能性がある。そこで定性的ではあるが、TLC プレート上で阻害活性を判定する方法（B 法）を考案した。TLC の結果を模式的に Fig. 17 に示す。PK18 は KA と同様の明瞭なスポットとして検出され、tyrosinase 阻害活性を示した。最近市販されている高度なデータ処理機能を持つ TLC プレートスキャナーによれば、このようなバックグラウンドが発色しスポットが明るく抜ける TLC 像も定量に用いることが可能である。この方法を定量的に改良すること、また実際の食品系や皮膚細胞に対する効果の検討が今後の課題である。

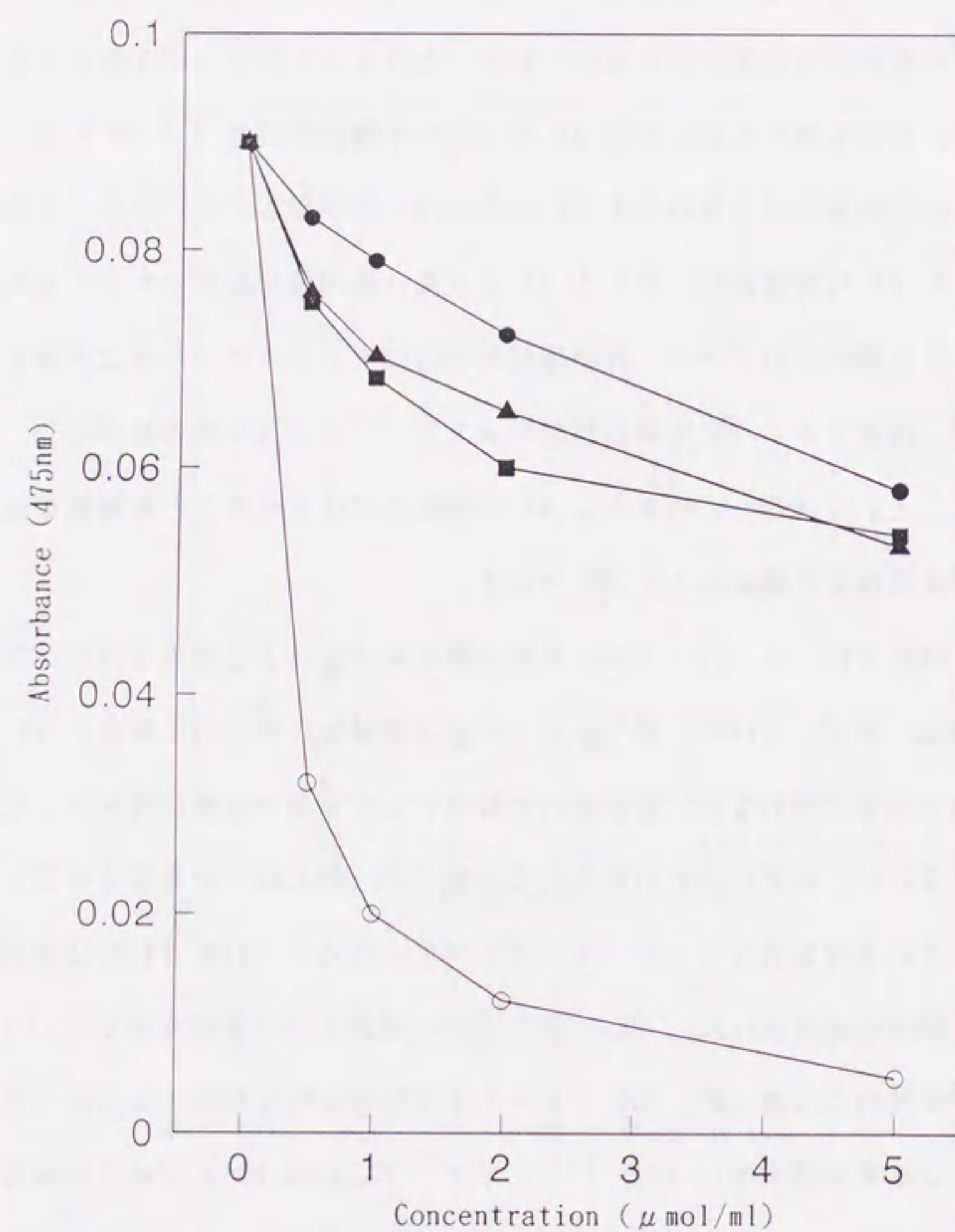


Fig. 16. Effect of Phosphatidylated Kojic Acid on Tyrosinase Activity
 ●; PK4. ▲; PK6. ■; PK8. ○; KA.

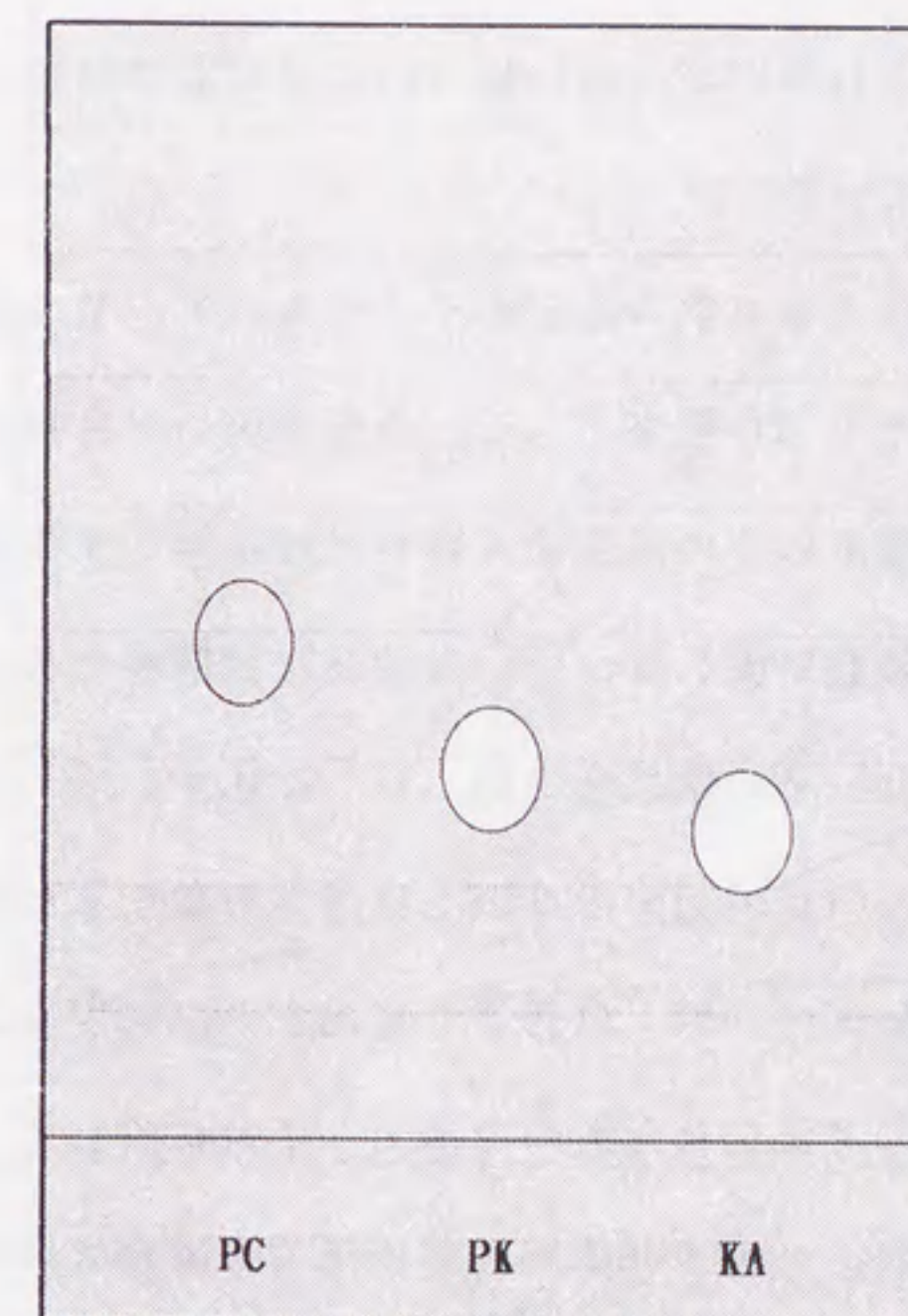


Fig. 17. Inhibition of Tyrosinase Activity by PK18 Assayed on Silica Gel TLC Plate

2-2-e. 7-phosphatidyl kojic acid の抗酸化性

油脂の酸化が微量の金属の存在により著しく促進されることは広く知られている。特にその作用は銅と鉄が強い。植物油脂の最終精製工程では水蒸気蒸留が行われているが、この時に citric acid が添加される。これは抗酸化剤の中でも一般に金属封鎖剤と呼ばれるもので、油脂の酸化安定性を向上させるために植物油脂中に含まれる微量の銅や鉄を不活化するのが目的である。製品として出荷された後の、消費者によって使用される過程でもこれらの金属の混入は避けられないが、citric acid は常温で油脂に難溶であり、油脂可溶性の金属封鎖剤が望まれている。

短～中鎖脂肪酸を持つ PK はクロロホルム/メタノール/アンモニア水を展開溶媒とする TLC では、PK は PA よりも Rf 値が小さく、極性が強い化合物であると考えられた。また実際、PK4 は PA の飽和濃度以上の濃度でも容易に水に溶かすことができた。これから推定されるように、短～中鎖脂肪酸を持つ PK は油脂に難溶性であった。そこで抗酸化性試験は PK18 について行った。その結果を Fig. 18 に示す。

試験開始から120 時間まで、triolein の POV は増加しなかったが、(銅添加)試験区と(銅+大豆 PC 添加)試験区の POV は著しく増加した。大豆 PC は、同じ脂肪酸を有する PK18 に対する対照として添加したものである。これに対して(銅+KA添加)試験区では完全に酸化が抑制された。(銅+PK添加)試験区でも酸化は抑制されたが、わずかに POV の上昇が観察された。おそらく、PK18 の主要な構成脂肪酸である linoleic acid や linolenic acid が酸化促進的に影響しているものと考えられる。(銅+KA添加)試験区において、試料調製の際に、酢酸銅や KA を添加するために溶媒としてメタノールを使用し、これを留去すると KA は油脂に不溶であるため沈殿してしまうが、それにも拘らず抗酸化性を示した。これは、メタノールを留去する以前の段階で既に銅とキレートを形成してしまうためではないかと考えられる。

以上の結果から、PK は油脂の抗酸化剤として利用できるものであると考えられる。

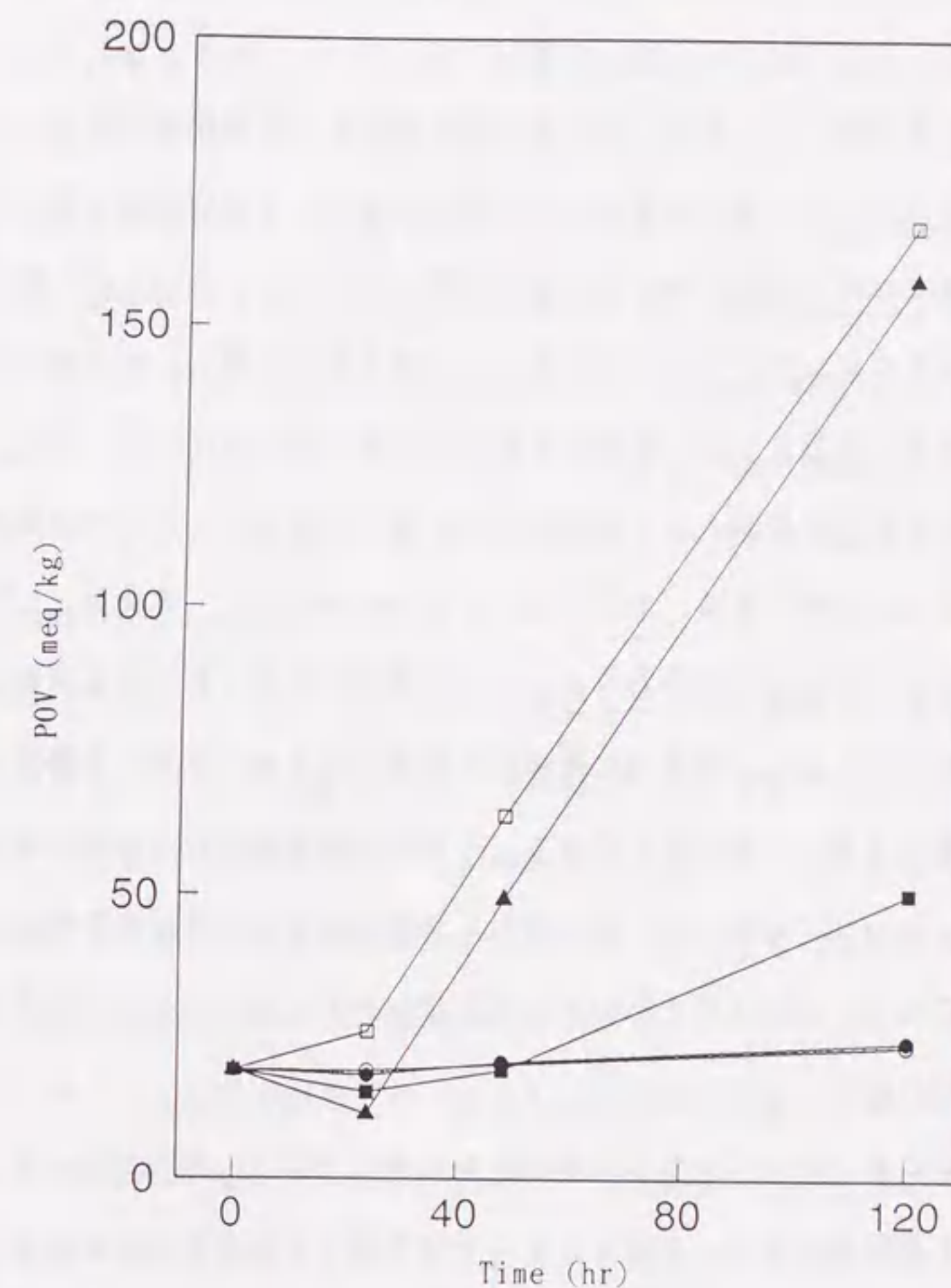


Fig. 18. Effect of PK18 on the Oxidation of Triolein Accelerated by Copper Acetate
○; control (triolein). □; 10ppm Cu⁺⁺. ▲; 10ppm Cu⁺⁺ + PC.
■; 10ppm Cu⁺⁺ + PK18. ●; 10ppm Cu⁺⁺ + KA.

要約

近年、食品工業の諸分野においては、資源を有効に活用し、産業廃棄物を減少させようという努力が続けられている。製油産業は其中でも比較的、資源利用度の高いものであり、例えば大豆搾油では投入原料のほとんど全量が製品化されている。しかし製品の付加価値という観点からすれば、まだ十分に活用されているとは言い難い。その代表的なものが大豆レシチンである。大豆レシチンの原料である大豆ガム質の大部分は、大豆レシチンに加工されることなく飼料用脱脂大豆に湿潤剤として還元されている。これは製油産業における唯一最大の未利用資源である。また大豆レシチンそのものも、乳化剤として多用されているとはいえ、その理由は安価であるというのが実情であり、低付加価値製品である。このような現状から大豆レシチンの高付加価値化の試みがなされてきた。本研究の目的は大豆レシチンに酵素的な加工を施すことにより、その付加価値を高め、資源の有効活用を図ることにあった。Phospholipase D (PLD) はホスファチジル基転移反応を触媒することが古くから知られており、この反応を応用すれば大豆レシチンから様々な有用物質を作り出すことが可能と思われた。

本研究の実施以前にも、キャベツなどの植物や微生物に PLD の存在が知られていた。そこでまず各地の土壌試料を集め、大豆レシチンを炭素源とする選択培地を使用し、PLD を生産する微生物のスクリーニングを行った。その結果、強いホスファチジル基転移活性を有する PLD を培養液中に分泌する2種類の放線菌、すなわち *Streptomyces lydicus* D-121 と *Streptomyces antibioticus* S-170 を得ることができた。両菌は共に PLD 生産菌としては文献的に未報告のものであった。あらかじめ両菌の培養条件を検討した後に、培養濾液から PLD を各種のクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一なまでに精製し

て、その性質を調べた。活性に及ぼす種々の化合物の影響や、基質特異性などは比較的よく似ていたが、転移反応のアクセプター特異性にわずかな違いがあった。精製酵素の比活性は、*S. lydicus* の PLD が 2390unit/mg, *S. antibioticus* の PLD が 1437unit/mg であり、すでに報告されていた他の PLD よりもかなり高かった。Phosphatidylethanolamine のホスファチジル基を choline に転移させて phosphatidylcholine を合成する反応を用いて、両 PLD と他の PLD を比較した。*Streptoverticillium hachijoense*, *S. chromofuscus*, およびキャベツの PLD の場合は、加水分解反応生成物である phosphatidic acid がかなり生成したが、*S. lydicus* と *S. antibioticus* の PLD では、ほとんど転移反応のみが進行した。

本研究によって得られた PLD の応用を検討した。リン脂質は、長鎖脂肪酸と親水性基を有する両親媒性物質であり、離型剤、分散剤や乳化剤など、大豆レシチンの実際的な利用に関しても、その両親媒性物質としての性質が応用されている。このことから、PLD を用いて合成した新規なリン脂質誘導体の応用としては、まず乳化剤が考えられた。本研究において合成した幾つかのリン脂質誘導体について、エマルションの相分離率や界面張力低下作用などの乳化特性を測定した。合成したリン脂質誘導体の中で、6-phosphatidyl-glucose と phosphatidyltriethyleneglycol は界面張力低下作用が大きく、かつエマルションの静置状態および遠心分離したときの相分離率が低く安定であり、天然のリン脂質である phosphatidylcholine よりも優れた乳化特性を有することが示された。

リン脂質が生体膜構成物質であることから、リン脂質型化合物は生体膜に対して親和性が高いものと思われる。このことから、生理活性化合物をホスファチジル化することが、その生理活性にどのような変化をもたらすか興味をもたれた。その例として、kojic acid から、ホスファチジル基の脂肪酸鎖長が異なる5種類の 7-phosphatidyl kojic acid を

合成した。まず膜に対する親和性を、ラット肝ミトコンドリア膜の膨潤試験により検討した。その結果、脂肪酸の炭素数が 8 および 10 の 7-phosphatidyl kojic acid はミトコンドリア膜に取り込まれ、膜に対する親和性を有することが判明した。

続いて *Escherichia coli* を試験菌に用い、濾紙ディスク法による阻止円形成を観察する方法で、脂肪酸の炭素数が 4 および 8 の 7-phosphatidyl kojic acid の抗菌性試験を行った。Kojic acid が 14 μmol /ディスクで阻止円を形成したのに対し、7-phosphatidyl kojic acid は 8.4 μmol /ディスクで阻止円を形成し、ホスファチジル化によって抗菌力が強められることが判明した。

化粧品に kojic acid を配合したものがある。これは、kojic acid が tyrosinase の活性部位の銅に対するキレーションによって tyrosinase 阻害活性を示すことから、皮膚におけるメラニン形成の抑制を目的としたものである。ホスファチジル化することにより、kojic acid の皮膚細胞に対する浸透性を高められるのではないかと考えられる。常法の tyrosinase 阻害活性試験法は 7-phosphatidyl kojic acid のような非水溶性の化合物に適用できないため、TLC プレート上で tyrosinase 阻害反応を行う試験法を考案した。その結果、定性的であるが、脂肪酸の炭素数が 18 である 7-phosphatidyl kojic acid も tyrosinase 阻害活性を保持していることが確認された。

油脂の酸化が微量の金属により著しく促進されることはよく知られている。油脂の抗酸化剤には、tocopherol 類のようなラジカル連鎖反応停止剤と、キレート形成により金属を不活化する金属封鎖剤とがある。食品分野で用いられる金属封鎖剤には、citric acid があるが、これは水溶性である。Kojic acid も各種二価金属イオンとのキレート形成能を有するが、同様に油脂に難溶である。そこで脂肪酸の炭素数が 18 である 7-phosphatidyl kojic acid が油脂可溶性の金属封鎖剤として有効であるかを検討した。銅イオン

を 10ppm 含む triolein に対して 7-phosphatidyl kojic acid を 200ppm 添加した試料を、40℃で保存して、経時的に過酸化価を測定した。その結果、7-phosphatidyl kojic acid は、対照に比較して明らかに酸化を抑制した。

謝 辞

本研究の遂行あたり、終始厳しい御指導を賜りました静岡大学農学部教授・伊奈和夫先生、静岡大学農学部教授・坂田完三先生、信州大学農学部教授・茅原紘先生に深く感謝申し上げます。また貴重な御助言と御協力を頂きました静岡大学農学部助教授・衛藤英男先生をはじめとする応用生物化学科の皆様にも厚く御礼申し上げます。本論文の後半、リン脂質型化合物の乳化特性に関して、御指導と御助言を頂いた香川大学農学部教授・山野善正先生、香川大学農学部助教授・合谷祥一先生に深く感謝申し上げます。酵素の性質の検討に関して御助言を頂いた名古屋大学農学部教授・山根恒夫先生に厚く御礼申し上げます。最後に、著者の研究生活の初めから今日に至るまで、常に温かい励ましを賜りました静岡大学農学部名誉教授・中林敏郎先生に心から御礼申し上げます。

引用文献

- (1) Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- (2) Etoh, H., Ban, N., Fujiyoshi, J., Murayama, N., Sugiyama, K., Watanabe, N., Sakata, K., Ina, K., Miyoshi, H. and Iwamura, H. (1993). Quantitative analysis of the antimicrobial activity and the membrane-perturbation potency of antifouling *para*-substituted alkylphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 467-469.
- (3) Imamura, S. and Horiuti, Y. (1979). Purification of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by hydrophobic affinity chromatography on palmitoyl cellulose. *J. Biochem.*, **85**, 79-95.
- (4) 今村茂行, 松村英二, 美崎英生, 武藤直紀 (1989). 新規なホスホリパーゼD-P およびその製造法. 特許広報 平1-12474.
- (5) Juneja, L. R., Kazuoka, T., Yamane, T. and Shimizu, S. (1988). Kinetic evaluation of conversion phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine by phospholipase D from different sources. *Biochim. Biophys. Acta*, **960**, 334-341.
- (6) Kato, S., Kokusho, Y., Machida, H. and S. Iwasaki, S. (1984). Isolation and identification of phospholipase D producing *Actinomycetes*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2181-2188.
- (7) 北原文雄, 青木幸一郎 (1983). コロイドと界面の化学, 第3版, 広川書店, 東京 p. 220.

- (8) 國生純孝, 加藤重昭, 町田靖夫 (1989). ホスホリパーゼDの製造方法. 特許広報 平1-17675.
- (9) 國生純孝, 加藤重昭, 町田靖夫 (1988). ホスホリパーゼDの製造法. 特許広報 昭63-62195.
- (10) 國生純孝, 角田昭, 町田靖夫, 岩崎慎二郎 (1988). 酵素法リン脂質-d-セリン誘導体の製造法. 公開特許広報 昭63-123389.
- (11) 近藤保, 鈴木四郎 (1974). 食品コロイド科学, 三共出版, 東京, p. 69.
- (12) Myers, D. K. and Slater, E. C. (1957). The enzymic hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria. *Biochem. J.*, **67**, 558-572.
- (13) 永沢信 (1967). 食品コロイド学, 共立出版, 東京, p. 256.
- (14) 中西透, 重政芳己, 川本勲 (1983). 発酵法によるホスホリパーゼDの製造法. 特許広報 昭58-52633.
- (15) Okawa, Y. and Yamaguchi, T. (1975). Studies on phospholipases from *Streptomyces*. *J. Biochem.*, **78**, 363-372.
- (16) 大山康明, 三島豊 (1990). コウジ酸の機能と美白効果. *Fragrance Journal* **6**, 53-58.
- (17) Quarles, R. H. and Dawson, R. M. C. (1969). The distribution of phospholipase D in developing and mature plants. *Biochem. J.*, **112**, 787-794.
- (18) Saito, M. and Kanfer, J. (1975). Phosphatidohydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 318-323.
- (19) 澤田浩司, 工藤聡, 渡辺常一, 黒田彰夫, 大木隆正 (1988). ホスホリパーゼDおよびその製造法. 特許広報 昭63-219373.
- (20) 澤田浩司, 渡辺常一, 本池真帆子, 工藤聡, 黒田彰夫 (1988). ホスファチジル基転移活性を示すホスホリパーゼDについて. 日本農芸化学会昭和63年度大会 (名古屋) 講演要旨集 p. 415.
- (21) Shimbo, K., Yano, H. and Miyamoto, Y. (1989). Two *Streptomyces* strains that produce phospholipase D with high transphosphatidyl transfer activity. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3083-3085.
- (22) Shimbo, K., Yano, H. and Miyamoto, Y. (1990). Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces lydicus*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1189-1193.
- (23) Shimbo, K., Iwasaki, Yamane, T. and Ina, K. (1993). Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, (in print).
- (24) 新保喜久雄, 合谷祥一, 山野善正, 伊奈和夫 (1993). 酵素的合成したリン脂質誘導体の乳化特性. 日食工誌 **40**, 755-763.
- (25) Shuto, S., Itoh, H., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K., Tsujino, M., Matsuda, A. and Ueda, T. (1988). A facile enzymatic synthesis of 5'-(3-sn-phosphatidyl) nucleosides and their antileukemic activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 209-217.
- (26) 渡辺睦人, 伊藤俊洋, 飯田雅昭, 岡部篤宣, 川口良成, 新保喜久雄, 園良治, 無類井建夫, 金子俊之 (1986). 二次元薄層クロマトグラフィー-脂質リン測定によるリン脂質の定量分析. 油化学 **35**, 1018-1024.
- (27) Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M. H., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath, P. H. A., Sackin, M. J. and Mortimer, A. M. (1983). A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1815-1830.

- (28) Yamaguchi, T., Okawa, Y., Sakaguchi, K. and Muto, N. (1973). Screening and identification of the phospholipase D-producing *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1667-1672.
- (29) 山野善正, 鶴敏之, 杉原史郎, 三木英三 (1982). 大豆レシチンによるモデルエマルジョンの安定性. *日食工誌* **29**, 137.
- (30) Yang, S. F., Freer, S. and Benson, A. A. (1967). Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, **242**, 477-484.

