

ホスホトリエステラーゼによる有機リン系農薬の速度論的光学分割
(東農工大・工・生命工) ○大内将吉, 杉浦弘人, 中村博征, 早出広司

【目的】ホスホトリエステラーゼ(PTE)は幅広い基質選択性を示す酵素であり, またリン原子上にキラリティーをもつ基質の場合, そのキラリティーを識別し立体特異的反応を行うことが知られている。本研究ではこのような特徴をもつPTEを利用して, 種々のキラル中心をもつリン酸エステル誘導体の速度論的光学分割について検討した。

【方法及び結果】有機リン系の農薬からキラル中心をもつリン酸エステル誘導体として, Ethyl-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN), Prothiofos, Trichlorfon (TRC), Phenthoate (PFM), Vamidotion (VAM), Tetrachlorovinphos (TFB)を選択し, PTEの加水分解基質として用いた。これらをGlycine-NaOH buffer (pH 9.5)中でPTE存在下, 加水分解反応を行った。反応系を光学分割用のChiracel OJ-R (ダイセル化学)カラムを用いたHPLCで分析した。その結果, EPNやProthiofosのようなリン原子上にキラル中心をもつ基質の場合では光学分割が可能であったものの, TRC, PFM, VAMのリン原子以外にキラル中心をもつ基質の場合には光学分割はできなかった。さらに, ジアステレオ化合物であるTFBの場合, PTEはE体のみを識別し加水分解することが明かとなった。

Kinetic Optical Resolution of Racemic Organophosphorous Insecticides Catalyzed by Phosphotriesterase,

○Shokichi Ohuchi, Hiroto Sugiura, Hiroyuki Nakamura, Koji Sode
(Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

【Key Words】 Alkyl Phosphate, Alkyl Phosphonate, Chiral Separation, Optically Active Insecticide

ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素の凍結乾燥法の検討
(東京農工大・工・生命工) 早出 広司, ○安武 望

【目的】当研究室では, ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素(PQQGDH)を用いた糖濃度を測定するバイオセンサーの構築について研究を進めている。バイオセンサーとしての実用化には酵素試料の長期保存安定性が要求される。これまでに溶液状態での熱安定性が向上したキメラ酵素, PQQGDH E97A3 (N末端側の97%が*E.coli*由来, C末端側の3%が*A. calcoaceticus*由来であるPQQGDH) について報告してきた。そこで, 本研究ではE97A3の凍結乾燥状態における保存安定性を検討することを目的とした。

【方法】凍結乾燥法の評価に使用したPQQGDHは, *E.coli*由来のキメラ酵素の構造遺伝子をPQQGDH欠損株で高発現させ, これを精製した。凍結乾燥は4℃において30Torr, 10時間行った。酵素の保存安定性は, 種々の温度で保存後のGDH残存活性を測定することにより評価した。

【結果】E97A3を含むPQQGDH可溶性膜画分を用いて熱安定性を検討したところ溶液状態では50℃60minの処理で完全に失活するのに対し, 凍結乾燥標品は70℃60 min処理でも70%以上の活性を保持していた。またこの凍結乾燥標品の, 4℃および-20℃での保存安定性を検討したところ, 初めの5日間で活性が60-70%位までに低下するものの, その活性はそれ以降25日間保持された。現在凍結乾燥時の賦形剤として糖類, タンパク質を添加することにより保存安定性を向上させることを検討している。

Storage stability of lyophilized PQQ glucose dehydrogenase

Koji Sode, ○Nozomu Yasutake (Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

【Key Words】 lyophilized enzyme, PQQ glucose dehydrogenase