

629

*Alcaligenes*属細菌A-6株のN-アシル-D-アスパラギン酸アミドヒドロラーゼの活性発現に關与するアミノ酸残基の検索

(大分大・工・応化) ○若山 守、山崎勇二、白水 輝、酒井謙二、森口充暲

[目的] *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6は、基質特異性の異なる3種類のN-アシル-D-アミノ酸アミドヒドロラーゼを誘導生産する。今回は、D-アスパラギン酸のN-アシル体に作用するN-アシル-D-アスパラギン酸アミドヒドロラーゼについて、3種類の酵素間で保存されているヒスチジン、グリシン、セリン残基の役割を検討した。
[方法と結果] 3種類の酵素のアミノ酸配列中に保存されているHis⁷²-X-His⁷⁴の72番目のHis⁷²をAsnに置換した変異酵素、及びGly¹⁹⁰-X-Ser¹⁹²-X-GlyのGly¹⁹⁰とSer¹⁹²をAsnに置換した変異酵素を、pET-23d(+)をベクターとして発現させた。変異酵素H72N、G190A、S192Aは、すべて野生酵素の1%以下の活性しか示さなかった。次に、活性の極度に低下あるいは消失した変異酵素を迅速かつ簡便に取得するために、本酵素遺伝子をグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子の下流に連結した融合タンパク質発現プラスミドを構築した。現在、融合タンパク質として発現した野生及び各変異酵素の諸性質について検討している。

Amino acid residues involved in catalysis of N-acyl-D-aspartate amidohydrolase from *Alcaligenes* A-6.

○Mamoru Wakayama, Yuji Yamasaki, Akira Shiramizu, Kenji Sakai, and Mitsuaki Moriguchi (Dept. Applied Chemistry, Oita Univ.)

[Key Words] N-acyl-D-aspartate amidohydrolase, fusion protein, glutathione S-transferase

630

新規ピューロマイシン不活化酵素の精製と諸性質

(宇部高専・物質、* 広大・医・薬)

○西村基弘、中村明子、松尾裕彰*、杉山政則*

【目的】 ピューロマイシン(PM)生産菌*Streptomyces alboniger*におけるPM不活化機構は、アセチル化酵素によるO-メチルチロシン残基中のアミノ基のアセチル化であることが知られている。ところが、最近、我々はブラスチジジンS生産菌*S. morookaensis* JCM4673株が、PMのアミノヌクレオシドとO-メチルチロシン間のアミド結合を切断する酵素を産生することを明らかにした。今回は、JCM4673株の無細胞抽出液より本酵素を精製し、その諸性質を検討した。

【方法及び結果】 本菌株の無細胞抽出液について、硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過などを行い、電気泳動的に単一の酵素標品を得た。精製酵素は、SDS-PAGE及びゲルろ過法により分子量約70,000のモノマーで、等電点は6.4であった。反応の至適温度は55℃、至適pHは7.5-8.0であり、pH6.5-8.0で比較的安定であった。本酵素は、DTTにより活性化されるが、Zn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、N-bromosuccinimideなどで強く阻害された。本酵素がアミド結合を切断することから、当初プロテアーゼとしての可能性が考えられたが、カゼイン、BSA、ヘモグロビン等のタンパクに対する分解活性は認められなかった。

Purification and characterization of the puromycin-inactivating enzyme from *S. morookaensis*.

○Motohiro Nishimura, Akiko Nakamura (Dept. Biotechnol., Ube Natl. Coll. of Tech.),

Hiroaki Matsuo and Masanori Sugiyama (Inst. of Pharm. Sci., Hiroshima Univ. School of Medicine.)

[Key Words] puromycin, blasticidin S, amidohydrolase, *Streptomyces morookaensis*.