

**576 CoA, ATP 非存在下における N- ミリスチルペプチドの酵素合成**

○東 雅之, 城本崇広, 五十嵐幸一, 大嶋 寛 (阪市大院・工)

【目的】蛋白質の脂質修飾の一つである N 末端グリシンのミリスチル化反応は、蛋白質の膜局在性や活性制御に関与することが知られている。またその反応は抗癌剤や抗ウイルス剤のターゲットとしても注目されている。ミリスチル化反応はアシル CoA 合成酵素および N- ミリスチル転移酵素によって行われ、CoA 化合物及び ATP が反応に必要とされる。我々は CoA 化合物及び ATP 非存在下で、オクタペプチド (N 末端にグリシン残基を持つ) とミリスチン酸からミリスチルペプチド合成を触媒する酵素を *Pseudomonas aeruginosa* の菌体破砕液から見出し以前に報告した。その後、酵素の精製を進め、精製標品の N 末端配列を決定し、その情報をもとに遺伝子取得を試みており、今回はこれらの内容について報告する。【方法及び結果】酵素反応は 40°C でミリスチン酸及びオクタペプチド (GNAAAARR) を含む 25mM のホウ酸緩衝液 (pH9) で行い、反応後 TCA を加え除蛋白した後、反応産物を HPLC で分析することにより活性を測定した。*Pseudomonas aeruginosa* OCU169 株の菌体破砕液からイオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィーにより酵素の精製を行った。精製標品が SDS-PAGE による解析でほぼ単一バンドであることを確認した後、目的のバンドを回収し、N 末端アミノ酸配列の決定を行った。N 末端および N 末端から 10 番目のアミノ酸は解読できなかったが、それ以外の 10 アミノ酸の情報が見られ、その情報をもとに *Pseudomonas aeruginosa* の遺伝情報を用いて検索を行った。その結果、機能が未知である遺伝子の産物と精製標品のアミノ酸配列が一致した。現在 *Pseudomonas aeruginosa* から遺伝子をクローニングし、大腸菌での大量発現を試みている。

**Enzymatic synthesis of a N-myristoyl peptide, independently of ATP and coenzyme A**

○ Masayuki Azuma, Takahiro Jyomoto, Koichi Igarashi, Hiroshi Ooshima (Dept. Appl. BioAppl. Chem., Osaka City Univ.)

**Key words** myristoylation, N-myristoyl transferase, *Pseudomonas aeruginosa*, acylation, myristoyl Peptide

**578 ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を用いたマイクロカプセルの生産 (1)**

○本間 務, 古崎真也, 野本 毅, 須川悦子, 矢野哲哉 (キヤノン・中央研)

【目的】マイクロカプセル、すなわち、コアとなる物質とそれを被覆する被膜とからなるミクロンサイズの微粒子は、粉体物性・徐放性・機能性の制御などの観点から様々な分野で注目されており、例えば、医薬・農薬等を内包した徐放性薬剤や、染料・顔料等を内包したマイクロカプセル化色材などが開発されている。本研究では、従来のマイクロカプセル化法と比較して簡便でかつ環境負荷の少ない新たなマイクロカプセル生産法の開発を目指して、微生物産生ポリエステルの 1 種であるポリ (3- ヒドロキシ酪酸) (PHB) の合成酵素を用いたマイクロカプセル生産の可能性を検証した。【方法及び結果】*Burkholderia cepacia* KK01 株由来の PHB 合成酵素遺伝子 (*phbC*) を大腸菌で発現させて PHB 合成酵素 (PhbC) を得た。これをコア物質のモデルとしてのセファロース担体微粒子の表面に固定化し、緩衝液中で 3- ヒドロキシブチリル CoA と反応させた。この反応液から微粒子を回収し電子顕微鏡で観察した結果、セファロース担体微粒子を覆う被膜の存在が確認された。さらにこの微粒子をナイルブルー A で染色し蛍光顕微鏡で観察した結果、セファロース担体微粒子が蛍光を発したことから、前記被膜が PHB であることが示唆された。また顔料微粒子 (銅フタロシアニン、カーボンブラック) をコアとして同様の反応を試みた結果、PHB の被膜の形成が確認された。

**Production of microcapsules by using poly(hydroxyalkanoic acid) synthase (1)**

○ Tsutomu Honma, Shinya Kozaki, Tsuyoshi Nomoto, Etsuko Sugawa, Tetsuya Yano (Canon Inc.)

**Key words** マイクロカプセル, PHB, 合成酵素

**577 W/O 反応系でのドコサヘキサエン酸含有ホスファチジルセリンの酵素合成**

○西川政吾<sup>1</sup>, 南部宏暢<sup>2</sup>, Juneja Lekh Raj<sup>2</sup>, 岩崎雄吾<sup>1</sup>, 山根恒夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>太陽化学)

【目的】ホスファチジルセリン (PS) は、アルツハイマー病や痴呆症患者に対する学習能力改善などの効果があるとされ、機能性食品素材として注目されている。一方、ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、生理作用として学習能・網膜反射能の向上など多くが報告されている。ホスホリパーゼ D (PLD) を用いたホスファチジル基転移反応により、本研究では DHA 含有レシチンからの DHA 含有 PS の合成を目的とした。その際、有機溶媒の使用をさけるため乳化剤としてリシノール酸を用いた W/O エマルション系での反応を検討した。【方法及び結果】基質には DHA を約 13% 含有した DHA 高含有レシチンを用いた。このレシチンをセリンと混合し PLD を作用させただけでは、あまり反応は進行しなかった。一方、レシチンをエマルション形成のための乳化剤であるリシノール酸とよく混合してから反応を行うと、反応率が劇的に向上することを見出した。この W/O 反応系において種々の反応条件を最適化した結果、基質反応率を約 90% まで高め、合成 PS 含量を約 80% まで高めることができた。また、生成した PS を回収し、その脂肪酸組成を調べた結果、DHA の組成は基質とほぼ変化せず、脂肪酸組成レベルを維持した反応を実現できた。

**Enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid containing phosphatidylserine in W/O emulsion system**

○ Seigo Nishikawa<sup>1</sup>, Hironobu Nanbu<sup>2</sup>, Lekh Raj Juneja<sup>2</sup>, Yugo Iwasaki<sup>1</sup>, Tsuneo Yamane<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Bio. Agro-Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Taiyo Kagaku Co., Ltd.)

**Key words** docosahexaenoic acid, phosphatidylserine, phospholipase D, transphosphatidylation, W/O emulsion system

**579 ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を用いたマイクロカプセルの生産 (2)**

○古崎真也, 本間 務, 野本 毅, 須川悦子, 矢野哲哉 (キヤノン・中央研)

【目的】我々は、ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を用いて、顔料などのミクロンサイズの微粒子をマイクロカプセル化する方法の開発を行っている。本講演では、このマイクロカプセルに機能性を付与することを目的として、顔料微粒子を PHB 以外の各種ポリヒドロキシアルカノエート (PHA) によって被覆した結果について報告する。【方法及び結果】*Pseudomonas cichorii* YN2 株由来の PHA 合成酵素遺伝子 (*phaC*) を大腸菌で発現させて PHA 合成酵素 (PhaC) を得た。これをサブミクロンから数ミクロンサイズの銅フタロシアニンおよびカーボンブラックの分散液中に添加し、4°C で数時間振とうすることで PhaC を各顔料微粒子に固定化した。この顔料微粒子を回収し、数回洗浄することで固定化されていない PhaC を除いた後、化学合成によって得た 3- ヒドロキシオクタノイル CoA、3- ヒドロキシ-5- フェニルバレリル CoA、3- ヒドロキシ-5- フェノキシバレリル CoA などの PhaC の基質モノマーを各々添加した。30°C で数十時間反応させた後、顔料微粒子をナイルブルー A で染色し、蛍光顕微鏡で観察したところ、顔料微粒子が蛍光を発することが確認され、本方法によって顔料微粒子が各種 PHA によって被覆されることが示された。

**Production of microcapsules by using poly(hydroxyalkanoic acid) synthase (2)**

○ Shinya Kozaki, Tsutomu Honma, Tsuyoshi Nomoto, Etsuko Sugawa, Tetsuya Yano (Canon Inc.)

**Key words** マイクロカプセル, PHA, 合成酵素