

3B10-3 タンパク質間電子伝達系を必要とする酸化還元酵素の特異反応場での機能化

○道添 純二¹, 一瀬 博文², 丸山 達生¹, 神谷 典徳¹, 後藤 雅宏³
(¹ 九大院・工・応化, ² 科技団さがけ研究 21, ³ 九大院・工・応化, 科技団さがけ研究 21)

【目的】現在問題となっている環境汚染物質の酵素分解には初発の反応として酸素添加反応が主に必要となっている。この酸素添加反応を行うシトクロム P450 は、3 つの異なるタンパク質成分間の分子間電子移動が必要な複合タンパク質系であるために、生体外での再構築は困難とされてきた。そこで本研究では、このシトクロム P450 システムを有機溶媒のような特異反応場で再構築することを試みた。

【実験】酵素は *Pseudomonas putida* 由来のシトクロム P450cam を用いた。数種類の界面活性剤テトラエチレングリコールデシルエーテルをそれぞれ有機溶媒に溶解させ、100mM の KCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に酵素を溶解させ、二相を高速攪拌することで酵素を内水相に包括した W/O エマルションを形成した。基質には 2mM カンファーを用い、基質の減少と反応生成物の増加を GC-MS により測定した。

【結果および考察】数種類の界面活性剤を用いて W/O エマルションを形成した結果、テトラエチレングリコールデシルエーテルを用いた場合に、最も安定した W/O エマルションを調製でき、シトクロム P450cam によるカンファーの水酸化反応が進行することが明らかとなった。発表では、より安定な W/O エマルションを調製するための界面活性剤の種類・濃度の影響や、酵素活性に影響を及ぼす因子などについて報告する。

Functionalization of Cytochrome P450 System in organic Media

○ Junji Michizoe¹, Hirofumi Ichinose², Tatsuo Maruyama¹, Noriho Kamiya¹, Masahiro Goto³
(¹Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ., ²JST PRESTO, ³Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ., JST PRESTO)

Key words 電子伝達, シトクロム P450, 有機溶媒

3B10-5 逆ミセルを用いたインクルージョンボディのリフォールディング

○河嶋 優美¹, 迫野 昌文², 一瀬 博文¹, 神谷 典徳², 後藤 雅宏^{1, 2}
(¹ 科技団さがけ研究 21, ² 九大院・工・応化)

【目的】変性状態のタンパク質が生物活性を回復するためには、リフォールディング操作によるタンパク質本来の高次構造の再生が必要である。本研究では再生媒体として、ナノ分子集合体逆ミセルを用いた。逆ミセル中には界面活性剤により有機溶媒から保護された water pool と呼ばれるナノメートルスケールの内核水相が存在する。この、逆ミセルの内水相に保持されたタンパク質は個々に隔離され、タンパク質同士の再凝集を防ぐことができる。リフォールディング対象として、大腸菌を宿主細胞として RNase A (from bovine pancreas) を大量発現し、その際にインクルージョンボディとして回収された RNase A を用いた。本研究は逆ミセルを用いて実際のインクルージョンボディを再生した初めての例である。

【結果及び考察】RNase A 封入体を用いて、逆ミセル法によるリフォールディングを行った。その結果、RNase A 封入体は 24 時間以内に活性を完全に回復することが明らかとなった。一方で、希釈法によるリフォールディングでは、明らかな凝集体の形成が目視で確認でき、最大再生率は約 40% であった。このことから、タンパク質を逆ミセルの孤立ナノ空間へ単離することにより、タンパク質間の相互作用を効果的に抑制し、希釈法に比べて高い再生率に達することが明らかとなった。

Protein Refolding of Inclusionbody by Reversed Micelles

○ Yuumi Kawashima¹, Masahumi Sakono², Hirohumi Ichinose¹, Noriho Kamiya¹, Masahiro Goto^{1, 2}
(PRESTO, JST, ²Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ.)

Key words refolding, protein, reversed micelles, RNase A, inclusionbody

3B10-4 非水媒体中における共役酵素系を利用した多段反応システムの構築

○一瀬 博文¹, 道添 純二², 丸山 達生², 神谷 典徳², 後藤 雅宏^{1, 2}
(¹ 科技団・さがけ研究 21, ² 九大院・工・応化)

【目的】逆ミセルは、水-界面活性剤-有機溶媒により形成されるナノ分子集合体である。我々は、逆ミセルを用いることで種々の生体分子が有機溶媒中で機能発現することをこれまでに示してきた。有機溶媒中における酵素反応は難水溶性化合物の効率的な物質変換を可能にすることから、種々の分野への応用が期待される。また、有機溶媒中において生体触媒を利用した多段反応系の構築により、さらに複雑多岐にわたる物質変換を工業レベルで可能にすると考えられる。本研究では、逆ミセルを利用して過酸化水素供給系に共役したペルオキシダーゼ反応について検討した。

【方法および結果】逆ミセルは Aerosol-OT (AOT) を溶解したイソオクタン中に酵素溶液を微量注入して調製した。ペルオキシダーゼ (HRP)、アルコールオキシダーゼ (AOX) およびグルコースオキシダーゼ (GOX) は市販品を用いた。

HRP および AOX を溶解した逆ミセル溶液に種々のアルコールを添加したところ 2,6-ジメトキシフェノール (2,6-DMP) の酸化反応が進行した。2,6-DMP 酸化活性は HRP および AOX 濃度に依存していた。また、HRP および GOX を溶解したイソオクタン/AOT 逆ミセル溶液中においてグルコースに依存した 2,6-DMP 酸化反応が進行した。これらの結果は、HRP/AOX/GOX が逆ミセル中で機能発現し、過酸化水素供給系に共役したペルオキシダーゼ反応が可能であることを示した。現在、至適反応条件の検討を急いでいる。

Multiple chemical transformations catalyzed by hybrid-enzyme system in non-aqueous media

○ Hirofumi Ichinose¹, Junji Michizoe², Tatsuo Maruyama², Noriho Kamiya², Masahiro Goto^{1, 2}
(PRESTO, JST, ²Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ.)

Key words 逆ミセル, 共役酵素系, ペルオキシダーゼ

3B11-1 新規分子集合体による変性 CAB のリフォールディング

○迫野 昌文¹, 神谷 典徳¹, 後藤 雅宏^{1, 2}
(¹ 九大院・工・応化, ² 科技団さがけ研究 21)

【目的】変性タンパク質のリフォールディングにおいて、タンパク質再生中に生じるタンパク質凝集体を効果的に防ぐ事が重要となる。凝集抑制方法として様々な手法が検討されているが、ナノ分子集合体逆ミセルを用いた方法は特に効果的である。逆ミセルは界面活性剤、有機溶媒と微量水からなるナノスケールの分子集合体であり、その中心核に水滴空間を有している。この水滴空間は界面活性剤により保護されており、変性タンパク質の溶解した水相と隔離されている。このことより、逆ミセルはタンパク質間の相互作用を抑制し、効果的なリフォールディング場となる。本研究では、これまでに逆ミセル場として詳細な検討を行ってきたアニオン性界面活性剤 di-2-ethylhexylsulfosuccinate sodium salt (AOT) に代わり、非イオン性界面活性剤 tetraethylene glycol dodecyl ether を用いて新規分子集合体を調製し、変性 carbonic anhydrase B (CAB) に対するリフォールディング効果を検討した。

【方法及び結果】非イオン性界面活性剤 tetraethylene glycol dodecyl ether をイソオクタン溶液に溶解し、更に適量の水を添加することで分子集合体を形成した。この溶液に変性 CAB 溶液を添加することでリフォールディング反応を開始した。一定時間のインキュベーションの後、1M の KCl を含む回収水相と接触し、CAB を回収した。CAB の活性測定を行ったところ、CAB は効果的に再生をしており、非イオン性界面活性剤により調整した分子集合体は良好なリフォールディング場であることを明らかにした。

Protein Refolding of Denatured CAB by Novel Molecular Assembly

○ Masafumi Sakono¹, Noriho Kamiya¹, Masahiro Goto^{1, 2}
(¹Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ., ²JST, PRESTO)

Key words refolding, protein, reversed micelles, carbonic anhydrase B