

2B09-5 ラン藻 *Nostoc* sp. PCC 7120 由来 phytochelatine 合成酵素の機能解析

○浦田 賢¹, 辻 直城¹, 堀 泰久¹, 中西 拓也¹,
平田 収正¹, 宮坂 均², 高木 昌宏³, 宮本 和久¹
(¹ 阪大院・薬・環境, ² 関電・総研, ³ 北陸先端・材料)

【目的】Phytochelatine (PC) は、高等植物、藻類、酵母などにおいて重金属無毒化を担っている重金属抱合ペプチドである。我々は、これまでに原核生物であるラン藻 *Nostoc* sp. PCC 7120 において PC 合成酵素遺伝子と相同性の高い配列 (ahr0975) が存在することを確認し、本遺伝子がコードするタンパク (NsPCS) が PC 合成酵素活性を有することを明らかにした。今回は、NsPCS の機能を真核生物由来の PC 合成酵素と比較、解析するとともに、PC 合成反応機構について考察を行った。

【方法および結果】NsPCS を用いて、PC 合成活性を調べた結果、高等植物の PC 合成酵素が担う第一段階目の反応である GSH からの γ -glutamylcysteine (γ -EC) の生成を強く触媒するが、第二段階目の反応である γ -EC 重合による PC の生成については非常に弱い活性しか認められなかった。また、NsPCS に存在するシステイン残基をセリン残基に置換した変異体を作製し、その機能について解析を行った。その結果、60 番目のシステイン残基を置換した変異体において、PC 合成活性が消失した。したがって、このシステイン残基は触媒反応に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Characterization of novel phytochelatine synthase derived from cyanobacterium, *Nostoc* sp. PCC 7120

○Masaru URATA¹, Naoki TSUJ², Yasuhisa HORI², Takuya NAKANISHI², Kazumasa HIRATA², Hitoshi MIYASAKA³, Masahiro TAKAGI⁴, Kazuhisa MIYAMOTO²
(¹ Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ² Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ³ Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ⁴ KEP Co., Inc., ⁵ Sch. Materials Sci., JAIST)

Key words phytochelatine, phytochelatine synthase, cyanobacteria

2B10-2 麹菌のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子の発現と硝酸代謝との関連性

赤沢 真一, ○桑原 綾子, 吉田 信行, 桂樹 徹,
谷 吉樹
(奈良先端大・バイオ)

【目的】我々の研究室ではフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD) の生理学的役割を研究している。これまでに *Aspergillus oryzae* RIB40 株において 2 種の FAOD アイソザイム遺伝子 (*FAOa1*, *FAOa2*) を見出し、破壊株の作成及び表現型の比較、検討を行った。その結果、*FAOa2* はアマドリ化合物であるフルクトシルバリン (Fru-Val) の代謝に必須であり、Fru-Val の代謝はアンモニウムリプレッションを受けず、また Fru-Val により亜硝酸の代謝が抑制されることが示唆された¹⁾。そこで FAOD と窒素代謝の関連を明らかにするため、本研究では *A. oryzae* における *FAOa1*、*FAOa2*、および硝酸代謝関連酵素遺伝子の発現解析を行った。

【方法・結果】ノザン解析の結果、*A. oryzae* RIB40 株においてグルコース、硝酸から成る最少培地で培養したところ、*FAOa1*、*FAOa2* の発現は見られなかった。一方 Fru-Val、硝酸からなる最少培地では *FAOa1* と *FAOa2* の発現は見られたが硝酸レダクターゼ遺伝子 (*niaD*) の発現は抑制されることが明らかとなり、Fru-Val による硝酸代謝の抑制が示唆された。さらに *FAOa1* について検討したところ、*niaD* 株において Fru-Val 存在下では *FAOa1* の発現が見られるのに対し、 Δ *faoA2* 株ではその発現は見られなかった。

1) 赤沢ら: 日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集, p. 115

Gene expression of fructosyl-amino acid oxidase genes and nitrate metabolism in *Aspergillus oryzae*

Shin-ichi AKAZAWA, ○Ayako KUWAHARA, Nobuyuki YOSHIDA, Tohoru KATSURAGI, Yoshiaki TANI
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Aspergillus oryzae*, fructosyl-amino acid oxidase, isozyme, nitrate metabolism

2B10-1 トランスグルタミナーゼによるミオグロビンの部位特異的二量化

○神谷 典穂¹, 高澤 健², 鈴木 勉², 長棟 輝行²
(¹ 九大院・工・応化, ² 東大院・工・化学生命)

緒言 我々はこれまで、トランスグルタミナーゼのタンパク質翻訳後修飾機能を利用した対象タンパク質の N あるいは C 末端特異的架橋化について検討を進めてきた。本研究では、ループ領域特異的なタンパク質架橋化について報告する。

実験 微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) は味の素 (株) より提供頂いたものを、定法に従い精製して使用した。馬心筋由来のミオグロビンは Sigma 社より購入し、2-ブタノン法によりヘムを取り除くことでアポミオグロビンを調製した。

結果及び考察 モデルタンパク質として使用したミオグロビンは、天然状態では MTG の基質にはならないが、ヘムが脱離したアポミオグロビンは MTG の基質となり、主生成物として二量体 (アポミオグロビンダイマー) を選択的に与えた。架橋化サイトの同定のため、MTG を利用してアポミオグロビンを小分子ブローブによりラベル化した。ラベル化アポミオグロビンの LC-MS/MS による質量分析の結果から、そのループ領域に架橋化サイトが存在することが明らかとなった。また、得られたアポミオグロビンダイマーはヘム結合能を保持していたことから、MTG を利用することで、対象タンパク質の基本性能を維持したループ領域特異的な架橋化が可能ながことが示唆された。

Functional dimerization of myoglobin catalyzed by transglutaminase

○Noriho KAMIYA¹, Takeshi TAKAZAWA², Tsutomu SUZUKI², Teruyuki NAGAMUNE²
(¹ Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ., ² Dept. Chem. Biotech., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words cross-linking, loop region, protein conjugation, transglutaminase

2B10-3 DCS 生産菌 *Streptomyces lavendulae* の PTPase 遺伝子 — そのクローニングと機能解析 —

○南 文乃, 熊谷 孝則, 的場 康幸, 捻橋 久美,
杉山 政則
(広島大院・医歯薬学総合研究科)

【目的】放線菌は、糸状菌のような形態分化を示し、かつ、抗生物質を始めとする二次代謝産物を産生することで有名である。近年、放線菌の形態分化と二次代謝産物産生の調節にタンパク質のリン酸化が関わっているとの例がいくつこ報告されるようになってきた。それに関連して、phosphotyrosine protein phosphatase (PTPase) をコードする遺伝子 (*ptpA*) が *S. coelicolor* A3(2) からクローニングされたが¹、その生理学的機能は不明のままである。本研究では、D-cycloserine (DCS) 生産菌 *S. lavendulae* から PTPase をコードする遺伝子をクローニングし、その遺伝子産物の機能解析を目的としている。

【方法及び結果】*S. coelicolor* A3(2) の *ptpA* をブローブとして用い、DCS 産生株 *S. lavendulae* ATCC25233 の染色体 DNA から *ptpA* に相補的な領域を含む 4.0 kb の *Pst*I 消化 DNA 断片を得た。シーケンエンスの結果、4.0 kb フラグメントには 504 bp からなる PTPase 遺伝子 (*ptpB* と命名) が存在していた。*ptpB* 遺伝子産物 (PtpB) のアミノ酸配列は、*S. coelicolor* の PtpA と 72.9% の相同性を示した。PtpB の機能を解析するため、PtpB を C 末端ヒスチンタグ付きタンパク質として大腸菌にて大量発現させた後、単一タンパク質まで精製した。得られた PtpB は、p-nitrophenyl phosphate を基質として脱リン酸化活性を示すと同時に、o-phosphotyrosine に対しても活性を示した。現在、PtpB の基質となるタンパク質を調査している。

Cloning and characterization of a PTPase gene (*ptpB*) from *Streptomyces lavendulae*

○Fumino MINAMI, Takanori KUMAGAI, Yasuyuki MATOBA, Kumi NEJIIHASHI, Masanori SUGIYAMA
(Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words D-cycloserine, phosphotyrosine protein phosphatase, *Streptomyces lavendulae*