

2H15-4 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 存在下におけるタンパク質のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

○木城 きくか, 吉武 朋彦, 小林 伸太郎, 小川 哲朗, 奥山 典生 (ペンタックス株式会社)

はじめに 水や緩衝液などに対して不溶性のタンパク質を可溶化するためには、尿素や塩酸グアニジン、各種の界面活性剤などが用いられる。特に、塩酸グアニジンやSDS (Sodium dodecyl sulfate) などのイオン性の界面活性剤は、可溶化能力は高いがイオン交換クロマトグラフィーでの分離が困難とされている。本研究では、陰イオン界面活性剤であるSDSを用いてタンパク質を変性させ、SDS-complexタンパク質のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行い、ハイドロキシアパタイトカラムの新しい有用性を見出すことを目的とした。方法 ハイドロキシアパタイト：粒子径40 μm (CHT: PENTAX) をステンレス管 (4.0 I.D. × 100mm: 杉山商事) に充填したカラムを用いた。サンプルは、各水溶性タンパク質 (5mg/mlあるいは10mg/ml) を1%SDS (3.47mM) に変性、可溶化したものを用いた。クロマトグラフィーの溶離条件は、リン酸緩衝液の濃度勾配で溶出する方法とした。リン酸緩衝液にSDSを添加した場合の溶離パターンとも比較した。

結果および考察 1%SDSに変性、可溶化したタンパク質を0.1%SDSを含むリン酸緩衝液でアパタイトクロマトグラフィーを行った。結果、通常のアパタイトクロマトグラフィーの溶出パターンと異なり、分子量に従って保持時間が長くなり、分子量と保持時間との間に相関関係があった。SDS系アパタイトクロマトグラフィーでは、タンパク質をSDS複合体にすることで、分子量の違いから分離できる可能性が示唆された。

Hydroxyapatite Chromatography in the presence of Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)

○Kikuka KISHIRO, Tomohiko YOSHITAKE, Shintarou KOBAYASHI, Tetsurou OGAWA, Tsuneo OKUYAMA (PENTAX Corporation)

Key words hydroxyapatite, SDS, chromatography

2H16-1 好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来の耐熱性ラッカーゼ

ポスター
発表あり

○宮崎 健太郎 (産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門)

ラッカーゼはフェノールの酸化的重合反応を触媒するマルチ銅オキシダーゼの一種であり、広い基質特異性から産業上さまざまな場面での利用が期待されている。従来ラッカーゼはカビを由来とした酵素の研究が中心であったが、近年、原核生物にもその存在が指摘され、大腸菌 *CueO*、枯草菌 *CotA* など、ラッカーゼ様酵素の報告が相次いでおり、カビ由来酵素とは異なった酵素学的性質を有することがわかってきている。発表者は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 のゲノム配列にラッカーゼ様酵素の配列を見出した。そこで、銅を含んだ培地で好熱菌を培養した結果、菌体内にラッカーゼ様酵素の活性を検出した。カラムクロマトグラフィーにより部分精製した蛋白質の Mass Fit Fingerprinting により、本酵素が TTC1370であることが判明した。また同時に本酵素が分泌蛋白質であることが判明した。次に該遺伝子の成熟蛋白質領域をコードする遺伝子をPCRにより増幅し、増幅断片をpETベクターに連結し発現プラスミドを構築した。定法に従い酵素遺伝子を発現し、粗酵素抽出液より加熱処理、カラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に均一な標品を得た。組換え酵素はラッカーゼに特有の青色を呈し、銅イオンの存在下で ABTS、シリンガルダジン、グアイアコール、2,6-ジメトキシフェノール等の基質を高温条件で効率的に酸化した。酵素活性の最適温度は90℃以上、80℃での酵素活性失活の半減期は14時間以上であり、従来にない非常に耐熱性の高い酵素であった。

A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27

○Kentaro MIYAZAKI (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Key words laccase, thermophile, thermostability

2H15-5 *Bacillus subtilis* CotA のビリルビンオキシダーゼ活性

○酒瀬川 信一¹, 石川 英彦¹, 今村 茂行¹, 櫻庭 春彦², 郷田 秀一郎², 大島 敏久² (¹旭化成ファーマ株式会社, ²徳島大・工・生物工)

B. subtilis の内孢子構成成分 CotA はラッカーゼとして報告されている。今回、我々はCotAが高いビリルビンオキシダーゼ活性をもつことを見いだしたので報告する。大腸菌で発現したビリルビンオキシダーゼは37度、pH 7.0における見かけのKmとVmaxが、それぞれ8 μM、28 μmol/min/mgであった。また、65度1時間熱処理して全く失活せず、これまでに報告されているビリルビンオキシダーゼに比べ、極めて高い特異性と高い熱安定性を有することが分かった。また、本酵素を用いて血清中総ビリルビン測定試薬を調整し血清検体70サンプルを測定したところ、市販の血清中総ビリルビン測定試薬を用いた測定値と高い相関を示した。以上より、本酵素は診断薬用酵素として高い有用性があることが示された。本報告は、バクテリア由来ビリルビンオキシダーゼの初めての報告である。

Bilirubin oxidase activity of *Bacillus subtilis* CotA

○Shinichi SAKASEGAWA¹, Hidehiko ISHIKAWA¹, Shigeyuki IMAMURA¹, Haruhiko SAKURABA², Shuichiro GODA², Toshihisa OHSHIMA² (¹Asahi Kasei Pharma Corporation, ²Dept. Biol. Sci. Tech., Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Key words CotA, bilirubin oxidase, *Bacillus subtilis*

2H16-2 養殖魚の糖化蛋白質センシングシステムの開発

津川 若子¹, 青柳 稔¹, 早出 広司¹, 塩谷 格² (¹東京農工大・工・生命工, ²日水中研)

【目的】生体内では血糖であるグルコースと血液中の蛋白質のアミノ基とのメイラード反応によって糖化蛋白質が生成する。血液中の蛋白質の糖化の割合は過去の血糖値を反映するため、糖尿病患者の血糖コントロール指標とされている。人間に限らずイヌ、ネコでも血清中の糖化蛋白質の総称であるフルクトサミンが糖尿病の血糖コントロール指標とされているが魚類における糖化蛋白質に関する知見はなく、測定法に関しても報告はない。これまでに我々は、養殖魚の血中に糖化蛋白質が存在することを確認している。そこで本研究では、養殖魚の血中における糖化蛋白質の新規なセンシングシステムの開発を目的とした。【方法】養殖ハマチ血清に対し蛋白質濃度はLowry法、フルクトサミン濃度はアルカリNBT法にそれぞれ基づき測定を行った。また、血清をボロン酸アフィニティクロマトグラフィーを用いて分画し、蛋白質全量に対するフルクトサミンの量を求めた。【結果】ハマチ血清中の蛋白質当たりのフルクトサミンは平均3.3 μmol/gであり、健康なヒトと同レベルだった。また、魚血清のボロン酸アフィニティクロマトグラフィー吸着画分における蛋白質当たりのフルクトサミン値は、非吸着画分の約3倍高値であった。これらのことからハマチ血清中には糖化蛋白質が存在すると考えられた。本結果は養殖魚の健康管理に糖化蛋白質を新たな指標とできることを示している。酵素を用いた新規な糖化蛋白質センシングシステムについてもあわせて報告する。

Measurement of glycated protein in cultured fish

Wakako TSUGAWA¹, Minoru AOYAGI¹, Koji SODE¹, Itaru SHIOYA² (¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Central Research Laboratories, Nippon Suisan Ltd.)

Key words fructosamine, measurement, fish, enzyme sensor