

3F10-4 異種ホスホリラーゼを組み合わせたβ型配糖体の新規合成プロセスの開発

○佐竹 遼子, 森松 孝之, 倉都 頌子, 桐村 光太郎, 木野 邦器
(早大・理工・応化)

【目的】配糖体は自然界に広く存在し、生理活性を示すものも多い。また、配糖化することにより溶解性や構造安定性の向上が期待される。工業的に有用なβ-グルコシドを効率的に合成するために、セロビオースホスホリラーゼ(CPase)に着目した。CPaseにβ-グルコシド合成活性を見出したが、高価なセロビオースを糖質原料として用いる点が課題であった。本研究では、安価な糖供与体からβ-グルコシドを合成する新規な反応プロセスの構築を目指した。【方法及び結果】我々は既にスクロースホスホリラーゼ(SPase)を用いるα-グルコシド合成を報告しているが、反応機構の異なるCPaseを組み合わせるにより、スクロースからβ-グルコシドが合成されると予想した。α-グルコシド生成を抑制するために配糖化活性の低いSPaseとして、*Pseudomonas saccharophila* IAM 14368¹由来のSPase遺伝子をクロニングし、His-Tag融合タンパク質として大腸菌で高発現させた。当該SPaseと*Clostridium thermocellum* YM4由来のCPase¹⁾の精製酵素を組み合わせて、スクロースと脂肪族アルコールからβ-グルコシドを一段階で合成する反応プロセスを確立した。反応条件を検討し、最適条件下でメタノールから供与スクロース当たり34%のモル変換効率でMethyl O-β-D-glucopyranosideの合成に成功した。

1) Kitaoka, M. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66 (12), 2578-2586.

Development of a Novel Process for beta-Glucoside Synthesis Using Sucrose Phosphorylase and Cellobiose Phosphorylase

○Ryoko SATAKE, Takayuki MORIMATSU, Shoko KURATSU,
Kohtaro KIRIMURA, Kuniti KINO
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words cellobiose phosphorylase, sucrose phosphorylase, beta-glucoside

3F10-5 *Bacillus* 由来配糖化酵素を用いたカテコールアミン配糖体の合成

○知久 和寛, 篠山 浩文, 天知 誠吾, 藤井 貴明
(千葉大院・自科)

【目的】スズメバネより単離した*Bacillus subtilis* KT12株は高いカテコール配糖化活性を有する糖質分解酵素を構成的に産生することを報告した(1)。一方、カテコールアミンであるL-DOPAはパーキンソン病の症状を劇的に改善させることが報告されている。しかし、難水溶性、大量摂取による消化器や循環器への副作用を引き起こすことが問題となっていた。そこで本研究では水溶性の増大、毒性低減などが見込めるL-DOPA配糖体の合成を試みた。【方法】配糖体の合成は、L字管に供与体5.0%、受容体5.0%を加えて、酢酸塩緩衝液(pH 5.0)に溶解させた後、酵素溶液を加え、30℃、24時間反応を行った。反応後、それぞれの配糖体の生成をTLCによって確認し、発色試薬としてニンヒドリンを用いた。【結果】L-DOPA配糖体合成について検討したところ、キシラン、デンプンを供与体としたそれぞれにおいて、複数のL-DOPA配糖体の合成が示唆された。さらに活性炭やイオン交換樹脂を用いた精製を試みたところ、TLCにおいて単一標品が得られ、現在構造解析を行っている。また、その他のカテコールアミンを受容体とした配糖体合成についても検討を進めている。(1) 知久和寛, 篠山浩文, 天知誠吾, 藤井貴明, 平成17年度生物工学会大会, P.170

Synthesis of catecholamine glycosides by transglycosylation of L-DOPA with carbohydrate degrading enzymes

○Kazuhiro CHIKU, Hirohumi SHINOYAMA, Seigo AMACHI,
Takaaki FUJII
(Grad. S. Sci. Tech., Chiba Univ.)

Key words Catecholamine, Transglycosylation, L-DOPA, *Bacillus subtilis*

3F11-1 6-アミノカプロン酸環状2量体加水分解酵素(EI)のX線結晶構造解析

安平 健吾¹, 柴田 直樹², 門上 剛¹, 上藤 由貴¹,
樋口 芳樹², 加藤 太郎¹, 武尾 正弘¹, 根来 誠司¹
(¹兵庫大院・工・物質, ²兵庫大院・生命理)

【目的】*Arthrobacter* sp. KI72株は、3種の6-アミノカプロン酸オリゴマー(ナイロン工業副産物)分解酵素を保持しているが、直鎖状2量体分解酵素(EI/II')の立体構造は、既に解明した。本研究では、環状2量体分解酵素(EI)の触媒機構や分子進化の知見を得るため、同酵素のX線結晶構造解析を行った。【方法と結果】EI酵素を大腸菌で高発現させ、精製した。沈殿剤1.0 Mクエン酸ナトリウム/緩衝液100 mM イミダゾール(pH 8.6)の条件下で、六角柱の結晶が得られた。Spring-8及びPhoton Factoryのビームラインを使用し、ネイティブ結晶では分解能1.90 Å、水銀誘導体では2.06 Åまでの回折データを取得した。単波長異常分散法により位相決定し、初期モデルの構築を行った結果、EIの特徴として、i)11本のβストランドが少しずつ回転しながら連続して並んでいること、ii)このβシートの周りをαヘリックスが取り巻く構造であることが明らかになった。EIと構造類似性を示すタンパク質をDALIプログラムでPDBから検索したところ、malonamidase E2(MAE2), peptide amidase (Pam)の2例のみが、各々、Z-scoreが44.8、36.8で高かった。MAE2においては、Ser¹⁵⁵, cisSer¹³¹, Lys⁶²が触媒中心を構成しているが、EIでは、立体的に類似した位置にSer¹⁷⁴, cisSer¹⁵⁰, Lys⁷²が存在し、これらが触媒機能に重要であると推定できた。

3D-structural analysis of 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolyase(EI)

Kengo YASUHIRA¹, Naoki SHIBATA², Go MONGAMI¹,
Yuki UEDO¹, Yoshiaki HIGUCHI², Dai-ichiro KATO¹,
Masahiro TAKEO¹, Seiji NEGORO¹
(¹Grad. Sch. Eng. Univ. Hyogo, ²Grad. Sch. Life Sci. Univ. Hyogo)

Key words X-ray crystallography, 6-aminohexanoate-oligomer hydrolase

3F11-2 超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 7 由来 RNase HI の結晶構造解析

○劉 東周, 全 賢基, 古賀 雄一, 高野 和文, 金谷 茂則
(阪大院・工・生命先端)

リボヌクレアーゼ H (RNase H) は Mg²⁺ や Mn²⁺ などの二価金属イオン存在下で、RNA/DNA ハイブリッドのRNA鎖のみを塩基非特異的に加水分解し、5'-リン酸基と3'-水酸基を生じる酵素である。本酵素は細菌からヒトにいたるまであらゆる生物に存在する。RNase Hは一次構造の違いからType 1とType 2に分類される。しかしこれらの構造には共通モチーフが見られ、特に活性中心付近の構造は互いに良く似ている。超好熱古細菌(始原菌) *Sulfolobus tokodaii* 7由来RNase HI(Sto-RNase HI)はType 1 RNase Hである。しかし、基質結合に重要な塩基性突出部位がない、RNA/RNA二本鎖のRNAも分解する、などから、構造的機能的に逆転写酵素のドメインとして存在するレトロウィルスのRNase Hに似ている。本研究では、Sto-RNase HIのこのような特徴を立体構造の観点から理解することを目的として、Sto-RNase HIの結晶化及び結晶構造解析を行った。得られた結晶は、空間群 P4₃, 格子定数 a=b=39.21, c=91.15で、解像度は1.5 Åであった。また、Sto-RNase HIのSeMet置換体結晶を用いてX-線回折データを回収し、MAD法により位相を決定した。得られたデータをもとにプログラムO及びCNSを用いて分子モデルの構築及び構造精密化を行い最終的に1.6 ÅでのSto-RNase HIの構造を決定した(R_{free} factor 23%, R factor 19%)。決定したSto-RNase HIの立体構造と既知のRNase Hの構造と比較し、その機能及び構造的特徴について議論するつもりである。

Crystal structure of RNase HI from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* 7

○Dong-Ju YOU, Hyongi CHON, Yuichi KOGA, Kazufumi TAKANO,
Shigenori KANAYA
(Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

Key words ribonuclease HI