

2G09-3 枯草菌由来の胞子結合型ラッカーゼの発芽に伴う活性の変化

○廣瀬 遼, 有馬 里佳, 平川 哲, 横井 春比古  
(宮崎大・工・物質環境化)

【目的】枯草菌由来の胞子結合型ラッカーゼ(CotA)は、分子状酸素を電子受容体として種々のフェノール類を酸化する酵素であり、本酵素の胞子との結合が熱や振盪に対する安定性に寄与していることを既に明らかにしている。より高活性の胞子結合型ラッカーゼを得ることを最終目的として、枯草菌の胞子形成および発芽途中のラッカーゼ活性を経時的に調べた。【方法および結果】枯草菌 *Bacillus subtilis* NBRC16449の胞子をYP液体培地に接種した後37℃でインキュベートして、経時的にサンプリングした一部の試料から胞子および菌体を回収してラッカーゼ活性を測定した。接種から6時間後迄の発芽の過程で活性は上昇したが、その後急激に低下した。培養上清中のプロテアーゼ活性を同時に測定したところ、接種後6時間目以降の著しい活性の上昇が確認された。胞子結合型ラッカーゼは、胞子の発芽後に栄養細胞が生産する菌体外プロテアーゼによる分解を受けていることが示唆された。

Germination dependent change in the activity of spore-bound laccase from *Bacillus subtilis*

○Jun HIROSE, Rika ARIMA, Satoshi HIRAKAWA, Haruhiko YOKOI  
(Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Miyazaki Univ.)

**Key words** laccase, *Bacillus subtilis*, spore, protease

2G09-5 *Manihot esculenta* 由来 (S)-hydroxynitrile lyase の Lys 残基への変異導入による発現量上昇

山崎 瑞恵, ○浅野 泰久  
(富山県大工・生工研セ)

【目的】我々は酵素法による光学活性シアノヒドリンの合成を目的として (1)、*M. esculenta* 由来 (S)-HNL(MeHNL)遺伝子の大腸菌内での大量発現を検討して来た。これまでにコドンで大腸菌用に最適化し、転写効率向上に成功した(2)。しかしながら、MeHNLはまだ多くが封入体として不溶性画分に発現する。また、基質の benzaldehyde は反応阻害剤としても作用するため、発現レベルと aldehyde 耐性の向上を目指し、aldehyde が作用すると思われる Lys 残基に着目し変異導入を検討した。【方法と結果】MeHNLに含まれる Lys20 残基から他の (S)-HNL と相同性のある残基、β-シート上に位置する残基など、立体構造や基質特異性に影響を与えると予想される6残基を選出した。各残基に saturation mutagenesis を導入し、ハイスループットスクリーニングを行った結果、可溶性画分に得られる活性型酵素量が上昇する Lys を3残基見出した。これら Lys3 残基は全て Pro に置換されていることを確認した。aldehyde 耐性向上は認められなかったが、この Pro 置換は変異点を掛け合わせると更に効果を上昇させ、3残基への Pro 置換により発現レベルが約7倍に改善された。このような進化分子工学の手法により変異型酵素が取得でき、従来大腸菌では活性型としての発現が困難であった植物酵素 MeHNL を容易に調製することが可能になった (3)。(1) Y. Asano, et al, *BBB*, **69**, 2349 (2005)、(2) 2004年度日本農芸化学会大会、(3) 2005年度日本農芸化学会大会

Increase of expression level of (S)-hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by mutation in lysine residues

Mizue YAMAZAKI, ○Yasuhisa ASANO  
(Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

**Key words** hydroxynitrile lyase, *Manihot esculenta*, directed evolution, high throughput screening

2G09-4 複核金属型人工酵素リポソームのSOD-like活性の評価

小濱 雄司, タンル クオク, 島内 寿徳, ○馬越 大, 久保井 亮一  
(阪大院・基工)

酸化ストレスは不可避のストレスであり、Alzheimer 症を始めとする各種疾病に関与する事が知られている。Superoxide Dismutase(SOD)など、抗酸化酵素の活性中心をモデル化した各種の人工酵素が報告されている。これまで、Porphyrin 誘導体を修飾したリポソームを用いて原核細胞に見られる Mn-SOD 様活性のある人工酵素リポソームについて報告されている。本研究では、真核細胞に多く見られる Cu,Zn-SOD を対象として、Cu,Zn など複核金属錯体を形成する人工 SOD リポソームを設計する手法について検討した。Dodecanoyl-Histidine(Dodec-His)修飾リポソームを調製し、Cu ならびに Zn 吸着挙動を解析した。リポソーム膜の相状態により、吸着挙動が制御される事を示した。上記の吸着挙動に基づいて、単核金属型ならびに複核金属型の Dodec-His 修飾リポソームを調製し、SOD 活性を解析した。後者(複核型)が前者(単核型)と比較して2倍以上の SOD 活性を示すことが分かった。

Evaluation of SOD-like activity of artificial enzymatic liposome modified with multi-nuclear metal

Yuji OHAMA, Le Quoc TUAN, Toshinori SHIMANOUCHI,  
○Hiroshi UMAKOSHI, Ryoichi KUBOI  
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** Membrane Stress Biotechnology, liposome, SOD, ligand

2G10-1 シトクロム  $c_3$  をクロスリンクした光合成反応中心からヒドロゲナーゼへの直接的電子移動による光水素生産

○伊原 正喜<sup>1</sup>, 仲本 準<sup>2</sup>, 大倉 一郎<sup>3</sup>, 蒲池 利章<sup>3</sup>, 前田 瑞夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>理研, <sup>2</sup>埼玉大学・理学部, <sup>3</sup>東工大院・生命理工)

藍藻や藻類を利用した太陽光による水素生産は、環境負荷が少なくコスト的にも優れた次世代エネルギー生産システムである。しかし実用化には、光変換効率に問題があることが知られている。その原因の一つは、光化学システムI (PSI) からプロトン還元酵素であるヒドロゲナーゼへの電子伝達頻度が低いことである。そこで今回は、PSI にヒドロゲナーゼの電子伝達パートナーであるシトクロム  $C_3$ (cyt $c_3$ )を化学的に連結し、PSI→cyt $c_3$ →ヒドロゲナーゼと続く人工的電子移動経路のモデル系の構築を目指した。cyt $c_3$ とPSIの連結体 (cyt $c_3$ -PSI) の作製では、まず、cyt $c_3$ とPSIのサブユニットであるPsaEの変異体を調製し、ヘテロクロスリンカーによって連結したクロスリンク体 (cyt $c_3$ -PsaE) 調製した。次に、cyt $c_3$ -PsaEはPsaE欠損PSIと自発的に結合し、cyt $c_3$ -PSIを形成することを確認した。ヒドロゲナーゼとcyt $c_3$ -PSIによる光水素発生速度は、cyt $c_3$ が連結されていない場合の約10倍であった。これらの結果は、設計通りにPSIからヒドロゲナーゼへと続く人工的電子移動経路が構築されたことを示している。

The Hydrogen Production Photochemically Driven by the Direct Electron Transfer from Photosystem I Cross-linked with Cytochrome  $c_3$  to [NiFe]-Hydrogenase

○Masaki IHARA<sup>1</sup>, Hitoshi NAKAMOTO<sup>2</sup>, Ichiro OKURA<sup>3</sup>, Toshiaki KAMACHI<sup>3</sup>, Mizuo MAEDA<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>RIKEN, <sup>2</sup>Fac. Sci., Saitama Univ., <sup>3</sup>Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol., <sup>4</sup>RIKEN)

**Key words** hydrogenase, photobioreactor