

1B11-5 Pretreatment of lipase with organic solvents and its application in reverse micellar systems

○Muhammad MONIRUZZAMAN¹, Yoshishige HAYASHI²,
Noriho KAMIYA¹, Masahiro GOTO¹
(¹Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ., ²Fac. Eng., Kanazawa Univ.)

The effect of the pretreatment of *Chromobacterium viscosum* lipase with various hydrophobic solvents on its activity in AOT/isooctane/water reverse micelles and a possible conformational change was investigated. The pretreatment of lipase led to a substantial increase of enzymatic activity in AOT reverse micelles. It was observed that higher hydrophobic solvents with shorter agitation time and vice versa had almost the same effect on the initial activity of lipase. A kinetic model that considers the free substrate in equilibrium with the substrate adsorbed on the micellar surface was successfully used to better understand the activity enhancement due to the modification of lipase surface. The Michaelis constant and the substrate adsorption equilibrium constant were reduced by the pretreatment of lipase with hexane, whereas the change in the maximum reaction rate was insignificant. These findings suggested that pretreatment with organic solvents enhanced the affinity of the lipase with substrate and reduced the interactions with AOT head groups. Fluorescence spectra of lipase encapsulated in RMs were performed to detect possible conformational changes in the enzyme caused by the pretreatment. A correlation between the maximum fluorescence intensity and the activity of treated lipase was found as a function of agitation time.

Pretreatment of lipase with organic solvents and its application in reverse micellar systems

○Muhammad MONIRUZZAMAN¹, Yoshishige HAYASHI²,
Noriho KAMIYA¹, Masahiro GOTO¹
(¹Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ., ²Fac. Eng., Kanazawa Univ.)

Key words Lipase, pretreatment, AOT, reverse micelles

1B12-2 ウシトリプシンのリフォールディング操作における還元体の生成と自己消化反応

○大嶋 勇二, 野原 大輔
(岐阜大・工・生命工)

【目的】分子内に6つのS-S結合をもつウシトリプシンはリフォールディング出発物質となる全還元体調製の際、グアニジン塩酸塩等の変性剤中でも活性を示し、自己消化反応が起きるため出発物質の確保が困難となる。そこで、出発物質調製のための様々な条件の検討を行ない、活性回復率の向上を図る。

【方法】還元反応中の自己消化反応によって生じるペプチド断片と全還元体本体を分離するため、還元反応終了後のトリプシン溶液のゲルろ過を行ない、タンパク質分画を得、凍結乾燥したものを出発物質としてリフォールディングを行なった。リフォールディングは、活性回復したトリプシンによる自己消化反応を抑制する目的で、トリプシンに対して阻害効果のある *p*-aminobenzamidine を固定化したゲルを用い、グルタチオン系の酸化還元剤を含む1M diethanolamine(pH 8.2)で48時間、室温で行なった。

【結果と考察】通常のゲルろ過によって得られたタンパク質分画を出発物質としてリフォールディングを行なったが、インヒビター固定化ゲル非共存系で5%、共存系で15%程度の活性回復率であった。より分離能の良いゲルろ過によれば、タンパク質分画中に様々なタンパクの分布が見られた。そこで各分画部分を出発物質としてリフォールディングを行ない、それぞれの活性回復率の比較検討を行なった。

Reduction and autoproteolysis in preparation of starting material for refolding of bovine pancreatic trypsin

○Yuji OHSHIMA, Daisuke NOHARA
(Dept. Biomol. Sci., Gifu Univ.)

Key words refolding, trypsin, autoproteolysis, reduced trypsin

1B12-1 機能性分子導入による外部刺激応答性人工酵素の創製

○鶴田 幸人, 西 基宏, 神谷 典穂, 後藤 雅宏
(九大院・工・応化)

【目的】酵素の機能を担う部位に何らかの機能性分子を導入し、外部刺激応答性を付与することによって、人為的な活性の制御が可能な人工酵素の開発が行われている。このような人工酵素は、外部刺激を感じし酵素反応へと変換することが可能なので、高感度センサーへの応用が期待される。そこで本研究では、プロテアーゼの部位特異的加水分解反応を引き金として、活性がスイッチングするように設計を施した人工酵素の創製を試みた。

【方法・結果】遺伝子工学的手法を用いて、*Schistosoma japonica* 由来グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)のC末端側にプロテアーゼ(トロンビン)ならびに微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTG)が認識する基質ペプチドを導入した。MTGの架橋反応を利用して、C末端基質ペプチドに部位特異的に阻害剤を導入した人工酵素を調製したところ、その活性は大きく減少した。これは、GSTの活性中心に近接するC末端への阻害剤導入によって、活性サイト付近での局所的な濃度増加を誘起できたためと考えられる。また、得られた人工酵素にトロンビンを作用させたところ、酵素活性の回復が確認された。以上のことから、当初の設計方針に基づき、プロテアーゼの加水分解反応に応答して活性がスイッチングする人工酵素を得ることに成功した。

An external stimuli-responsive hybrid enzyme tethered by a small functional molecule

○Yukito TSURUDA, Motohiro NISHI, Noriho KAMIYA,
Masahiro GOTO
(Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ.)

Key words enzyme sensor, activity switching, protease

2B09-1 タンパク質工学的手法による超好熱性L-スレオニン脱水素酵素の触媒機構解析

○東 紀子¹, 谷元 浩一¹, 西岡 求¹, 石川 一彦², 田谷 正仁¹
(¹阪大院・基礎工,²産総研・関セ)

【目的】L-スレオニン脱水素酵素(TDH)は、スレオニン代謝系におけるNAD 依存性の酸化還元酵素である。我々は既に、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* のTDH遺伝子の大腸菌を用いた組換え体酵素を取得しTDH活性を有することを示した。本研究では、反応の律速段階であるプロトン転移と関連残基が形成する活性環境に着目し、反応速度論の見地より反応機構の検討を行った。

【実験方法および結果】立体構造情報を基に、触媒部位のアミノ酸残基にタンパク質工学的手法で部位特異的変異を導入し、数種の変異体酵素を作製した。得られた変異体酵素を反応速度論的に検討したところ、44番目のスレオニンおよび152番目グルタミン酸残基が触媒機構に重要な役割を担っていることが確認された。これらの残基はアルコール脱水素酵素(ADH)において保存されている。しかし、152番目グルタミン酸残基は、亜鉛リガンドに直接関与していないことがわかった。さらに数種のADHの触媒活性中心モデルを参考にTDHの触媒機構解析を考察した。また酵素反応時の構造変化について熱力学的解析を試みた。

(文献) Ishikawa, K., Higashi, N., Nakamura, T., Matsuura, T., Nakagawa, A. (2007) The first crystal structure of L-threonine dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 366, 857-867.

Catalytic mechanism of the hyperthermophilic L-threonine dehydrogenase based on protein engineering

○Noriko HIGASHI¹, Koichi TANIMOTO¹, Motomu NISHIOKA¹,
Kazuhiko ISHIKAWA², Masahito TAYA¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., ²ESBS, AIST)

Key words kinetic analysis, L-threonine dehydrogenase, *Pyrococcus horikoshii*