

## 2Gp05 アクセサリータンパク質を用いる酵素の多機能化戦略～コレステロールエステラーゼ～

○内川 明日香<sup>1</sup>, 鈴木 久皇<sup>2</sup>, 津川 若子<sup>1</sup>, 早出 広司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東農大院・工・生命工, <sup>2</sup>パナソニック四国エレクトロニクス株式会社)

### 【目的】

タンパク質に新規機能を導入する方法として、他の機能ドメインの融合が一般的に用いられる。しかし、機能ドメインを目的タンパク質に融合させることにより構造変化が起こり、元来の機能を失ってしまう場合がある。特に酵素においては活性の大幅な低下が懸念される。そこで、新規多機能分子の開発方法として、アクセサリータンパク質に新規機能ドメインを融合させることで、酵素の活性を保持しつつ、新規機能を導入する方法を提案する。本研究では、緑膿菌由来リパーゼ(LipA) 特異的なアクセサリータンパク質であるLipBに蛍光タンパク質GFPを融合し、多機能酵素の開発を行った。

### 【方法・結果】

LipAおよびGFP融合LipBの発現ベクターを構築し、大腸菌で組換え発現させた結果、LipAは封入体を形成し、GFP融合LipBは水溶性タンパク質として発現した。LipAを可溶化し、GFP融合LipBによるリフォールディングを試みた結果、GFP融合LipBはLipBと同程度のシャペロン機能を有していることが示された。また、LipA リフォールディング後においても GFP 融合LipBと会合体を形成しており、リパーゼ活性とGFPの蛍光を示した。アクセサリータンパク質であるLipBにGFPを融合させることで、LipAの活性を失うことなく、GFPの導入に成功し、新規多機能酵素の開発法に成功した。

## A novel strategy in the development of multi-functional enzyme using engineering accessory protein

○Asuka UCHIKAWA<sup>1</sup>, Kunou SUZUKI<sup>2</sup>, Wakako TSUGAWA<sup>1</sup>, Koji SODE<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Panasonic Shikoku Electronics Co., Ltd.)

**Key words** lipase, refolding, protein engineering, chaperonin

## 2Gp07 ゲノムデータベースを用いた原核生物由来新規フルクトシルアミン酸化酵素の探索

○片山 怜, 早出 広司  
(東農大院・工・生命工)

### 【目的】

当研究室では糖尿病診断指標の一つである糖化ヘモグロビン(HbA1c)の簡便かつ迅速な測定法の開発を目指している。その測定法の一つにフルクトシルアミン酸化酵素(fructosyl amine oxidase; FAOD)を用いた酵素法がある。これまでにグラム陽性細菌*Arthrobacter* FV1-1株より、 $\alpha$ -フルクトシルアミノ酸( $\alpha$ -FA)に特異的なFAODを見出し、クローニングとHbA1c測定への応用を示した。本研究では新規FAODの探索を目的として、ゲノムデータベースを用いた新規FAODの探索およびクローニングを行い、特性検討を行った。

### 【方法および結果】

原核生物由来 FAOD のアミノ酸配列を基に BLAST データベース検索を行った。上位に挙がったタンパク質の中から、アマドリ化合物あるいはオパイン代謝能が報告されていないグラム陽性細菌由来の酵素を選択した。同酵素をクローニングした後、発現ベクターを構築し、大腸菌にて組換え発現した。得られたタンパク質は水溶性画分として回収された。同酵素を調製した後、 $\alpha$ -FAを基質としてPOD/TODB/4AA法を用いたFAOD活性測定を行った。その結果、同酵素は $\alpha$ -FAに特異的な新規FAODであることが示された。

## Genome-wide screening of novel fructosyl amine oxidase from prokaryote

○Satoshi KATAYAMA, Koji SODE  
(Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** Fructosyl amine oxidase, Genome database, Cloning

## 2Gp06 マンガンペルオキシダーゼによる異常プリオンの分解と分解機構

○堤 祐司<sup>1</sup>, 高田 依里<sup>2</sup>, 松浦 裕<sup>3</sup>, 毛利 資郎<sup>3</sup>, 近藤 隆一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>九大院・農, <sup>3</sup>独法・動衛研)

ウシ海綿状脳症(BSE)やヒトのCreutzfeldt-Jakob病(CJD)などのプリオン病は異常プリオンタンパク(PrP<sup>Res</sup>)によって引き起こされると考えられている。これらプリオン病はPrP<sup>Res</sup>が正常プリオンタンパク(PrP<sup>C</sup>)をPrP<sup>Res</sup>に変換蓄積する事によって発病すると考えられている。PrP<sup>Res</sup>は $\beta$ シート構造に富みproteaseによる分解を受けにくく、通常の病原体ならば病原性を失う熱処理や化学処理に対して安定である。現在、ヒトの医療分野における高額検査機器などの洗浄に対して応用が可能なPrP<sup>Res</sup>の不活化法の確立が求められており、安全かつ簡便な不活化法への応用のために、PrP<sup>Res</sup>分解活性をもつ酵素の探索が行われている。これまでに我々は白色腐朽菌*Ceriporia lacerata* MZ-340がPrP<sup>Res</sup>を分解・不活化することが可能であることを示し、また、*C. lacerata* MZ-340および*Phanerochaete chrysosporium*の産生するマンガンペルオキシダーゼ(MnP)がPrP<sup>Res</sup>をWestern Blotting分析検出限界以下まで分解可能であることを確認した。

そこで本研究では、MnPよりPrP<sup>Res</sup>をより高度にかつ短時間で分解させるために、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>供給のためのグルコースオキシダーゼおよびグルコース添加量、MnSO<sub>4</sub>添加濃度等のMnP処理条件の最適化を行った。また、PrP<sup>Res</sup>のモデルとして、リコンビナントプリオンタンパク(recPrP)を用いて、MnPによるPrP<sup>Res</sup>の分解メカニズムを検討した。

## Degradation of PrP<sup>Res</sup> by manganese peroxidase

○Yuji TSUTSUMI<sup>1</sup>, Eri TAKATA<sup>2</sup>, Yuichi MATSUURA<sup>3</sup>, Shirou MOHRI<sup>3</sup>, Ryuichiro KONDO<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., <sup>3</sup>Natl. Inst. Animal Health)

**Key words** prion protein, manganese peroxidase, degradation, inactivation

## 2Gp08 チューリップ組織中のチューリップシド変換酵素の精製と性質

○加藤 康夫<sup>1</sup>, 荘司 和明<sup>2</sup>, 佐藤 幸生<sup>3</sup>, 荻田 信二郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>富山県大院・生物工, <sup>2</sup>富山県農林水総合技セ, <sup>3</sup>富山県大・教養)

【目的】チューリップ組織内には、著量(生重量で数%)の抗菌性配糖体、チューリップシド(Pos)類が存在する事が知られている。演者らは、本化合物の抗菌活性の作用メカニズムと耐毒性との関係について検討する過程で、チューリップ組織中に、Posを分子内エステル転位反応により、より強い抗菌活性を示すチューリップパリン(Pa)へと変換する酵素活性があることを見出した。本酵素と基質であるPos類の組織内局在性と、病原菌の感染や組織の破壊により両者が出会いPaを生成する生理作用は大いに興味を持たれる。今回は、チューリップ組織中から本酵素を精製し、若干の諸性質について検討した。

【方法・結果】酵素活性は、Posを基質としてpH6.5のリン酸緩衝液中で酵素反応を行い、生成したPaをHPLC分析にて定量することにより測定した。「紫水晶」球根の凍結乾燥サンプルをリン酸緩衝液(pH6.0)中で破砕して得た無細胞抽出液より、DEAE-Toyopearl, Butyl-Toyopearl, Gigapite, Mono-Qの各種クロマトグラフィーにて、本酵素を高度に精製した。本酵素は中性付近に至適pHをもつサブユニット分子量約35,000の酵素で、エステラーゼやフォスファターゼの阻害剤である重金属やNaF, PMSFにより強く阻害された。Pos-Aに対するKmは約9 mM、Vmaxは約1×10<sup>5</sup> U/mgであった。「紫水晶」の他の組織からの本酵素精製を行った結果についてもあわせて報告する。

## Purification and properties of tuliposide-converting enzyme from tulip tissues

○Yasuo KATO<sup>1</sup>, Kazuaki SHOJI<sup>2</sup>, Yukio SATO<sup>3</sup>, Shinjiro OGITA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biotech., Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>Toyama Pref. Agric. Forest. Fish. Res. Cent., <sup>3</sup>Dept. Liberal Arts Sci., Toyama Pref. Univ.)

**Key words** tulip, tuliposide, enzyme, purification and properties