

2Da05 酵素によるホスファチジルイノシトール異性体の組成分析
○池田 稚佳, 昌山 敦, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾
(名大院・生命農・生命技術)

[目的] ホスファチジルイノシトール(PI)は、細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たすことや、様々な生理活性を持つことから近年注目されている。当研究室では蛋白工学的に改変された改変型ホスホリパーゼD(PLD)を用いることで、これまで困難とされてきたホスファチジルコリンとmyo-イノシトールからのPI合成に成功した。myo-イノシトールの6個の水酸基は化学的に非等価であるため、改変PLDに合成されるPIには原理的に6種類の立体異性体(1-PIから6-PI)が存在しうる。順相HPLCによる直接分析ではPI異性体を1(3)-PI、2-PI、4(6)-PI、5-PIの4つのピークに分離できる。しかし、1-PIと3-PIおよび4-PIと6-PIはイノシトール環に対する対称性のため、区別ができないという問題があった。本研究ではPI特異的ホスホリパーゼC(PI-PLC)を用いた選択的加水分解を利用することで、1-PI/3-PI存在比を推定する方法を確立することを目的とした。
[方法および結果] 放線菌由来PI-PLCを化学合成した1-PI、3-PIに作用させたところ、1-PIは分解されるが、3-PIは分解されないことを確認した。またPI-PLC処理前後での1(3)-PIの減少量をHPLCで測定する事でPI異性体混合物中の1-PI/3-PI比を推定できることがわかった。この方法を用いて改変型PLDにより合成されたPI異性体の分析を行ったところ、変異内容の違いにより、1-PI/3-PI生成比が大きく変化する事を見いだした。

Enzyme-assisted Composition analysis of phosphatidylinositol isomers
○Chika IKEDA, Atsushi MASAYAMA, Hideo NAKANO, Yugo IWASAKI
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

Key words phosphatidylinositol, phospholipase C

2Da08 D- サイクロセリン生成に関与するセリン O- アセチルトランスフェラーゼの構造解析
○小田 康祐, 的場 康幸, 野田 正文, 熊谷 孝則, 杉山 政則
(広大院・医歯薬総合)

結核の二次選択薬として使用されるD-サイクロセリン(DCS)は、L-セリンを出発物質とし、幾つかの酵素反応を経て作られるが、その合成経路は未だ証明されていない。最近、私たちの研究グループは、DCSを産生する*Streptomyces lavendulae* ATCC11924から、DCS合成に関与すると推定される遺伝子クラスターをクローニングした。そのクラスター内には、ホモセリンO-アセチルトランスフェラーゼ(HAT)に対して相同性を示すタンパク質の遺伝子が見出された。他のグループから提案されているDCSの合成経路から考えると、HATに対して相同性を示すタンパク質は、セリンO-アセチルトランスフェラーゼ(SAT)であろうと推定される。実際、大腸菌を宿主として発現させたタンパク質はSATの触媒活性を示した。本研究では、SL-SATと命名した、ATCC11924株由来SATのX線結晶構造解析を目的としている。大腸菌を宿主として得たSL-SATを精製後、結晶化し、SPRING-8 BL26B2にて、その回折強度を測定した。HATをスタートモデルとした分子置換法により、その三次元構造を決定した結果、SL-SATは、既知のSATとは構造的に異なり、HATと類似した構造を示した。今後は、SL-SATがHATと類似した構造を示すにも関わらず、SATとしての触媒活性を示す理由を構造的に明らかにしたい。なお、SL-SATの回折実験に御協力下さった、理化学研究所 放射光システム生物学研究グループの皆様にご心より感謝申し上げます。

Crystal structure of a *Streptomyces* serine O-acetyltransferase responsible for the biosynthesis of D-cycloserine.
○Kosuke Oda, Yasuyuki Matoba, Masafumi Noda, Takanori Kumagai, Masanori Sugiyama
(Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words D-cycloserine, acetyltransferase, crystal, structure

2Da06 改変型ホスホリパーゼ D を用いた環状二級アルコールに対するリン脂質化
○尾崎 朱里, 昌山 敦, 森 昭博, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾
(名大院・生命農)

【目的】 放線菌由来ホスホリパーゼD(PLD)は、優れたホスファチジル基転移活性を有しており、様々なリン脂質合成に利用可能である。野性型PLDはイノシトール等の嵩高い化合物に対する転移活性を持たない。最近我々は、放線菌PLDを蛋白工学的に改変する事で、イノシトールに対する転移活性を獲得した改変型PLDの作出に成功した。本研究では、作出した改変型PLDの応用範囲を拡大すべく、各種の環状二級アルコール類を受容体としたホスファチジル基転移反応を検討した。

【方法と結果】 myo-イノシトールに対する位置特異性の異なる3種の改変型PLD、および野性型 PLD を用い、ホスファチジルコリンと環状二級アルコール類との転移反応を検討した。受容体としては、イノシトール異性体類(myo-, allo-, scyllo-, muco-, D-chiro-, L-chiro-, epi-イノシトール)、クエルシトール類(vibo-, epi-, proto-クエルシトール)、イノソース、およびデオキシ糖類(フコース、ラムノース)を用いた。反応産物をTLCおよびLC-MSにより分析したところ、改変型PLDでは用いた全ての受容体に対応するリン脂質の生成が確認された。一方、野性型PLDでは転移反応はほとんど進行しなかった。また、受容体によっては転移反応産物に複数の位置異性体の生成が確認され、その生成比は用いた改変 PLD の種類により異なっていた。さらに、オオムギ等の植物に存在が確認されているホスファチジル-scyllo-イノシトール(P-scyllo-Ins)に着目し、その合成条件を最適化することで、収率約20%でP-scyllo-Insを調製する事ができた。

Transphosphatidylation of cyclic secondary alcohols using engineered phospholipase D
○Akari OZAKI, Atsushi MASAYAMA, Akihiro MORI, Hideo NAKANO, Yugo IWASAKI
(Grad. Sch. Biol. Agrc. Sci., Nagoya Univ.)

Key words phospholipase D, phospholipid, cyclic secondary alcohol, inositol

2Da09 *Lumbricus rubellus*に見出された多糖分解酵素の解析
赤澤 真一¹, 〇遣水 潤¹, 中澤 光², 小笠原 渉², 森川 康²
(¹長岡高専・物質工, ²長岡技科大・生物系)

【目的】 ミミズは地龍とも言われ、古くから解熱、鎮痛に効く漢方として親しまれている。また、ゴミの量を低減させるためにミミズを用いた生ゴミのコンポスト化は広く行われており、ミミズにはセルラーゼが存在する事が示唆されてきた。しかしながら、ミミズ由来セルラーゼの生化学的な解析はこれまでほとんど行われていない。そこで、我々はアカミミズである*Lumbricus rubellus* 粗酵素抽出液中に含まれる多糖分解酵素について検討した。
【方法・結果】 *L. rubellus*凍結乾燥粉末に緩衝液を加え一晩放置後、遠心分離し上清を粗酵素溶液とした。この粗酵素溶液を用いて各種プレートアッセイを行い、粗酵素中に含まれる多糖分解酵素について検討した。またこの粗酵素溶液を硫酸分画、透析後、各種カラムクロマトグラフィーに供しCMCaseの精製を試みた。その結果、至適温度が40℃である事等が明らかとなった。

Analysis of polysaccharide-degrading enzymes from *Lumbricus rubellus*
Shin-ichi AKAZAWA¹, 〇Jun YARIMIZU¹, Hikaru NAKAZAWA², Wataru OGASAWARA², Yasushi MORIKAWA²
(¹Dept. Mat. Eng., Nagaoka Natl. Coll. Tech., ²BioEng., Nagaoka Univ. Tech.)

Key words Lumbricus rubellus, earthworm, cellulase, CMCase