

2Dp14 ナイロンオリゴマー分解酵素 (NylC) の高度耐熱化

○三田 隆二¹, 田中 優佑¹, 永井 圭介¹, 柴田 直樹², 李 映昊³,
加藤 太郎¹, 武尾 正弘¹, 樋口 芳樹², 後藤 祐児³, 根来 誠司¹
(¹兵庫県大院・工・物質,²兵庫県大院・生命理,³阪大・蛋白質)
santaryuji@gmail.com

【目的】 *Arthrobacter* (plasmid pOAD2) 由来の6-アミノヘキサノ酸オリゴマー加水分解酵素 (p2-NylC) は40℃までが安定化域であるが、D36A/D122G/H130Y/E263Q変異により耐熱性が大幅に上昇する。本研究では熱安定化効果を、各種変異酵素の円二色性 (CD) 測定及びX線結晶構造解析から検討した。【方法と結果】 変異酵素を波長220nmで、温度を25℃から95℃まで1℃/分に変化させてCD測定を行った。その結果、熱変性のTm値は、親型p2-NylCの52℃に対し、D122G単独変異で76℃、D122G/H130Y二重変異で81℃、D36A/D122G/H130Y/E263Q四重変異酵素では88℃で、Tm値は4変異で36℃上昇した。熱安定化効果を立体構造レベルで解析するため、D122G変異、D122G/H130Y二重変異、D36A/D122G/H130Y/E263Q四重変異酵素のX線結晶構造解析を行った。その結果、熱安定化は以下の加算的效果に起因すると推定した。1) p2-NylCのAsp122は、隣接サブユニットのGlu115に近接し、静電的反発により不安定化しているが、D122G置換は同要因を解消する。2) p2-NylC酵素のArg127-Ala135領域の電子密度は観察されないが、H130Y置換は、Tyr130-Glu126間に水素結合を形成し、ループを安定化する。3) Glu126は、隣接サブユニットのAsp36と静電的に反発しているが、D36A置換はこれを解消する。

Molecular basis for enhancement of thermostability of nylon oligomer hydrolase

○Ryuji Santa¹, Yusuke Tanaka¹, Keisuke Nagai¹, Naoki Shibata², Young-Ho Lee³, Dai-ichiro Kato¹, Masahiro Takeo¹, Yoshiki Higuchi², Yuji Goto², Seiji Negoro¹
(¹Grad.Sch.Eng., Univ. Hyogo, ²Grad.Sch.Life Sci. Univ. Hyogo, ³Inst. Prot. Res., Osaka Univ)

Key words N-terminal nucleophile family, nylon oligomer, thermostability, X-ray crystallography

2Dp17 ホタルルシフェラーゼが触媒するチオエステル化反応で基質認識をつかさどる部位の解析

○加藤 太郎, 平石 善洋, 武尾 正弘, 根来 誠司
(兵庫県大院・工)
kato@eng.u-hyogo.ac.jp

ホタルルシフェラーゼは発光反応を触媒するだけでなく、長鎖脂肪酸に対するチオエステル化反応も触媒することが出来る。特に基質が2-アリアルプロパン酸の場合には立体選択的な反応が進行することを我々は見出している。しかしこれまでの検討からすべてのホタルルシフェラーゼが2-アリアルプロパン酸に対する立体選択的な反応を触媒できるわけではないことがわかってきた。例えばヒメホタル由来ルシフェラーゼは本能力を有しない。我々はこの違いがどこから来るのかを明らかにするために、既知のルシフェラーゼ構造を基に、基質周辺のアミノ酸残基を比較することとした。基質から5Å以内に位置する残基に有意な差は見出せなかった一方、5-10Åの間に位置する残基に活性の有無と相関があると考えられる違いを見出すことが出来た。そこで、それらの部位にアミノ酸置換を施した変異体を作製し、チオエステル化活性への影響を確認した。その結果、2-アリアルプロパン酸に対する基質認識を変化させることに成功した。またこれらのアミノ酸残基が基質認識においてどのような役割を果たしているのかを速度論解析により分析した。

Analysis of important residues for substrate recognition in firefly luciferase catalyzed thioesterification reaction

○Dai-ichiro Kato, Yoshihiro Hiraishi, Masahiro Takeo, Seiji Negoro
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words enantioselective, thioesterification, acyl-CoA synthetase, firefly luciferase

2Dp15 耐熱化 NylC による 6 ナイロンの酵素分解

○永井 圭介¹, 田中 優佑¹, 三田 隆二¹, 大嶋 渉平², 井内 健輔²,
加藤 太郎¹, 武尾 正弘¹, 持地 広造², 根来 誠司¹
(¹兵庫県大院・工・物質系,²兵庫県大院・工・機械系)
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

【目的】 ナイロンは強度、耐薬品性などの特性が優れ、繊維・プラスチックとして広く利用されている。このような合成化学物質による環境負荷低減化には、不要ナイロンのリサイクル、すなわち原料または他の有用物質への変換が、重要な検討課題である。本研究では、耐熱化 NylC を用いて、ナイロン6の酵素分解を検討した。

【方法・結果】 ナイロンの微粉末 (50mg/ml) をリン酸緩衝液に懸濁し、耐熱化 NylC (0.1mg/ml) を用いて、60℃で2時間反応させた。酵素反応前後のナイロン6の分子量変化は、アルゴンクラスター二次イオン質量分析法により検討した。酵素反応前のナイロン6ではm/z=10000-25000程度であったピーク集団が、反応後は8000-23000にシフトした。また、m/z=1500-3000において、酵素反応後にのみ明瞭なピークが示された。さらにm/z=1500以下の領域では、酵素反応前は3-7量体のピークが確認されたが、反応後は消失した。また、反応後の可溶成分をTLCで分析したところ、酵素のみ、ナイロン6のみでは、ニンヒドリン反応でスポットが確認できなかったが、酵素反応後は6-アミノカプロン酸と同鎖状2量体のスポットが確認できた。

Enzymatic hydrolysis of nylon-6

○Keisuke Nagai¹, Yusuke Tanaka¹, Ryuji Santa¹, Shohei Oshima², Kensuke Iuchi², Dai-ichiro Kato¹, Masahiro Takeo¹, Kozo Mochiji², Seiji Negoro¹
(¹Dept. Mat. Sci. and Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, ²Dept. Intel. Mech. Tech., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo.)

Key words nylon, thermostable enzyme, hydrolase

2Dp18 レポーター蛋白質β-galactosidaseとβ-glucuronidaseの翻訳反応中の4量体形成過程の速度論解析

○松浦 友亮^{1,3}, 細田 一史², 市橋 伯一³, 数田 恭章³, 四方 哲也^{2,3}
(¹阪大院・工・生命先端,²阪大院・情報・バイオ情報,³ERATO・科学技術振興機構)
matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

β-galactosidase (GAL) と β-glucuronidase (GUS) は、共にホモ4量体を形成して初めて活性を発現する酵素であり、レポーター蛋白質として広く使われている。一方で、両酵素の4量体形成過程に関しては、ほとんど知られていない。そこで我々は、転写・翻訳反応とカップルさせたときのGALとGUSの会合反応の速度論解析を行い、細胞内に近い環境で、二つのレポーター蛋白質の違いを明らかにすることを目指した。具体的には、無細胞翻訳系を用い、GALとGUSの会合反応を行い、活性酵素の生成、会合状態の時間変化を測定し、会合反応の速度定数を求めた。その結果から、GALの場合、変性状態からの会合速度と比べ、転写・翻訳反応とカップルさせたほうが50倍も速く反応が進むことがわかった。また、速度定数の比較から、GALはGUSと比べて1000倍近く会合速度が速いことがわかった。GALでは会合反応が反応律段階になっていないのに対して、GUSでは、単量体から2量体、2量体から4量体形成過程が共に反応律速になっていた。これらの結果から、レポーターとしてGALとGUSの違いが明らかになった。GALは単量体の発現量が2倍増加すると4量体も2倍増加するのに対し、GUS単量体発現量が2倍増加すると4量体は16(=2⁴)倍増加する。発現量の定量的な測定にはGALが、発現量変化の高感度検出にはGUSが適していることが示唆される。

Kinetic analysis of β-galactosidase and β-glucuronidase tetramerization coupled with protein translation

○Tomoaki Matsuura^{1,3}, kazufumi Hosoda², Norikazu Ichihashi³, Yasuaki Kazuta³, Tetsuya Yomo^{2,3}
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ³ERATO, JST)

Key words enzyme, protein folding, *in vitro* coupled transcription/translation, beta-galactosidase