

1P-069 O-ウレイド-L-セリン合成酵素 DcsD の活性発現に重要なアミノ酸残基の特定

○宇田 成利, 的場 康幸, 小田 康祐, 熊谷 孝則, 野田 正文,
杉山 政則
(広島大院・医歯薬保健学)
d122350@hiroshima-u.ac.jp

【目的】D-サイクロセリン(D-CS)は, 肺へ移行し易く, 既存抗生物質耐性菌にも有効であることから, 結核の二次選択薬として使われる。当研究室では, D-CS 生産菌 *Streptomyces lavendulae* ATCC11924 から, 10 個の遺伝子から構成される D-CS 生合成遺伝子クラスター (*dcsA-dcsH*) をクローニングすることに成功した。このクラスター内に存在する *dcsD* の遺伝子産物(DcsD)は, O-アセチル-L-セリンとスルフィドから L-システインを合成する酵素と相同性を示す。最近, DcsD は, L-システイン合成だけでなく, O-アセチル-L-セリンとヒドロキシ尿素とを基質として, D-CS 生合成の中間体の 1 つ O-ウレイド-L-セリン合成を触媒することを証明した。本研究では, DcsD の活性発現に重要なアミノ酸残基の特定を目的とした。

【方法および結果】大腸菌を宿主として得られた組換え DcsD を結晶化し, SPring-8 にてその X 線回折強度を測定した。得られたデータをもとに, 分子置換法により DcsD の三次元構造を決定した。L-システイン合成酵素の構造と比較し, 酵素反応への関与が予想されたアミノ酸残基に対し, 部位特異的変異を導入し, 酵素反応速度論解析を行った。その結果, ヒドロキシ尿素との結合に Val74 と Ser121 が重要であることを見出した。

Identification of the residues important for catalytic expression of O-ureido-L-serine synthase, DcsD, found in D-cycloserine biosynthetic pathway

○Narutoshi Uda, Yasuyuki Matoba, Kosuke Oda, Takanori Kumagai,
Masahumi Noda, Masanori Sugiyama
(Grad. Sch. Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.)

Key words o-acetylserine sulphydrylase, enzyme, X-ray crystallography, antibiotic

1P-071 PlumbemycinB 生合成に関与する 2 種のタンパク質 ATP-grasp37 および ATP-grasp38 の機能解析

○中野 真里, 新井 利信, 木野 邦器
(早大・先進理工・応化)
kkino@waseda.jp

【目的】*Streptomyces plumbus* NBRC13708 が産生する抗生物質 PlumbemycinB (PB) は, Ala, Asn および L-2-amino-5-phosphono-3-cis-pentenoic acid (APPA) からなるトリペプチドである。PB 生合成遺伝子クラスター内には, APPA 合成に関与する 8 つの遺伝子と, L-アミノ酸リガーゼをコードすると推定される ATP-grasp37 および ATP-grasp38 が存在する (U. S. Patent 20110217734 A1)。本研究では, この 2 種類の ATP-grasp 遺伝子の発現検討と組換えタンパク質の機能解析を実施し, PB 合成における意義を考察した。

【方法・結果】大腸菌を用いて 2 種類の組換えタンパク質 ATP-grasp37 と ATP-grasp38 を調製し, Ala と Asn および APPA 類似化合物である DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV) を基質として検討を行った。ヒドロキシルアミンと鉄を用いる比色分析法により, ATP-grasp37 は Asn を, ATP-grasp38 は Ala をそれぞれ N 末端基質とするリガーゼであることが示唆された。さらに, この組換えタンパク質を同時に作用させ, LC-ESI-MS 分析を行ったところ, Ala-Asn-APV と Asn-APV を検出したが, Ala-Asn は検出されなかった。これらの結果から, ATP-grasp37 により Asn-APPA がまず生成し, 次いで ATP-grasp38 により Ala が N 末端側に結合して, PB 合成が進行するものと示唆された。

Characterization of ATP-grasp37 and ATP-grasp38 involved in plumbemycinB biosynthesis

○Mari Nakano, Toshinobu Arai, Kuniki Kino
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words plumbemycinB, L-amino acid ligase, ATP-grasp, *Streptomyces plumbus*

1P-070 比色分析を利用した非リボソーム型ペプチド合成酵素におけるアデニル化ドメインの基質特異性評価

○鈴木 亮平¹, 原 良太郎², 木野 邦器^{1,2}
(¹早大・先進理工・応化, ²早大・理工研)
kkino@waseda.jp

【目的】ペプチド性抗生物質などの多様な二次代謝産物の生合成に関与する非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) は, アデニル化ドメイン (A ドメイン) において ATP 依存的にアミノ酸のカルボキシ基をアデニル化する。我々は, A ドメインにその基質となるアミノ酸を作用させた状態でプロリンなどの求核剤を添加すると, アミド結合が形成されることを明らかにしてきた¹⁾。A ドメインの基質特異性評価には, 通常 ATP-[³²P]PPi 交換反応が利用されるが, 本手法では実際に生成するアミド化合物との相関性が低い点で問題があった。そこで, 本研究では, A ドメインの基質特異性を簡便に評価する新たな手法として, ヒドロキシルアミン比色分析法を検討した。

【方法・結果】*Bacillus brevis*由来 Tyrocidine A 合成酵素の A ドメインをモデルとして, 20 種類のタンパク質構成性アミノ酸とヒドロキシルアミンを作用させた。アミド結合形成によって生成するヒドロキサム酸は, Fe³⁺ の存在下でキレート形成し呈色するため, 吸光度測定 (490 nm) により定量ができる。予想通り, 本測定と HPLC 分析から算出される生成アミド量には良好な相関性が認められた。他種 NRPS の A ドメインにおいても同様の結果が得られたことから, 本比色分析は A ドメインの基質特異性評価に有効であることが明らかとなった。

1) 鈴木ら, 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 4C15a08

Colorimetric assay for substrate specificity of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domain

○Ryohei Suzuki¹, Ryotaro Hara², Kuniki Kino^{1,2}
(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²RISE, Waseda Univ.)

Key words non-ribosomal peptide synthetase, substrate specificity, colorimetric assay

1P-072 *Actinomadura* sp. 由来新規プロテアーゼの精製、キャラクタリゼーションおよび遺伝子クローニング

○後藤 あずさ, 杉森 大助
(福島大・共生システム理工)
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

緒言

プロテアーゼは古くから研究開発され, 様々な分野で利用されている。医療機器洗浄液にもプロテアーゼが使用されているが, 手術器具に強固に付着した血液汚れを完全に洗浄することができないため, 強力なプロテアーゼの開発が望まれている。本研究では, 固着血液に対して高い洗浄力を有する新規プロテアーゼの開発を目指し, 放線菌を対象に目的酵素のスクリーニングを行った。本発表では, *Actinomadura* sp. 由来新規プロテアーゼの精製, キャラクタリゼーション, 遺伝子クローニングについて報告する。

結果

Actinomadura sp. RD001933 株, *Actinomadura miaoliensis* RD000920 株の各培養上清からアセトン沈殿, 各種クロマトグラフィーにより, 各々種類ずつプロテアーゼを精製した。精製プロテアーゼは, どちらも至適温度が 75℃, 至適 pH が 7.2 付近であり, 1 mM Zn²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mg²⁺ の存在下では活性が約 4 割低下した。また, 5 mM EDTA, PMSF の存在下では活性が著しく低下した。両酵素遺伝子のクローニングの結果, 両者のアミノ酸配列は完全に一致し, *Cystobacter fuscus*由来 alkaline serine exoprotease A (L9JKM0) と 64% の相同性を示したことから, 本酵素は新規プロテアーゼと考えられる。両菌株を混合培養した場合, その培養上清を濃縮して得た酵素液は, 単独培養によって得られたものに比べて洗浄力が強く, 医療器具洗浄機 WD3060 (Smeg 社製) で従来洗浄液では洗浄できなかった血液固着洗浄評価インジケーター TOSI-GOLD (Pereg 社製) を 65℃, 20 分で洗浄することができた。

Purification, characterization, and gene cloning of a novel protease from *Actinomadura* sp.

○Azusa Goto, Daisuke Sugimori
(Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ.)

Key words protease, *Actinomadura* sp., purification & characterization, gene cloning