

1P-085 2ステップ酵素反応によるアプタマーコンジュゲートの分子設計

○高原 茉莉¹, 林 浩之輔^{1,2}, 後藤 雅宏^{1,3}, 神谷 典穂^{1,3}
 (¹九大院・工・応化, ²日立アロカメディカル, ³九大・未来化セ)
 m_takahara@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

核酸アプタマーとは、標的分子と特異的に相互作用する一本鎖核酸である。従って、分子認識部位あるいは標的指向部位としてアプタマーを機能性分子とコンジュゲートできれば、分析分野やドラッグデリバリー分野まで応用範囲が拡大することが期待される。本研究では、分析分野への応用として、シグナル増幅のための酵素とアプタマーのコンジュゲートを得ることを目的とした。酵素-アプタマーコンジュゲートの調製には、酵素及びアプタマーそれぞれの分子ユニットの機能損失を最小にする、部位特異的なラベル法が重要である。そこで、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 及び microbial transglutaminase (MTG) の2つの酵素反応を組み合わせた新しい手法について検討した。TdTは、核酸の3'末端にプライマー非依存的にヌクレオチドを付加する酵素である。MTGは、特定のGlnとLysの側鎖間の架橋反応を触媒する酵素である。まず、TdTによりアプタマーにGln修飾ヌクレオチドを付加した。一方、遺伝子工学の手法で対象酵素にLysを導入し、MTGによる部位特異的な修飾を介して、酵素-アプタマーコンジュゲートを調製した。得られたコンジュゲートは、標的分子の濃度に応じてシグナルが増加し、酵素及びアプタマー部位の機能保持が確認された。発表では、2ステップTdT/MTG酵素反応の反応条件が標的分子の検出に与える影響と、アプタマーコンジュゲートの新たな分子設計について報告する。

Molecular design of a target molecule using aptamer-enzyme conjugates

○Mari Takahara¹, Kounosuke Hayashi^{1,2}, Masahiro Goto^{1,3}, Norihiro Kamiya^{1,3}
 (¹Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Kyushu Univ., ²Hitachi Aloka Medical, Ltd., ³CFC, Kyushu Univ.)

Key words DNA aptamer, DNA-enzyme conjugate, terminal deoxynucleotidyl transferase, microbial transglutaminase

1P-087 Strain-specific bactericidal activity of lantibiotic, nukacin ISK-1

○Urmi Roy¹, Mohammad Riazul Islam¹, Jun-ichi Nagao², Abdullah-Al-Mahin¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sonomoto^{1,3}
 (¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Fukuoka Dental Coll., ³Bio-Arch., Kyushu Univ.)
 urmi2k7@yahoo.com

Lantibiotic nukacin ISK-1 is an antibacterial peptide produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. Earlier studies have shown that nukacin ISK-1 binds to cell wall precursor lipid II and inhibits bacterial cell wall biosynthesis, thereby only stops the growth of bacteria without killing (1, 2). Such bacteriostatic activity was observed against *Bacillus subtilis* JCM 1465¹. In this study, we have demonstrated that nukacin ISK-1 showed strain-specific bactericidal activity against *Micrococcus luteus* DSM 1790 and *Staphylococcus simulans* 22 by determining decrease in optical density and colony forming unit. To investigate the bactericidal mechanism of action of nukacin ISK-1, *M. luteus* and *S. simulans* were used as an indicator strains. Transmission electron micrograph analysis showed lysis of the cells, supporting bactericidal activity. Dissipation of the membrane potential was observed in the indicator strains but not in *B. subtilis* and other bacteria where nukacin ISK-1 showed bacteriostatic action. Inability to release ATP or fluorescence dye indicated that nukacin ISK-1 does not make pore in the cell membrane. These results suggest that nukacin ISK-1 inhibits cell wall biosynthesis and dissipates the membrane potential without pore formation in the cell membrane for strain-specific bactericidal activity.

(1) Antimicrob. Agents Chemother., 53, 3595 (2009); (2) J. Am. Chem. Soc., 134, 3687 (2012)

Strain-specific bactericidal activity of lantibiotic, nukacin ISK-1

○Urmi Roy¹, Mohammad Riazul Islam¹, Jun-ichi Nagao², Abdullah-Al-Mahin¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sonomoto^{1,3}
 (¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Fukuoka Dental Coll., ³Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words lantibiotic, antibacterial peptide, mode of action, strain-specific bactericidal activity

1P-086 Mechanism of mutual regulation between peptidase and ATPase domains of a bifunctional ABC transporter for lantibiotic synthesis

○Sen Zheng¹, Jun-ichi Nagao², Mami Nishie¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sonomoto^{1,3}
 (¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Fukuoka Dental Coll., ³Bio-Arch., Kyushu Univ.)
 zhengsen6685@gmail.com

The lantibiotic nukacin ISK-1 is produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. Ribosomally synthesized prepeptide NukA consists of an N-terminal leader peptide and a C-terminal propeptide moiety. Modification enzyme NukM introduces unusual amino acids in propeptide to produce modified NukA. Dual functional ABC transporter NukT contributes to leader peptide cleavage and mature nukacin ISK-1 transport (1). NukT consists of three regions: an N-terminal peptidase domain (PEP), a C-terminal ATP binding domain (ABD) and a transmembrane domain. However, the molecular mechanism of NukT remains to be elucidated. To investigate the function of NukT domains, we expressed NukT in *Staphylococcus carnosus* TM300, purified and reconstituted its peptidase and ATPase activity in vitro. Our data showed that NukT cleaved off the leader peptide of modified NukA without ATP. On the contrary, ATPase activity was enhanced markedly by addition of modified NukA and slightly by nukacin ISK-1. The enhancement of ATPase activity was inhibited by a serine/cysteine protease inhibitor and was not found in NukT mutant which has lost its peptidase activity. These data suggest cooperative functioning of NukT domains, which the leader peptide cleavage by PEP enhances ATPase activity of ABD.

(1) J. Biol. Chem., 286, 11163 (2011)

Mechanism of mutual regulation between peptidase and ATPase domains of a bifunctional ABC transporter for lantibiotic synthesis

○Sen Zheng¹, Jun-ichi Nagao², Mami Nishie¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sonomoto^{1,3}
 (¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Fukuoka Dental Coll., ³Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words ABC transporter, antimicrobial peptide, post-translational modification, maturation and secretion protein

1P-088 DNA結合タンパク質を用いたタンパク質の新規ビーズディスプレイ法の開発

○溝口 琢郎¹, Murzabaev Marsel¹, 小林 功², 児島 孝明¹, 人見 清隆³, 中野 秀雄¹
 (¹名大院・生命農学, ²農研機構・食総研, ³名大院・創薬科学)
 hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】

本研究室では、エマルジョン内でのPCRと無細胞タンパク質合成系を組み合わせた機能性生体分子 *in vitro* ハイスループット解析手法、ビーズディスプレイ法の開発に成功している。しかしながら本手法を様々なタンパク質・酵素機能変化に用いるためには、ビーズ当たりの提示タンパク質分子数の増大と、提示タンパク質分子数の均一化が望まれる。本研究では、DNA結合タンパク質である一本鎖Cro(scCro)を用いたビーズディスプレイ法の改良を目的とした。

【方法と結果】

モデルペプチドをDNA結合タンパク質であるscCroとの融合タンパク質として発現させ、その結合配列を用いてビーズ上への提示量をしらべたところ、従来の抗エピトープ抗体を介した場合と比べ、顕著に高い提示量が確認された。また、より均一な液滴中で無細胞タンパク質合成反応を行う為、Flow focusing技術を用いて作製したエマルジョン内で、無細胞タンパク質合成系によるscCroの発現を行い、フローサイトメトリーによりビーズ上のscCro提示量の解析を行った。その結果、Flow focusingによってエマルジョンを作製した場合のscCro提示量は、従来のスターラーを用いた場合に比べより均一で、この技術がライブラリーの均一化に有効であることが示された。現在、架橋酵素であるマウス由来トランスグルタミナーゼ2のターゲット配列の探索に用い解析を進めている。

Development of novel beads display system of proteins by using a DNA-binding protein.

○Takuro Mizoguchi¹, Marsel Murzabaev¹, Isao Kobayashi², Takaaki Kojima¹, Kiyotaka Hitomi³, Hideo Nakano¹
 (¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²NFRI, ³Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words *in vitro* molecular evolutionary engineering, DNA-binding protein, *in vitro* coupled transcription/translation, flow cytometry