

**2P-057 ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼ D の一選択性向上**

○黒岩 千智, 石田 健, 田中 秀俊, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾  
(名大院・生命農学)  
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】ホスファチジルイノシトール (PI) は脂質代謝改善作用などが認められる機能性リン脂質である。本研究室では、元来 PI 合成活性を持たない放線菌由来ホスホリパーゼ D (PLD) をタンパク工学的に改変することで、同活性を付与する事に成功した。しかし、改変型 PLD による PI の合成反応では、酵素の *myo*-イノシトールに対する位置特異性が完全ではないため天然型の 1-PI に加えて、その位置異性体である 3-PI も合成されてしまうという問題があった。そこで本研究では、1-PI の高純度合成を目的として、PI 合成型 PLD を改変することでさらなる位置特異性の向上を試みた。

【方法・結果】現有する改変型 PLD のうち、NYR(W187N/Y191Y/Y385R) 変異体は 1-PI を優先的に生成し、その 1-PI/3-PI 比は約 76/24 である。NYR のイノシトール結合ポケットを構成する G186 から D190 の 5 残基からなるループ構造に着目し、それぞれの残基を他の 19 アミノ酸に置換した変異 *pld* 遺伝子を作製した。作製した変異遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた粗 PLD を用いて PI 合成反応を行い、生成する PI の異性体組成を分析した。その結果、G186 および D189 への変異が選択性向上に有効であり、特に G186T 変異体では 1-PI/3-PI 比が約 90/10 程度に向上した。現在、G186 位と D189 位変異体の中から特異性の優れた 5 種類づつを選択し、それらを掛け合わせた二重変異体の作製と位置選択性の評価を行っている。

**Improving the positional specificity of phosphatidylinositol-synthesizing phospholipase D**

○Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** phospholipase D, phosphatidylinositol, *myo*-inositol, positional specificity

**2P-059 膜結合型脂肪酸不飽和化酵素の基質選択機構の解明**

○渡邊 研志, 大野 洵, 秋 庸裕  
(広島大院・先端物質)  
aki@hiroshima-u.ac.jp

【目的】不飽和化酵素ファミリーは高度不飽和脂肪酸をはじめ、多様な構造と機能を示す脂肪酸の生合成を司る重要な酵素群である。膜結合型の同酵素群は共通して 2 つの疎水性領域に隔てられた 3 つの親水性領域と活性中心を形成する 3 つの His クラスターを有しているが、基質選択性や反応機構を規定する構造基盤は未解明である。本研究では、高い相同性を示す Δ6 及び Δ5 不飽和化酵素 (D6d 及び D5d) において互いに排他的な基質特異性を規定するアミノ酸残基を特定し、基質選択機構の解明に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法及び結果】D6d の His クラスターを含む親水領域における D5d との相違アミノ酸残基を個別または複数の組合せで D5d 型に置換した変異型 D6d を作成し、それらを発現させた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂肪酸組成を分析した。その結果、D6d 型と D5d 型の基質選択性を交換させる複数のアミノ酸残基を特定した。次に、すでに確立した D6d 精製系に準じて変異型 D6d を精製し、*in vitro* での活性評価を試みた。すなわち、変異型 D6d 遺伝子の 5' 末端側に FLAG タグ遺伝子を付加して発現ベクター pPIC3.5K に組み込み、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* での発現系を構築した。界面活性剤を用いて変異型 D6d を膜から溶離させ、これを FLAG タグを介したアフィニティ精製及びゲル濾過に供して精製し、各精製酵素を用いて *in vitro* 活性について検討しているところである。

**Substrate recognition mechanism of membrane-bound fatty acid desaturases**

○Kenshi Watanabe, Makoto Ohno, Tsunehiro Aki  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** fatty acid desaturase, structure-function relationship, polyunsaturated fatty acid

**2P-058 Δ5 不飽和化酵素の発現と精製**

○大野 洵, 渡邊 研志, 秋 庸裕  
(広島大院・先端物質)  
aki@hiroshima-u.ac.jp

【目的】脂肪酸は不飽和化と共役化、エポキシ化などの修飾により生体内で多様な生理活性を発揮する。その生合成に関わる修飾酵素群のうち、小胞体膜に局在する不飽和化酵素ファミリーは、疎水性膜貫通領域や His クラスターなどの共通モチーフを持つが、反応機構や基質特異性に関する立体構造的根拠は未だ解明されていない。本研究では、ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸など高度不飽和脂肪酸の生合成において中心的な役割を担っている Δ5 不飽和化酵素 (D5d) の構造機能相関解析を目的として、バイオリアクターによる大量発現および精製を試みた。

【方法及び結果】D5d 遺伝子の 5' 末端側に FLAG タグ配列を付加して発現ベクター pPIC3.5K の AOX プロモーター下流に組み込み、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株へ導入した。得られた形質転換体から、抗生物質 G418 耐性を基準に多コピー高発現株を選択した。同株についてメタノール誘導発現後、ウエスタンブロットおよびガスクロマトグラフィー分析を行った結果、脂肪酸不飽和化活性をもつ D5d の発現が認められた。また、誘導発現培地の炭素・窒素源組成やメタノール添加時期などの検討を通じて 7 L 規模での培養を行うことにより、発現量を 20 倍以上増加させることができた。さらに、FLAG タグを介したアフィニティ精製にも成功した。現在、菌体破砕方法や界面活性剤による可溶性条件を検討して、精製標品の収量改善を試みているところである。

**Expression and purification of Δ5 fatty acid desaturase**

○Makoto Ohno, Kenshi Waranabe, Tsunehiro Aki  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** fatty acid desaturase, *Pichia pastoris*, polyunsaturated fatty acid

**2P-060 シロイヌナズナ由来 P450 モノオキシゲナーゼ CYP73A5 を利用した 6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸の合成**

○中谷 和真<sup>1</sup>, 古屋 俊樹<sup>1</sup>, 東田 英毅<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工・応化, <sup>2</sup>旭硝子)  
kkino@waseda.jp

【目的】ポリマー、染料、感光体の原料として有用な 6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸の化学合成法は、高温・高圧条件を必要とし、また位置選択性が低いために 3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸を副産してしまう。一方、シロイヌナズナ由来の P450 モノオキシゲナーゼ CYP73A5 は、生理基質のケイ皮酸に対する酸化活性に加えて、2-ナフトエ酸の 6 位を選択的に酸化する活性も有することが報告されている (Biochemistry, 36, 15253 (1997))。本研究では、CYP73A5 遺伝子を分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 内で発現させ、作製した組換え酵母を酸化触媒とする 6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸の合成について検討した。

【方法・結果】CYP73A5 遺伝子を相同組換えにより *S. pombe* の染色体上に 1 コピー導入した。作製した組換え *S. pombe* を酵素触媒として 2-ナフトエ酸と反応させたところ、少量ながら 6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸の生成が確認された。活性強化による生産性の向上を目的として、シロイヌナズナ由来の P450 レタクターゼ遺伝子 *ATRI* を 1 コピー導入し、さらに CYP73A5 遺伝子の多コピー導入を検討した。現在、作製した組換え株のコピー数と活性との関連など詳細評価中である。

**Biocatalytic synthesis of 6-hydroxy-2-naphthoic acid by cytochrome P450 CYP73A5 from *Arabidopsis thaliana***

○Kazuma Nakatani<sup>1</sup>, Toshiaki Furuya<sup>1</sup>, Hideki Tohda<sup>2</sup>, Kuniki Kino<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Asahi Glass Co., Ltd.)

**Key words** P450, cytochrome P450, monooxygenase, *Schizosaccharomyces pombe*