

1P-059 エノキタケ抽出物の菌周病菌由来プロリルトリペプチジルペプチダーゼ阻害作用

○安形 博業¹, 中嶋 義隆¹, 伊藤 潔², 芳本 忠¹
¹摂南大・理工・生命,²摂南大・薬)
 yoshimoto@lif.setsunan.ac.jp

【目的】 菌周病菌 (*Porphyomonas gingivalis*) はエネルギー源として糖を利用することができなく、アミノ酸を利用する特殊な菌である。コラーゲンは Gly-X-Pro の繰り返し構造が基本となるが、*P.gingivalis* の持つプロリルトリペプチジルペプチダーゼ (PTP) は N 末端から 3 番目にプロリンが存在するとプロリンのカルボキシル側を切断するため重要な酵素とされている。我々は PTP の立体構造を X 線結晶構造解析法で初めて明らかにし 1)、更に化学合成した PTP 阻害剤との複合体構造解析にも成功してきた 2)。今回、菌周病予防薬を目指し、天然物に酵素阻害剤を求めクリーニングした。

【方法】 96 穴プレートを用い、酵素活性は Ala-Phe-Pro-β-naphthylamide (NA) を基質とし遊離した β-naphthylamine をアゾ発色させ 550nm で吸光度測定した。植物、漢方薬、タンパク質分解ペプチドなど比較的容易に手に入る物質について PTP の阻害を調べた。

【結果・考察】 150 のサンプルを調べた中で PTP の阻害剤として幾つか阻害活性が見られた。その中で、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) 抽出物が高い阻害を示したので、エノキタケから阻害剤の精製を試みた。抽出物の塩析分画 (40 ~ 80%) の後、Toyopearl HW-60 と DEAE-Toyopearl で精製した。阻害剤はタンパク質で、*P.gingivalis* の PTP を阻害したが、ジペプチジルペプチダーゼ 4、プロリルエンドペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼには全く阻害しなかった。

1, *J. Mol. Biol.*, 362, 228-240 (2006) 2, *J. Mol. Biol.*, 375 (3), 708-719 (2008)

Prolyl tripeptidyl peptidase inhibitor from *Flammulina velutipes*

○Hirona Agata¹, Yoshitaka Nakajima¹, Kiyoshi Ito², Tadashi Yoshimoto¹
¹(Dept. Lifesci., Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ., ²Fac. Pharm., Setsunan Univ.)

Key words Prolyl tripeptidyl peptidase, periodontal disease, peptidase, mushroom

1P-061 *Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの特製解析

○竹中 慎治, 尾関 貴博, 田中 耕生, 吉田 健一
 (神戸大院・農・生命機能)
 stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【目的】 *Chryseobacterium* 5-3B 株の生産するアセチル CoA 依存的 N-アセチルトランスフェラーゼ (NatA) は、キラルアミンである 2-フェニルグリシン (2PG) の L-体に対してのみ活性を示す特異な酵素である。^{1,2)} 本研究では、組換え酵素 (rNatA) の酵素化学的諸性質を調べたので報告する。

【方法】 酵素活性: アセチル CoA 共存下、2PG の N-アセチル化物である 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の生成量または遊離 CoASH 量を定量し、算出した。遺伝子発現: natA 断片を pET28b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株に導入して得られた形質転換株で発現させた。

【結果】 NatA およびその周辺の 2 つの ORF は L-2PG 存在下で誘導的に発現していた。NatA について相同性検索したところ、特性解析が詳細に行われている既報のアリルアミン N-アセチルトランスフェラーゼ (Ar-NH2 Nat) 等の転移酵素とは類似性がほとんどなかった。組換え酵素 rNatA は 2PG の基質類縁化合物の中で L-2PG の他 D,L-2-chlorophenylglycine (相対活性、56.9%) や L-4-hydroxyphenylglycine (16.7%) に対して活性を示したが、Ar-NH2 Nat の最良な基質に対する活性は低かった。同酵素は、アセチル CoA 以外にプロピオニル CoA やブチル CoA のアシル基を同基質のアミノ基に転移することができた。現在、アセチル基転移反応にかかわるアミノ酸残基を解析を行っている。1) S. Takenaka et al., *Biotechnol. Lett.*, 35:1053-1059, 2013. 2) S. Takenaka et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:1770-1776, 2013.

Characterization of N-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp.

○Shinji Takenaka, Takahiro Ozeki, Kosei Tanaka, Kenichi Yoshida
 (Dept. Agribiosci., Grad. Sch. Agri., Kobe Univ.)

Key words *Chryseobacterium*, N-acetyltransferase, 2-phenylglycine

1P-060 *Flavobacterium* 科細菌 *Elizabethkingia* sp. RL13212 株由来新規アゾ還元酵素の精製と特性解析

○安酸 国起, 村上 俊, 三輪 京子, 森川 正章
 (北大院・地環科・生物圏科学)
 kunikiyasukata0820@ec.hokudai.ac.jp

【背景と目的】 アゾ色素は現在最も広く利用される人工合成色素であるが、その生体への有害性は近年ようやく注目されはじめたばかりであり、未だ世界中でアゾ色素の廃棄に伴う環境汚染が進行を続けている。とりわけ化学的に安定で分解が困難である難分解性のアゾ色素については、化学的処理の場合はコスト面、生物学的処理の場合はその低い分解性が大きな壁となっている。本研究は、難分解性アゾ色素の一種である OrangeG への分解活性を示す細菌のゲノムに見出された、アゾ還元酵素の候補遺伝子を大腸菌で発現させることで、アゾ還元酵素の諸特性解析を行うことが目的である。

【方法】 対象の細菌である *Elizabethkingia* sp. RL13212 のドラフトゲノムを解析し、BLAST-P を用いて既知のアゾ還元酵素との相同性から、原因遺伝子の候補を 2 つ絞り込んだ。また各候補遺伝子を pET28a に導入し、これを用いて *E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。その後、目的の遺伝子を大量発現させ、マルチベクターを用いて菌体を破碎して酵素の大量精製を試みた。精製後、この酵素のアゾ還元活性の測定など特性解析を行った。

【結果と考察】 対象のアゾ還元酵素は立体構造上非常に近い位置に FMN、NADH 両バインディングサイトを持ち、しかもその一部が重複していた。また、本酵素はアゾ色素の一種であるメチルレッドに対して活性を示した。その際、補酵素として FMN と NADH を要求し、FMN と NADPH を添加すると酵素反応が強く阻害されることが判明した。

Purification and characterization of novel azo-reductases from *Flavobacteriaceae Elizabethkingia* sp. RL13212

○Kuniki Yasukata, Shun Murakami, Kyoko Miwa, Masaaki Morikawa
 (Div. Biosphere Sci., Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words azoreductase, *Flavobacterium*, bioremediation, *Elizabethkingia*

1P-062 海洋性細菌に広がる推定セリンラセマーゼ配列の発見と解析

○窪田 高秋, 島村 繁, 小林 徹, 出口 茂
 (海洋研究開発機構)
 takaakikubota@jamstec.go.jp

【目的】 近年の分析技術の向上に伴いアミノ酸の異性体分析が容易になると、D-アミノ酸は環境や生体中において微量に存在することが明らかになってきた。驚くことに海洋は溶存有機物中のアミノ酸 D/L 比が 30% を超すという、他の環境よりも高濃度で D-アミノ酸が存在する。このうち D-セリンはそのほとんどが遊離の低分子成分として存在し、他の細胞壁成分由来の D-アミノ酸とは大きく異なる。最近の報告では、D-セリンが動物の中樞神経系において NMDA 型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして神経伝達を調節していることがほぼ証明され、注目されている。その一方で海洋の D-セリンについては生合成経路や海洋生物に及ぼす影響に関して全く知られていない。そこで我々は海洋における D-セリンの代謝と役割を明らかにするためにまずは海洋微生物のセリンラセマーゼ (SR) の探索と解析を試みた。

【方法・結果】 ゲノムが記載されている微生物に対して網羅的 BLAST 解析を試みたところ、これまで微生物型の SR と呼ばれていた配列よりも、むしろ真核生物型 SR とされてきた遺伝子の類似配列が、海洋微生物に広く存在することを見出した。組換え酵素による機能解析の結果、本酵素は真核生物型 SR と同様、セリンのラセミ化およびセリン分解活性を併せ持つ二機能性酵素だった。本酵素は Mg²⁺ および ATP によって活性化され、この特徴は植物よりヒトなどの動物由来 SR に良く似ていた。本発見は、これまで予想されていたよりも多くの海洋性微生物がセリンのラセミ化活性を有することを示唆しており、これらの微生物における D-セリンの役割については興味を持たれる。

Finding and analysis of a putative serine racemase in various marine bacteria

○Takaaki Kubota, Shigeru Shimamura, Tohru Kobayashi, Shigeru Deguchi
 (JAMSTEC)

Key words D-amino acid, racemase, marine environment, bioinformatics