

1P-067 L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索と効率的な生産法の開発

○木野 はるか^{1,2}, 角谷 政尚², 服部 宏一², 東條 博昭², 駒井 強², 南木 昂², 木野 邦器¹
(¹早大・先進理工・応化,²長谷川香料)
kkino@waseda.jp

【目的】無保護のアミノ酸を直接連結して任意のジペプチドが合成できる L-アミノ酸リガーゼ (Lal) を用いて、塩味増強作用を示すジペプチドの探索とその効率的生産を目的に検討を行った。

【方法・結果】報告されている機能性ジペプチドの多くは、天然のタンパク質をプロテアーゼなどで加水分解した画分から見出されている。一方、Lal は任意のジペプチド合成が可能であるため、加水分解物中に存在する割合が低いと予想されるジペプチドも機能の評価対象になりえる。そこで、広範な基質特異性を有する TabS¹⁾を用いて計 111 種類の反応液を調製した。塩味増強効果の評価は、塩味増強ジペプチドとして報告のある Leu-Ser (特開 2012-165740) との比較において実施し、Leu-Ser と同等もしくはそれより強い効果を示し、かつその効果は反応液に残存するアミノ酸や核酸ではなく、ジペプチドに起因すると判断した反応液を 8 種類選抜した。この中から Met と Gly を基質とした反応液に注目し、TabS の基質特異性と標品を用いた呈味評価より、塩味増強効果を有するジペプチドとして新たに Met-Gly を見出した。なお、TabS では Met-Gly よりも Met-Met が多く生じるが、N 末端基質として L-Met と L-Leu に強い親和性を有する BL00235²⁾を利用すると、Met-Gly が主生成物となり、効率的合成が可能になった。

1) Appl. Environ. Microbiol., 79, 5023-5029 (2013). 2) J. Biosci. Bioeng., 106, 313-315, (2008).

Screening of salt taste enhancing dipeptides and effective production of the dipeptides by L-amino acid ligase

○Haruka Kino^{1,2}, Masanao Kakutani², Koichi Hattori², Hiroaki Tojo², Tsuyoshi Komai², Takashi Nammoku², Kuniki Kino¹
(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²T. Hasegawa Co., LTD)

Key words dipeptide, salt enhance, L-amino acid ligase

1P-069 海洋細菌由来マルチ銅オキシダーゼを用いたフェノール性人工色素の脱色

○田口 太郎¹, 吉川 潤², 堀口 博文², 天知 誠吾¹
(¹千葉大院・園芸,²合同酒精(株) 酵医研)
tarochi529@gmail.com

【背景と目的】

工業設備等から排出されるフェノール性色素による土壌・排水の汚染が問題となっており、その対策としてマルチ銅オキシダーゼ (MCO) の一種であるラッカーゼを用いた処理が注目されている。しかし、一般的な糸状菌由来ラッカーゼを用いた処理は分解速度の遅さや、中性・塩基性条件下での活性の低さ、温度や塩化物イオンに対する安定度の低さが課題となっている。当研究室ではこれまで、宮崎県の天然ガスかん水中より単離したヨウ化物イオン酸化能を持つ細菌 Q-1 株の生産する MCO の精製と構造遺伝子の特定に成功している。そこで本研究では、Q-1 株由来 MCO を用いたフェノール性人工色素の脱色を検討することを目的とした。さらに、メディエーターを用いた反応性向上についても検討した。

【結果】

メディエーター無添加の場合及びメディエーターとして ABTS, HOBt を添加した場合、フェノール性色素 (Remazol brilliant blue R, Orange G, Amido black, Methyl red, Indigo carmine) に対する脱色能はほとんど観察されなかった。一方、メディエーターとしてヨウ化カリウムを添加したところ、全ての色素に対する脱色能は大幅に向上した。さらに至適 pH は中性付近に存在し、糸状菌 (カワラタケ、ヒラタケ) 由来ラッカーゼと比較したところ、温度・塩化物イオンに対するより高い安定性も観察された。

Decolorization of artificial phenolic dyes by multicopper oxidase produced by marine bacterium strain Q-1

○Taro Taguchi¹, Jun Yoshikawa², Hirofumi Horiguchi², Seigo Amachi¹
(¹Grad. Sch. Horticult., Chiba Univ., ²Enz. Pharm. Res. Lab., GODO SHUSEI CO., LTD.)

Key words multicopper oxidase, potassium iodide, decolorization, marine bacterium

1P-068 乳酸菌由来 L-Aspartate : L-Alanine 交換輸送体 AspT 第 3 膜貫通領域システイン置換体を用いた蛍光修飾による AspT の構造変化の解析

○鈴木 聡美¹, 木村 拓也¹, 笹原 綾子¹, 七谷 圭², 阿部 敬悦^{1,3}
(¹東北大院・農・生物産業創成,²東北大院・工・バイオ工,³東北大・未来研)
b3ad1306@s.tohoku.ac.jp

【背景・目的】我々は、微生物による発酵産業において、有用物質生産性を向上させる鍵となる輸送体に注目している。これ迄に、産業細菌由来のアスパラギン酸 : アラニン交換輸送体 (AspT) が電位差形成的な L-Aspartate (Asp) : L-Alanine (Ala) 交換輸送反応を触媒し、kinetics 解析から AspT が Asp, Ala に対して異なる結合サイトを持つことを明らかにした。本研究では基質およびアナログ存在時の G62C, P79C の蛍光修飾パターンから、AspT の構造変化を議論する。

【方法】AspT 第 3 膜貫通領域 (TM3) の Gly62, Pro79 の Cysteine (Cys) 置換変異体 AspT-G62C, P79C を発現させた大腸菌を、浸透圧法により破砕して膜画分を取得した。膜画分に SH 基修飾試薬オレゴングリーンマレイミド (OGM) と基質を添加し一定時間蛍光修飾した後、両変異体を界面活性剤抽出し、Affinity 精製を行った。精製 AspT 変異体を SDS-PAGE に供し、バンドの蛍光及び CBB 染色強度を Image J で定量し、蛍光修飾効率を算出した。

【結果・考察】Asp 濃度増加に伴い P79C の蛍光強度が増加した。G62C は基質非存在で蛍光修飾され、Ala 濃度の増加に伴い蛍光修飾強度が低下した。Asp, Ala 共存時の両変異体の蛍光修飾強度は、単独基質存在時の蛍光修飾強度よりも低下傾向にあった。この結果は、両基質共存時には、Asp 結合型の conformation と Ala 結合型の conformation が共存することを示唆していた。

Conformational analysis of the amino acid exchanger AspT

○Satomi Suzuki¹, Takuya Kimura¹, Ayako Sasahara¹, Kei Nanatani², Keietsu Abe^{1,3}
(¹Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ., ²Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ³NICHE, Tohoku Univ.)

Key words transporter, labeling experiment, conformation change

1P-070 納豆菌 TAKANO-NK 株由来のナットウキナーゼの精製と諸性質の検討

○袴田 佳宏¹, 大江 昌史¹, 西川 宗伸², 晴山 聖一², 田谷 有紀², 大箸 信一¹
(¹金工大・ゲノム研,²タカノフーズ株式会社)
yhakamada@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】ナットウキナーゼ (NKase) は、強力な血栓溶解作用を有するプロテアーゼである。納豆菌の違いにより NKase に差異があるが調べるため、納豆製造用の NKase と、市販 NKase を精製し、その性質を比較した。

【方法】納豆菌 TAKANO-NK 株 (タカノフーズ株式会社保有株) を振盪培養し、得られた培養上清を各種カラムクロマトグラフィーに供した。各精製酵素の合成基質に対する基質特異性、最適反応温度、最適反応 pH、熱安定性、各種金属塩に対する安定性、Lineweaver-Burk プロットによる解析を行った。

【結果】培養の結果、600nm における NK 株の培養液濁度は、約 110 (3.7 × 10¹⁰ cfu/mL) であった。SDS-PAGE による精製酵素の推定分子質量は、共に約 31kDa で、合成基質 I-E-G-R-pNA に対して最も反応性が高かった。両酵素の最適反応温度、最適反応 pH、および熱安定性はそれぞれ、50℃、pH 9.0、および 50℃であった。また、本酵素の 1 mM Cu²⁺ に対する残存活性は、約 60% であったのに対し、市販酵素は阻害を受けなかった。ALPF-pNA に対する Km は、それぞれ 1.86 mM, 1.67 mM で、kcat は 0.25 s⁻¹ および 0.43 s⁻¹ であった。

【考察】NKase の分子質量は、ウロキナーゼやプラスミン (50kDa~90kDa) よりも小さいことが知られている。また、NKase はズブチリシンとは異なり、ALPF-pNA に対する作用よりも I-E-G-R-pNA に対して高い分解活性を有することから、本酵素も NKase と判断された。また、酵素学的な差異から、納豆菌種により生産される NKase も異なることが示唆された。

Purification and Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto Strain NK

○Yoshihiro Hakamada¹, Masashi Ohe¹, Takanobu Nishikawa², Seiichi Hareyama², Yuuki Taya², Shinichi Ohashi¹
(¹Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., ²Takano Foods Co., Ltd)

Key words *Bacillus* sp., Natto, Nattokinase, characterization