

**1P-091 DnaK 阻害剤を用いた慢性細菌感染症の制御戦略**○有田 (森岡) 健一<sup>1</sup>, 山中 邦俊<sup>1</sup>, 水之江 義充<sup>2</sup>, 小椋 光<sup>1</sup>, 杉本 真也<sup>2</sup><sup>1</sup>熊本大・発生研・分子細胞制御, <sup>2</sup>慈恵医大・医・細菌学)  
Shinya Sugimoto (ssugimoto@jikei.ac.jp)

細菌がバイオフィームを作ることや、低栄養環境で休眠状態となり抗菌剤に対して高い耐性を示すこと (persistence) は、慢性細菌感染症の原因となりうる。我々は、網羅的な遺伝子解析から、分子シャペロン DnaK がバイオフィーム形成および persistence に重要な役割を果たすことを見出した。そこで、これまでに報告されている DnaK 阻害剤を用いて、大腸菌のバイオフィーム形成と persistence に与える影響を調べた。その結果、天然フラボノールの一種である Myricetin が増殖は阻害せず、濃度依存的にバイオフィーム形成を阻害すること (IC<sub>50</sub>=46.2μM) を見出した。また、Myricetin は persistence の抑制にも有効であり、他の薬剤との併用により耐性菌の出現を大幅に抑制した。これらの知見は慢性細菌感染症の制御法の確立に繋がると期待される。

**Regulation of Biofilm Formation and Persistence by Small Molecules targeting Molecular Chaperone DnaK**○Ken-ichi Arita-Morioka<sup>1</sup>, Kunitoshi Yamanaka<sup>1</sup>, Yoshimitsu Mizunoe<sup>2</sup>, Teru Ogura<sup>1</sup>, Shinya Sugimoto<sup>2</sup><sup>1</sup>Dept. Mol. Cell. Biol., IMEG, Kumamoto Univ., <sup>2</sup>Dep. Bacteriol., Jikei Univ., Sch. Med.)**Key words** DnaK, biofilm, Persistence, Myricetin**1P-093 化学・生物発光特性から考察するホタルルシフェラーゼによるアミノルシフェリンの認識方法**加藤 太郎<sup>1</sup>, ○白川 大暉<sup>1</sup>, 前中 美華<sup>1</sup>, 丹羽 一樹<sup>2</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup><sup>1</sup>兵庫県大院・工・物質系, <sup>2</sup>産総研)  
kato@eng.u-hyogo.ac.jp

<目的> ホタルルシフェラーゼの発光域を広げるためのアナログが開発されている。アミノルシフェリンはオレンジ色に光るアナログであるが、酵素との相互作用に関する情報はほとんど知見がない。そこで我々は種々の変異酵素を用いて、アミノルシフェリンに対する発光特性を収集すると共に、MD シミュレーションを用いた酵素-基質間相互作用を予想した。また、新たに確立した化学発光法を用いて発光ポテンシャルを見積もることも試みた。これらの情報を総合し、酵素がどのようにアミノルシフェリンを認識しているのかの知見を得ることとした。

<方法> D-ルシフェリン発光で色調が変化することが分かっている変異酵素を用いて、アミノルシフェリンに対する発光特性を、また MD シミュレーションにより基質-酵素間相互作用に関する情報を収集した。また、生物発光メカニズムを模倣した新しい発光システムを構築し、発光スペクトルを測定した。<結果> 発光スペクトルは、生物・化学発光共にほぼ同じであった。また、変異酵素間でも発光色は変化せず、速度論解析結果も違いはなかった。また、MD シミュレーションより得られた安定構造比較から、活性部位周辺の状況 (剛直性、プロトンの解離状態) は変異酵素間でばらばらであり、明確な相互作用を確認することはできなかった。以上の結果よりアミノルシフェリンは、発光時酵素と特別な相互作用をしていないのではないかと考えられる結果を得た。

**Recognition of aminoluciferin by firefly luciferase from chemi- and bioluminescence properties.**Dai-ichiro Kato<sup>1</sup>, ○Daiki Shirakawa<sup>1</sup>, Mika Maenaka<sup>1</sup>, Kazuki Niwa<sup>2</sup>, Takeo Masahiro<sup>1</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup><sup>1</sup>Dept. Mater. Sci. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>AIST)**Key words** firefly luciferase, chemiluminescence, bioluminescence, substrate analogue-enzyme interaction**1P-092 部位特異的変異によるマルトトリオース生成アミラーゼの転移活性の向上**○掃部 正浩<sup>1</sup>, 西村 重徳<sup>1</sup>, 谷 修治<sup>1</sup>, 炭谷 順一<sup>1</sup>, 多田 俊治<sup>2</sup>, 川口 剛司<sup>1</sup><sup>1</sup>阪府大院・生環科・応生科, <sup>2</sup>阪府大院・理・生物科学)  
mu201013@edu.osakafu-u.ac.jp

[背景と目的] *Kitasatospora* sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼ (G3Amy) は水酸基を有する化合物に対してマルトトリオース (G3) を転移する活性を有しており、G3 配糖体合成酵素としての応用が期待される。しかし、産業的に利用するためにはさらに加水分解活性を抑え、転移活性を向上させることが望まれる。以前、我々はアクセプター部位に存在すると考えられる 12 種のアミノ酸に対して部位特異的変異導入を行い、加水分解活性に対する転移活性 (T/H) が向上した 6 種の変異酵素 (L191R, R223K, F258H, D323R, D323H, D323W) の取得に成功した。本研究ではアクセプター部位近傍のアミノ酸に変異導入を行い、さらに変異部位を組み合わせることで、さらなる T/H を向上させた変異酵素の取得を目指した。

[方法と結果] アクセプター部位近傍に存在すると考えられる 5 種のアミノ酸 (A226, A227, L277, F279, N317) に対して部位特異的変異導入を行い、合計 65 種の 1 アミノ酸が置換された変異酵素を作製した。これらの変異酵素を発現させた大腸菌の無細胞抽出液をグルコース (G1) 存在下で可溶性澱粉に反応させ、G1 に G3 が転移し生じた転移反応産物 G4 と加水分解産物 G3 の生成量を TLC を用いて解析した。その結果、L277, F279, N317 の変異酵素 (合計 17 種) で、G4/G3 量の明らかな増加が確認された。現在、二重および三重変異酵素の作製を行っているところである。

**Improvement of transglycosylation activity of maltotriose-forming amylase by site-directed mutagenesis**○Masahiro Kamon<sup>1</sup>, Shigenori Nishimura<sup>1</sup>, Shuji Tani<sup>1</sup>, Jun-ichi Sumitani<sup>1</sup>, Toshiji Tada<sup>2</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>1</sup><sup>1</sup>Dep. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)**Key words** amylase, site-directed mutagenesis, transglycosylation**1P-094 L-ルシフェリンを用いたホタル発光システム**加藤 太郎<sup>1</sup>, ○奥田 真利<sup>1</sup>, 丹羽 一樹<sup>2</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup><sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>産総研)

kato@eng.u-hyogo.ac.jp

<目的> D-ルシフェリンはホタルルシフェラーゼ発光反応における天然基質であるが、その鏡像体である L-ルシフェリンは発光基質とはならず、逆に強力な阻害剤として作用してしまう。そのため、発光反応の感度や定量性という観点から問題があった。我々は、この問題を解決するためにデラセミ化反応を視念し、L-体からでも効率良く発光するシステムの構築を試みた。具体的には、ホタルルシフェラーゼのもう一つの触媒活性を用いたチオエステル化とチオエステルを組み合わせ合わせた複合反応系を用いた。今回の検討では、本経路の最適化および、アナログに対する発光活性を確認することとした。

<方法> ホタルルシフェラーゼとチオエステルを共存させることによって、L-ルシフェリンから *in situ* 立体反転を伴って D-ルシフェリンを調製し、発光させることを試みた。発光活性はルミノメータを用いて測定した。反応系中の鏡像異性体の割合はキラルな固定相を有する HPLC カラムを用いて算出した。

<結果> L-体から D-体への立体反転反応が進行し、発光していることを確認できた。また、立体反転活性はルシフェラーゼの由来や pH によって異なることもわかった。ルシフェリンアナログを用いた検討では、いくつかのアナログについて立体反転反応の進行が確認出来、本反応系の利用範囲を広げられる可能性があることがわかった。

**Firefly light emitting system using L-luciferin**Dai-ichiro Kato<sup>1</sup>, ○Masatoshi Okuda<sup>1</sup>, Kazuki Niwa<sup>2</sup>, Masahiro Takeo<sup>1</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup><sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>AIST)**Key words** firefly luciferase, bioluminescence, thioesterification, deracemization process