

1P-099 アルキルジアミンに作用するアミノ基転移酵素の探索

満倉 浩一¹, ○時本 悠司², 吉田 豊和¹
 (¹岐阜大・工・化生工, ²岐阜大・工・生命工)
 mitukura@gifu-u.ac.jp

【目的】イミンの不斉還元は、光学活性アミン合成の効率的な合成法の一つである。当研究室では、R体および S体選択的イミン還元酵素を見出し、酵素による環状イミンの不斉還元を報告している。環状イミンは市販品が少なく、大半は、化学合成を必要とする。そこで、イミンの酵素合成に着目した。例えば、1,4-ジアミノブタン(プトレッシン)において、一方のアミノ基を選択的にアルデヒド基に変換することができれば、分子内環化によって環状イミンを合成することが可能となる。そこで本研究では、直鎖状アルキルジアミンを用いて土壌からアミノ基転移酵素活性を示す微生物の取得を目指した。【方法と結果】プトレッシンを単一窒素源とし、ピルビン酸を加えた培地で集積培養を行い、土壌からジアミン分解菌を分離した。休止菌体を用いてピルビン酸存在下、プトレッシン変換反応を行ったところ、YT46株が高いアラニン生成活性を示した。16S rDNA 解析から、YT46株は、*Variovorax paradoxus*と99%の相同性を示した。無細胞抽出液を調製したのち、プトレッシンと α -アミノペンズアルデヒドを含む反応系で酵素反応を行ったところ、 Δ^1 -ピロリンの生成に伴い合成される 1,2,3,4-テトラヒドロキナゾリン誘導体を検出した。

Screening of aminotransferase acting on alkyl diamine

Koichi Mitsukura¹, ○Yuji Tokimoto², Toyokazu Yoshida¹
 (¹Dept. Chem. Biomol. Sci., Fac. eng., Gifu Univ., ²Dept. Biomol. Sci., Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words alkyl diamine, aminotransferase, imine synthesis, *Variovorax paradoxus*

1P-101 チロシナーゼ阻害ペプチドの作用メカニズムの解析

○今井 雄太, 田中 聖也, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
 (新潟大・自然研)
 mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】チロシナーゼは、L-チロシンを基質とした初発の2段階の反応を触媒してメラニン形成を促進する。細胞での過剰なメラニン生産は色素沈着疾患を引き起こすことから、チロシナーゼ制御(阻害)が色素沈着防止や美白に効果をもたらす。本研究室では、これまでに既知のチロシナーゼ阻害ペプチド P4と高い相同性を示すペプチド TH10を見出した。これらは配列中に共通してチロシン残基を有することから、L-チロシンのアナログ基質としてチロシナーゼの酵素反応を阻害していると考えられる。そこで本研究では、これらのペプチドの変異体解析と生体分子相互作用解析などから詳細な作用機構を解明することを目的とした。

【方法】酵素反応は、L-チロシンを基質としてマッシュルームチロシナーゼ(AbTyr)のモノフェノラーゼ反応を測定することにより行った。酵素阻害は、モノフェノラーゼ反応に対する各ペプチドの50%阻害濃度(IC₅₀)を求めることにより評価した。また、AbTyrを固定化したCM5センサーチップと生体分子相互作用解析装置Biacore Xを用いて、これらのペプチドの作用機構を解析した。

【結果】P4とTH10ペプチドは、配列中にそれぞれ2残基と1残基のチロシンを有している。これらのチロシン残基を中心に変異を導入し、合計15種類の派生ペプチドを設計した。派生ペプチドを用いて酵素阻害実験を行った結果、AbTyr阻害活性の発現にはチロシン残基が必須で、C末端に位置する時にその阻害活性は大きくなること、その阻害活性はチロシン残基前後の配列に多少の影響を受けることがわかった。現在、生体分子相互作用解析により、詳細な作用機構を解析している。

Analysis of the action mechanism of tyrosinase inhibitory peptides

○Yuta Imai, Seiya Tanaka, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
 (Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words inhibitor, peptide, tyrosinase, melanin synthesis

1P-100 ハイドロラーゼを利用した光学活性アミノピロリジン合成

満倉 浩一¹, ○原 健介², 中田 俊昭², 長澤 透², 吉田 豊和¹
 (¹岐阜大・工・化生工, ²岐阜大・工・生命工)
 mitukura@gifu-u.ac.jp

【目的】光学活性アミンは、医薬品の合成中間体としての用途が期待できることから、酵素を利用した光学活性アミン合成法が数多く報告されている。特にハイドロラーゼは、広い基質特異性や優れた立体選択性を示すものが多く、光学活性化化合物合成における有力な酵素の一つに挙げられる。そこで、本研究では、ラセミ体1-ベンジル-3-アセトアミドピロリジン(BAAP)を立体特異的に加水分解する活性菌を探索し、ハイドロラーゼによる光学活性1-ベンジル-3-アミノピロリジン(BAP)の酵素合成を目的とした。

【方法と結果】*rac*-BAAPを単一炭素源として用いて集積培養を行い、BAAPハイドロラーゼ活性を示す微生物をニンヒドリンによるアミン検出を指標にして土壌から分離した。休止菌体による10 mM *rac*-BAAPの加水分解を行い、基質と生成物濃度から活性菌を評価した結果、N13株を選抜した。16S rDNA解析からN13株は、*Rhizobium*属細菌であることが判明した。培養条件を検討したところ、本ハイドロラーゼは、誘導酵素であることが明らかになった。休止菌体反応を行ったのち、生成したアミンを精製し、3,5-ジニトロ塩化ベンゾイルを用いてアミドに変換した。そのアミドをキラルHPLC分析したところ、光学純度は、78% ee(S)であった。一方、精製酵素を調製し、酵素によるBAAP加水分解を行った結果、生成したアミンの光学純度は、97.4% ee(S)であった。

Synthesis of optically active aminopyrrolidine using hydrolase

Koichi Mitsukura¹, ○Kensuke Hara², Toshiaki Nakata², Toru Nagasawa², Toyokazu Yoshida¹
 (¹Dept. Chem. Biomol. Sci., Fac. eng., Gifu Univ., ²Dept. Biomol. Sci., Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words 1-benzyl-3-aminopyrrolidine, hydrolase, *Rhizobium* sp., enantioselectivity

1P-102 大腸菌発現系を利用した組換えヒトチロシナーゼの生産

○金岡 巧, 田中 聖也, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
 (新潟大・自然研)
 mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】細胞での過剰なメラニン生産は色素沈着疾患を引き起こす。そのため、メラニン生産過程の律速酵素であるチロシナーゼの制御(阻害)が色素沈着防止や美白に効果をもたらす。一方、ヒト由来チロシナーゼ(HsTyr)の大量生産が困難であることから、医薬品や化粧品分野におけるこれらの阻害成分の検証実験には、マッシュルーム由来チロシナーゼがモデル系として使用されている。そこで本研究では、HsTyrを用いたより実用性の高い検証実験を行うための分子基盤を構築するため、大腸菌発現系を用いて組換えHsTyrの生産法を検討した。

【方法と結果】HsTyrの膜貫通ドメインを除いた全長(HsTyrL)とコアドメイン(HsTyrS)の遺伝子配列をPCRにより増幅し、pET21bベクターに挿入した。構築したプラスミドでは、*lac*リプレッサーの制御下にHsTyr(L/S)遺伝子を配置し、C末端側にHis-tag配列を付加した。また、BL21(DE3), HMS174(DE3), C41(DE3), C43(DE3)などの合計8種類の大腸菌株を発現宿主として使用した。HsTyrの発現は、大腸菌の細胞抽出物の可溶性画分を使用して、His-tag配列を認識するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法によって検証した。各組換え大腸菌において、2種類の培養温度(30℃, 16℃)と時間(24 h, 48 h)をそれぞれ検討した結果、C41(DE3)株を宿主として使用し、16℃で24時間培養した時に、HsTyrSが最も高生産されることを見出した。現在、さらに条件を検討することによってHsTyrの高発現を目指すとともに、発現させたHsTyrの精製方法について検討を行っている。

Production of recombinant human tyrosinase using *Escherichia coli* expression system.

○Takumi Kanaoka, Seiya Tanaka, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
 (Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words human tyrosinase, oxidase, recombinant protein production, melanin synthesis