

1P-053 PAPS 合成酵素アイソフォームの機能解明とその利用

○上中 勝護¹, 黒木 勝久¹, 上地 珠代², 剣持 直哉²,
Liu Ming-Cheh³, 水光 正仁¹, 榊原 陽一¹
(¹宮崎大・農, ²宮崎大・フロンティア, ³トレド大・薬)
ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

【目的】PAPS synthetase (PAPSS)は、無機硫酸(SO₄²⁻)とATPから活性硫酸PAPS(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)を合成する酵素である。脊椎動物ではゲノムにPAPSS遺伝子が複数存在しており、ヒトではPAPSS1/2、ゼブラフィッシュではPAPSS1/2/3が知られている。これらアイソフォームはそれぞれ個別の生理学的意義を有していることが推察されるが、未だに解明されていない。本研究では、PAPSS アイソフォームの生理機能解明とその利用を目的として研究を行った。

【方法】ヒトおよびゼブラフィッシュ PAPSS は pGEX 系ベクターを用いて大腸菌で発現・精製したリコンビナント酵素について酵素学的諸性質の解析を行った。また、モルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)を用いて、ゼブラフィッシュ受精卵へのマイクロインジェクションにより PAPSS 遺伝子をノックダウンし、表現型の観察を行った。

【結果および考察】PAPSS はアイソフォーム間で異なる酵素学的諸性質を有しており、ノックダウン実験においてもアイソフォーム間で差異のある表現型が観察された。PAPS は生体内における化学修飾の一種「硫酸化」に用いられる唯一の硫酸供与体であり、解毒代謝やステロイドホルモンの機能調節、タンパク質翻訳後修飾等に不可欠である。本結果より、PAPS は脊椎動物の発生段階において重要な役割を担っていることが推察された。また、硫酸化ペプチド/タンパク質や硫酸化生体制御分子を標的とした物質生産においてその利用が期待される酵素で有る。

Functional analysis and application of PAPS synthetase

○Shogo Kaminaka¹, Katsuhisa Kurogi¹, Tamayo Uechi², Naoya Kenmochi²,
Liu Ming-Cheh³, Masahito Suiko¹, Yoichi Sakakibara¹
(¹Fac. Agric., Univ. Miyazaki, ²Front. Sci. Res. Center., Univ. Miyazaki, ³Fac. Pharm., Univ. Toledo)

Key words PAPS synthetase, sulfation, zebrafish

1P-054 平板動物由来リゾチームの機能解析

○塙 宗雅, 中野 裕昭
(筑波大院・生命環境・下田臨海実験セ)
h.nakano@shimoda.tsukuba.ac.jp

【背景・目的】リゾチーム(EC 3.2.1.17)は細菌細胞壁のN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンとのβ1-4結合を加水分解する溶菌酵素であり、その溶菌及び抗菌作用から天然の抗菌物質として食品保存料や医薬品に応用されている。しかし、現在普及しているニワトリリゾチーム(HEWL)は活性が比較的低く、またグラム陽性菌に対する抗菌性は示すがグラム陰性菌には作用しないため、その使用範囲は限られている。平板動物は6種類の細胞からなる単純な形態の海産無脊椎動物であり、体外消化を行うため耐塩性に優れた消化酵素を有していると考えられる。また、飼育下の平板動物においてグラム陰性菌を溶菌する現象も観察されているため、広い抗菌スペクトルを有するリゾチームの存在が示唆される。よって、我々は平板動物にはHEWLよりも広範囲で応用可能なリゾチームが存在すると予想し、解析を行った。

【方法・結果】他生物種の溶菌タンパク質の遺伝子情報及び平板動物ゲノムデータベースを用いて平板動物リゾチーム遺伝子の完全長cDNAをクローニングし、大腸菌を用いて発現させた組換え平板動物リゾチーム(rPLys)を精製した。精製rPLysのグラム陽性菌 *Micrococcus luteus* に対する溶菌作用からその最適反応温度、最適反応pH、各種金属塩の影響、熱安定性について評価したところ、rPLysは低温、中性においてHEWLより高い活性を有したものの、予想に反して海水程度のイオン強度の溶液中では活性を示さなかった。また、熱処理後にも50%以上の残存活性を示した。現在、rPLysのグラム陽性菌及び陰性菌に対する抗菌スペクトルの解析を行っている。

Functional analysis of a lysozyme from Placozoa

○Munetsugu Bam, Hiroaki Nakano
(Shimoda Marine Research Center, Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Placozoa, lysozyme, bacteriolysis, marine invertebrate

1P-055 ホスファチジルイノシトール酵素合成の効率化

○村木 美智子, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾
(名大院・生命農学)
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

【背景・目的】ホスホリバーゼD(PLD)はリン脂質のホスホジエステル結合の加水分解反応とホスファチジル基転移反応を触媒する。後者の反応は、安価なレシチンから希少な高価なリン脂質を合成するために利用できる。リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール(PI)には脂質代謝改善作用等の有効な生理機能や化学合成は非効率的で煩雑であるため、高効率なPIの製造法が望まれている。

本研究室では元来PI合成能を持たない放線菌 *Streptomyces antibiotics* 由来PLDをタンパク工学的に改変することで、同活性を付与することに成功した。しかし、この改変型PLDによるPI合成反応ではPIの収率が低く、リン脂質全体の10%程度にすぎないという問題があった。そこで酵素の実用性を高めるため、酵素反応条件を検討し、PIの合成効率の向上を目指した。

【方法・結果】種々の反応条件の検討をした結果、反応系に高濃度のNaClを含有させた際にPI収率の劇的な向上が見いだされた。

種々のNaCl濃度でのイノシトール溶解度を測定したところ、NaCl濃度が上昇するにつれて、イノシトール溶解度も上昇することが確かめられた。また、イノシトールを過剰に加えて行った反応では、さらなるPI合成効率の向上が認められた。

最適条件(20℃、24h、80%飽和NaCl、飽和イノシトール)においてリン脂質中のPIの割合は約50%に達し、従来の10%程度から飛躍的にPI合成効率を上昇させることに成功した。

Improvement of enzymatic phosphatidylinositol synthesis

○Michiko Muraki, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words phospholipase D, salt

1P-056 化学還元、微生物酸化反応を用いたD-フコースから1-デオキシ-D-ブシコースの生産

○吉原 明秀¹, 山口 貴弘², Fleet George W. J.³, 何森 健⁴
(¹香川大・希少糖研セ, ²香川大・農, ³Oxford Univ., ⁴希少糖生産技術研究所)
yoshihara@ag.kagawa-u.ac.jp

【目的】我々は、自然界にわずかに存在しない単糖である希少糖の効率的な生産を目指し研究を行っている。これまで、D-ブシコースなどの希少糖を大量生産する事で、希少糖が様々な生理活性を有することを明らかにしてきた。本発表では、化学還元、微生物酸化反応を用いた1-デオキシ-D-ブシコースの効率的な生産方法確立を目的とした。

【方法】まず、D-フコースから水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元により、D-フシトールを生産した。得られた生産物を基質とし *Enterobacter agglomerans* 221eを用いた酸化反応により、6-デオキシ-D-タガトースへ転換した。6-デオキシ-D-タガトースを上記の方法により、6-デオキシ-D-タリトールへ還元した。さらに、得られた6-デオキシ-D-タリトールを基質に *Klebsiella pneumoniae* 40bRを用いて1-デオキシ-D-ブシコースの生産を試みた。

【結果】D-フコースは、水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元により、100%D-フシトールに転換された。*E. agglomerans* 221eを用いて、1% D-フシトールを30℃で72時間酸化させた結果、6-デオキシ-D-タガトースが60%得られた。得られた6-デオキシ-D-タガトースは、水素化ホウ素ナトリウムを用いて6-デオキシ-D-タリトールとD-フシトールに還元でき、その比は6-デオキシ-D-タリトール:D-フシトール=65:35であった。1%6-デオキシ-D-タリトールを基質に、*K. pneumoniae* 40bRを用いて30℃で酸化した結果、24時間ですべての基質が変換され1-デオキシ-D-ブシコースを生産することができた。

Production of 1-deoxy-D-psicose from D-fucose

○Akihide Yoshihara¹, Takahiro Yamaguchi², George W. J. Fleet³, Ken Izumori⁴
(¹RSRC, Kagawa Univ., ²Fac. Agric., Kagawa Univ., ³Oxford Univ., ⁴Izumoring LLC)

Key words rare sugar, 1-deoxy-D-psicose, Microbial oxidation