

2P-029 プロテアーゼを必要としない HbA1c 測定法の開発

○一柳 敦¹, 鍼 陽介¹, 渡辺 文太³, 中津 亨², 加藤 博章²,
五味 恵子¹
(¹キッコーマン, ²京大院・薬, ³京大・化研)
aichiyanaigi@mail.kikkoman.co.jp

【目的】糖尿病の診断マーカーである HbA1c は、ヘモグロビン β 鎖の N 末端に血中のグルコースが結合して生成する糖化タンパク質であり、血中ヘモグロビンに占める HbA1c の割合は過去 1-2 ヶ月の平均血糖値を反映する。これまでに我々は、fructosyl peptide oxidase (FPOX) を利用して、HbA1c の β 鎖 N 末端からプロテアーゼにより遊離される糖化ジペプチド(F-VH)を定量する HbA1c の酵素的測定法を開発し、本測定法は既に市場に受け入れられている。一方で、測定試薬中のプロテアーゼは FPOX にも作用するため、理想的には HbA1c から F-VH を遊離させる工程を含まない測定法が望まれる。そこで本研究では、FPOX の基質特異性を改変して HbA1c の β 鎖特異的に作用する FPOX を獲得し、プロテアーゼを必要としない HbA1c の酵素的測定法の構築を目指した。

【方法・結果】結晶構造から同定した FPOX の基質結合部位を構成するアミノ酸残基を対象に変異導入実験を行い、変性 HbA1c に対して酸化活性を示す FPOX-H を獲得した。続いて、FPOX-H に界面活性剤耐性変異を追加導入した FPOX-DH を作製し、界面活性剤で前処理した HbA1c の定量試験を行った。HbA1c を FPOX-DH で酸化した時に生じる H₂O₂ の定量にはペルオキシダーゼによる比色法を利用した。その結果、標準物質の HbA1c 濃度と吸光度の間に相関が成立し、プロテアーゼを必要としない HbA1c の酵素的測定法の構築に成功した。

Development of protease-free HbA1c measurement method

○Atsushi Ichiyanaigi¹, Yosuke Masakari¹, Bunta Watanabe³, Toru Nakatsu²,
Hiroaki Kato², Keiko Gomi¹
(¹Kikkoman Corp., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ., ³Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

Key words diabetes, hemoglobin A1c, fructosyl peptide oxidase

2P-030 亜硝酸はギ酸オキシダーゼの電子受容体となる

○中垣 康平, 田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之
(福井大院・工)
uchida@u-fukui.ac.jp

[背景] ギ酸オキシダーゼ (FOD) は酵素を電子受容体としてギ酸を二酸化炭素に酸化し、同時に過酸化水素を産出する。FOD は、GMC オキシドレダクターゼファミリーに属するが、イソアロキサジン環の 8 位が修飾された 8-formyl-FAD をコファクターとし、そのビリミジン環部位近傍には His-Arg 対が存在する。本研究では、FOD の亜硝酸との反応について検討した。

[方法] 嫌気的条件下でギ酸 1.0 mM 処理により生成する FOD 還元型酵素を亜硝酸 1.0 mM と反応させ、可視吸収スペクトル変化を測定した。この反応液から PD-10 カラムを用いてギ酸、亜硝酸を除き、亜硝酸添加、無添加時における可視吸収スペクトル変化を測定した。また、酸化型 FOD やジチオナイト還元により作成したセミキノン型 FOD と亜硝酸との反応についても検討した。

[結果と考察] 還元型酵素は、嫌気的条件下で亜硝酸と反応させると、混合している間に可視吸収スペクトルが変化した。変化後の可視吸収スペクトルは、ジチオナイト還元により生成するセミキノン型酵素の可視吸収スペクトルと類似していた。酸素存在下、このセミキノン型酵素を亜硝酸と反応させると、可視吸収スペクトルが徐々に変化し最終的には酸化型酵素のスペクトルになった。一方、亜硝酸無添加時には変化しなかった。また、酸化型酵素は亜硝酸と反応させると、可視吸収スペクトルが変化した。これらの結果より、(1) FOD の酸化型、セミキノン型、還元型酵素は、全て亜硝酸結合能を有し、(2) 還元型酵素及びセミキノン型酵素に対して亜硝酸は一電子受容体として働く、(3) 還元型酵素から亜硝酸への一電子は、セミキノン型酵素から亜硝酸への一電子移動よりずっと早いことが分かった。

Nitrite serves as electron acceptor of formate oxidase

○Koukei Nakagaki, Naoto Tanabe, Daiki Doubayashi, Masaya Oki,
Hiroyuki Uchida
(Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

Key words formate oxidase, nitrite

2P-031 ジペプチド Val-Gly 合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼの精製と諸性質の検討

○田中 貴大¹, 高木 一好², 若山 守¹
(¹立命館大院・生命科学・生工, ²立命館大院・生命科学・応化)
wakayama@sk.ritsumeai.ac.jp

【目的】 Val-Gly(バリングリシン)は γ-Glu-Val-Gly(γ-グルタミルバリングリシン)の酵素合成の基質として有用なジペプチドである。γ-Glu-Val-Gly は非常に高活性なコク味物質として、新規な食品添加物としての利用が期待されている。しかし、Val-Gly を効率的に合成する方法が確立されていないため、γ-Glu-Val-Gly は高価な物質である。そこで、本研究では、L-アミノ酸エステラーゼにより、バリンのメチルエステルとグリシンから、Val-Gly を酵素合成する方法を確立することを目的とし、土壌中から Val-Gly 合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼを生産する菌のスクリーニング、および酵素の精製と精製酵素を用いた酵素の諸性質の検討を行った。

【方法・結果】 日本各地の土壌より、Val-Gly 合成能を有する微生物のスクリーニングを行った。その結果、単離した 17 種類の菌株のうち、*Elizabethkingia* 属の一種に最も強い活性が見られた。そこで、*Elizabethkingia* sp. TT1 の菌体より、陽イオン交換、疎水性、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて L-アミノ酸エステラーゼを精製した。最終精製酵素は、精製倍率 1300 倍、比活性 118.8 μmol/min/mg を示した。SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果、本酵素はホモダイマーとして機能することが示唆された。本酵素の至適 pH は 9.0、至適温度は 25℃、安定温度は 25℃~40℃、安定 pH は 5.0~8.5 となり、EDTA および Ni²⁺によってわずかに反応が阻害された。

Purification and characterization of L-amino acid esterase catalyzing synthesis of dipeptide Val-Gly

○Takahiro Tanaka¹, Kazuyoshi Takagi², Mamoru Wakayama¹
(¹Biotechnol., Graduate School of Life Sci., Ritsumeikan Univ., ²Applied. Chem., Graduate School of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words dipeptide, val-gly, L-amino acid esterase, purification

2P-032 *Delftia acidovorans* 由来 β-aspartyltransferase の精製と諸性質の検討

○猶原 良祐¹, Asep A. Prihanto¹, 野々村 祐輝¹, 高木 一好²,
梅川 碧里¹, 若山 守¹
(¹立命館大院・生命科学・生工, ²立命館大院・生命科学・応化)
wakayama@sk.ritsumeai.ac.jp

【目的】 γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) は加水分解反応と転移反応を触媒する酵素である。GGT は N-terminal nucleophile hydrolase superfamily に属し、2 つのヘテロサブユニットを持つことが知られており、グルタチオン代謝への関与やテアニンを始めとする γ-グルタミル化合物合成への利用など多くの研究がされてきた。一方、β-アスパルチルトランスフェラーゼ(BAT)に関しては *Mycobacterium tuberculosis* 由来の酵素しか報告されていないのが現状である。GGT に関する研究を行う中で、*Delftia acidovorans* 由来 GGT(DaGGT)が GGT 活性と BAT 活性を併せ持つことが示唆された。これは初めての例であり、本発表では DaGGT の部分精製酵素標品における諸性質について報告する。

【方法・結果】 DaGGT 遺伝子を pET22b でクローン化し、Rosetta Gami B(DE3) で形質転換した。得られた形質転換体を 30℃、LB 培地で培養した。その後、OD₆₀₀ が 0.4 に達したところで、0.2 mM IPTG を加え、22℃で 24 時間培養した。集菌、超音波破碎を行い、これを無細胞抽出液とした。この無細胞抽出液をクロマトグラフィーに供し、β-aspartyltransferase を部分精製し、諸性質を検討した。BAT 活性は pH7.5、50℃で 9.92 μmol/min・mg であり、同条件で BAT 活性が GGT 活性よりも高かった。現在、本酵素の発現量が低いことが課題であり、高発現するために種々の検討を行っている。

Purification and Characterization of β-aspartyltransferase from *Delftia Acidovorans*

○Ryosuke Naohara¹, Prihanto Asep A.¹, Yuuki Nonomura¹, Kazuyoshi Takagi²,
Midori Umekawa¹, Mamoru Wakayama¹
(¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., ²Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words gamma-glutamyltransferase, beta-aspartyltransferase, characterization, purification