

**2P-041** *Chryseobacterium* sp. 5-3B 株由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの部位特異的アミノ酸置換と機能解析

○尾関 貴博, 田中 耕生, 吉田 健一, 竹中 慎治  
(神戸大院・農・生命機能)  
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【目的】本研究では、キラルアミンのアミノ基を立体選択的に *N*-アセチル化する酵素の特性を明らかにし、生体触媒として利用することを目的としている。*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株由来アセチル CoA 依存性 *N*-アセチルトランスフェラーゼ (NatA) は、2-フェニルグリシンの L-体に対してのみ活性を示す。NatA は既報の *N*-アセチルトランスフェラーゼ類とは類似性が低く、アセチル CoA や基質との結合にかかわる領域は明らかではない。そこで、アミノ酸置換によりこれらの領域の推定を試みたので報告する。

【方法・結果】組み換え酵素およびその変異酵素は、pET28b ベクターおよび大腸菌 BL21 (DE3) 株にて His-tag 融合タンパク質として生産させ、His-Accept カラムにより精製した。*S. aureus* Mu50 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼ (PDB No. 3d8p) を基に NatA の推定高次構造モデルを作製し、アセチル CoA や基質結合にかかわる領域を推定した。結合に関わると推定したアミノ酸残基について、部位特異的変異導入法にて 20 種の変異酵素を調製し、*N*-アセチル化酵素活性を調べた。アセチル CoA 結合にかかわるアミノ酸残基として、M87、V89、K131、Y133 に着目し、アラニン残基へ置換した変異酵素は、対照と比較して相対活性は 1.6%、<1%、<1%、5.8% となった。一方、基質との結合にかかわるアミノ酸残基として Y148 に着目し、アラニン残基へ置換した変異酵素は、対照と比較して相対活性は 170% となった。現在、各変異導入酵素について、動力学的定数の算出を進めている。

**Characterization of internal substrate and acetyl-CoA binding sites in *N*-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. 5-3B**

○Takahiro Ozeki, Kosei Tanaka, Ken-ichi Yoshida, Shinji Takenaka  
(Dept. Agribiosci., Grad. Sch. Agri., Kobe Univ.)

**Key words** *Chryseobacterium*, *N*-acetyltransferase, 2-phenylglycine

**2P-042** 細菌由来ジアミントランスアミナーゼ遺伝子のクローニングと発現酵素の特性解析

○竹内 大貴<sup>1</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 岡井 直子<sup>2</sup>, 田中 耕生<sup>2</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>, 竹中 慎治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農,<sup>2</sup>神戸大・自科・研究環)  
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【目的】脂肪族ジアミン類は、ブトレンシヤカダベリン等の生体由来アミンとエポキシ樹脂硬化剤、ポリアミド・ポリウレタン樹脂のモノマー原料として利用される工業化学製品に大別できる。生体アミンは細胞の必須成分でもあり、外膜の安定化や細胞の成長と増殖に関わる。一方、ジアミン類は、ヒスタミン分解酵素を阻害することで食中毒を助長することや発がん性物質であるニトロソアミン類の前駆体となることも指摘されている。よって、脂肪族ジアミン類の微生物分解に関わる酵素系を明らかにすることは、環境保全の観点から重要である。本研究では、*P. aeruginosa* NBRC12689 や *E. coli* K-12 由来ジアミントランスアミナーゼ (YgjG および SpuC) の基質特異性を中心に酵素の特性を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】NBRC12689 株および K-12 株をブトレンシヤ添加培地および L-Lys 培地で一晩振とう培養し、細胞破砕液中のトランスアミナーゼ活性を調べた結果、それぞれ 1.37 および 1.36 mU/mg であった。つづいて、両菌株からジアミントランスアミナーゼ遺伝子 (*spuC* [1,368 bp] および *yjgG* [1,377 bp]) をクローニングし、pCold<sup>TM</sup> に組み込み *E. coli* DH5α に導入して得られた形質転換株で His-tag 融合タンパク質として発現させた。Ni-キレートアガロースカラムにより精製した rSpuC はブトレンシヤに対して活性を示し、比活性 22 mU/mg であった。現在、rYgjG の発現も進めており、炭素数の異なる脂肪族アミン類に対しての基質特性を明らかにする予定である。

**Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of bacterial diamine transaminases**

○Daiki Takeuchi<sup>1</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Naoko Okai<sup>2</sup>, Kosei Tanaka<sup>2</sup>, Ken-Ichi Yoshida<sup>1</sup>, Shinji Takenaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agri., Kobe Univ., <sup>2</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

**Key words** diamine transaminase, putrescine

**2P-043** かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus* 属糸状菌由来アスパルティックプロテアーゼの特性解析

○竹中 慎治<sup>1</sup>, 仙波 弘雅<sup>1</sup>, 田中 耕生<sup>1</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>, 小山 大<sup>2</sup>, 土居 幹治<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農,<sup>2</sup>マルトモ)  
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【目的】我々は、かつお節のかび付けに伴う色相変化の機構を明らかにすることを目的とし、かつお節 (枯節) から単離された *Aspergillus* 属糸状菌の生成する脱色因子の特性解析を行い、アスパルティックプロテアーゼが脱色因子の 1 つであることを報告した<sup>1)</sup>。同プロテアーゼには、脱色活性に優れた MK82 株由来プロテアーゼと低水分活性下においても活性を維持できる MA0196 株由来ハイマンノース型プロテアーゼがある。本報では、*Phicha pastoris* による組み換えプロテアーゼの生産とそれらの特製解析について述べる。

【方法および結果】MK82 プロテアーゼおよび MA0196 プロテアーゼの N 末端および内部アミノ酸配列を参考に、それぞれの菌株から mRNA を抽出して調製したプロテアーゼ cDNA をクローニングした。*P. pastoris*-pPICZαA の発現系で発現を行い、培養上清に活性体を分泌生産させることができた。両組み換えプロテアーゼのプロテアーゼ活性や色素タンパク質脱色活性は親株酵素と同程度であった。また、至適 pH や温度安定性についても同程度であった。つづいて、培養条件を検討し、親株での培養と比較して培養液あたりのプロテアーゼ量は 10 倍以上に高めることができた。現在、親株由来酵素と組み換え酵素の特性比較をさらに進めている。1) J. Sci. Food Agric. 93:1349-1355 (2013).

**Characterization of aspartic proteases from *Aspergillus repens* and *Aspergillus glaucus***

○Shinji Takenaka<sup>1</sup>, Hironori Senba<sup>1</sup>, Kosei Tanaka<sup>1</sup>, Ken-Ichi Yoshida<sup>1</sup>, Dai Koyama<sup>2</sup>, Mikiharu Doi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., <sup>2</sup>Marutomo Co., Ltd.)

**Key words** *Aspergillus repens*, *Aspergillus glaucus*, aspartic protease, decolorisation

**2P-044** FMO および QM/MM 法によるサルコシオキシダーゼの反応シミュレーション

○阿部 幸浩<sup>1</sup>, 庄司 光男<sup>2</sup>, 西矢 芳昭<sup>3</sup>, 相場 洋志<sup>1</sup>, 岸本 高英<sup>1</sup>, 北浦 和夫<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>東洋紡,<sup>2</sup>筑波大院・数理物質,<sup>3</sup>摂南大・理工・生科,<sup>4</sup>神戸大院・シ情)  
yukihiro\_abe@toyobo.jp

【背景と目的】サルコシオキシダーゼ(MSOX)は、腎疾患マーカーであるクレアチニンの定量測定に広く使われている。MSOX の反応機構は、大きく(1)ヒドリド移動、(2)1 電子移動、(3)ポラー機構が提案されているが、詳細は解明されていない。本研究では、サルコシオおよびシクロプロピルグリシン(CPG)が受ける周囲の残基からの相互作用をフラグメント分子軌道(FMO)法で求め、次に反応経路を QM/MM 法で検討した。

【計算方法】サルコシオキシダーゼの結晶構造 (PDB ID: 1EL5) を基に系を作り、周囲に水を配置して、20 ns 間の MD シミュレーションを行った。反応中心から半径 40Å の球状に系を切り出して計算モデルとした。反応において重要な役割を果たすと考えられるフラビン環、His269、サルコシ、および His269 とサルコシの間に存在する水を QM 領域にとり、NWChem/QM/MM/B3LYP-D3/6-31G\*/Amber99 でミニマイズした。酵素表面から 10Å 内の水を残して、FMO 法により基質と周辺残基との相互作用を計算した。また、NEB 法により反応経路および遷移状態を推定した。

【結果と考察】基質がサルコシの場合、反応はヒドリド移動機構で進む。一方、基質が CPG の場合、CPG からフラビンへの 1 電子移動→CPG の開環→開環 CPG のフラビン C4a への付加→H 原子の分子内転移→開環 CPG の脱離で反応が進む可能性が高いことが示唆された。

**Reaction simulation of sarcosine oxidase by using FMO and QM/MM methods**

○Yukihiko Abe<sup>1</sup>, Mitsuo Shoji<sup>2</sup>, Yoshiaki Nishiyama<sup>3</sup>, Hiroshi Aiba<sup>4</sup>, Takahide Kishimoto<sup>1</sup>, Kazuo Kitaura<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>TOYOBO, <sup>2</sup>Grad. Sch. Pure Appl. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>Dept. Life Sci., Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ., <sup>4</sup>Grad. Sys. Inf., Kobe Univ.)

**Key words** sarcosine oxidase, mechanism, simulation, QM / MM