

3P-033 セルロソームミメティクス複合体の構築によるナノ近接場での連続酵素反応

○野北 昂志¹, 一瀬 博文², 北岡 卓也²
 (¹九大院・生資環, ²九大院・農)
 ngt-takashi@agr.kyushu-u.ac.jp

【緒言】グリーンサステナブルケミストリーの発展において、酵素は低環境負荷での触媒反応を可能し、有用物質の合成触媒として注目されている。有用物質生産へ向け、温度や pH などの外的要因に対して鋭敏に応答する酵素活性を戦略的に制御し、効率的な多段階反応を達成することは生産プロセスの構築へ向けた重要な課題である。セルロース分解性微生物はセルロソームと呼ばれる複合体によって効率的なセルロース分解を行う。セルロソームは中核となるスキャフォールドインにコードされたコヘシンと、酵素にコードされたドックリンが強くかつ近接場に固定化されている。本研究では、コヘシン-ドックリン間の高い親和性を活かし、コヘシン融合グリセロールデヒドロゲナーゼ (GDH) とドックリン融合アセトフェノニレダクターゼ (APRD) の近接固定化による連続反応を試みた。

【方法・結果】*Clostridium thermocellum* のコヘシン領域を *Escherichia coli* DH5α 由来 GDH に連結した融合酵素およびドックリン領域を *Geotrichum candidum* 由来 APRD に連結した融合酵素を pET ベクターへ導入した。*E. coli* BL21 (DE3) star を宿主として発現、精製を行った。GDH-APRD 連続反応の活性は、基質を含む緩衝液 (500 μM Glycerol, 500 μM NAD⁺, 500 μM acetophenone) 中で、所定時間反応後、基質および生成物の消長を HPLC で分析した。速度論的解析の結果、コヘシン-ドックリン相互作用が誘発されて酵素が近接場に固定化され、基質チャネリング効果が発現して連続反応の効率が上昇したことが示唆された。

Cooperative Enzymatic Reaction by Cellulosomal Complex via Cohesin-Dockerin Interaction

○Takashi Nogita¹, Hirofumi Ichinose², Takuya Kitaoka²
 (¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words cellulosome, cohesin-dockerin, enzyme engineering

3P-034 シトクロム P450 BM3 の固定化

鈴木 理沙, ○平川 秀彦, 長棟 輝行
 (東大院・工)
 hirakawa@bio.t.u-tokyo.ac.jp

【目的】シトクロム P450 BM (P450 BM3) はヘムドメインとシトクロム P450 還元酵素 (CPR) 様ドメインからなるモノオキシゲナーゼである。P450 BM3 はホモ二量体を形成し、CPR 様ドメインが補酵素 NADPH から受け取った電子はもう一方のペプチド鎖に含まれるヘムドメインに伝達される。このホモ二量体中での分子間電子伝達において CPR 様ドメインは構造変化を起こす必要があるために、多点で担体上に安定に固定化する既往の方法では P450 BM3 を固定化酵素として利用するのは困難である。本研究では、ヘテロ三量体タンパク質を介して、ヘムドメインと CPR 様ドメインに分割した P50 BM3 を担体上で再構成することにより、P450 BM3 の担体上への固定化を試みた。

【方法・結果】*Sulfolobus solfataricus* 由来核内増殖抗原 (PCNA) は PCNA1、PCNA2、PCNA3 からなるヘテロ三量体タンパク質である。個別に発現したサブユニットは等モル濃度で混合するだけ速やかにヘテロ三量体を形成することが知られている。まず、PCNA1 に CPR 様ドメイン、PCNA3 にヘムドメインを連結した融合タンパク質と PCNA2 を混合することにより、P450 BM3 が再構成できることを確認した。次に、アミンカップリングで PCNA2 を固定化した後、PCNA1 融合 CPR 様ドメインと PCNA3 融合ヘムドメインを結合させた。P450 BM3 を直接固定化した場合はほとんど触媒活性を発揮しなかったのに対して、PCNA を介して固定化した場合は触媒活性を発揮し、ラウリン酸の水酸化を行うことに成功した。

Immobilization of cytochrome P450 BM3

Risa Suzuki, ○Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune
 (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words cytochrome P450, immobilization, hydroxylation, scaffold

3P-035 歯周病菌のプロリルトリペプチジルペプチダーゼを阻害する米ぬか由来タンパク質

○安形 博菜¹, 西村 仁¹, 中嶋 義隆¹, 伊藤 潔², 芳本 忠¹
 (摂南大学・理工学研究科・生命科学専攻, ²摂南大学・薬学部)
 yoshimoto@lif.setsunan.ac.jp

【目的】歯周病は成人の 60% が感染し、歯肉コラーゲンを分解し歯が抜ける病気と共に様々な病気を起す。原因菌 (*Porphyromonas gingivalis*) はエネルギー源として糖の利用ができなく、アミノ酸を利用する特殊な菌である。我々は、*P.gingivalis* の持つプロリルトリペプチジルペプチダーゼ (PTP) がキナーゼとして、立体構造の解明や化学合成阻害剤との複合体構造解析を行ってきた。今回、歯周病予防薬を目指し、天然物に酵素阻害剤を求めクリーニングした結果、米糠から PTP 阻害剤 (PTPI) を見出した。

【方法】酵素活性は Ala-Phe-Pro-β-naphthylamide (NA) を基質とし遊離した β-naphthylamine をアゾ発色させ 550nm で吸光度測定した。

【結果・考察】米糠抽出物から硫酸分画、疎水およびイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法を用いて阻害剤を単一に精製した。阻害物質はタンパク質で SDS-PAGE による分子量は 24kDa であった。阻害物質はジペプチジルペプチダーゼ 4 やプロリルトリペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼは阻害しなかった。質量分析から PTPI は Mn タイプのスーパーオキシドデスムターゼ (rMnSOD) (GeneBank ID: Os05g0323900) であることが分かった。更に、遺伝子を大腸菌のコドンに合わせ cDNA を合成し、pET32 ベクターに組み込み大腸菌 BL21(DE3) でチオレドキシニン (Trx) との融合タンパク質として発現した。Ni カラムで精製したところ、阻害活性および SOD 活性も示した。しかし、チオレドキシニンそのものの両活性は見られなかった。

Inhibitor from rice bran for prolyl tripeptidyl peptidase from *Porphyromonas gingivalis*

○Hirona Agata¹, Hitoshi Nishimura¹, Yoshitaka Nakajima¹, Kiyoshi Ito², Tadashi Yoshimoto¹
 (¹Dev. Lifesci. Fac.Sci. Eng. Setsunan Univ., ²Pharm., Setsunan Univ.)

Key words prolyl tripeptidyl peptidase, inhibitor, periodontal disease

3P-036 *Rhodococcus* 属菌のフタル酸モノエステル加水分解酵素に重要なアルギニン残基

岩田 真人^{1,2}, ○西山 孝¹, 藤井 隆夫¹
 (¹崇城大・生物生命, ²アイエムビー株式会社)
 fujii@life.sojo-u.ac.jp

【背景・目的】フタル酸エステル類はプラスチック製品の可塑剤として使われているが、難分解性化合物である。我々が土壌サンプルより分離した 2 株のフタル酸エステル類資化性菌、*Rhodococcus* sp. EG-5 株と *Gordonia* sp. P8219 株は共にフタル酸モノエステル類の分解に関わる mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) hydrolase を持っていた。両菌株の MEHP hydrolase の同一性は 39% しかないが、共に serine hydrolase で、catalytic triad および活性中心セリン残基を含むモチーフ (G-x₁-S-x₂-G) が保存されていた。x 部位に塩基性残基が存在することは珍しいが、両酵素では x₁ と x₂ はそれぞれヒスチジンとアルギニンで、とくに x₂ がアルギニンである他の serine hydrolase はない。P8219 株の MEHP hydrolase で x₂ をメチオニンに変異させると酵素活性が消失することを報告している。本研究では、EG-5 株の MEHP hydrolase でもこれら塩基性残基が活性に重要であるか確かめることを目的とした。

【方法・結果】EG-5 株の MEHP hydrolase の x 部位を疎水性残基に置換するよう変異させた遺伝子を実験室で発現させた。MEHP を基質とした場合、野生型酵素では Vmax が 90 μmol/min・mg に達したが、x₂ をアラニンおよびイソロイシンに置換した酵素では活性がなく、EG-5 株の MEHP hydrolase でも x₂ 部位のアルギニンの重要性が確認された。

The arginine residue is critical for the phthalate monoester hydrolase of *Rhodococcus* sp.

Makoto IWATA^{1,2}, ○Takashi NISHIYAMA¹, Takao FUJII¹
 (¹Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ., ²IMB Co, Ltd.)

Key words *Rhodococcus*, serine hydrolase, phthalate monoester