

1C11-1 放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来長鎖および短鎖アミノアシラーゼの特性解析およびクローニング

○中谷 泰之, 是石 真友子, 今中 洋行, 今村 維克, 中西 一弘
(岡山大院・自然科学研究科)

放線菌 *Streptomyces mobaraensis* NBRC13819 の培養上清から見出した長鎖および短鎖アミノアシラーゼに着目し、酵素の精製、諸特性解析および遺伝子解析を行った。長鎖および短鎖アミノアシラーゼの反応最適温度は、それぞれ 50°C と 60°C、反応最適 pH は共に 8.0、pH 安定性は、37°C、1 時間インキュベーションの条件下で、それぞれ 9~10 と 5~8 の範囲であった。熱安定性は 1 時間インキュベーションの条件下でそれぞれ 40°C、60°C であった。基質特異性については、長鎖アミノアシラーゼの場合は *N*-アセチル-L-アミノ酸だけでなく *N*-ラウロイル-L-アミノ酸に対しても高い活性が認められた。短鎖アミノアシラーゼにおいては、*N*-アセチル-L-アミノ酸に幅広い基質特異性を示した。また、遺伝子解析の結果、長鎖および短鎖アミノアシラーゼ全 ORF は、それぞれ 1,383 bp、3,150 bp から構成されることがわかった。現在、大量発現系を構築し、本酵素の発現を検討している。

1) M. Koreishi, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1914-1922, 2005.

Characterization and cloning of long-chain aminoacylase and short-chain aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*

○Yasuyuki NAKATANI, Mayuko KOREISHI, Hiroyuki IMANAKA, Koreyoshi IMAMURA, Kazuhiro NAKANISHI
(Grad. Sch. of Natur. Sci. & Technol., Okayama Univ.)

Key words *Streptomyces mobaraensis*, aminoacylase, *N*-acetyl-L-amino acid, *N*-lauroyl-L-amino acid

1C11-3 抗腫瘍性酵素 L-メチオニン γ -リアーゼの変異酵素 C49K の作製及び性質検討

○工藤 大蔵¹, 田村 隆¹, 瀧本 明生², 高倉 知朗², 稲垣 賢二¹
(¹岡山大院・自然科学, ²塩野義製薬・創薬研)

【目的】 *Pseudomonas putida* 由来の L-メチオニン γ -リアーゼ (EC.4.4.1.11) は L-メチオニンの γ -脱離反応を触媒するピリドキサル 5'-リン酸関与酵素である。腫瘍細胞は正常細胞と比較して L-メチオニン要求性が高く、本酵素でメチオニン飢餓状態にすることでアポトーシスが誘導されるという報告がなされているので、本酵素は抗腫瘍性酵素として応用されつつある。しかし、我々は本酵素が血中においてプロテアーゼ消化などによって失活するという結果を見出した¹⁾。本酵素の Cys49-Phe50 がそのターゲットとなりうる事が判明したことから、Cys49 を Lys に変換し、その残基を PEG 化することにより血中安定性を得ることを目的としている。今回、変異酵素 C49K を作製し諸性質を検討したので報告する。【方法と結果】 部位特異的変異導入法により C49K を作製し、大腸菌で高発現させ、野生型酵素とともに DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー、Sephacryl カラムクロマトグラフィー等を駆使してそれぞれ精製した。C49K は野生型とほぼ同等の活性を有していた。速度論解析や他の諸性質については現在検討中である。

¹⁾工藤ら、2004 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p120

Production and characterization of mutant enzyme C49K of antitumor enzyme L-methionine gamma-lyase

○Daizou KUDOU¹, Takashi TAMURA¹, Akio TAKIMOTO², Tomoaki TAKAKURA², Kenji INAGAKI¹
(¹Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., Okayama Univ., ²Disc. Res. Lab. of Shionogi and Co., Ltd)

Key words methionine gamma-lyase, pyridoxal 5'-phosphate, mutagenesis

1C11-2 放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来ペニシリン V アシラーゼのアシル基転移反応を利用した機能性化合物の酵素合成

○是石 真友子, 伊勢 雄一, 谷 和葉, 今中 洋行, 今村 維克, 中西 一弘
(岡山大・工・生物機能)

放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来ペニシリン V アシラーゼは当初、カプサイシン加水分解酵素として単離されたが、遺伝子解析等の結果、beta-ラクタムアシラーゼファミリーに属することが判明した(1-2)。フェノキシ酢酸メチルおよび 6-アミノペニシラン酸を基質としたペニシリン V の合成を行い、本酵素の転移反応活性を評価した結果、高い変換効率で転移反応を触媒することが分かった。さらに、種々のカルボン酸メチルエステルおよびアミノ化合物を用いて、beta-ラクタム系抗生物質、カプサイシン誘導体、脂肪アシルアミノ酸および脂肪アシルペプチドなどの誘導体の合成を行ったところ、本酵素は幅広い基質特異性と高い転移反応活性を有することが示された(3)。(1) M. Koreishi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 72-78 (2006). (2) D. Zhang et al., *J. Biotechnol.*, **128**, 788-800 (2007). (3) M. Koreishi et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.

Enzymatic synthesis of functional compounds by the acyl-transfer reaction catalyzed by penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*

○Mayuko KOREISHI, Yuuichi ISE, Kazuha TANI, Hiroyuki IMANAKA, Koreyoshi IMAMURA, Kazuhiro NAKANISHI
(Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words penicillin V acylase, *Streptomyces mobaraensis*, acyl transfer reaction, beta-lactam antibiotic

1C11-4 L-グルタミン酸オキシダーゼの立体構造と機能の関連解析

○有馬 二郎¹, 佐々木 千津子², 坂口 智香³, 田村 隆³, 日下部 均⁴, 杉尾 成俊², 稲垣 賢二³
(¹岡山県生科総研, ²三菱化学バイオ研, ³岡山大・農, ⁴エンザイムマイクロバイオセンサ)

放線菌が生産する L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOx) は、基質特異性が厳格なため、食品や医療分野への応用に期待される(1)。また本酵素は、活性や基質親和性に劣る 2 量体の前駆体として発現し、プロテアーゼ消化で 6 量体の成熟体となる(2)。本研究では、成熟体 LGOx の立体構造から基質認識機構を予測すると共に、前駆体の構造予測を行い、性質との関係について考察した。

LGOx 分子表面には活性部位につながる長いトンネルが存在し、基質取り込みの過程が特異性と直接関わると考えられた。そこで LGOx をレセプター、Glu をリガンドとして酵素-基質結合をシミュレーションした。その結果、Glu と結合し得る部位を 3 箇所同定でき、各部位での安定な基底状態を持つ結合モデルを、基質取り込みの中間体と想定することで、取り込まれる基質の軌道が予測できた。また、他のアミノ酸でシミュレーションすると、結合部位やリガンドの安定性に差が見られ、Glu への厳格な特異性を裏付ける結果となった。現在、ホモロジーモデリングで得られる前駆体 LGOx の予測構造と、性質との関係を検討している。

1) Upadhyay et al. (2006) *Sens. Actuators B: Chem.* **119**, 570-576.

2) Arima et al. (2003) *J. Biochem.* **134**, 805-812.

Relationship between the structure of L-Glutamate oxidase and its enzymological characteristics

○Jiro ARIMA¹, Chiduko SASAKI², Chika SAKAGUCHI³, Takashi TAMURA³, Hitoshi KUSAKABE⁴, Shigetoshi SUGIO², Kenji INAGAKI³

(¹Res. Inst. Biol. Sci., Okayama Pref., ²Mitsubishi Kagaku Inst. Biotech., ³Fac. Agric., Okayama Univ., ⁴Enzyme Micro Biosensors LLP)

Key words oxidase, glutamate, substrate specificity