

3P-029 超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素と高分子化補酵素を用いたバイオアノードの構築

○山崎 晃司¹, 坂元 博昭^{1,5}, 里村 武範^{2,5}, 櫻庭 春彦³, 大島 敏久⁴, 末 信一朗^{1,2,5}
 (¹福井大院・工・繊維, ²福井大院・工・生物応用化, ³香川大・農, ⁴大阪工大, ⁵福井大学・生命セ)
 suyeb10@u-fukui.ac.jp

[緒言]

本研究室では、バイオ燃料電池の電池寿命の短さを解決するため、安定な超好熱菌由来の酵素を用いてバイオデバイスを構築している。本研究では、L-グルタミン酸を基質とする *Pyrobaculum islandicum* 由来 NAD 依存性グルタミン酸脱水素酵素 (Pis-GDH) と、NADH から電子を電極へと受け渡すため、*Pyrococcus horikoshii* 由来の NADH 脱水素酵素活性を持つ PDH タンパク質を用いてバイオアノードを構築した。さらに、NAD⁺ をアルギン酸に固定化した高分子補酵素 (Alg-NAD⁺) を用いて電子伝達効率の向上を目指した。

[実験方法及び結果]

金電極上に Dithiobis-C₂-NTA の自己組織化単分子膜を形成し、NTA 基に Ni²⁺ を配位させ、PDH に導入した His-tag と Ni²⁺ により PDH を電極に固定化した。遊離の Pis-GDH 及び補酵素として Alg-NAD⁺ を用い、フェロセンカルボン酸 (Fc-COOH) をメディエーターとし、作成した電極をサイクリックボルタンメトリーにより評価した。

Alg-NAD⁺ の添加に伴い Fc-COOH の酸化波が増大し、この酸化波の増大は遊離 NAD⁺ と比較して 1.3 倍であった。これは Alg-NAD⁺ の NAD⁺ 分子間でプロトン共役電子移動が起こることにより酵素の触媒効率が向上したためであると考えられる。

Construction of bioanode using glutamate dehydrogenase from *Pyrobaculum islandicum* and polymerized coenzyme

○Koji Yamazaki¹, Hiroaki Sakamoto^{1,5}, Takenori Satomura^{2,5}, Haruhiko Sakuraba³, Tohsihisa Ohshima⁴, Shin-ichiro Suye^{1,2,5}
 (¹Dept. Frontier Fiber Tech. Sci., Univ. Fukui, ²Dept. Biotechnol., Univ. Fukui, ³Fac. Agric., Kagawa Univ., ⁴Osaka Inst. Tech., ⁵Research and Education Prog. Life Sci, Univ. Fukui)

Key words Bioanode, Polymerized NAD⁺, Glutamate dehydrogenase

3P-030 PCNA ヘテロ三量体を利用した DNA 上への多酵素集積

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

複数の酵素による反応 (多酵素反応) を利用した複雑な構造を持つ化合物の合成が盛んに研究されており、人工的に複数の酵素を複合体形成させることで効率良い多酵素反応を実現可能であることが示されてきた。反応効率の良い多酵素複合体を構築するためには各酵素の数・配向・位置を制御することが非常に重要である。報告されている複合体構築法は酵素の失活や複合化可能な酵素の数の数に限りがあるなどの問題点があり、汎用性に欠ける。そこで、DNA 上に望みの数の酵素を望みの位置・配向で複合化可能な手法の開発を試みた。

Metalsphaera sedula 由来の核内増殖抗原(PCNA)は、段階的にヘテロ三量体を形成するリング状のタンパク質である。そこで DNA 鎖上で PCNA を逐次的に三量化させることにより、PCNA 三量体を DNA 鎖上に順番に配置する。まず、高い DNA 結合能と配列特異性を持つ DNA 結合タンパク質と PCNA1 との融合タンパク質を DNA 鎖に結合させ、起点を作る。次に、PCNA2 を加え、ヘテロ二量体を形成させ、そして、PCNA3-PCNA1 融合タンパク質を加えることで、一つ目の PCNA リングの形成及び二つ目のリング形成の開始点を作る。その後、PCNA2 及び PCNA3-PCNA1 の添加操作を繰り返すことにより DNA 配列を認識することなく、PCNA リングが DNA 上に配置されると期待される。実際にプチグレドキシン(PdX)及びプチグレドキシン還元酵素(PdR)を融合した PCNA2 を用いることで、これら二つの酵素を DNA 鎖上に固定化した。複合体の酵素活性を評価すると、PCNA2、PCNA2-PdR、PCNA2-PdX の添加順を変えることで複合体内部での PdR 及び PdX の距離を制御できることが分かった。

Controlled immobilization of multiple enzymes on DNA using PCNA from *Metalsphaera sedula*

○Fumiya Iwata, Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune
 (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words Multienzyme complex, PCNA, DNA-binding protein

3P-031 DNA 結合タンパク質を介したシトクロム P450 システムの再構成

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

【背景と目的】 細菌由来シトクロム P450(P450)が活性を示すには、NAD(P)H から、フェレドキシン還元酵素(FdR)とフェレドキシン(FdX)を介した電子伝達が必要であり、効率的な電子伝達のためには比較的高濃度の FdX が必要となること問題である。これまでに、足場分子を用いて FdR、FdX、P450 を人為的に近接させることによって電子伝達効率の向上が試みられてきた。足場分子を用いる際には、その足場分子の三次元的な構造が電子伝達効率に影響すると考えられる。本研究では配列によって三次元構造を制御可能な DNA を足場として、P450cam とその電子伝達タンパク質であるプチグレドキシンレダクターゼ (PdR)、プチグレドキシン(PdX)を DNA 結合タンパク質の一つである transcription activator like effector (TALE) を介して集積することで活性の向上を試みた。

【実験方法及び結果】 それぞれ異なる DNA 配列を認識する三種の TALE(TALEng, TALEhd, TALEnn) を PdR、PdX、P450cam と遺伝的に融合したものを発現精製した。初めに PdR-PdX 間の距離の異なる足場 DNA を用いて PdX によるシトクロム c の還元反応速度を測定することで PdR-PdX 間の電子伝達効率を評価した。その後 PdR-PdX 間の距離や PdX-P450cam 間の距離が異なる足場 DNA を用い、P450cam の酵素反応における NADH の消費速度を測定することによって PdR-PdX 間や PdX-P450cam 間の電子伝達効率を評価した。その結果、電子伝達効率は距離依存性を示し、DNA 上に集積することによって P450cam の活性が向上した。

DNA binding protein mediated reconstitution of cytochrome P450

○Yohei Hatakeyama, Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune
 (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words P450, *Pseudomonas putida*, DNA-binding protein

3P-032 メタノールバイオ電池のための酸化還元酵素の試験管内進化に向けたマイクロビーズディスプレイ法の検討

○四井 亜理沙, 設楽 俊也, 藤原 慶, 土居 信英
 (慶應大院・理工)
 doi@bio.keio.ac.jp

【背景と目的】 メタノールバイオ電池は、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) およびギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) の 3 種類の酸化還元酵素を利用し、高いエネルギー密度をもつメタノールを二酸化炭素と水に完全分解する過程で 6 つの電子を取り出すことで発電をおこなう。常温常圧で稼働可能であり小型化軽量化が容易であることなどから注目されているが、実用化には、出力および寿命の向上が必要であり、酵素の活性および安定性の向上が求められている。そこで当研究室では、ダイヤモンド微小電極を組み込んだマイクロ流体デバイス (*Anal. Chem.* 86:9570, 2014) とマイクロビーズディスプレイ法を組み合わせた酸化還元酵素の進化実験系の構築を目指している。本研究では、これら 3 つの酵素をマイクロビーズに固定するマイクロビーズディスプレイ法の検討をおこなった。

【方法と結果】 まず、ADH、ALDH および FDH の N 末および C 末にマイクロビーズ固定用 3xHA タグを付加した発現用遺伝子を作製し、大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系を用いて各酵素を転写翻訳し、発現をウエスタンブロットングにより、活性を補酵素である NADH の 340 nm の吸光度測定により確認した。その結果、タグを C 末に付加した場合に、3 種類すべての酵素の活性を確認し、3 段階酵素反応を試験管内で再構成することができた。次に、各酵素を、ビオチン標識抗 HA タグ抗体を介してストレプトアビジンビーズに固定し、固定された酵素の活性確認を前述と同様におこなった。本発表では、以上の結果について報告する。

Microbead display for *in vitro* evolution of oxidoreductases for a methanol biofuel cell

○Arisa Yotsui, Shunya Shitara, Kei Fujiwara, Nobuhide Doi
 (Grad. Sch. Sci. Tech., Keio Univ.)

Key words enzyme activity, alcohol dehydrogenase, methanol, NAD-dependent