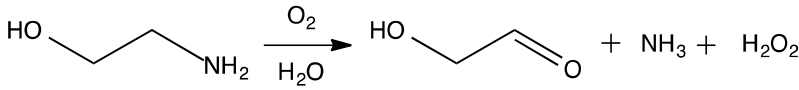


研究代表者	所属学系・職名 物質・エネルギー学系 教授 氏名 杉森大助
研究課題	高活性型アミン酸化酵素の諸性質解析と反応メカニズム解明 Characterization of highly active amine oxidase and elucidation of the reaction mechanism.
成果の概要	<p>アミン酸化酵素（以下 AOX）は、体外臨床診断薬用酵素として産業応用が期待されている酵素の一つである。これまでに、本酵素に関しては多くの研究が報告されているが、既知 AOX はエタノールアミン（以下 EA）の酸化活性が低いことが産業応用上課題であった。そこで、研究代表者らは EA に対する酸化活性が高い新規 AOX をスクリーニングし、EA に対して触媒効率が高い新規 AOX をカビの一種から見出した。本研究では、その触媒効率が高い理由を解明するための研究を実施した。</p> <div style="text-align: center;">  <p style="text-align: center;">エタノールアミン <span style="float: right;">過酸化水素</span></p> </div> <p style="text-align: center;"><b>図 1. アミン酸化酵素によるエタノールアミン酸化反応</b></p> <p>カビ由来 AOX（以下 SrAOX）について酵素学的諸性質を調べた結果、pH 7.2、45℃で酵素が最も良く働き、中性から弱塩基性 pH 域、4℃～45℃付近で活性を有することがわかった。また、基質特異性試験の結果、チラミンなどの芳香族アミンに比べて、EA などの直鎖脂肪族アミンに対して高い特異性を示した。この特徴は、<i>Arthrobacter sp.</i> 由来 AOX (ArAOX) と類似したものだったが、SrAOX の EA 酸化反応の活性化エネルギーは 29.5 kJ/mol であり、ArAOX の約半分のエネルギーで EA を酸化できることがわかった。SrAOX の速度論解析の結果、EA に対する親和性 (<math>K_m</math> 値) が 0.847 mM、最大反応速度 <math>V_{max}</math> が <math>6.99 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg-protein}^{-1}</math> と既知酵素に比べて触媒効率が極めて高く、特に EA との親和性高いという特徴があることがわかった。</p> <p>SrAOX の遺伝子塩基配列を解読することにも成功し、さらに組換え大腸菌を用いて本酵素を大量生産する方法を確立した（国内特許出願）。</p> <p>SrAOX が EA に対して高い酸化活性を有するメカニズムを解明することを目指し、本酵素の X 線結晶構造解析を試みたが、良好な結晶が得られなかった。そこで、本酵素の立体構造モデルを作成し、既知酵素との違いについて解析・考察した。その結果、図 2 に示すように本酵素は既知酵素の立体構造と全体的には類似した構造をしているものの、触媒作用を行う活性中心のアミノ酸残基を比較すると、3 者間で大きな違いが認められた（図 3）。この違いが EA の基質特異性および EA に対する高い酸化活性の要因になっているものと結論づけた。</p>

成果の概要

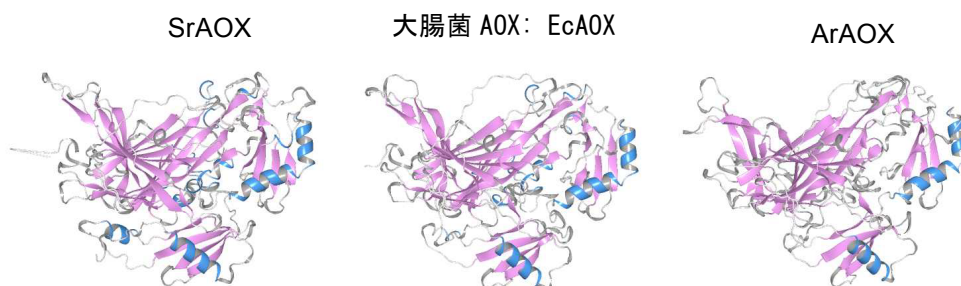


図 2. 既知酵素との立体構造比較

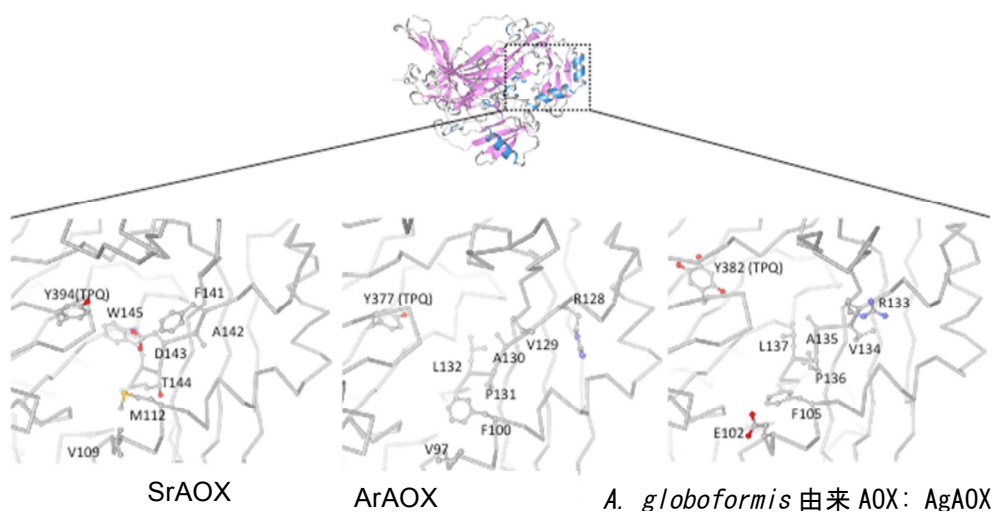


図 3. 既知類似酵素との活性中心付近の比較

なお本研究によって、以下の成果を得た。

査読付き論文

- 1) Daisuke Sugimori, Junki Ogasawara, Koki Okuda, and Kazutaka Murayama, Purification, characterization, molecular cloning, and extracellular production of a novel bacterial glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, J. Biosci. Biotechnol., 117 (4), 422-430 (2014).
- 2) Shingo Mineta, Kazutaka Murayama, and Daisuke Sugimori, The characterization of a glycerophosphoethanolamine ethanolaminophosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, J. Biosci. Biotechnol., 119 (2), 123-130 (2015).
- 3) Yoshitaka Hirano, Keisuke Chonan, Kazutaka Murayama, Shin-ich Sakasegawa, Hideyuki Matsumoto, and Daisuke Sugimori, *Syncephalastrum racemosum* amine oxidase with high catalytic efficiency toward ethanolamine, and its application in ethanolamine determination, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1-15 (2016). doi:10. 1007/ s00253-015-7198-5

記事

- 1) アミンオキシダーゼの基質認識メカニズムの解明を目指して、杉森大助、SPACC ニュースレター3月号 (2014)
- 2) 福島大学のバイオ関連研究室の紹介、Branch spirit 北日本支部、生物工学

成果の概要	<p>会誌, 88 (2), p. 78 (2014.6). 6月号</p> <p>国際会議 A novel glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase and glycerophosphoethanolamine ethanolaminophosphodiesterase from <i>Streptomyces sanglieri</i>, <u>Daisuke Sugimori</u>, Koki Okuda, Shingo Mineta, and Kazutaka Murayama, 2014 AOCs annual meeting (23rd Annual Biocatalysis Symposium), May 7, 2014 (San Antonio, TX, USA).</p> <p>国内学会 1) <i>Streptomyces sanglieri</i> A14株 glycerophosphoethanolamine ethanolamine-phosphodiesterase のキャラクターゼーションおよび発現、触媒機構の推定、峯田真吾、杉森大助、日本生物工学会 2014 年度大会、2014. 9. 9 (札幌コンベンションセンター、札幌市) 2) <i>Streptomyces sanglieri</i> A14株由来 glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase の立体構造予測と触媒残基および触媒作用メカニズムの推定、奥田航輝、杉森大助、日本生物工学会 2014 年度大会、2014. 9. 9 (札幌コンベンションセンター、札幌市) 3) <i>Streptomyces coeruleorbidus</i> 由来 aminolevulinate aminotransferase の精製およびキャラクターゼーション、遺伝子クローニング、千葉凌雅、酒瀬川信一、松本 英之、杉森大助、日本生物工学会 2014 年度大会、2014. 9. 9 (札幌コンベンションセンター、札幌市) 4) グリセロホスホコリン コリンホスホジエステラーゼの触媒反応機構の推定、奥田航輝、杉森大助、2014 年度 第5回学際的脂質創生研究部会講演会、2015. 1. 24 (京都大学) 5) グリセロホスホエタノールアミン エタノールアミンホスホジエステラーゼの基質認識機構、杉森大助、峯田真吾、2014年度 第5回学際的脂質創生研究部会講演会、2015. 1. 24 (京都大学)</p> <p>受託研究費 平成 26 年度、JST 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) 探索タイプ、鉛中毒の診断に有効な新規酵素の開発、170 万円</p> <p>共同研究費 平成 26 年度、ヒゲタ醤油株式会社、ブレビバチルスを用いたタンパク質生産技術の開発、100 万円</p> <p>寄付金 “Cosmo Bio Tools for School” 第 11 回 公開講座応援団助成プログラム(平成 26 年度)、196,400 円 (うち現物支給 106,400 円分、寄付金 9 万円)</p>
-------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------