

2.7.1 研究分野:酵素化学

構成員：	教授	井上 國世
	准教授	保川 清
	助教	滝田 禎亮
	助教	兒島 憲二
	大学院博士後期課程	3 名
	大学院修士課程	7 名
	専攻 4 回生	3 名
	その他	4 名
	特定研究員	2 名
	研究員	1 名

A. 研究活動 (2009. 4～2010. 3)

A-1. 研究概要

a) 蛋白質分解酵素に関する研究

(i) サーモライシンの活性発現機構。好熱性プロテアーゼであるサーモライシンの活性は飽和濃度の中性塩の存在下に 20 倍以上も増大することを見いだした。この高度な好塩性の仕組みを理解することにより本酵素の活性発現の分子機構を解明できるものと期待できる。基質の切断部位アミノ酸残基の構造の塩類による活性化に対する効果、活性部位のチロシン残基の存在状態と化学修飾および部位特異的変異導入、サーモライシン表面の荷電性残基の存在状態と酵素活性との関係について解明しようとしている。

(ii) マトリックス・メタロプロテイナーゼ (MMP) の酵素化学的性質。MMP は動物細胞の細胞間の接着性マトリックス・タンパク質を加水分解し、細胞分裂や形態形成、さらにはガン転移に関与している亜鉛含有プロテアーゼである。われわれはヒト大腸ガン細胞由来の MMP-7 の酵素化学的性質を、微生物の亜鉛含有プロテアーゼであるサーモライシンとの比較することにより検討している。また、癌転移抑制剤としての応用が期待できる MMP-7 の阻害剤を天然有機化合物 (緑茶カテキンやリグナン) から探索することを試みている。

b) アミノアシル tRNA 合成酵素に関する研究

中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来のリジル tRNA 合成酵素 (LysRS) の構造と基質認識機構。アミノアシル tRNA 合成酵素は、その基質認識の厳格さにより、遺伝暗号をタンパク質の一次構造に翻訳する際の精度を保証している。我々は高純度の LysRS の高収率精製法を確立し、これによって得た酵素標品を用いて、各種基質及びそのアナログとの相互作用を、数種の酵素活性測定法、蛍光滴定法、平衡透析法、及びストップフロー装置による解析を組み合わせ、基質結合順序や基質分子認識に対する知見を明らかにしてきた。一方、本酵素の構造に関する知見を得るため、ペプチドのアミノ酸の配列をもとに、*Bacillus stearothermophilus* から LysRS 遺伝子をクローニングし全塩基配列を決定し、大腸菌での大量発現系を確立した。現在、結晶化並びに変異体の解析およびドメイン間相互作用の検討を行っている。また、超好熱性古細胞菌由来アミノアシル tRNA 合成酵素の大腸菌での発現を試みている。

c) 糖質分解酵素およびその阻害剤に関する研究

微生物由来のアミラーゼについてその熱安定性の改変を変異導入、反応系の工夫を通して行っている。カルシウム結合部位の改変により、熱安定性は大きく変化させることが出来た。これらの成果は、デンプン糖化工業や製パン工業に適用できる。また、コムギアルブミンから哺乳類のアミラーゼに対する阻害剤 (0.19AI) を精製し、ブタすい臓 α -アミラーゼ (PPA) に対する阻害を検討した。NaCl の添加効果、pH の効果などの検討により、PPA-0.19AI 複合体形成には1本の静電的相互作用が関与することを見出した。現在、化学修飾により、この静電的相互作用に関与する残基を検索している。また、PPA に対するコーヒークロロゲン酸や緑茶カテキンの阻害を検討している。本研究の成果は、肥満防止や糖尿病予防に利用できる。

d) モノクローナル抗体の高度利用に関する研究

(i) モノクローナル抗体は臨床診断や生理活性物質の分析に広く利用されているが、測定感度の向上や操作の簡便化など改良すべき点が多く、モノクローナル抗体の活性断片化、酵素コンジュゲートの調製、二価特異性抗体の調製を検討する。また、均一系酵素免疫測定法の開発を考慮して、リポソーム・アッセイ法や蛍光法を検討している。また、EIA の感度を 103~105 倍増大させることを目的とし、酵素反応のシンクロナイゼーションにより、二次抗体に結合したアルカリホスファターゼの活性増幅を試みている。また、食品分析やアレルギー検査で重要なヒスタミンの免疫測定法を検討する。

(ii) 触媒抗体。クロラムフェニコールのエステル誘導体に対して加水分解活性をもつ抗体を用いてその酵素としての性質を速度論的および熱力学的に解析している。

e) 大豆タンパク質およびコムギタンパク質の有効利用に関する研究

(i) モノクローナル抗体は臨床診断や生理活性物質の分析に広く利用されているが、測定感度の向上や操作の簡便化など改良すべき点が多く、モノクローナル抗体の活性断片化、酵素コンジュゲートの調製、二価特異性抗体の調製を検討する。また、

均一系酵素免疫測定法の開発を考慮して、リポソーム・アッセイ法や蛍光法を検討している。また、EIA の感度を 103~105 倍増大させることを目的とし、酵素反応のシンクロナイゼーションにより、二次抗体に結合したアルカリホスファターゼの活性増幅を試みている。また、食品分析やアレルギー検査で重要なヒスタミンの免疫測定法を検討する。

(ii) 触媒抗体。クロラムフェニコールのエステル誘導体に対して加水分解活性をもつ抗体を用いてその酵素としての性質を速度論的および熱力学的に解析している。

f) 逆転写酵素に関する研究

逆転写酵素 (RT) は分子生物学的研究や RNA ウイルスの臨床分析において必要不可欠な酵素である。反応効率、耐熱性、転写の正確性という観点から、トリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus, AMV) RT とモロニー Maus 白血病ウイルス (Moloney murine leukaemia virus, MMLV) RT がよく使用されているが、反応効率や耐熱性の一層の改良が求められている。われわれは、AMV RT と MMLV RT の酵素化学的性質を検討するとともに、部位特異的変異による活性と安定性の向上を目指している。

A-2. 研究業績 (国内・国外含む)

a) 成果刊行

著 書

- ・井上國世：プロテアーゼによるダイズタンパク質の消化分解と蛋白質化学的物性の改変. 酵素応用の技術と市場 2009 (シーエムシー出版編集部編) p. 36-44, 2009
- ・長谷川信弘、井上國世：微生物アミラーゼを用いるデンプン加工工業の問題点と今後の課題. 酵素応用の技術と市場 2009 (シーエムシー出版編集部編) p. 19-27, 2009
- ・井上國世 (監修)：産業酵素の応用技術と最新動向、p. 1-345、シーエムシー出版、東京、2009
- ・井上國世：総論—「産業酵素」研究の過去、現在、未来. 産業酵素の応用技術と最新動向 (井上國世、監修) p. 1-14、シーエムシー出版、東京、2009
- ・井上國世、橋田泰彦、草野正雪、保川清：サーモライシンの応用と高機能化. 産業酵素の応用技術と最新動向 (井上國世、監修) p. 58-68、シーエムシー出版、東京、2009
- ・保川清：核酸増幅法. 産業酵素の応用技術と最新動向 (井上國世、監修) p. 194-202、シーエムシー出版、東京、2009
- ・井上國世 (監修)：フードプロテオミクス—食品酵素の応用利用技術、p. 1-243、シーエムシー出版、東京、2009

原著論文（査読付）

- Asaoka, K., Yasukawa, K., and Inouye, K. Coagulation of soy proteins induced by thermolysin and comparison of the coagulation reaction with that induced by subtilisin Carlsberg. *Enz. Microb. Technol.*, 44; 229-234, 2009
- Inouye, K., Nakano, M., Asaoka, K., and Yasukawa, K. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. *J. Agric. Food Chem.*, 57; 717-723, 2009
- Inouye, K., Yasumoto, M., Tsuzuki, S., Mochida, S., and Fushiki, T. The optimal activity of a pseudozymogen form of recombinant matriptase under the mildly acidic pH and low ionic strength conditions. *J. Biochem.*, 147; 485-492, 2010
- Kojima, K., Tsuzuki, S., Fushiki, T., and Inouye, K. Role of the stem domain of matriptase in the interaction with its physiological inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor type I. *J. Biochem.*, 145; 783-790, 2009
- Kojima, K., Tsuzuki, S., Fushiki, T., and Inouye, K. The activity of a type II transmembrane serine protease, matriptase, is dependent solely on the catalytic domain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73; 454-456, 2009
- Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Insights into the catalytic roles of the polypeptide regions in the active site of thermolysin and generation of the thermolysin variants with high activity and stability. *J. Biochem.*, 145; 103-113, 2009
- Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Synthesis of N-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester catalyzed by thermolysin variants with improved activity. *Enz. Microb. Technol.*, 46; 320-325, 2010
- Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Effects of the mutational combinations on the activity and stability of thermolysin. *J. Biotechnol.*, 147; 7-16, 2010
- Miyake, Y., Yasumoto, M., Tsuzuki, S., Fushiki, T., and Inouye, K. Activation of a membrane-bound serine protease matriptase on the cell surface. *J. Biochem.*, 146; 273-282, 2009
- Miyake, Y., Yasumoto, M., Tsuzuki, S., Fushiki, T., and Inouye, K. The role of asparagine-linked glycosylation site on the catalytic domain of matriptase in its zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804; 156-165, 2010
- Miyake, Y., Tsuzuki, S., Fushiki, T., and Inouye, K. Matriptase does not require hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 for activation in an epithelial cell expression model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74; 848-850,

2010

- Miyake, Y., Tsuzuki, S., Yasumoto, M., Fushiki, T., and Inouye, K. Requirement of the activity of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 for the extracellular appearance of a transmembrane serine protease matriptase in monkey kidney COS-1 cells. *Cytotechnology*, 60; 95-103, 2009.
- Mizuno, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Insight into the mechanism of the stabilization of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74; 440-442, 2010
- Mochida, S., Tsuzuki, S., Yasumoto, M., Inouye, K., and Fushiki, T. Secreted expression of pseudozymogen forms of recombinant matriptase in *Pichia pastoris*. *Enz. Microb. Technol.*, 45; 288-294, 2009
- Murai, N., Miyake, Y., Tsuzuki, S., Inouye, K., and Fushiki, T. Identification of the basolateral sorting signal of a type II transmembrane serine protease matriptase. *Cytotechnology*, 59; 169-176, 2009
- Narita, Y. and Inouye, K. Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas α -amylase isozymes I and II. *J. Agric. Food Chem.*, 57; 9218-9225, 2010
- Sakurama, H., Takita, T., Mikami, B., Itoh, T., Yasukawa, K., and Inouye, K. Two crystal structures of lysyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus* in complex with lysyladenylate-like compounds: insights into the irreversible formation of the enzyme-bound adenylylate of L-lysine hydroxamate. *J. Biochem.*, 145; 555-563, 2009
- Tsukiyama, T., Lee, J., Okumoto, Y., Teraishi, M., Tanisaka, T., and Inouye, K. Gene cloning, bacterial expression, and purification of a novel rice (*Oryza sativa* L.) ubiquitin-related protein, RURM1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74; 430-432, 2010
- Tsuzuki, S., Miyake, Y., Inouye, K., and Fushiki, T. The occurrence of matriptase C-terminal fragments on the apical and basolateral sides of Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73; 2538-2540, 2009
- Yasukawa, K., Agata, N., and Inouye, K. Detection of *cesA* mRNA from *Bacillus cereus* by RNA-specific amplification. *Enz. Microb. Technol.*, 46; 391-396, 2010
- Yasukawa, K., Konishi, A., and Inouye, K. : Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press, 2010

・Yasukawa, K., Mizuno, M., and Inouye, K. Characterization of Moloney murine leukaemia virus/avian myeloblastosis virus chimeric reverse transcriptases. J. Biochem., 145; 315-324, 2009

総説

・奥村史朗、井上國世. Bacillus thuringensis がつくる「クリスタル」タンパク質の不思議一殺虫剤やガン治療など膜に作用するタンパク質のライブラリーへの期待. 化学と生物, 47; 670-672, 2009

・神野英毅、清水昌、井上國世. 微生物変換による Laminaria japonica からの水素・エタノール生産に関する研究. 日本大学大学院生産工学研究科生命工学リサーチセンター平成21年度研究報告書、7-14、2009

・井上國世（共訳）. マッキー生化学（第4版）分子から解き明かす生命（市川厚監修、福岡伸一監訳）. 第6章、171-210、化学同人、2010年3月

特許

・井上國世、村上良樹、金谷宗昭. 水溶性ヘミセルロースの調製方法. 出願番号：特願2009-169711、出願日：2009年7月21日

b) 学会発表

- ・日本農芸化学会 2009 年度大会：19 件
- ・日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部 2009 年度合同大会：6 件
- ・日本農芸化学会第 463 会講演会：1 件
- ・第 56 回日本生化学会近畿支部例会：4 件
- ・第 82 回日本生化学会大会：9 件
- ・第 56 回日本食品科学工学会 2009 年度大会：1 件
- ・第 61 回日本生物工学会大会：1 件
- ・第 9 回食品酵素化学研究会 第 15 回秋田応用生命科学研究会：2 件
- ・第 14 回日本病態プロテアーゼ学会：1 件
- ・日本きのこ学会第 13 回大会：1 件

A-3. 国内における学会活動など

所属学会等（役割）

- ・井上 國世：日本生化学会（評議員、近畿支部評議員、大会シンポジウム実行委員、

大会プログラム委員)、日本病態プロテアーゼ学会(世話人)、日本農芸化学会(理事、役員選考委員会委員、関西支部長、関西支部評議員)、日本食品科学工学会(関西支部評議員)、日本動物細胞工学会(評議員)、食品分析研究会(常任幹事)、食品酵素化学研究会学術講演会(世話人)

・保川 清:日本農芸化学会(シンポジウム担当およびプログラム担当、関西支部庶務幹事)

競争的資金等獲得状況

①科学研究費補助金

・基盤研究(B):井上 國世:サーモライシンの食品工業への利用性拡大を目的とした蛋白質工学と反応制御工学

・基盤研究(C):保川 清:高機能逆転写酵素を用いた cDNA 合成法と RNA 増幅法の性能評価と用途拡大

②その他の競争的資金

・NEDO イノベーション実用化助成事業(株式会社ティー・ティー・エムとの共同研究):井上 國世:可搬型免疫測定システムの開発

・(独)科学技術振興機構 地域イノベーション創出総合支援事業重点地域研究開発推進プログラム シーズ発掘試験:保川 清:高機能 MMLV RT 逆転写酵素の作製と迅速診断への応用

・(財)飯島記念食品科学振興財団 研究助成:保川 清:穀類加工食品中の嘔吐型セラウス菌の逆転写酵素を用いた RNA 増幅法による検出

A-4. 国際交流・海外活動

所属学会等(役割)

・井上 國世:Sixth General Meeting on the International Proteolysis Society, Surfers Paradise Marriott Resort and Spa, Gold Coast, Australia (大会組織員)(2009 年 10 月)、Biotechnology Annual Review (Elsevier) (国際編集委員)、New Biotechnology (Elsevier) (Review 担当国際編集委員)、Enzyme and Microbial Technology (Elsevier) (国際編集委員)、Food Science and Biotechnology (国際編集委員)

国際会議・研究集会等(国、役割)

・井上 國世:8th International Conference on Protein Stabilization, Graz University of Technology, Graz, Austria (招待講演者)(2009 年 4 月)、Sixth General Meeting on the International Proteolysis Society, Surfers Paradise Marriott Resort and Spa, Gold Coast, Australia (講演者)(2009 年 10 月)、4th International Conference on Polyphenols and Health, Harrogate International

Centre, Harrogate, UK（共同発表者）（2009 年 12 月）

国際共同研究・海外学術調査等

- ・細菌感染と治療に関与するプロテアーゼに関する共同研究、井上國世（米国、ミシガン大学）
- ・ダイズおよびコムギタンパク質の物性解析に関する共同研究、井上國世（オランダ、ワーゲニンゲン大学）
- ・コーヒーポリフェノールに関する共同研究、井上國世（英国、リーズ大学）
- ・マトリックスメタロプロテアーゼの消化器疾患に関する共同研究、井上國世（オランダ、ライデン大学）
- ・マトリックスメタロプロテアーゼの反応機構に関する共同研究、井上國世（英国、インペリアルカレッジ）
- ・酵素と抗体のバイオテクノロジーに関する共同研究（ノルウェー、トロムソー大学）
- ・好熱性酵素に関する構造と機能に関する研究、井上國世（韓国、ソウル国立大学、延世大学）
- ・酵素反応機構に関する研究、井上國世（英国、ワーウィック大学、エクセター大学）
- ・アミラーゼとプロテアーゼの反応機構および食品科学工業への応用、井上國世（カナダ、ゲルフ大学）
- ・タンパク質安定化に関する共同研究、井上國世（オーストリア、グラーツ工科大学、BOKU、オーストリア国立科学研究所）

B. 教育活動（2009. 4～2010. 3）

B-1. 学内活動

a) 開講授業科目（担当教員）

- ・全学共通科目： 基礎化学実験（兒島）
- ・学部： 食品生化学Ⅱ（井上、保川）、酵素の作用と応用（井上、保川）、酵素化学（井上、保川）、課題研究（卒業論文）（井上、保川）、酵素化学実験及び実験法（保川、滝田、兒島）
- ・大学院： 酵素化学特論（井上）、酵素化学専攻演習（井上、保川、滝田、兒島）、酵素化学専攻実験（井上、保川、滝田、兒島）

B-2. 学外における教育活動

学外非常勤講師

- ・井上國世：岩手大学農学部特別セミナー（2009 年 9 月）、琉球大学農学部特別セミ

ナー（2009 年 11 月）

・井上國世：東洋大学・客員教授、日本大学生産工学研究科生命工学リサーチセンター・学外研究員

B-3. 国際的教育活動

留学生・外国人研修員の受入

・留学生： 修士課程 1 名（ケニア） 研究生等 4 名（ジンバブエ 1、中国 3）

海外での講義・講演

・井上 國世

特別セミナー(非常勤講師):Yonsei University, Seoul(韓国)

C. その他

・井上國世：文部科学省科学技術政策研究所専門調査員、京都市バイオ産業技術フォーラム・幹事、京都市医・工・ライフサイエンス連携プロジェクト検討委員会・委員、経済産業省地域新生コンソーシアム研究開発事業・評価委員、中小企業基盤整備機構実用化研究開発事業・評価委員、財団法人飯島記念食品科学振興財団・選考委員、日本学術振興会特別研究員等審査会・委員、関西サイエンスフォーラム関西イノベーション創出推進委員会ワーキンググループ・委員