

講座 食品生命科学

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、兒島 憲二
	大学院博士後期課程	2名
	大学院修士課程	8名
	専攻4回生	4名
	その他	4名
	特定研究員	2名
	研究員	1名

A. 研究活動（2010.4～2011.3）

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て、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、リボソーム・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

大豆タンパク質、特に脱脂大豆は有効に利用されないことが多い。これの食品としての有効性を検討する。種々の樹脂を用いて物理化学的脱臭法を開発している。また、種々のプロテアーゼによる凝集物の生成の機構を明らかにし、新規な食品の作製を試みている。一方、コムギタンパク質は、主要な食用タンパク質であるが、特徴的なアミノ酸組成を持ち、in vivoおよびin vitroでの加水分解は容易ではない。コムギグルテンを素材として有効な加水分解法を検討している。

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とモロニーマウス白血病ウイルス（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した。さらに、部位特異的変異により安定性を向上させた。

A-2. 研究業績（国内・国外含む）

a) 成果刊行

著 書

・井上國世、橋田泰彦：速度論的解—総論．酵素利用技術大系（小宮山眞監修）p. 51-55、株式会社エヌ・ティー・エス、東京、2010

・井上國世、保川清：アスパルテームの合成．酵素利用技術大系（小宮山眞監修）p. 632-636、株式会社エヌ・ティー・エス、東京、2010

・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

原著論文（書評論文を含む）

・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

・Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Synthesis of N-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester catalyzed by thermolysin variants with improved activity. *Enzyme 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. 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

・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

- 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

- Yasukawa, K., Agata, N., and Inouye, K. Detection of *cesA* mRNA from *Bacillus cereus* by RNA-specific amplification. *Enzyme Microb. Technol.*, 46; 391-396, 2010

- 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

- Yasukawa, K., Konishi, A., and Inouye, K.: Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction catalyzed by reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 1925-1930, 2010

- Mochida, S., Tsuzuki, S., Inouye, K., and Fushiki, T.: A recombinant catalytic domain of matriptase induces detachment and apoptosis of small-intestinal epithelial IEC-6 cells cultured on laminin-coated surface. *J. Biochem.*, 148: 721-732, 2010

- Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A., and Inouye, K.: Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis. *J. Biotechnol.*, 150: 299-306, 2010

- Inouye, K., Tsuzuki, S., Yasumoto, M., Kojima, K., Mochida, S., and Fushiki, T.: Identification of the matriptase second CUB domain as the secondary site for interaction with hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1. *J. Biol. Chem.*, 285: 33394-33403, 2010

- Tsuzuki, S., Murai, N., Miyake, Y., Inouye, K., and Fushiki, T.: The structural requirements of matriptase in its ectodomain release in polarized epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 1295-1297, 2010

• Muta, Y., Yasui, N., Matsumiya, Y., Kubo, M., and Inouye, K.: Expression in *Escherichia coli*, refolding, and purification of the recombinant mature form of human matrix metalloproteinase 7 (MMP-7). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 2515-2517, 2010

• Menach, E., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Effects of site-directed mutagenesis of the loop residue of the N-terminal domain of Gly117 of thermolysin on its catalytic activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 2457-2462, 2010

• Ueda M., Goto T., Nakazawa M., Miyatake K., Sakaguchi M., and Inouye K.: A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia foetida*: characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, beta-glucosidase, beta-1,3 glucanase, and beta-xylosidase. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 157: 26-32, 2010

• Sekiguchi, S., Kohno, H., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Chemiluminescent enzyme immunoassay for the measuring of leptin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75: 752-756, 2011

• Narita Y. and Inouye K.: Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I. *Food Chemistry*, 127: 1532-1539, 2011

• Muta, Y. and Inouye, K.: Tyr219 of human matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) is not critical for catalytic activity, but is involved in the broad pH-dependence of the activity *J. Biochem.*, in press.

• Sekiguchi, S., Hashida Y, Yasukawa, K., and Inouye, K.: Effects of amines and aminoalcohols on bovine intestine alkaline phosphatase activity. *Enzyme Microb. Technol.*, in press

• Miyake, T., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Analysis of the mechanism of inhibition of human matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) activity by green tea catechins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press

・Konishi, A., Nemoto, D., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Comparison of the thermal stabilities of the ab heterodimer and a subunit of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. Biosci. Biotechnol. Biochem., in press

総説

・サーモライシンの高度機能化－溶媒工学とタンパク質工学 「化学と教育」第59巻3月号
ヘッドライン企画 社団法人日本化学会化学教育協議会 2011年 P.132-135

特許

・保川清、井上國世. 変異型逆転写酵素、それをコードする核酸、変異型逆転写酵素の製造方法、核酸関連酵素の熱安定性の向上方法、逆転写方法、逆転写反応キットおよび検査キット. 出願番号：特願2010-181471、出願日：2010年8月13日

・井上國世、村上良機、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、公開日：2010年1月21日

b) 学会発表

- ・第57回日本生化学会近畿支部例会：4件
- ・日本農芸化学会2010年度関西支部大会：3件
- ・第10回食品酵素化学研究会：1件
- ・第62回日本生物工学会大会：1件
- ・第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会：4件
- ・日本農芸化学会関西支部第468会講演会：1件
- ・日本農芸化学会2011年度大会：15件

A-3. 国内における学会活動など①

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、英文誌編集委員）

A-3. 国内における学会活動など②

競争的資金等獲得状況

研究種目

・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：井上國世（株式会社ティー・ティー・エムとの共同研究）：可搬型免疫測定システムの開発

A-4. 国際交流・海外活動①

所属学会等（役割）

・井上國世：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：2nd International Conference on Novel Enzymes. University of Exeter, Exeter, UK.（招待講演者）（2010年4月）、20th International Congress of Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP 2010), Amsterdam, The Netherlands（ポスター発表者）（2010年8月）、14th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2010). Rimini, Italy 口頭講演者（2011年9月）、6th Meeting of East Asia for Mushroom Science 2010. Gyeongju, Korea,（ポスター共同発表者）（2011年11月）、2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010),（招待講演者）（2010年12月）

国際共同研究・海外学術調査等

・井上國世：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（米国、ミシガン大学）

・井上國世：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（オランダ、ワーゲンゲン大学）

・井上國世：コーヒーポリフェノールに関する共同研究（英国、リーズ大学）

・井上國世：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（オランダ、ライデン大学）

・井上國世：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（英国、インペリアルカレッジ）

・井上國世：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）

・井上國世：好熱性酵素に関する構造と機能に関する研究（韓国、ソウル国立大学、延世大学）

・井上國世：酵素反応機構に関する研究（英国、ワーウィック大学、エクセター大学）

・井上國世：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（カナダ、ゲルフ大学）

・井上國世：タンパク質安定化に関する共同研究（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（2010.4～2011.3）

B-1. 学内活動

a) 開講授業科目（担当教員）

・学部： 食品基礎生物学Ⅰ（井上、保川）、食品生化学Ⅰ（保川）、食品生化学Ⅱ（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、滝田、児島）、酵素化学実験及び実験法（保川、滝田、児島）

・大学院： 酵素化学専攻演習（井上、保川、滝田、児島）、酵素化学専攻実験（井上、保川、滝田、児島）

B-2. 学外における教育活動

学外非常勤講師

- ・井上國世：岩手大学農学部非常勤講師（大学院農学研究科担当）（2010年6-9月）
- ・井上國世：県立広島大学大学院生命環境学研究科 特別講義（2010年6月）
- ・井上國世：東洋大学生命科学部 特別講義（2010年10月）

公開講座等

- ・井上國世：ふくい未来技術創造ネットワーク推進事業 講演会 講演者（福井市 2010年11月）
- ・井上國世：新潟大学地域連携フードサイエンスセンターシリーズ講演会 講演者（新潟市 2011年1月）
- ・井上國世：福山大学グリーンサイエンス講演会 講演講演者（福山市 2011年2月）
- ・井上國世：京都産学公連携機構国際シンポジウム パネルディスカッション パネラー（京都市 2011年3月）

B-3. 国際的教育活動①

留学生・外国人研修員の受入

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