

| | |
|--------------|---|
| Title | Fusarium graminearum IF09462 由来ガラクトースオキシダーゼの反応特性 |
| Author(s) | 大沢, 克彦 |
| Citation | |
| Issue Date | 1997-03 |
| Type | Thesis or Dissertation |
| Text version | none |
| URL | http://hdl.handle.net/10119/2393 |
| Rights | |
| Description | Supervisor:民谷 栄一, 材料科学研究科, 修士 |

Fusarium graminearum IFO9462 由来 ガラクトースオキシダーゼの反応特性

大沢 克彦 (民谷研究室)

【目的】

ガラクトースオキシダーゼは、二電子酸化反応を触媒する酵素であり、第一級アルコールからアルデヒドと過酸化水素を生成させる。この酵素の活性部位は一個の銅イオンを含むアミノ酸で構成されており、酵素分子内部のチロシンなどのアミノ酸自身が補酵素の働きをすることが示唆されている。これは他のオキシダーゼがフラビンやヘムなどのアミノ酸以外の分子を必要とするのと異なり、将来タンパク質工学的改変を行う材料としても優れていると考えられる。一方、既知のガラクトースオキシダーゼは基質特異性が広く、バイオセンサーなどへの応用には問題が指摘されている。そこで、本研究では、*Fusarium graminearum* IFO9462 由来のガラクトースオキシダーゼを新たに精製し、この反応特性などを中心に検討を行った。

【実験】

Fusarium graminearum IFO9462 を 3 日間前培養後、7 日間本培養を行い、その培養液を攪拌式セルを用いて脱塩、緩衝液の交換を行い、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順に分離操作を行い、ガラクトースオキシダーゼを精製した。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製度、および分子量を調べた。酵素活性は、3-methoxybenzyl alcohol を用いる Direct Assay と生成する過酸化水素をペルオキシダーゼを用いて測定する Coupled Assay の 2 つの方法により測定した。まず、精製した酵素を用いて、pH や温度に対する依存性や安定性について調べた。次に、酵素の各種基質に対する K_m 値などを求め、既知の酵素との反応特性の比較検討を行った。

【結果・考察】

Fusarium graminearum IFO9462 由来のガラクトースオキシダーゼを単一酵素に精製することができた。SDS-PAGE の結果より分子量は約 68,000 であった。本酵素と既知の酵素との基質特異性について、D-galactose の活性を基準に調べたところ D-galactosamine や 3-methoxybenzyl alcohol に対しては既知の酵素に対して 60 % の活性しか示さず、本研究で精製を行ったガラクトースオキシダーゼの方が D-galactose に対する選択性が高いことが示唆された。次に、 K_m 値に関して、既知の酵素と比較したところガラクトースに対して本酵素は 83.5mM、既知の酵素は 38.2mM であり、本酵素の方がガラクトースに対する親和性が低いことがわかった。次に、pH 依存性について調べたところ本酵素の最適 pH は約 7.5 であり、最適 pH が 6~6.5 である既知の酵素との間で相違が見られた。このように *Fusarium graminearum* 由来ガラクトースオキシダーゼの生化学的特性や反応特性などを明らかにできた。

keywords

ガラクトースオキシダーゼ, *Fusarium graminearum*, 基質特異性