

令和 7 年度 奈良女子大学研究推進プロジェクト経費研究報告書

奈良女子大学長 殿

研究代表者

所 属 ・ 職 生活環境科学系食物栄養学領域・准教授
氏 名 福井健二

本年度の交付を受けた研究推進プロジェクト経費について、下記のとおり報告いたします。

申請区分	☐ (A) 多様な人材の協働による研究
	☒ (B) 一般研究
研究課題	L-/D-乳酸の精密発酵のための乳酸脱水素酵素の高機能化

1. プロジェクトの成果（研究推進プロジェクト経費が交付された期間に、この研究によって得られた新たな知見等の成果を、申請書の「研究目的、研究計画・方法」に対応させて記載すること。また、支出内訳との関係についても記載すること。）
2 ページ以内で記載してください。

本研究は、申請書において掲げた「異なる生物種に由来する乳酸脱水素酵素（LDH）の構造および機能の比較解析を通じた基質認識機構の解明と、構造情報に基づく機能改変の可能性の検証」という目的に基づき、ヒト由来およびビフィズス菌由来 LDH を対象として研究を推進したものである。

まず、研究計画における「対象酵素の調製系の確立」に対応して、ヒト由来 LDH およびビフィズス菌由来 LDH の遺伝子クローニングを行い、大腸菌を用いた大量発現系の構築に成功した。さらに、各酵素にアフィニティタグを融合させることで、アフィニティクロマトグラフィーに基づく高純度かつ再現性の高いタンパク質精製法を確立した。これにより、構造解析および機能解析に必要な量と品質を満たす試料調製が可能となった。本項目に関連する経費は、主に遺伝子クローニングおよび発現系構築のための試薬類、培養関連消耗品、ならびにクロマトグラフィー用担体の購入に充当された。

次に、「酵素機能の基礎的特性の解明」に対応して、精製した各 LDH について酵素活性測定を実施し、野生型酵素の反応動力学的パラメータを決定した。これにより、ヒト由来酵素とビフィズス菌由来酵素の機能的差異を定量的に比較するための基盤データを取得した。本項目に関連する経費は、酵素活性測定に用いる基質や補酵素、分光測定用消耗品等に使用された。

さらに、「構造解析による基質認識機構の解明」に関して、ヒト由来 LDH について結晶化条件の最適化を行い、高品質な結晶の取得に成功した。その結果、既報を上回る 1.3Å 分解能での X 線結晶構造解析を達成した。一方、ビフィズス菌由来 LDH についても結晶化に成功しており、回折実験に適した良質な結晶を得ている。現在、データ収集および構造決定に向けた準備が整っている段階である。本項目に関連する経費は、結晶化試薬、結晶化プレート等の消耗品費に充当された。

得られたヒト由来 LDH の高分解能構造を詳細に解析した結果、基質結合部位におけるアミノ酸残基配置および立体構造が基質特異性決定に重要な役割を果たすことを明らかにした。この知見に基づき、「構造情報に基づく機能改変の検証」として、基質認識に関与すると考えられる残基に変異導入を行った。その結果、触媒部位への 1 アミノ酸残基の変異導入によって基質特異性が変化することを見出した。この成果は、乳酸脱水素酵素において立体構造情報に基づく合理的設計により基質特異性の改変が可能であることを実証するものであり、本研究の目的の一つを達成した重要な成果である。本項目に関連する経費は、変異体作製のための分子生物学的試薬および機能評価に係る消耗品に使用された。

以上の成果により、ヒトおよびビフィズス菌由来 LDH の比較に基づく基質認識機構の理

解が進展するとともに、構造情報を活用した酵素機能改変の有効性が示された。今後は、本研究で確立した手法および得られた知見を基盤として、ビフィズス菌由来酵素や高度好熱菌由来酵素に対して同様の戦略を適用し、基質特異性のさらなる改変および機能拡張を目指す予定である。これにより、基礎的な酵素機構の理解に加え、産業応用に資する酵素設計指針の確立につながることを期待される。

2. プロジェクト成果の発表

(論文名, 発表者, 発表雑誌等, 巻・号, 発表年等)

なし

3. 支 出 内 訳						
備 品 費		消耗品費	旅 費	謝金等	その他	計
品 名	金 額					
ミニサーマル サイクラー S ANSYO PS-M P16	295,000 円	353,000円	0円	0円	0円	648,000円