

# 26Q-pm109

Linker scanning 法を用いたニコチンアミド *N*-メチル転移酵素の活性アミノ酸残基の探索

○疋田 清美<sup>1</sup>, 石原 彩<sup>1</sup>, 加藤 三矢子<sup>1</sup>, 山田 達也<sup>1</sup>, 村田 富保<sup>1</sup>, 金田 典雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名城大薬)

【目的】ニコチンアミド *N*-メチル転移酵素 (NNMT, EC 2.1.1.1) は、*S*-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体として、ニコチンアミドの *N*-メチル化を触媒する酵素である。NNMT は、ニコチンアミド以外にもニコチンアミドに構造の類似したピリジン類の *N*-メチル化も触媒することが可能であり、神経毒などの合成への関与が示唆されている。本研究では NNMT の生理機能を解明するため、Linker scanning 法および部位特異的変異導入法を用いてヒト NNMT の活性アミノ酸残基の探索を試みた。今回、昨年度の本大会で報告した領域以外の 3 領域の変異体の活性について報告する。

【方法および結果】ヒト NNMTcDNA を鋳型として、Linker scanning 法により、5 アミノ酸残基からなる任意のアミノ酸配列領域をすべて Ala に変換した変異型 NNMTcDNA を作製し、GST 融合タンパク質 (GST-NNMT) として大腸菌で発現させた。大腸菌を超音波破碎し、その可溶性画分について硫酸沈殿、GSH-アフィニティークロマトグラフィーを行い、各変異型 GST-NNMT を得た。酵素活性は、基質としてニコチンアミドと [<sup>14</sup>C-CH<sub>3</sub>] SAM を用い、反応生成物をイオンペアー剤存在下有機溶媒で抽出後、放射活性を測定して求めた。その結果、11 領域の変異型 GST-NNMT のうち、16N-20Y 領域、21L-25Y 領域、202S-206I 領域を含む 5 領域で活性が野生型の 1% 以下に低下した。これら活性の低下した変異体において、部位特異的変異導入法により一残基ずつ Ala に変換した変異型 NNMTcDNA を作製し、上記と同様に GST-NNMT を精製した。次に、PreScission Protease 処理により GST 結合部分を切断後、変異型 NNMT を精製し、これらの変異体の活性を測定した。その結果、Y204 が活性発現に重要な役割を果たす可能性が示された。