

1A15-1 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が触媒する可逆的脱炭酸反応

○吉田 豊和, 長澤 智子, 林 俊久, 長澤 透  
(岐阜大工・生命工)

【目的】我々は炭酸固定反応をも効率的に触媒する脱炭酸酵素としてピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素、インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素を見いだし、その反応特性を報告し、また酵素一次構造を解析してきた。今回は、同様に炭酸固定反応を触媒する4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有する微生物を土壌から分離し、酵素活性を高めるための培養条件と反応の可逆性を評価した。

【方法・結果】4-ヒドロキシ安息香酸を用いた集積培養から分離した微生物、および嫌気性微生物を用い、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素活性を休止菌体反で評価し、最も強い活性を示す細菌 P240 株を得た。本脱炭酸酵素活性は4-ヒドロキシ安息香酸で強く誘導されるが、炭酸固定反応の基質であるフェノールでの誘導効果は全く認められなかった。培養条件を最適化した後、炭酸固定活性を評価した結果、フェノールからモル変換率 12.5% で4-ヒドロキシ安息香酸を生成した。

Reversible decarboxylation catalyzing 4-hydroxybenzoate decarboxylase

○ Toyokazu Yoshida, Tomoko Nagasawa, Toshihisa Hayashi, Toru Nagasawa  
(Dept. of Biomolecular Sci., Gifu Univ.)

**Key words** decarboxylase, carboxylation, 4-hydroxybenzoic acid, phenol, CO<sub>2</sub> fixation

1A15-3 微生物触媒による 2,6-ジメチルピリジンのメチル基酸化反応

吉田 豊和, 佐田 有紀, ○松井 剛, 長澤 透  
(岐阜大工・生命工)

【目的】種々の官能基を有する複素環化合物は、生理活性物質合成のための基本骨格として有用であり、生体触媒による温和な条件下での複素環化合物への官能基変換・導入法の開発が望まれている。今回は、2,6-ジメチルピリジンの一つのメチル基を選択的に酸化する微生物を見いだし、その反応特性を検討した結果を報告する。

【方法・結果】メチル基酸化活性を有する微生物を土壌から分離するために、n-アルカンおよび分岐鎖アルカン（プリスタン）を単一炭素源とした集積培養を行った。休止菌体反応によって2,6-ジメチルピリジンのメチル基酸化活性を評価し、高活性を示す細菌を得た。本菌株は2,6-ジメチルピリジンの一つのメチル基を選択的に酸化し、6-メチルピコリン酸を生成した。6-メチルピコリン酸や2-メチルピリジンには全く作用しなかった。その他の基質についての反応性の評価を現在を進めている。

Microbial oxidation of 2,6-dimethylpyridine into 6-methylpicolinic acid

Toyokazu Yoshida, Yuki Sada, ○ Tsuyoshi Matsui, Toru Nagasawa  
(Department of Biomolecular Science, Faculty of Engineering, Gifu University)

**Key words** microbial catalysis, oxidation, N-heterocyclic compounds, 2,6-dimethylpyridine, 6-methylpicolinic acid

1A15-2 アダマンタンの微生物による位置選択的水酸化

○満倉 浩一, 近藤 良典, 吉田 豊和, 長澤 透  
(岐阜大工・生命工)

【目的】アダマンタン誘導体は、シクロヘキサン環4個がかご形に縮合した bulky な構造を持ち、抗ウイルス剤等の医薬品原料、フォトレジスト材料などの新規機能性材料としての用途が期待されている。アダマンタン誘導体の大半は、アダマンタノールを出発原料として合成されており、位置選択的水酸化反応による1-アダマンタノールや2-アダマンタノールの調製法の確立は意義深い。そこで我々は、アダマンタンの位置選択的水酸化反応を触媒する微生物の探索を試みた。またアダマンタンの変換生成物を単離し構造解析を行った。さらに、培養条件、反応条件の検討により、水酸化反応の最適化を試みた。

【方法および結果】我々は、研究室保存菌を用いてアダマンタン変換活性をもつ微生物を探索し、カビ 160 株、放線菌 147 株、細菌 163 株を検討したところ、カビ7株、放線菌18株にアダマンタン変換活性が認められた。GC 分析で、単一生成物のピークを与えた放線菌 *Streptomyces* sp. を選び、アダマンタンの変換生成物の蓄積を試みた。得られた反応生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C-NMR 分析を行った結果、1-アダマンタノールであることが確認された。

Microbial regioselective hydroxylation of adamantane

○ Koichi Mitsukura, Yoshinori Kondo, Toyokazu Yoshida, Toru Nagasawa  
(Dept of Biomolecular Sci., Gifu Univ.)

**Key words** adamantane, regioselective, hydroxylation, *Streptomyces* sp.

1A15-4 褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* 由来セロビオース脱水素酵素遺伝子のクローニング

○加治佐 平, 吉田 誠, 五十嵐 圭子, 鮫島 正浩  
(東大院農生科)

【緒言】木材を腐朽する担子菌は、腐朽過程における材の変色の違いによって白色腐朽菌と褐色腐朽菌に分類される。すでに白色腐朽菌においては木材およびセルロースの分解について多くの酵素学的な研究が為されており、その中でセロビオース脱水素酵素 (CDH) の機能と発現挙動が注目されている。一方、褐色腐朽菌によるセルロース分解に関する研究は非常に限られている。そこで本研究では、褐色腐朽指標菌 イドタケ (*Coniophora puteana*) から CDH 遺伝子をクローニングし、さらにタンパク構造ならびに発現挙動について調べた。

【方法と結果】イドタケをセルロースを炭素源とする培地で振とう培養し、得られた菌体から得た mRNA をもとに一本鎖 cDNA を合成した。CDH 間での相同性領域に基づく縮重プライマーを用いて RT-PCR により二本鎖 DNA を合成し、さらに RACE 法によって全長アミノ酸配列を得た。これに対して BLAST 相同性検索を行ったところ、フラボタンパクに特徴的な Flavin binding motif、および GMC oxidoreductases motif の配列が見られたことから、得られた配列は CDH であると同定した。また、他の担子菌由来の CDH アミノ酸配列と比較した結果、褐色腐朽菌 イドタケ由来の CDH はアミノ酸配列を見る限りでは、相同性が 70% を越え、白色腐朽菌との差異が認められなかった。また、セルロース培地における CDH 遺伝子の発現挙動についても両者は類似していると見なされた。

Cloning of cellobiose dehydrogenase from the brown rot fungus *Coniophora puteana*

○ Taira Kajisa, Makoto Yoshida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima  
(Dept. Biomaterial Sci.)

**Key words** cellulose degradation enzyme, cellobiose dehydrogenase, basidiomycetes, *Coniophora puteana*