

2A15-4 *Bacillus fusiformis* WU-ATR-9 由来 D-amino acid aminotransferase による D-トリプトファン合成

○太田 文徳, 池田 直俊, 佐藤 大, 新井 利信,
桐村 光太郎, 木野 邦器
(早大理工・応化)

【目的】 D-アミノ酸は医薬品などの重要な合成中間体として注目されており、とくに芳香族 D-アミノ酸は医薬品合成の原料として需要が高まっている。我々は、ケト酸から対応する D-アミノ酸へのアミノ基転移反応を触媒する D-amino acid aminotransferase (DAAT) に着目した。D-トリプトファンの効率的な合成法の確立を目的として、インドールビルビン酸から D-トリプトファン合成を触媒する微生物の探索を行い、得られた微生物の当該反応にかかわる酵素の諸性質について検討を行った。

【方法および結果】 D-トリプトファンを唯一の窒素源として生育する微生物に対し、インドールビルビン酸への D-アラニンからのアミノ基転移活性を測定した。その結果、優良株 *Bacillus fusiformis* WU-ATR-9 を取得した。当該活性を示す酵素を約 3000 倍にまで精製した。本酵素は、約 33kDa のホモダイマーと推定され、また既知の DAAT と同様多くの α -ケト酸に対し触媒活性を示したが、その基質特異性は大きく異なっていた。WU-ATR-9 株の休止菌体反応では、インドールビルビン酸から取率 45% で D-トリプトファンが生成した。

Synthesis of D-tryptophan by D-amino acid aminotransferase (DAAT) from *Bacillus fusiformis* WU-ATR-9.

○ Fuminori Ohta, Naotoshi Ikeda, Sato Masaru, Arai Toshinobu, Kirimura Kohtaro, Kino Kuniki
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words D-tryptophan, D-amino acid aminotransferase, *Bacillus fusiformis*

2A16-1 芳香族アミノ酸に対してラセミ化活性を有する微生物の探索

○新井 利信, 佐藤 大, 桐村 光太郎, 木野 邦器
(早大理工・応化)

【目的】 近年、D-アミノ酸は医薬品などの重要な合成中間体として注目されており、とくに芳香族 D-アミノ酸は医薬品合成の原料として需要が高まっている。我々は、効率的な D-アミノ酸生産プロセスの確立を目的として、物質のラセミ化反応を触媒するラセマーゼに着目した。トリプトファン (Trp) に対するラセミ化酵素は従来知られていないが、検出感度の高いスクリーニング系を考案して探索を行なったところ、目的の活性を有する微生物を得た。さらに候補株の当該活性について検討を行なった。

【方法および結果】 インドール検出法を応用した Trp ラセマーゼ活性に対するスクリーニング系を考案した。本スクリーニング系により得られた候補株 WU-STR-7 において、D-, L-Trp を基質として反応を行なったところ、各々の光学異性体の生産が確認された。WU-STR-7 株は 16S rDNA 配列の解析から *Bacillus* sp. と同定された。また、本菌株は Trp だけではなくフェニルアラニン (Phe) に対してもラセミ化活性を有していた。さらに、WU-STR-7 株による Phe ラセミ化は、既知の Phe ラセマーゼとは異なり、ATP に依存しないで起こることも確認した。

Screening of microorganism which has enzyme activity catalyzing racemization of aromatic amino acid.

○ Toshinobu Arai, Masaru Sato, Kohtaro Kirimura, Kuniki Kino
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words D-amino acid, aromatic amino acid, racemase, *Bacillus* sp.

2A15-5 *Alteromonas* sp. E-1 由来の菌体内 β -アガラゼ遺伝子 (*agal*) の大腸菌における発現とネオアガロビオースの生産

○高橋 啓, 佐藤 利行, 木野 邦器, 桐村 光太郎
(早大理工・応化)

【目的】 演者らは、*Alteromonas* sp. E-1 に新規な菌体内 β -アガラゼ (AGAI) を見出し、アガロースから選択的にネオアガロビオースを生産可能なことを見出した。当該酵素の分子量は SDS-PAGE では 82 kDa、ゲルろ過で 180 kDa であり、2 量体酵素と考えられた。本研究では、当該酵素をコードする遺伝子 (*agal*) をクローニングして、大腸菌内で発現させてネオアガロビオース生産が可能であることを確認した。

【方法および結果】 E-1 より AGAI を精製し、その N 末端および内部アミノ酸配列をもとに作製したプローブを用いて E-1 の DNA を保持するファージライブラリーから陽性クローンを取得し、*agal* の塩基配列を決定した。高発現ベクター pET21-a (+) に *agal* を挿入したプラスミド pEAGAI を保持した *Escherichia coli* BL21 (DE3) の無細胞抽出液の比活性は 9.9×10^{-1} U/mg であり、E-1 の 15.6 倍に達した。0.4% (w/v) アガロースを基質として、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1.6 ml に 0.4 ml の *E. coli* BL21 (DE3) /pEAGAI 無細胞抽出液 (アガラゼ活性として 1.12 U) を加えて 40°C で 12 h 反応させたところ、ネオアガロビオース 4.39 mg を生産した。

1) K. Kirimura et al., J. Biosci. Bioeng., 87, 436-441 (1999).

Expression of the gene (*agal*) encoding a novel intracellular β -agarase of *Alteromonas* sp. E-1 for production of neoagarobiose.

○ Kei Takahashi, Toshiyuki Sato, Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words agar, β -agarase, *Alteromonas*, neoagarobiose

2A16-2 *Comamonas testosteroni* 由来 3-ヒドロキシ安息香酸 4-水酸化酵素の結晶構造解析

○廣本 武史¹, 細川 桂², 藤原 伸介¹, 山口 宏¹
(¹関西学院大・理工,²バイオ微生物研究所)

植物体の構成成分であるリグニンの資化に関わる酵素群は、リグニンの代謝産物として芳香族環を有する様々な有機化合物を分解する。近年、それらが有する代謝能を利用し、環境中に遺棄された PCB やダイオキシンなどの難分解性芳香族化合物を分解する、つまり生物学的手法による汚染環境の浄化が試られている。そこで我々は、リグニン資化系酵素の中でもより単純な単環性芳香族化合物に作用する一分子酸素添加酵素に注目し、それらの触媒反応過程における詳細な機能相関の解明、および代謝能の向上を目的とした。ここではリグニンの中間代謝産物、3-ヒドロキシ安息香酸に特異的に作用する *Comamonas testosteroni* 由来 3-ヒドロキシ安息香酸 4-水酸化酵素の結晶構造を決定したので報告する。

本酵素はサブユニットの分子量が 71,000 のホモダイマー構造を有し、分子状態を用いて基質をプロトカテク酸に異化する反応を触媒する。また補酵素として FAD、および NADPH を必要とすることが明らかになっている。本研究では異常分散を考慮した多重同形置換法により、2.2 Å 分解能にてその結晶構造を決定した。また一次構造における相同性検索の結果、*Trichosporon cutaneum* 由来フェノール水酸化酵素に対して比較的高い相同性を示した。本会では両結晶構造を比較し、特に基質認識に関する議論を行いたいと考えている。

Crystal structure of 3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase from *Comamonas testosteroni*

○ Takeshi Hiromoto¹, Keiichi Hosokawa², Shinsuke Fujiwara¹, Hiroshi Yamaguchi¹
(¹Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., ²Inst. Bio-microbiol.)

Key words 3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase, oxygenase, biodegradation, substrate specificity