

2A15-4 α -Amino- ϵ -caprolactam racemase が触媒するアミノ酸アミドラセマーゼ活性の発見

○浅野 泰久, 山口 重徳
(富山県大工・生工研セ)

【目的】*Achromobacter obae* 由来の α -Amino- ϵ -caprolactam racemase (EC 5.1.1.15)は、 α 位にアミノ基を有する環状アミド類のラセミ化を触媒する酵素である¹⁾。前報において我々はその遺伝子を合成し、大腸菌において発現させた²⁾。今回は本酵素がアミノ酸アミドに対するラセミ化反応を触媒することを発見したので報告する。

【方法・結果】*Achromobacter obae*由来の α -Amino- ϵ -caprolactam racemase の遺伝子情報³⁾に基づき、46個の合成プライマーを設計し、Assembly PCR 法により本遺伝子を合成した。組換え大腸菌で発現させた本酵素を熱処理及び各種クロマトグラフィーにより均一に精製し、文献どおり α -Amino- ϵ -caprolactamのラセミ化を触媒することを確認した(350U/mg)。さらに本酵素をD-およびL-アラニンアミドに作用させたところ、いずれも良好にラセミ化反応が進行した。本酵素は、アミノ酸に対するラセミ化活性は示さなかった。本報告は、アミノ酸アミドラセマーゼ活性についての最初の報告であり、アミノ酸アミドを原料とする光学活性なアミノ酸の定量的な合成への利用が期待できる。

1)Ahmed, S., A. et al., *Agric. Biol. Chem.*, (1983), 47(8), 1887.

2)山口重徳、浅野泰久、2004年度日本農芸化学会講演要旨集p266.

3)Accession No.E01594

Discovery of new substrates amino acid amides for alpha-amino-epsilon-caprolactam racemase from *Achromobacter obae*

○Yasuhisa ASANO, Shigenori YAMAGUCHI
(Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words *Achromobacter obae*, alpha-Amino-epsilon-caprolactam racemase, Amino acid amide racemase

2A16-1 D-サイクロセリン生産菌の自己耐性機構—D-Ala-D-Ala ligase の生化学的解析—

○河原 裕美, 市川 梓, 的場 康幸, 熊谷 孝則,
杉山 政則
(広島大院・医歯薬学総合研究科)

【目的】D-cycloserine (DCS) は、放線菌 *Streptomyces* (S.) *garryphalus* や *S. lavendulae* により生産される抗生物質であり、臨床的には抗結核剤として使用されている。DCS は細菌細胞壁のペプチドグリカン合成に必要な Ala racemase (ALR)を阻害するほか、D-alanyl-D-alanine ligase (DDL: ALRと同様、ペプチドグリカン合成にかかわる酵素)を阻害する。本研究では、DCS 生産菌 *S. lavendulae* のDDLがDCSに対して耐性を示すか否か明らかにすることを目的とした。【方法及び結果】DDL遺伝子をpETベクターに挿入し、*E. coli* BL21(DE3)pLysSに導入した。この形質転換体を所定時間培養し、得られた菌体を超音波破碎した。この無細胞抽出液を遠心して得られる上清画分を硫酸沈殿後、各種カラムクロマトグラフィーにかけることで、DDLを単一のタンパク質まで精製した。精製DDLを用いた機能解析を通じて、DCS生産菌のDDLはDCSによる阻害を受けにくいと結論付けた。すなわち、*S. lavendulae*のDDLは自己耐性因子のひとつとして機能している。

Characterization of a *Streptomyces* D-alanyl-D-alanine ligase as a target of D-cycloserine and as a D-cycloserine-resistance determinant

○Yumi KAWAHARA, Azusa ICHIKAWA, Yasuyuki MATOBA, Takanori KUMAGAI, Masanori SUGIYAMA
(Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words D-alanyl-D-alanine ligase, D-cycloserine, *Streptomyces lavendulae*

2A15-5 D-Cycloserine 生産菌の自己耐性機構—Alanine racemase の構造生物学的解析—

○野田 正文, 的場 康幸, 熊谷 孝則, 杉山 政則
(広島大院・医歯薬学総合研究科)

【目的】放線菌 *Streptomyces* (S.) *garryphalus* や *S. lavendulae* により生産される D-cycloserine (DCS) は細胞壁合成阻害抗生物質の一種であり、臨床的には結核の治療薬として使用されている。細胞壁のペプチドグリカン合成に必要な酵素のひとつ、alanine (Ala) racemase (ALR) は、補酵素として pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を必要とするが、DCSはPLPと反応する結果、ALRの触媒活性を阻害する。従って、DCS生産菌のALRがDCSにより阻害を受けるか否かは興味の手たれるところである。

【方法及び結果】DCS生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233由来のALRをコードする遺伝子 (*alr*) をクローニングし、*E. coli* ホスト・ベクター系を用いた *alr* 遺伝子産物 (ALR) の大量発現系ならびに精製系を確立した。新しく開発した円偏光二色性 (CD) スペクトル法にてDCSによるALR反応阻害の速度論的解析を行ったところ、対照として用いた *E. coli* のALRとの間で、阻害度の明確な相違が認められた。

一方、ALR単体およびDCSとALRとの複合体について、そのX線結晶構造解析を行った。その結果、*S. lavendulae* ALRの触媒活性部位の空間は、既に決定されているDCS感受性の *Bacillus stearothermophilus* のALRのそれより広いことがわかった。また、DCS生産菌のALRがDCS耐性を示すのは、DCSとPLPとの反応中間体が本来は生じ得ないラセミ化状態を経由することが要因となって、最終不活化産物の生成速度の減少を引き起こすことが原因であることがわかった。

Structural biology of an alanine racemase from D-cycloserine-producing microorganism

○Masafumi NODA, Yasuyuki MATOBA, Takanori KUMAGAI, Masanori SUGIYAMA
(Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words alanine racemase, CD spectrum, crystallographic study, D-cycloserine

2A16-2 *Microbacterium* sp. 由来新規 D-aminoacylase の遺伝子クローニング

○浅野 悠, 劉 建, 中山 亨, 西野 徳三
(東北大院・工・生工)

【目的】D-aminoacylase(N-acyl-D-amino acid amidohydrolase) はD-アミノ酸のN-アシル体に立体特異的に作用して、これをD-アミノ酸と脂肪酸に加水分解する反応を触媒する酵素であり、アミノ酸の光学分割酵素として産業的に利用されている。本研究では医薬品原材料として需要の高まるD-アミノ酸生産への利用を目指し、新たな生物種からのD-aminoacylase遺伝子のクローニングを試みた。

【方法及び結果】我々の以前の研究で、宮城県のと土壤より単離された D-aminoacylase 生産菌、*Microbacterium* sp. より D-aminoacylase が精製されていた。本研究では精製酵素より取得したN末端及び内部配列から縮重プライマーを設計し、これらを用いてPCRにより遺伝子断片の増幅を試みた。その結果得られた約 770 bp の断片配列から再度外向きのプライマーを設計し、ゲノミックライブラリーをテンプレートにして5'-ならびに3'-領域の増幅を試みた。これにより495アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子全長の配列を得た。その推定アミノ酸配列は既知の *Alcaligenes* 属由来のものと比較して相同性が約 30%と低く、また *Alcaligenes* 属由来 D-aminoacylase 中で金属リガンドの一つとされる Cys⁹⁶ に対応する残基が保存されていないなど、その一次構造上の新規性は高く興味深い。現在大腸菌中での異種発現系を構築中である。

Cloning of a D-aminoacylase gene from *Microbacterium* sp.

○Yu ASANO, Jian LIU, Toru NAKAYAMA, Tokuzo NISHINO
(Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words D-aminoacylase, D-amino acid, *Microbacterium* sp.