

1F16-1 微生物変換によるフェノールからのサリチル酸の選択的合成

○郡司 裕朗¹, 岩崎 勇一郎¹, 石井 義孝², 木野 邦器¹, 桐村 光太郎¹
(¹早大・理工・応化, ²早大・科健機構)

【目的】 サリチル酸はアスピリンの中間体をはじめとして種々の用途があるが、微生物変換による生産法は知られていない。本研究では、フェノールに対する位置選択的なカルボキシル化を可能とする微生物の探索を行い、微生物変換によるサリチル酸の選択的合成について検討した。【方法および結果】 約3000個の土壌試料について、サリチル酸を唯一の炭素源とした培地を使用して集積系を取得した。さらに、各集積系から微生物を単離し、休止菌体反応によりフェノールからサリチル酸の合成能力を示す候補株 WU-0401 を取得した。WU-0401 株を用いたカルボキシル化反応はフェノールの2位に位置選択的な反応であり、生成物が1種類のみであることをHPLCにより確認した。さらに、¹³C-NMRと¹H-NMRにより構造決定を行い、生成物をサリチル酸と同定した。サリチル酸を含む培地で前培養したWU-0401株の休止菌体を使用して、30℃、24時間の反応により20 mMのフェノールから16%の取率でサリチル酸を選択的に合成することに成功した。

Regio-selective Synthesis of Salicylic Acid from Phenol by Bioconversion

○Hiroaki GUNJI¹, Yuichiro IWASAKI¹, Yoshitaka ISHII², Kuniki KINO¹, Kohtaro KIRIMURA¹
(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Consolidated Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda Univ.)

Key words salicylic acid, bioconversion, phenol

1F16-3 サーモライシンの活性部位の Asn112 の変異による活性の pH 依存性の改変

草野 正雪, ○保川 清, 橋田 泰彦, 井上 國世
(京大院・農・食生科)

【目的】 *Bacillus thermoproteolyticus* 由来好熱性中性金属プロテアーゼであるサーモライシン (TLN) の活性は pK_a が5.0-5.6, 7.5-8.3のベル型のpH依存性を示す。今回、活性部位に存在するAsn112を荷電性アミノ酸残基に変異させ、pH 依存性の改変を試みた。【方法と結果】 変異型 TLN (N112A, N112D, N112E, N112H, N112K, N112R) 遺伝子を部位特異的変異導入法により作成し、大腸菌JM109株を宿主として発現させた。N112DとN112Eのみ培養上清中に活性型として分泌されたので、これらを精製し、酵素活性を測定したところ、野生型TLN (WT) と比べ以下の差がみられた。(1)中性基質である *N*-Furylacryloyl-Gly-L-Leu-amide (FAGLA) の加水分解活性において、N112Dの酸性側の pK_{e1} が5.3から5.7に変化した。(2)酸性基質である *N*-Carbobenzoxy-L-Asp-L-Phe-Methyl ester (ZDFM) の加水分解活性において、N112DとN112Eはベル型のpH依存性を示さず、pHが増加するにつれ k_{cat}/K_m は減少した。N112DとN112Eの k_{cat}/K_m は、WTと比べてpH 7.0では0.23-0.53%、pH 5.5では4.5-13%であった。【考察】 FAGLAの加水分解においてN112Dの pK_{e1} がアルカリ性側にシフトした。これは導入された負電荷が酸性側の活性解離基のプロトン化を安定化したためと考えられる。N112DとN112EはZDFMの加水分解においてWTと異なる酵素活性を示したことについては、導入された負電荷とZDFMの間の反発によるものと考えられる。

Engineering of the pH-dependence of thermolysin activity as examined by site-directed mutagenesis of Asn112 located at the active site of thermolysin

Masayuki KUSANO, ○Kiyoshi YASUKAWA, Yasuhiko HASHIDA, Kuniyo INOUE
(Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words pH-activity profile, site-directed mutagenesis, thermolysin

1F16-2 新規な可逆的サリチル酸炭酸酵素の精製と遺伝子クローニング

○若山 瑠美子¹, 郡司 裕朗¹, 岩崎 勇一郎¹, 石井 義孝², 木野 邦器¹, 桐村 光太郎¹
(¹早大・理工・応化, ²早大・科健機構)

【目的】 演者らは、フェノールからサリチル酸を合成可能な微生物としてWU-0401株を取得した。そこで、本研究では、新規な可逆的サリチル酸炭酸酵素をWU-0401株から精製し、遺伝子クローニングと大腸菌における発現について検討した。【方法および結果】 WU-0401株によるフェノールからサリチル酸への変換は1種類の可逆的サリチル酸炭酸酵素 (Sdc) により行われていることを明らかにした。そこで、Sdcを4段階のクロマトグラフィーによりSDS-PAGEで単一のバンド (40 kDa) となるまで精製した。さらに、Sdcをコードする遺伝子 (*sdc*) をクローニングし、塩基配列を決定した。*sdc*のORFは349個のアミノ酸残基から成る39.7 kDaのタンパク質をコードしており、*Aspergillus oryzae*由来の2,3-ジヒドロキシ安息香酸炭酸酵素と50%、*Rhizobium radiobacter* WU-0108由来の γ -レゾルシン酸炭酸酵素¹⁾と39%の相同性を示した。また、*sdc*を大腸菌で発現させることに成功し、可逆的なサリチル酸炭酸活性を確認した。

Purification and Gene Cloning of a Reversible Salicylic Acid Decarboxylase as a Novel Enzyme

○Rumiko WAKAYAMA¹, Hiroaki GUNJI¹, Yuichiro IWASAKI¹, Yoshitaka ISHII², Kuniki KINO¹, Kohtaro KIRIMURA¹
(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Consolidated Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda Univ.)

Key words salicylic acid, reversible decarboxylase, gene cloning

1F16-4 変異型サーモライシンの自己分解点の改変による安定性の向上

○村田 尚子¹, 松宮 芳樹¹, 井上 國世², 久保 幹¹
(¹立命館大・理工・化生工, ²京大院・農)

【背景・目的】 サーモライシン (TLN) は*Bacillus thermoproteolyticus*が産生する耐熱性中性プロテアーゼであり、その耐熱性には自己分解が密接に関与している。これまでにTLNの自己分解点の一つを改変することにより、耐熱性が向上した変異型TLN (L155A, F, G, S) を取得した。しかしながらこれら変異型TLNはいずれもIle¹⁵⁶で新たに自己分解されていた。本研究では、Ile¹⁵⁶を種々のアミノ酸に置換することにより更なる耐熱性の向上を目指し、酵素活性の低下を伴わない変異型TLNを取得することを目的とした。

【方法・結果】

最も耐熱性が向上しており酵素活性はWTと同様のL155Aと、最も酵素活性が向上し耐熱性もWTよりも向上していたL155Sを基にし、新たに現れた自己分解点であるIle¹⁵⁶をAla, Asn, Valに置換した(L155A-I156A, N, V, 及びL155S-I156N, V)。L155A-I156A, N, Vは耐熱性は向上していたが酵素活性は低下していたことから、自己分解点改変による影響及び酵素活性の低下による影響が考えられた。一方、L155S-I156N, Vは酵素活性の低下を伴わず耐熱性が向上しており、自己分解が抑えられたことにより耐熱性が向上したと考えられた。自己分解点改変変異型TLNの二次的に現れた自己分解点Ile¹⁵⁶を改変することにより、更にTLNを安定化させることが可能であった。

Further stabilization of thermostabilized mutant thermolysin by modifying its new autodegradation site

○Naoko MURATA¹, Yoshiki MATSUMIYA¹, Kuniyo INOUE², Motoki KUBO¹
(¹Dept. Biosci. Biotech., Ritsumeikan Univ., ²Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words thermolysin, thermostability, autodegradation, *Bacillus thermoproteolyticus*