

2F11-3 クロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* DTP0602株のクロロフェノールモノオキシゲナーゼの発現と性質

○八田 貴¹, 岩本 麻理¹, 長尾 恵梨香¹, 萱野 由記¹, 滝澤 昇²
(¹岡山理大・技科研, ²岡山理大・工・応化)

【目的】木材の防腐剤 2,4,6-トリクロロフェノール (2,4,6-TCP) 分解菌 *Ralstonia pickettii* DTP0602 株由来のクロロフェノールモノオキシゲナーゼ (HadA) は、HadB, HadE タンパクが存在した場合、2,4,6-TCP を効率良く 6-クロロヒドロキシフェノールへ変換する。これらタンパクの詳細な解析を行った。【方法及び結果】本酵素の基質特異性は広く 4-ニトロフェノール, 2,5-ジニトロフェノール, シリンガルデヒド, 3,5-ジプロモ4-ヒドロキシベンゾニトリル等、種々のフェノール類を基質とした。最適 pH は、それぞれの基質の pKa よりも約 0.5-1.0 高かった。HadB は FAD を補酵素とするフラボプロテインであるが、HadE (フラビンレダクターゼ) によって還元された HadB/FADH₂ は FADH₂ 単独に比較し安定だった。本菌株由来のクロロフェノールモノオキシゲナーゼは、in vitro では HadA, HadB, HadE の比率が、1:4:0.16 の場合に活性が最大である。in vivo での発現量を調べるために hadA, hadB, hadE-lacZ の各融合遺伝子を作成し、LacZ 活性を調べたところ、比率は 1:0.64:0.15 であった。クロロフェノールを基質とした場合は反応に HadB を要求したが、4-ニトロフェノールの場合は HadB が不要であった。このことは、4-ニトロフェノール分解菌の遺伝子クラスターに hadB と同源性のある遺伝子が存在しない事と一致していた。

Characterization of chlorophenol monooxygenase from 2,4,6-trichlorophenol degrader *Ralstonia pickettii* DTP0602

○Takashi HATTA¹, Mari IWAMOTO¹, Erika NAGAO¹, Naoki KAYANO¹, Noboru TAKIZAWA²
(¹Res. Inst. Tec., Okayama Univ. Sci., ²Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words chlorophenol, *Ralstonia pickettii*, oxygenase

2F11-5 *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素の基質特異性改変による PHA 共重合組成制御

○佐々木 雄大, 大井 俊彦, 田口 精一
(北大院・工・生物機能高分子)

【目的】*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA 重合酵素は、短鎖長の 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) と、中鎖長の 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) を基質として、P(3HB-co-3HA) を合成できるユニークな酵素である。しかし、PHA の硬さを規定する 3HB の取り込み能力は微弱である。これまでの進化工学的研究から、本酵素中の 4 つの部位 (E130, S325, S477, Q481) が基質特異性や PHA 合成能の向上に大きく関与していることがわかった。本研究では、E130 部位と S325 部位における優良変異を固定した形で、触媒残基 (H479) 近傍に位置する 477 部位と 481 部位を同時に総アミノ酸置換することによってさらに 3HB 取り込み能力を増強し、多様な 3HB 組成比の PHA 共重合体の創製を目指した。(方法および結果) E130 部位と S325 部位における優良変異遺伝子をベースに、477 部位と 481 部位に飽和変異を導入し、変異体ライブラリーを作製した。基質として 3HB のみが供給される系で PHB 含量を指標とし、PHB 染色色素を利用したプレートアッセイや定量 HPLC を用いて 3HB 取り込み能力の増強した変異体を選抜した。獲得した変異体の塩基配列を解析した結果、アミノ酸置換として特に 477 部位にはグリシンあるいはアルギニンが重要である傾向が見られた。現在、これらの変異酵素を用いて、基質として 3HB と 3HA が供給される系で PHA 共重合体を合成し、そのモノマー組成比を測定中であるが、3HB のモル分率が野生型では 20% 程度であったのに対し、変異酵素の中には 70% を示すものも創出されている。

Composition control of PHA copolymer by altering substrate specificity of *Pseudomonas* sp. 61-3 PHA synthase

○Takahiro SASAKI, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI
(Dept. Eng., Div. Biotech. Macromol. Chem., Hokkaido Univ.)

Key words PHA synthase, substrate specificity

2F11-4 脂質膜界面を反応場とするアミロイド β-金属錯体の酸化酵素様機能 ~ コレステロールの酸化反応 ~

田崎 誠, ○吉本 則子, 島内 寿徳, 馬越 大, 久保井 亮一
(阪大院・基工)

アミロイド性タンパク質は構造異常により不溶性線維性凝集物 (アミロイド) を形成し、神経細胞への毒性を示すことが知られている。特に、アミロイド β タンパク質 (Aβ) は、アルツハイマー症の原因タンパク質として広く研究されている。しかし、その生理学的意義に関しては不明な点が多い。最近、Aβ-金属錯体は金属酵素様活性を発現することが報告されている。脂質膜界面を反応場として用いた場合、反応基質-脂質膜間の親和性、脂質膜界面の脂肪酸ドメインの有無などが反応特性の変化に大きく起因する可能性がある。今回、我々は、コレステロールの酸化反応を取り上げ、脂質膜特性が反応特性 (Michaelis-Menten 定数など) に及ぼす影響を検討した。その結果、膜流動性や脂質膜の不均一性が脂質膜に配向するコレステロールの酸化反応に影響を与えることが示唆された。

Metaloenzymatic function of Amyloid beta-metal complex on liposome membrane: cholesterol oxidation

Makoto TASAKI, ○Noriko YOSHIMOTO,
Toshinori SHIMANOUCHI, Hiroshi UMAKOSHI, Ryoichi KUBOI
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words Membrane Stress Biotechnology, cholesterol oxidation, amyloid beta, liposome

2F12-1 *Pseudomonas putida* IFO12996 由来低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ Ile³⁸⁴, Tyr³⁹⁶ 残基変異体の解析

○米山 万里子, 佐藤 大, 桐村 光太郎, 木野 邦器
(早大・理工・応化)

【目的】医薬・農業合成の重要な中間体である D-トリプトファン の効率的な合成プロセス開発を目的に、広い基質特異性を有する *Pseudomonas putida* IFO 12996 由来アミノ酸ラセマーゼ (BAR) に着目した。これまでに BAR へのランダム変異導入より取得した改変酵素の解析から、Ile³⁸⁴ と Tyr³⁹⁶ での変異がトリプトファンラセミ化活性向上に影響を及ぼす残基であることを明らかにしてきた¹⁾。そこで、各変異部位のアミノ酸置換と活性の変化の関係を明らかにするため部位特異的な変異の導入と解析を行った。【結果】BAR から取得したランダム変異株の中で、多くのアミノ酸に対して活性が向上した I384M とトリプトファンに対して特異的に活性が向上した Y396C に着目し、両残基への部位特異的な変異導入を実施した。その結果、Ile³⁸⁴ における変異では、I384M が最も高いトリプトファンラセミ化活性を示し、他のアミノ酸に対しても顕著な活性向上を示すことが明らかになった。一方、Tyr³⁹⁶ における変異では、トリプトファンに対し特異的な活性向上を示したのは Y396C のみであり、Tyr³⁹⁶ 置換体で最も高いトリプトファンラセミ化活性を示した Y396S は、他のアミノ酸に対しても活性向上を示した。部位特異的な単独変異導入株の中でトリプトファンに対し最も高い活性を示した I384M は 24 時間で L-トリプトファンからの完全なラセミ化を可能にした。

1) 米山万里子ら、日本生物工学会 2005 年度大会、講演要旨集 p112

Site-Direct Mutagenesis on Ile³⁸⁴ and Tyr³⁹⁶ Residues of Broad Specificity Amino Acid Racemase from *Pseudomonas putida* IFO 12996

○Mariko YONEYAMA, Masaru SATO, Kohtaro KIRIMURA,
Kuniki KINO
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words D-tryptophan, broad specificity amino acid racemase