

2C15-5 P450cam 変異体とグリセロールデヒドロゲナーゼを共発現した組換え大腸菌の構築とインジゴ生産への応用

○毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏
(九大院・工・応化)

【目的】現在、青色染料のインジゴは化学合成物が用いられているが、近年、遺伝子組み換え技術の進展によって、微生物触媒によってその生産を試みる研究が始まっている。これらの研究は、多くの大腸菌が有するトリプトファンゼによって生産されるインドールを、遺伝子組み換えによって導入した酸化酵素によってインジゴの前駆物質インドキシルへと変換するものである。本研究では、*Pseudomonas putida*由来のCYP101 (P450cam)の変異体 (P450cam F87W/Y96F) を酸化酵素として用い、組換え大腸菌でのインジゴ生産を試みた。さらに、P450cam F87W/Y96Fの酸化反応に必要なNADHの再生を触媒するグリセロールデヒドロゲナーゼ (GLD) を、補酵素再生酵素として組み込むことで、限られた補酵素量で継続的な酸化反応を可能にする細胞触媒の構築を目指している。

【結果・考察】P450cam F87W/Y96FおよびGLDを大腸菌細胞内に共発現させるための発現ベクターを構築し、大腸菌BL21(DE3)株に導入することで共発現大腸菌を獲得した。この大腸菌を培養した結果、GLDを共発現させずP450cam変異体のみを発現した大腸菌では、インジゴの生成を確認できなかったのに対して、GLDとP450camの変異体を共発現させた大腸菌ではインジゴの生産を行うことが可能なことを確認した。

Co-expression of P450cam mutant and glycerol dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* and its application to indigo production

○Tsuyoshi MOURI, Noriho KAMIYA, Masahiro GOTO
(Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ.)

Key words whole cell biocatalyst, cytochrome P450cam, NADH regeneration, Indigo

2C16-2 高活性なフェニルアセトアルデヒド還元酵素変異体を選択する系の改良

○牧野 祥嗣, 大川 徹, 伊藤 伸哉
(富山県大工・生工研セ)

有用酵素の実用化にはしばしば酵素の改良が必要とされる。その場合、改良法の良し悪しがプロセスの性能を左右するとも言える。しかし、有用酵素が対象とする反応は必ずしもスクリーニングに適さず、どのようにこれを補うかが問題となる。本報告ではこのことに関して、酵素改良法についての我々の事例研究結果を述べる。フェニルアセトアルデヒド還元酵素 (PAR) は、様々なケトン類からキラルアルコールへの、高立体選択的な変換反応を触媒する (Itoh et al. (2002) *EJB* 269:2394)。本反応液への2-プロパノール (IPA) の添加は、PARによる補酵素NADHの再生に利用できること、難溶性基質の溶解が促進されることなどの点で有利である。我々はこれまでに、野生型PARの高濃度IPA下での低活性を改良したSar268 (Makino et al. (2005) *AEM* 71:4713)、HAR1などの変異体を開発してきた。しかし、その改良手法はより効率的、ハイスループットにできると考えられた。そこで我々は優良変異体選択法の改良を試みた。モデル基質 *m*-chlorophenacyl chloride (*m*-CPC) の変換能は、手間のかかる直接測定でしか評価できない。そこで、プレスクリーニング法について検討した。従来の基質 IPA と比較して、DL-1-phenylethanol (1-PE) および acetophenone (AP) での活性と *m*-CPC 変換能に相関が認められた。そこで、1-PE でのメンブランススクリーニング、AP でのマイクロプレートアッセイ、*m*-CPC 変換試験という手順を検討したところ、効率のよいスクリーニングが確認され、新規な有利アミノ酸置換も見出すことができた。

An improved procedure for selecting highly active phenylacetaldehyde reductase mutants

○Yoshihide MAKINO, Tohru DAIRI, Nobuya ITOH
(Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words phenylacetaldehyde reductase, asymmetric reduction, enzyme engineering, 2-propanol

2C16-1 *Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 BM-3 活性化因子としての superoxide dismutase の機能解析

小川 順, ○工藤 あずさ, 矢野 由紀, 前田 千春, 清水 昌
(京大院・農・応用生命)

【目的】*Bacillus megaterium* 由来のシトクロム P450 (BM-3) はファインケミカル合成に有用な水酸化酵素として注目されている。我々は水酸化反応のモデルとして、BM-3 変異型酵素のひとつ F87V による indole からの青色染色 indigo 生産、および 2-benzoyloxyphenol (2BP) からの医薬中間体 2-benzoyloxyhydroquinone (2BHQ) 生産を指標に、BM-3 活性化因子の探索、同定、ならびに機能解析を試みた。

【方法・結果】F87V 精製酵素を用いた反応液に種々の微生物の cell-free extract (CFE) を添加し、反応効率の向上を検討した結果、F87V の発現に用いた大腸菌 DH5 α を含む複数の菌株の CFE に添加効果が見られた。さらに、DH5 α の CFE から P450 活性化因子の単離、精製を試みたところ、indigo もしくは 2BHQ の生産を活性化する複数の画分を得た。このうち、indigo 生産において活性化を示したタンパク質は、N 末端アミノ酸配列分析により、superoxide dismutase と同定された。BM-3 活性化因子としての superoxide dismutase の影響を様々な変異型酵素ならびに基質の組み合わせにより検討した。

Functional analysis of superoxide dismutase as an activating factor of cytochrome P450 BM-3 from *Bacillus megaterium*

Jun OGAWA, ○Azusa KUDO, Yuki YANO, Chiharu MAEDA,
Sakayu SIMIZU
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words cytochrome P450

2C16-3 *Bacillus* sp. 809A より精製したエステラーゼによるプロキラル 2-phenyl-1,3-propanediol diacetate の立体選択的加水分解

○三井 亮司¹, 新谷 精豊¹, 工藤 健太¹, 築野 卓夫², 田中 三男¹
(¹岡山理大・理・生化, ²築野食品工業)

【目的】プロパン骨格を持つ光学活性化合物を容易にかつ安価に合成することを目的とし、プロキラル 2-phenyl-1,3-propanediol diacetate (以下 PPdAc) の一方のエステルのみを加水分解させることにより、光学活性 2-phenyl-1,3-propanediol monoacetate (以下 PPMac) を得ることができる菌株のスクリーニングを行った。また、本反応に関与するエステラーゼを精製し、諸性質を明らかにしたので報告する。

【方法および結果】PPdAcの加水分解により PPMac を高収率で培養液中に蓄積する *Bacillus* sp. 809a を土壌より分離した。この休止菌体を用いて PPdAc に対して反応を行ったところ、PPMac の収率が最大となった時点での光学純度は (S)60% ee. であった。しかしながら PPMac がさらに 2-phenyl-1,3-propanediol へと加水分解されると、残存する PPMac の光学純度が上昇する現象が見られた。経時的に収率および光学純度を測定した結果、PPMac の収率が約 60% のときに 90% ee. 以上の (S) 体 PPMac を得ることができた。そこで本反応に関わる酵素の作用機作を明らかにするため PPdAc 加水分解活性を持つエステラーゼを精製した。得られた精製酵素は休止菌体において見られた反応と同様の機作を示した。また、この酵素の N 末端アミノ酸配列より、本エステラーゼは *Bacillus* 属細菌において広く分布していることが明らかとなった。

Asymmetric hydrolysis of prochiral 2-phenyl-1,3-propanediol diacetate by a purified esterase from *Bacillus* sp. 809A

○RYOJI MITSUJ¹, SEIHO SHINYA¹, KENTA KUDO¹,
TAKUO TSUNO², MITUO TANAKA¹
(¹Dept. Biochem., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ²Tsuno Food Industrial Co. Ltd.)

Key words *Bacillus* sp., esterase, stereospecificity, propanediol diacetate