

2Fa09

L-アスパラギン酸脱水素酵素を用いるL-アスパラギン酸合成

○川上 矩加¹, 芦田 裕之², 石川 孝博¹, 柴田 均¹, 澤 嘉弘¹
(¹ 島根大・生資科・生命工, ² 島根大・総科研・遺伝子)

【目的】L-アスパラギン酸(L-Asp)の生産方法としては、現在、微生物由来の固定化アスパルターゼを用いる方法が主流となっているが、様々な問題がある。本研究では、近年発見されたアーキア由来のL-アスパラギン酸脱水素酵素(AspDH)とNAD⁺再生系とのカップリング反応を用いるL-Asp合成の最適条件を検討した。

【方法・結果】昨年本大会で報告した*Bacillus subtilis* 由来リンゴ酸脱水素酵素(MDH)と*Archaeoglobus fulgidus* 由来AspDHを同時に発現する両有体クローンにトルエン処理で膜透過性を付与した大腸菌体にブタ心筋由来あるいは*Escherichia coli*由来フマラーゼをさらに加え、出発物質をフマル酸とした反応条件の検討を行った。生成L-Aspの定量は、アスパラギン酸酸化酵素(LAO)・西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)を用いる発色法により行った。さらに、両有体菌体による長時間培養でのL-Asp合成についても検討した。培養開始から約26時間後、定常期になったことを確認してからIPTGによる発現誘導を行った。N源として高濃度の塩化アンモニウム・硝酸カリウム・尿素等を培地中に添加し、C源は10 mMずつ定期的に添加した。

膜透過性両有体菌体にフマラーゼを加えた反応系での糖化率は約84%とかなり良好であった。長時間培養系では、C源としてグルコースを用いた時の糖化率が最大であった。しかし、長時間培養を行った際、生成L-Asp量は徐々に減少し、340 nm に吸光を持つ黄色物質の増加が見られるようになった。黄色物質の生成はC源としてフマル酸を用いることで抑制することができた。

Synthesis of L-aspartic acid by using L-aspartate dehydrogenase

○Norika KAWAKAMI¹, Hiroyuki ASHIDA², Takahiro ISHIKAWA¹, Hitoshi SHIBATA¹, Yoshihiro SAWA¹
(¹Life Sci. & Biotechnol., Shimane Univ., ²Mol.Func.Genom., Shimane Univ.)

Key words amino acid, L-Aspartate dehydrogenase

2Fa11

部位特異的変異導入によるL-フェニルアラニン水酸化酵素の基質特異性改変

○原 良太郎¹, 野澤 あい², 木野 邦器³
(¹早大・理工・応化, ²早大・理工・応化, ³早大・理工・応化)

【目的】5- ハイドロキシトリプトファンは抗精神病薬として有用である。*Chromobacterium violaceum* 由来L-フェニルアラニン水酸化酵素(CviPAH)はL-フェニルアラニンの4位に加え、微弱ながらL-トリプトファンの5位を位置特異的に水酸化する。我々はCviPAHのW180F変異酵素では、基質であるL-トリプトファンとのpai-paiスタッキング効果により基質-酵素複合体が安定化して活性が向上することを報告した¹⁾。本研究では更なるL-Trp水酸化活性の向上を目的として、X線結晶構造に基づいた立体構造モデリングから有効変異部位を予測し、部位特異的変異導入を検討した。

【方法・結果】Protein Data Bankで公開されているCviPAH (1LTZ)、ヒト由来PAH (1DMW)、ヒト由来L-トリプトファン水酸化酵素(1MLW)の立体構造に基づき、酵素と基質および補酵素ピリリンとの分子間相互作用を詳細に比較した。その結果、基質の認識は180位が担う一方で、101位のロイシン残基は補酵素を認識していることを予測した。そこで、101位の活性への影響を検証するために大腸菌発現系を用いた部位特異的変異導入により101位を種々のアミノ酸に置換した変異体を作製した。酵素精製後L-トリプトファン水酸化活性を評価したところ、チロシンへの置換変異体で活性向上を確認した。さらに、L101YとW180Fの二重変異酵素においては野生型酵素と比較して顕著な活性向上を達成した。

1) 野澤ら、日本農芸化学会2008年度大会講演要旨集、p23

Modification of L-phenylalanine hydroxylase by site-directed mutagenesis

○Ryotaro HARA¹, Ai NOZAWA², Kuniki KINO³
(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ., ³Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words 5-hydroxytryptophan, L-phenylalanine hydroxylase

2Fa10

Delftia sp. HT23 由来の新規酵素 D-threo-3- ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの利用

○和田 大, 篠原 茂樹, 前田 隆行, 横田 篤
(北大院・農・応生科)

【背景】3-ヒドロキシアスパラギン酸(HO-Asp)はアスパラギン酸の構造アナログであり、4つの光学異性体を持つ。すでに4つうちL-threo-HO-Aspに作用するデヒドラターゼが*Pseudomonas* sp. T62から発見されている。我々は最近、新たにD-threo体を変換する酵素を*Delftia* sp. HT23株から取得した。今回は本酵素の光学分割やセクションマーカへの利用の可能性について報告する。

【方法と結果】D-threo-HO-Asp デヒドラターゼ遺伝子を発現ベクターpQE30に連結して大腸菌JM109に導入し、発現させた。His-tagを用いて精製した酵素を使い DL-threo-HO-Asp を基質として酵素の光学分割を行った。その結果、光学的に純粋なL-threo-HO-Aspを得ることができた。このことから、本酵素はHO-Aspの光学分割に利用できることが示された。また、本酵素は*Saccharomyces cerevisiae* においてアスパラギン酸のアナログとして働き、毒性を示すL-erythro-HO-Aspにも作用する。この性質をセクションマーカとして利用することを考え、*S. cerevisiae* 中で発現させた。本酵素遺伝子を発現させた酵母はL-erythro-HO-Aspに耐性となり、本酵素の酵母におけるセクションマーカへの利用の可能性が示された。

Application of D-threo-3-dehydratase from *Delftia* sp. HT23

○Masaru WADA, Shigeki SHINOHARA, TAKAYUKI MAEDA, ATSUSHI YOKOTA
(Divi. Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words 3-hydroxyaspartate, optical resolution, *Saccharomyces cerevisiae*

2Fa12

ペプチド性抗生物質Rhizocticin生合成遺伝子クラスターからのオリゴペプチド合成 L- アミノ酸リガーゼの発見

○新井 利信, 小窪 雅弘, 木野 邦器
(早大・理工・応化)

【目的】我々はペプチド性抗生物質 Rhizocticin の生産菌 *Bacillus subtilis* NBRC3134から、Argと各種アミノ酸を連結してジペプチドを合成するL-アミノ酸リガーゼ (RizA) の取得に成功している。しかし、RizAにはすべてのRhizocticin誘導体の合成活性はないため、RizAとは別の新たなL-アミノ酸リガーゼの存在を予測した。このたびRizA周辺領域の遺伝子解析からRizAとは異なる候補遺伝子 (RizBと命名) を見出した。本研究では当該遺伝子産物がRhizocticin B, C, Dの合成に関与する新規L-アミノ酸リガーゼであると推定し検討を行った。

【方法・結果】RizBをC末端His-tag融合タンパク質として大腸菌で生産した。Rhizocticin Bの構造から「Val」と「Arg-Ser」を基質としたペプチド合成を検討した。反応産物をLC-ESI-MSで検証した結果、「Val-Arg-Ser」および「Val-Val-Arg-Ser」と推定されるm/zピークの存在を確認した。本酵素はMg²⁺を補因子としてATPを加水分解してADPとリン酸を生じることから、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)ではなく、アミドリガーゼ型酵素であると推察した。さらに、Val, Leu, Ileを基質としたところ、ValおよびLeuにおいては2~5量体、Ileにおいては2~4量体のホモペプチド生成を確認し、RizBはオリゴペプチド合成が可能な全く新たなL-アミノ酸リガーゼであると判明した。

A novel L-amino acid ligase, which is encoded by a gene in the rhizocticin biosynthetic gene cluster, synthesizes oligopeptide

○Toshinobu ARAI, Masahiro KOKUBO, Kuniki KINO
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words L-amino acid ligase, peptide, antibiotics, *Bacillus subtilis*