

2P-1069 微生物還元酵素を用いる 4-ヒドロキシイソロイシン立体異性体の生産：異性体分析法の確立と活性菌体の評価

日比 慎¹, 〇脇田 祐太², 高橋 孝治², 加古 純子², 横関 健三¹, 清水 昌², 小川 順²

(¹京大院・農・産業微生物学,²京大院・農・応用生命)

【背景】4-ヒドロキシイソロイシン(4-HIL)は、様々な生理活性が期待されている希少アミノ酸である。4-HILには3つの不斉炭素があり、立体異性体が8個存在する。その中でも、(2S,3R,4S)-4-HILによる糖尿病改善効果に関して多くの報告がなされている。また、4-HILの他の立体異性体においても、インスリン分泌活性が確認されている。さらに4-HIL立体異性体は様々な化合物のキラルビルディングブロックとなりえる。この様に、HILの各々の立体異性体を、純度よく作り分けることができれば、その有用性をより生かすことができるだろう。そこで、本研究では、微生物還元酵素を用いてプロキラルな4-HIL前駆体である4-オキソイソロイシン(AMKP)から立体選択的に4-HILを生産すべく、異性体分析法の確立と活性菌株の評価を試みた。【結果】GTC誘導体化したサンプルを、HPLC分析に供することで、4種のAMKP立体異性体および8種のHIL立体異性体、計12種の化合物の一斉分析法を確立できた。この分析法を用いて、研究室保存菌からすでにスクリーニングによって選抜されていたAMKP還元活性菌が生成する4-HILの立体異性を同定した。その結果、基質であるAMKPの立体構造の認識、ならびに、基質の4位カルボニル基の還元に関して、様々な立体選択性を示す菌株が存在することを見いだした。

Stereoselective production of 4-hydroxyisoleucine by microbial enzymes : development of diastereomer analysis method and evaluation of the reaction products

Makoto HIBI¹, 〇Yuta WAKITA², Koji TAKAHASHI², Junko KAKO², Kenzo YOKOZEKI¹, Sakayu SHIMIZU², Jun OGAWA²

(¹Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.,²Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words 4-hydroxyisoleucine, carbonyl reductase, HPLC analysis, stereoselectivity

2P-1071 Aminolysin の反応メカニズムの解明と環状ジペプチド類の効率的酵素合成

〇白木 博一^{1,2}, 山本 幸弘¹, 山里 明弘¹, 熊谷 祐也¹, 向原 隆文¹, 畑中 唯史¹

(¹独)日本学術振興会特別研究員PD,²岡山生物研)

【目的】環状ジペプチド類は、多様な構造、生理活性から興味深い化合物群であり、我々のグループでは、その効率的な酵素合成を目指して研究を進めている。これまでに、(1)触媒残基としてセリンを有する新規なアミノペプチダーゼが放線菌に幅広く分布しており、(2)そのシステイン変異体(以下aminolysin)が、ペプチド結合の形成を触媒する事実を明らかにしてきた。ただし本反応の効率は必ずしも高いとは言えない。このような経緯から本研究では、aminolysinの反応メカニズムを精査し、その情報を基に、環状ジペプチド類の効率的合成を達成する事を目的としている。

【方法と結果】本反応の特徴として、アミノ酸エステル体アシルドナー/アクセプターとして用いる時、ワンポットで環状ジペプチド類が得られる事実が挙げられる。そこで、種々の条件下で酵素反応を行い、その生成物をLC/MSを用いて同定した。その結果、本触媒はアミノ酸エステル体同士のアミノリシス反応のみを触媒し、その結果生じるジペプチドエステル体が、非酵素的分子内アミノリシスを経て環状ジペプチド類を与えるメカニズムが示唆された。現在、本メカニズムに確証を得るために、反応中間体と予想されるジペプチドエステル体の単離と非酵素的分子内アミノリシス反応の有無を検討している。加えて、副反応である加水分解を抑制する反応条件の選抜と、その最適化を試みている。

Clarification of the reaction mechanism of aminolysin and its application into the effective synthesis of cyclic dipeptides

〇Hirokazu Usuki^{1,2}, Yukihiko Yamamoto¹, Akihiro Yamasato¹, Yuya Kumagai¹, Takafumi Mukaihara¹, Tadashi Hatanaka¹

(¹JSPS Research Fellow,²RIBS Okayama)

Key words aminolysin, serine protease, cyclic dipeptides, aminopeptidase

2P-1070 Tabtoxin 合成細菌からの新規 L-アミノ酸リガーゼの取得

〇石倉 峻, 有村 泰宏, 新井 利信, 木野 邦器 (早大・理工・応化)

【目的】タバコ野火病の原因物質であるTabtoxinは、Tabtoxinine-β-lactamとL-Thrが縮合したジペプチドである。我々はTabtoxinのペプチド結合形成にL-アミノ酸リガーゼ(Lal)が関与することを予測し、Tabtoxin合成細菌である*Pseudomonas syringae* BR2由来のTabtoxin合成遺伝子クラスターを解析した。その結果、AAP13071遺伝子にリガーゼ酵素に特有なATP-Grasp motifが存在することを見出した。本研究では、同じくTabtoxin合成細菌である*Pseudomonas syringae* NBRC14081からAAP13071に相当する遺伝子をクローニングし、組換え酵素についてLal活性を検証したので報告する。

【方法・結果】BR2株由来AAP13071遺伝子の塩基配列を基に、*P. syringae* NBRC14081のゲノムDNAから該当する遺伝子をPCR法により増幅し、塩基配列を決定した。これを*tabS*と命名し、大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製した。タンパク質構成アミノ酸にβ-Alaを加えた計21種類のアミノ酸を基質として反応を行い、その生成物をLC-ESI-MSで解析した結果、136種類に及び組合せでジペプチドが合成されていることを確認した。TabSは既知のLalと比較して最も広範な基質特異性を示し、Lalとしては初めてC末端にProを含有するジペプチドPro-Proを合成することや、発毛抑制効果が報告されているPhe-β-Alaの合成も可能であることを明らかにした。

A novel L-amino acid ligase from a tabtoxin-producing microorganism

〇Shun ISHIKURA, Yasuhiro ARIMURA, Toshinobu ARAI, Kuniki KINO

(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words tabtoxin, L-amino acid ligase, dipeptide, peptide synthesis

2P-1072 Anammox 菌のヘテロ 2 量体シクロム c の X 線結晶構造解析

〇平 大輔¹, 中村 照也², 山縣 ゆり子², 古川 憲治¹, 藤井 隆夫³

(¹熊大院・自然科学,²熊大院・薬,³崇城大・応生命)

嫌気性アンモニア酸化(anaerobic ammonium oxidation: Anammox)はアンモニアと亜硝酸から窒素分子を生ずる新規な脱窒反応である。この反応過程においてはヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、反応機構の全容解明には至っていない。これまでに我々はAnammox菌から大・小2つのサブユニットから成る25 kDaのヘテロ2量体シクロムcを単離し、-400 mV以下の低い酸化還元電位を有することなど、その性質を報告してきた。本研究では、このヘテロ2量体シクロムcの立体構造解明を目的とし、X線結晶構造解析を行った。結晶化は精製したnativeヘテロ2量体シクロムcと、大腸菌で発現した組換え体大サブユニットを試料とし、蒸気拡散法により行った。両試料で結晶が得られたが、今回は、良好な単結晶が得られた大サブユニットについてSPRING-8で回折データ収集を行い、Fe-SAD法にて1.75 Å分解能で立体構造を決定した。大サブユニットはClass IIのシクロムcに分類される4本のalpha-ヘリックスからなる三次構造を形成していた。また、HisとCysにより配位されたc型ヘムを1個含有していた。このc型ヘムへのHis/Cys配位は天然において非常に稀な配位環境であり、これまで数例の報告があるのみである。Class IIシクロムcにおけるHis/Cys配位は、本報告が初めての例である。Anammox菌のヘテロ2量体シクロムcの低い酸化還元電位は、このHis/Cys配位が大きな要因になっていると考えられた。

Crystal structure of a heterodimeric cytochrome c from an anammox bacterium strain KSU-1

〇Daisuke HIRA¹, Teruya NAKAMURA², Yuriko YAMAGATA², Kenji FURUKAWA¹, Takao FUJII³

(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.,²Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ.,³Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words anaerobic ammonium oxidation, cytochrome c, heme protein