

1P-041 古細菌由来核内増殖抗原を利用した細菌由来シクロム P450 の担体上への固定化

○平川 秀彦¹, 芳賀 智亮¹, 早田 洋平¹, 長棟 輝行^{1,2}
 (¹東大院・工・化生, ²東大院・工・バイオエンジニアリング)
 hirakawa@bio.t.u-tokyo.ac.jp

シクロム P450 (P450) は位置特異的・立体選択的な酸化反応を触媒するため、キラル化合物などの合成用触媒としての利用が期待されている。多くの細菌由来 P450 ではその触媒サイクルにおいてフェレドキシン還元工に (FdR) によって還元されたフェレドキシン (FdX) からの電子伝達による活性化を必要とすることから、P450 は FdX が P450 - FdR 間のシャトル分子として働くマルチコンポーネントシステムとして利用する必要がある。そのため、FdX を P450 や FdR と共に担体上に固定すると P450 - FdR 間のシャトル分子としての機能を失い、細菌由来 P450 を固定化酵素として利用するのは困難である。そこで、我々は古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来核内増殖抗原 (PCNA) のヘテロ三量体を利用して P450、FdX 及び FdR を担体上に共固定し、モノオキシゲナーゼ活性を示す固定化 P450 の実現を目指した。PCNA は三つのサブユニット (PCNA1、PCNA2、PCNA3) から構成される。PCNA1 に FdR と FdX を導入した融合タンパク質 FdR-PCNA1-FdX 及び PCNA3 に P450 を導入した融合タンパク質 PCNA3-P450 を構築した。PCNA2 を NHS 活性化担体に直接固定化した後、FdR-PCNA1-FdX と PCNA3-P450 を添加すると、担体上の PCNA2 を介して FdR-PCNA1-FdX と PCNA3-P450 が固定化された。NHS 活性化担体に直接 P450、FdX 及び FdR を共固定化した場合は全くモノオキシゲナーゼ活性を示さなかったのに対し、PCNA2 を介して固定化した場合はモノオキシゲナーゼ活性を示した。

An archaeal proliferating cell nuclear antigen-mediated immobilization of bacterial cytochrome P450 onto solid supports

○Hidehiko Hirakawa¹, Tomoaki Haga¹, Yohei Hayata¹, Tetuyuki Nagamune^{1,2}
 (¹Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, ²Dept. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words immobilization, monooxygenase, PCNA, *Sulfolobus solfataricus*

1P-043 *Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの発現と特製解析

○竹中 慎治, 吉田 健二, 吉田 健一
 (神戸大院・農)
 hakko3@kobe-u.ac.jp

【目的】*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株の生産するアセチル CoA-N-アセチルトランスフェラーゼ (NatA) は、キラルアミン 2-フェニルグリシン (2PG) の L-体に対して活性を示す特異な酵素である。¹⁾ 本研究では、本酵素遺伝子を大腸菌にて発現し、組換え酵素 (rNatA) の酵素化学的諸性質を調べたので報告する。

【方法】酵素活性および 2PG の定量：既報の方法に従った。¹⁾ 遺伝子発現：natA 断片を pET28b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 形質転換株で発現させた。

【結果】5-3B 株ゲノム DNA からインバース PCR 等にて目的とする遺伝子断片を含む約 2.7 kb の断片をクローニングできた。NatA (162 a.a.) の上流には機能未知であるが GntR-like protein (471 a.a.) を見出した。NatA は既報のアリルアミン N-アセチルトランスフェラーゼ (Ar-NH2 Nat) 等の転移酵素とは類似性がほとんどなかった。形質転換株の培養条件を検討し、IPTG 添加後に 15℃ で 24 時間培養すると活性体を効率的に回収することができた。rNatA は 2PG の基質類縁化合物の中で L-2PG の他 D,L-2-chloro-2PG (相対活性、56.9%) や L-4-hydroxy-2PG (16.7%) に対して活性を示したが、Ar-NH2 Nat の最良な基質である 5-aminosalicylate (5.5%) に対する活性は低かった。同酵素は、アセチル CoA 以外にプロピオニル CoA やブチリル CoA のアシル基を同基質のアミノ基に転移することができた。最適条件下で L-2PG に対する酵素反応速度論量を求めたところ、Km 値および Vmax 値はそれぞれ 175 ± 18 μM および 42 ± 4 μmol・min⁻¹・mg protein⁻¹であった。1) S. Takenaka et al., Biotechnol. Lett., 2013, (DOI 10.1007/s10529-013-1172-z).

Cloning, expression, and characterization of N-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. 5-3B

○Shinji Takenaka, Kenji Yoshida, Ken-ichi Yoshida
 (Grad. Sch. Agric., Kobe Univ.)

Key words *Chryseobacterium*, 2-phenylglycine, N-acetyltransferase

1P-042 アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた組換え大腸菌による trans-アコニット酸生産

○油原 かほり, 小林 慶一, 桐村 光太郎
 (早大・先進理工・応化)
 kkohtaro@waseda.jp

【目的】trans-アコニット酸は機能性高分子原料としての用途があり、バイオプロセスによる生産が期待されている。アコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7) は、植物や *Pseudomonas* 属細菌等の微生物に存在し、cis-アコニット酸と trans-アコニット酸の異性化反応を触媒する酵素である [1]。本研究では、*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来のアコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた組換え大腸菌を用いた trans-アコニット酸生産を行った。【方法および結果】*Pseudomonas* sp. WU-0701 よりアコニット酸イソメラーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として高発現させることで、組換え酵素を活性のある可溶性タンパク質として取得した。取得した組換え酵素は、cis-アコニット酸を基質とする *in vitro* 反応により性質を検討した。最適反応 pH が 6.0、最適反応温度が 37℃ で、*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来のアコニット酸イソメラーゼと同一の性質を示した。さらに、クエン酸から cis-アコニット酸への脱水反応を触媒するアコニターゼ遺伝子をアコニット酸イソメラーゼ遺伝子と共に発現させた大腸菌を作製した。作製した組換え大腸菌を生体触媒として利用し、37℃、30 分間の反応で 100 mM のクエン酸を原料として 34.8 mM の trans-アコニット酸の生産に成功した。

[1] 油原, 他, 2012 年度日本生物工学会大会講演要旨集, 講演番号 2Ca14(2012).

Production of trans-Aconitic Acid by Recombinant *Escherichia coli* Expressing Aconitate Isomerase Gene

○Yuhara Kahori, Kobayashi Keiichi, Kirimura Kohtaro
 (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words aconitate isomerase, trans-acconitic acid, citric acid, *Pseudomonas* sp.

1P-044 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 による麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 FAD 結合型 Glucose dehydrogenase の組換え発現

○歌島 悠^{1,2}, 相場 洋志¹, 岸本 高英¹, 正木 和夫^{2,3}, 家藤 治幸⁴
 (¹東洋紡, ²広島大院・生物圏, ³酒総研, ⁴愛媛大・農)
 masaki@nrib.go.jp

Glucose Dehydrogenase (以下 GDH) は、Glucose oxidase とともに、血糖値測定装置である血糖センサーに利用される酵素である。近年、基質特異性に優れた FAD を補酵素とする GDH が、*Aspergillus oryzae* から取得されている。本研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産する FAD 結合型 GDH (以下 AoFADGDH) の高生産を目的とし、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 を宿主として組換え発現を試みた。担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質発現系では、キシラナーゼプロモーターを利用した発現系が確立している [1]。さらに、これまでの研究で *Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質の組換え発現のためには、コドンユースージの最適化と N 末端の分泌シグナル配列の最適化が効果的であることを確認している [2]。そこで、AoFADGDH 遺伝子についても同様にコドンユースージを最適化した遺伝子を合成し、さらに分泌シグナル配列を、*Cryptococcus* sp. S-2 由来の配列に置換し発現量の検討を行った。結果、コドンユースージ最適化遺伝子を使用することにより、活性型で AoFADGDH が細胞外に分泌生産されることを確認し、さらに、分泌シグナルを *Cryptococcus* sp. S-2 のキシラナーゼ由来の配列に置換することで、その生産量は 2.5 倍に向上した。

[1] K. Masaki, et al, AMB 93:1627-1636, 2012

[2] 歌島悠ら、日本農芸化学会 2013 年度大会

Heterologous expression of FAD-dependent glucose dehydrogenase from *Aspergillus oryzae* in a basidiomycete yeast *Cryptococcus* sp. S-2

○Yu Utashima^{1,2}, Hiroshi Aiba¹, Takahide Kishimoto¹, Kazuo Masaki^{2,3}, Haruyuki Iefuji⁴
 (¹TOYOBO CO., LTD, ²Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ., ³NRIB, ⁴Fac. Agric., Ehime Univ.)

Key words glucose dehydrogenase, *Aspergillus oryzae*, *Cryptococcus* sp. S-2, heterologous production