

**2P-037 Lactobacillus plantarum AKU 1009a 由来リノール酸水和酵素の機能解析**○竹内 道樹<sup>1</sup>, 田辺 香緒里<sup>1</sup>, 平田 晶子<sup>1</sup>, 朴 時範<sup>2</sup>, 岸野 重信<sup>1</sup>, 小川 順<sup>1</sup><sup>1</sup>京大院・農・応用生命, <sup>2</sup>京大院・農・産業微生物  
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】近年、様々な機能性脂肪酸が、栄養学的・薬理的見地から注目を集めており、機能性脂肪酸の微生物生産に関する試みも盛んに行なわれている。機能性脂肪酸の一つである共役リノール酸 (CLA) は共役した二重結合を有するリノール酸の異性体であり、体脂肪の減少・抗がん作用・動脈硬化予防作用など有益な生理活性が見いだされている。本研究では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a によるリノール酸からの CLA 生産に関与する不飽和脂肪酸飽和化代謝について、本代謝を構成する4つの酵素(水和酵素 (CLA-HY)、酸化還元酵素 (CLA-DH)、異性化酵素 (CLA-DC)、飽和化酵素 (CLA-ER)) を見いだしている。本研究では、本代謝系の初発反応である水和反応を触媒する CLA-HY について諸性質の解明を試みた。

【方法・結果】CLA-HY を His-tag 融合タンパク質として大量発現する形質転換大腸菌を作成し、得られた形質転換体より酵素を精製した。本酵素の補酵素は FAD であり、本酵素の水和活性が NADH の添加により上昇することを明らかにした。本酵素による水和反応は、Δ9 位にシス型二重結合を有する炭素数 18 の脂肪酸を基質とし、10 位選択的に水酸基を導入した。また、導入した水酸基の立体は S 体選択的であることを明らかにした。さらに、至適水和反応 pH が 5.5、至適水和反応温度が 37°C、リノール酸に対する *K<sub>m</sub>* 値が 92 μM であることを明らかにした。

**Functional analysis of linoleate hydratase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a**○Michiki Takeuchi<sup>1</sup>, Kaori Tanabe<sup>1</sup>, Akiko Hirata<sup>1</sup>, Si-Bum Park<sup>2</sup>, Shigenobu Kishino<sup>1</sup>, Jun Ogawa<sup>1</sup><sup>1</sup>Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.**Key words** lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, hydratase**2P-038 Lactobacillus plantarum AKU 1009a 由来リノール酸水和酵素を用いた水酸化脂肪酸の実用的生産の検討**○北村 苗穂子<sup>1</sup>, 竹内 道樹<sup>1</sup>, 岸野 重信<sup>1</sup>, 平田 晶子<sup>1</sup>, 朴 時範<sup>2</sup>, 小川 順<sup>1</sup><sup>1</sup>京大院・農・応用生命, <sup>2</sup>京大院・農・産業微生物  
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】近年、共役脂肪酸や水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸など特異な構造を有する脂肪酸の生理機能に注目が集まっている。しかし、これらの脂肪酸の機能評価や用途開発を支援する効率的供給はいまだ達成されていない。我々は以前より、リノール酸を効率よく共役リノール酸 (CLA) へと変換する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a を用いた不飽和脂肪酸代謝の解析を試みている。本研究では、その初発反応であるリノール酸の水和反応を触媒する水和酵素 (CLA-HY) を活用し、水酸化脂肪酸の実用レベルでの生産を試みた。【方法・結果】乳酸菌 *L. plantarum* AKU 1009a 由来の水和酵素 (CLA-HY) を大量発現する形質転換大腸菌を作成し、得られた形質転換体の洗浄菌体を触媒として種々の不飽和脂肪酸の水和を試みた。その結果、リノール酸から 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid を、α-リノレン酸から 10-hydroxy-*cis*-12, *cis*-15-octadecadienoic acid を得ることができた。また、反応条件を最適化することにより、それぞれ約 30% (w/v) の基質から 95% 以上の収率で生成物 (10-hydroxy-脂肪酸) を得ることができた。さらに生成物の精製工程についても検討を行い、純度 99% 以上にて精製することに成功した。

**Practical production of hydroxy fatty acids catalyzed by the hydratase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a**○Nahoko Kitamura<sup>1</sup>, Michiki Takeuchi<sup>1</sup>, Shigenobu Kishino<sup>1</sup>, Akiko Hirata<sup>1</sup>, Si-Bum Park<sup>2</sup>, Jun Ogawa<sup>1</sup><sup>1</sup>Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.**Key words** hydroxy fatty acid, hydratase, lactic acid bacteria**2P-039 1,4-ジアセチル-2-メチルピペラジンに作用する立体特異的ハイドロラーゼの探索**満倉 浩一, ○高間 健, 林 秀樹, 吉田 豊和, 長澤 透  
(岐阜大・工・生命工)

mitukura@gifu-u.ac.jp

【背景・目的】光学活性ピペラジンは、2つのアミノ基が分子内に存在する複素環化合物であり、医薬品などの合成中間体としての用途が期待されている。酵素による光学活性ピペラジン合成法として、市販リパーゼによるラセミ体 2-メチルピペラジンの不斉アシル化が報告されているが、変換率と立体選択性の点で問題を抱えている。そこで我々は、ラセミ体 1,4-ジアセチル-2-メチルピペラジン (rac-DAMPZ) を用いて、立体特異的ハイドロラーゼ生成菌の取得を試みた。

【方法・結果】rac-DAMPZ を単一炭素源として用いて集積培養したところ、DAMPZ 加水分解活性菌が 11 株得られた。生成したアミンを 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシルイソチオシアナート (GITC) を用いて誘導化した後、HPLC 分析から立体配置と光学純度を算出した。得られた活性菌の中で、H8 株が、高活性で高エンアンチオ選択性を示した。16S rDNA 解析から、H8 株を *Microbacterium* sp. と同定した。培養および反応条件を検討した後、休止菌体を用いて 300 mM rac-DAMPZ の変換反応を行った結果、変換率 52.7% で (S)-1-アセチル-2-メチルピペラジン (>99% ee) を生成した。

**Survey of stereospecific hydrolase acting on 1,4-diacetyl-2-methylpiperazine**Koichi Mitsukura, ○Ken Takama, Hideki Hayashi, Toyokazu Yoshida, Toru Nagasawa  
(Dept. Biomol. Sci., Fac. Eng., Gifu Univ.)**Key words** stereospecific hydrolase, optically active, piperazine derivative**2P-040 2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の探索**○吉田 拓矢, 大村 信人, 満倉 浩一, 吉田 豊和  
(岐阜大・工・生命工)

toyosida@gifu-u.ac.jp

【背景・目的】ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は、逆反応である炭酸固定反応も触媒し、酸素感受性が強くヒドロキシ基の *p* 位のカルボキシル基を脱炭酸する酵素群と、酸素に対して比較的安定で *o* 位のカルボキシル基を脱炭酸する酵素群の大きく二つのグループに分類できる。*p* 位と *o* 位にヒドロキシ基を有する 2,4-ジヒドロキシ安息香酸 (2,4-DHBA) を分解する微生物の存在は報告されているが、活性菌は分離されておらず、2,4-DHBA 脱炭酸酵素の特徴は明らかになっていない。そこで、酸素感受性を考慮し、主に好気条件下で 2,4-DHBA 脱炭酸酵素生成菌の取得を試みた。

【方法・結果】2,4-DHBA を含んだ栄養培地に種々の土壌サンプルを入れ、静置培養した後、活性菌を分離した。培養液上清を TLC を用いて分離菌の活性の有無を評価した。その結果、10 菌株が活性を示した。これらの菌株を振とう培養した後、休止菌体反応で活性を評価した。10 菌株のうち 9 菌株が活性を示し、それらの中で、最も活性の強い菌株を選択し、培養および反応条件を検討した。休止菌体を用いて基質特異性などの反応特性の解明を進めている。

**Survey of 2,4-dihydroxybenzoic acid decarboxylase**○Takuya Yoshida, Nobuto Omura, Koichi Mitsukura, Toyokazu Yoshida  
(Dept. Biomol. Sci., Fac. Eng., Gifu Univ.)**Key words** decarboxylation, 2,4-dihydroxybenzoic acid, resorcinol, semi-aerobic cultivation