

**1P-071 *Mycobacterium*属細菌由来二核鉄型酸化酵素複合体の大腸菌における発現**

○古賀 美千代, 古屋 俊樹, 林 未華, 木野 邦器  
(早大・先進理工・応化)  
kkino@waseda.jp

【目的】二核鉄型酸化酵素は有機化合物の酸化分解において重要な役割を担っている。なかでも放線菌由来の二核鉄型酸化酵素は、酸化触媒としての工業的有用性も高く、応用展開に期待が寄せられているが、構造的にもユニークな本酵素を異種の細胞内で発現させることは困難となっている。大腸菌での発現も成功しておらず、産業利用を目的とした高活性組換え細胞の開発の妨げになっている。本研究では、フェノールのヒドロキノンへの変換を触媒する *Mycobacterium*属細菌由来 MimABCD の大腸菌における活性発現を試みた。  
【方法・結果】大腸菌に *mimABCD* 遺伝子を導入したが、活性を発現させることはできなかった。SDS-PAGE 分析から、オキシゲナーゼ細胞の開発の妨げユニット MimA およびスモールサブユニット MimC は不溶化し、レダクターゼ MimB およびカップリングプロテイン MimD はほとんど発現していないことが明らかとなった。そこで *mimABCD* 遺伝子クラスター下流に存在し、シャペロン機能をコードすることを明らかにしている *mimG* 遺伝子<sup>1)</sup> を共発現させたところ、MimA と MimC が可溶化し、フェノール変換活性が検出された。さらに *mimD* の塩基配列を大腸菌用のコドンに最適化することにより MimD の発現は改善され、変換活性も 11 倍に向上した。

1) Furuya et al., FEBS J, 280, 817-826 (2013).

**Active expression of Mycobacterial Binuclear Iron Monooxygenase Complex in *Escherichia coli***

○Michiyo Koga, Toshiki Furuya, Mika Hayashi, Kuniki Kino  
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** chaperonin, monooxygenase, heterologous expression, *Mycobacterium*

**1P-073 *Penicillium* sp. KAIT-M-117 由来  $\gamma$ -アミノ酪酸オキシダーゼ遺伝子の大腸菌における発現**

○池田 大介, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司  
(阪府大院・生環科・応生科)  
takashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

【目的】*Penicillium* sp. KAIT-M-117 は、GABA を基質とし、オキシダーゼ活性を有する酵素を生産するが、GABA 特異的に酸化反応を行う酵素は他に報告がなく、本菌株が生産する GABA オキシダーゼは新規な酵素と考えられる。しかし、本菌株における生産性は低く、また本酵素の精製が困難であるため、諸性質は不明である。そこで、部分アミノ酸配列より取得された本酵素遺伝子を、大腸菌を宿主として発現させ、発現産物の精製および諸性質の解明を目指した。

【方法・結果】精製を容易にするために本酵素を His-tag 融合タンパクとして生産することにした。His-tag を N 末端または C 末端に付加して条件検討を行った結果、N 末端に His-tag を付加し、16°C で 3 日間培養することで最も高い酵素生産が確認された。無細胞抽出液から Ni-Chelating Sepharose を用いて得た電気泳動的に単一な精製標品を用いて本酵素の諸性質を調べた。スペクトル測定を行い、365 nm, 455 nm 付近に吸収極大が見られたことから、本酵素はフラビン酵素であるとわかった。またカイネティクスを測定し、 $K_m$  は 5.3 mM,  $k_{cat}$  は 17.5 s<sup>-1</sup> であった。さらに、基質特異性を調べたところ、 $\alpha$ -アミノ酸や  $\beta$ -アラニン、モノアミンであるプロピルアミンやブチルアミンに対して活性は検出できず、5-アミノ吉草酸や 6-アミノヘキサミン酸にのみわずかに示したことから、本酵素が GABA に対して高い基質特異性を有することが明らかとなった。

**Expression of  $\gamma$ -aminobutyrate oxidase gene from *Penicillium* sp. KAIT-M-117 in *Escherichia coli***

○Daisuke Ikeda, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi  
(Dep. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Penicillium*, oxidase, flavoprotein, GABA

**1P-072 *Pseudomonas aeruginosa* 由来二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼを利用したジヒドロキシ芳香族化合物の位置選択的合成**

○古屋 俊樹<sup>1</sup>, 斎 政彦<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工・応化, <sup>2</sup>森永製菓)  
tfuruya@fuji.waseda.jp

【目的】ケイ皮酸やスチルベンのジヒドロキシ誘導体は、抗酸化活性等の多様な生理活性を示す有用な化合物である。これらのジヒドロキシ芳香族化合物は植物からの抽出法や化学合成法により得られるが、生産効率に課題も有する。本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 4-ヒドロキシフェニル酢酸モノオキシゲナーゼ HpaBC に着目してそのケイ皮酸類やスチルベン類に対する活性を評価し、ジヒドロキシ誘導体の合成を試みた。

【方法・結果】*hpaBC* 遺伝子を発現させた組換え大腸菌を生体触媒として各種基質と反応させた。その結果、*p*-クマル酸に対して高い活性を示し、メタ位を水酸化してカフェ酸を生成した。フラスコスケールで反応を実施したところ、24 時間で 56.6 mM (10.2 g/L) のカフェ酸合成を達成した<sup>1)</sup>。また、HpaBC はフェルラ酸、コニフェラルデヒドやレスベラトロールに対しても活性を示し、レスベラトロールからはアンチエイジング素材として有用なピセアタンノールを生成した。

1) Furuya et al., Appl Microbiol Biotechnol, 98, 1145-1154 (2014).

**Regioselective synthesis of high-value dihydroxy-aromatic compounds by the two-component flavin-dependent monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa***

○Toshiki Furuya<sup>1</sup>, Masahiko Sai<sup>2</sup>, Kuniki Kino<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Morinaga & CO., Ltd.)

**Key words** oxygenase, hydroxylation, caffeic acid, piceatannol

**1P-074 放線菌フェルラ酸エステラーゼの機能解析**

○裏地 美杉<sup>1</sup>, 田村 はるか<sup>1</sup>, 溝端 栄一<sup>2</sup>, 小川 健一<sup>1</sup>, 井上 豪<sup>2</sup>, 中川 唯史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山生物研, <sup>2</sup>阪大院・工・応化)  
hatanaka@bio-ribs.com

【目的】イネ科バイオマスに豊富に含まれるフェルラ酸は、高い抗酸化活性を保有することから、食品や化粧品品の添加物として利用されている。バイオマスからのフェルラ酸抽出方法として、微生物酵素を用いた方法が提案され、フェルラ酸エステラーゼ (FAE) はこの方法において重要な役割を担う鍵酵素である。我々は新たな FAE の探索のため、フェルラ酸エチルエステルの加水分解活性を基に放線菌エステラーゼライブラリーをスクリーニングし、2つの FAE 酵素を見出した。今回は、見出した放線菌 FAE の機能解析を行うことを目的とし、放線菌由来 FAE の 1 つである、R18 とそのホモログ酵素の性質検討を行った。

【方法と結果】R18 に相同性を示す遺伝子を、放線菌ゲノム情報から探索したところ、*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株のホモログ遺伝子 (TH-2-18) は、R18 とアミノ酸配列で 74% の相同性を示すことがわかった。そこで、R18 と TH-2-18 の大腸菌リコンビナントタンパク質を作成し、フェルラ酸エチルを基質として諸性質を解析した。さらに、3 種の桂皮酸エステル類、また *p*-ニトロフェニル酪酸を基質として用いてエステラーゼ活性測定を行い、それぞれの酵素の基質特異性を比較した。TH-2-18 は、*p*-ニトロフェニル酪酸に対しては、R18 の約 1/2 のエステラーゼ活性を示したが、フェルラ酸エチルおよび桂皮酸エステル類には約 1/10 のエステラーゼ活性を示した。現在 R18 の結晶構造解析に取り組んでいる。

**Characterization of feruloyl esterase from *Streptomyces***

○Misugi Uraji<sup>1</sup>, Haruka Tamura<sup>1</sup>, Eiichi Mizohata<sup>2</sup>, Ken'ichi Ogawa<sup>1</sup>, Tsuyoshi Inoue<sup>2</sup>, Tadashi Hatanaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>RIBS, Okayama, <sup>2</sup>Div. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *Streptomyces*, esterase, ferulic acid