

1P-095 二種類のハイドロラーゼ生成菌を利用した光学活性 2-メチルピペラジンの合成

○満倉 浩一¹, 白木 勇佑², 高間 健², 長澤 透², 吉田 豊和¹
¹岐阜大・工・化生工, ²岐阜大・工・生命工
 mitukura@gifu-u.ac.jp

【目的】光学活性環状アミンは、医薬品や農薬などの合成中間体としての用途が期待されている。当研究室では、これまでに 1,4-ジアセチル-2-メチルピペラジン (DAMPZ) に作用するハイドロラーゼの探索を行い、*Microbacterium* 属由来の S 体特異的ハイドロラーゼを見出している。しかしながら、このハイドロラーゼは、DAMPZ を 1-アセチル-2-メチルピペラジン (1A2MPZ) に変換するため、DAMPZ から直接的に光学活性 2-メチルピペラジン (2MPZ) を合成できない。そこで、ラセミ体の 1A2MPZ を用いて集積培養を行い、エナンチオ選択的ハイドロラーゼの取得を試みた。また、休止菌体を用いて DAMPZ から直接、光学活性 2MPZ の合成を検討した。

【方法と結果】*rac*-1A2MPZ を単一炭素源とする培地で集積培養した結果、ハイドロラーゼ活性を示す菌株が 13 株得られた。それら中から、休止菌体反応でエナンチオ選択性を調べた結果、YS11 株が最も高い S 体選択性を示した。この菌株は 16S rDNA 解析したところ、*Mesorhizobium* 属であることが判明した。培養条件を検討したのち、休止菌体を用いて 20 mM *rac*-1A2MPZ の加水分解反応を行ったところ、80 時間後に変換率 40% で 94% ee(S) の 2MPZ を生成した。*Microbacterium* sp. H8 と *Mesorhizobium* sp. YS11 の休止菌体を用いて 20 mM *rac*-DAMPZ の変換反応を行った結果、速やかに加水分解反応が進行し、変換率 45% で 99% ee(S) の 2MPZ を生成した。

Synthesis of optically active 2-methylpiperazine using two hydrolase-forming strains

○Koichi Mitsukura¹, Yusuke Shiraki², Ken Takama², Toru Nagasawa², Toyokazu Yoshida¹
¹Dept. Chem. Biomol. Sci., Fac. Eng., Gifu Univ., ²Dept. Biomol. Sci., Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words 2-methylpiperazine, hydrolase, *Mesorhizobium* sp., enantioselectivity

1P-097 メソポーラス材料を足場とした異種酵素の集積反応場の構築

○松浦 俊一, 千葉 真奈美, 外門 恵美子, 角田 達朗
 (産総研)
 matsuura-shunichi@aist.go.jp

【目的】精製酵素を利用した低環境負荷型の物質変換プロセスでは、近年、2 種類以上の酵素による反応経路の応用が期待されている。しかし、複数の酵素を使用する場合、酵素間の凝集体形成により反応が阻害されることが多い。そこで我々は、無機多孔体 (メソポーラスシリカ) の規則性細孔に異種のタンパク質を高密度かつ安定に配列化する手法を提案し、これまでにタンパク質の凝集抑制効果や、発光酵素-蛍光タンパク質間の共鳴エネルギー移動効率の向上効果等を見出している。本手法では、酵素間の物質移動距離を短縮できるため、生体模倣反応による有用物質生産の効率化に寄与できると考えられる。本研究では、シリカ細孔への異種酵素の集積を試みると共にカスケード反応におけるメソポーラス材料の優位性を検証した。

【方法・結果】異種酵素 (glucose oxidase, catalase) とメソポーラスシリカ微粒子 (粒径: 4μm, 細孔径: 24.5nm) を緩衝液中で混和することで複合化した結果、競合吸着よりも各々の酵素を順次固定させた場合により多くの酵素を共吸着することができた。また、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により異種酵素の固定化状態を直接観察したところ、大半の酵素はシリカ粒子のエッジ領域に集積されている様子が観測された。高密度集積された glucose oxidase 及び catalase の酵素活性は、glucose の酸化反応における gluconolactone の生成量及び上記反応により生じる H₂O₂ の分解量から各々評価を行った。固定化酵素を使用した場合の gluconolactone/H₂O₂ 比は遊離酵素の場合より数倍高くなったことより、異種酵素の集積反応場としてのメソポーラス材料の優位性が示された。

Construction of an integrated reaction field of hetero-enzyme using mesoporous materials

○Shun-ichi Matsuura, Manami Chiba, Emiko Tomon, Tatsuo Tsunoda (AIST)

Key words immobilized enzyme, mesoporous silica, glucose oxidase, catalase

1P-096 構造からみた D 体特異的アミド加水分解酵素の誤作動反応

○有馬 二郎, 太田 朱香, 宮谷 一紗, 森 信寛
 (鳥取大・農)
 arima@muses.tottori-u.ac.jp

酵素は、生体内での本来の機能に加え、その条件から外れた場合、ときに特異な触媒能を発揮する。放線菌由来の D 体特異的アミド加水分解酵素は分類上、活性中心に Ser 残基を有するペプチダーゼに属する。本酵素の本来の機能は加水分解であると考えられるが、加水分解と拮抗して高いアミノリシス活性を示し、ペプチド結合を有する化合物を生成する。我々はこの反応を有用物質生産に応用できる誤作動反応と捉え、構造面からの解析を行った。本発表では、本酵素の構造解析から推測される誤作動反応の機構と、変異を通じた機能解析について報告する。

加水分解とアミノリシスには、求核剤として水とアミンの認識が関与する。本酵素の場合、様々なアミノ酸類に加え、1,8-ジアミノオクタン (1,8-DAO) を認識して誤作動反応を起こす。1,8-DAO との複合体構造を解析した結果、1,8-DAO は活性ポケットの入口に位置し、活性中心 Ser の立体的な妨害は見られなかった。しかし、D-アミノ酸誘導体に対する加水分解とアミノリシスの Km 値が大きく異なったことから、1,8-DAO との結合が活性部位の環境変化をもたらすと考えられた。また、1,8-DAO と活性中心 Ser の間に存在する 2 つの Ile を Ala に置換すると、アミノリシス活性を大きく増大させた。この変異は活性部位にスペースを生じさせるものであり、これがアミノリシス活性増強に関係すると推測された。

Structure of D-stereospecific amide hydrolase that exhibits unnatural side reaction

○Jiro Arima, Ayaka Ota, Kazusa Miyatani, Nobuhiro Mori
 (Fac. Agric., Tottori Univ.)

Key words peptide, D-amino acid, aminopeptidase, aminolysis

1P-098 L-アミノ酸リガーゼ YwfE のアミノ酸変異による基質選択性の改変

○津田 岳夫, 浅見 真奈, 小口 孔明, 小島 修一
 (学習院・理・生命)
 takeo.tsuda@gakushuin.ac.jp

枯草菌の L-アミノ酸リガーゼ YwfE は、L-アラニンと非蛋白質性アミノ酸 L-アンチカプシンを ATP 依存的に連結してジペプチド抗生物質のパチライシンを生成する。YwfE はアンチカプシンの代わりに L-Phe なども基質とし、L-Ala-L-Phe などの α-ジペプチドを生成できる。これは、YwfE が人工甘味料アスパルテーム (L-Asp-L-Phe-OMe) などの機能性ジペプチドを生成できる可能性を期待させる。しかし、N 末端側の基質は L-Ala に特異性が高い。我々は YwfE の N 末端側のアミノ酸認識様式を明らかにするため、YwfE に L-Ala が結合した状態の X 線結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定した。L-Ala は保存された E273, E311, R328 の側鎖と G331 の主鎖アミドによって静電的相互作用によって認識され、その結果として Cβ 炭素は W332 や M334 とファンデルワールス接触する位置に存在した。その構造を基にアミノ酸変異体を作成し、L-Ala と L-Phe に依存した ATPase 活性を測定した。すると、W332A 変異体のみ、野生型とは異なり L-Ala 無しにも関わらず L-Phe 単独による活性化が見られた。逆相 HPLC 測定により、この変異体は L-Phe-L-Phe ジペプチドを生成することが確認された。この結果は、W332 は結合するアミノ酸を小さな L-Ala に制限する役割をすることを示唆している。さらに、W332 に導入した側鎖の大きさや形に応じて基質特異性が変化した。これらの知見は、機能改変した L-アミノ酸リガーゼを用いて、目的のジペプチドを生産できる可能性を示している。

Amino acid mutation alters the substrate specificity of YwfE, an L-amino acid ligase

○Takeo Tsuda, Mana Asami, Yoshiaki Koguchi, Shuichi Kojima
 (Dep. LifeSci., Fac. Sci., Gakushuin Univ.)

Key words substrate specificity, protein engineering, peptide, mutagenesis