

1P-069 4-ヒドロキシン安息香酸脱炭酸酵素サブユニットの発現が *cis*, *cis*-ムコン酸生産に及ぼす促進効果

○今仁志¹, 尾形 拓哉², 菊地 晟弘², 諸岡 深雪¹, 園木 和典^{1,2}
 (¹弘前大院・農生,²弘前大・農生)
 sonoki@hirosaki-u.ac.jp

【目的】 *cis*, *cis*-ムコン酸(ccMA)は、ポリエステルやポリアミド等の合成原料となる基幹化合物である。これまでにバイオマスを原料としたccMA生産においてはProtocatechuate decarboxylase (Pdc)反応がボトルネックであったが、我々は4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit BであるKpdBの発現により解消できることを見出した。Pdcのアミノ酸配列はKpdBCDから成る4-hydroxybenzoate decarboxylaseのsubunit C (KpdC, 28%)に加え、VdcBCDから成るvanillate decarboxylaseのsubunit C (VdcC, 28%)などと相同性を示したので、Pdc-KpdB複合体の形成など直接的な相互作用によりPdc反応が促進されたと考えられた。そこで本研究では、PdcとKpdB間の相互作用について解析を進めた。

【結果】 KpdBを共発現させた組換え大腸菌由来の粗酵素液は約20倍に比活性が向上した。KpdBの共発現の有無による最適温度、最適pHに違いはなく、DEAE-イオン交換クロマトグラフィーではPdcとKpdBは異なる画分に溶出された。Pdcが溶出された画分の比活性は粗酵素液よりも低く、KpdBが溶出された画分と混合しても比活性は回復しなかった。また、透析した粗酵素液は著しい比活性の低下を示した。これらの結果から、PdcとKpdBが複合体を形成することでPdc活性が向上した可能性は低く、Pdc活性の向上に寄与する低分子の補因子の存在が示唆された。

本研究の一部は野田産研研究助成、科研費の支援を受けて実施した。

Effect of 4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit expression on protocatechuate decarboxylation in *cis*, *cis*-muconate production

○Hitoshi Kon¹, Takuya Ogata², Akihiro Kikuchi², Miyuki Morooka¹, Tomonori Sonoki^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., ²Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)

Key words protocatechuate decarboxylase, *cis*, *cis*-muconate, Pdc, KpdB

1P-070 キメラ型ビフェニルジオキシゲナーゼによるフラボンの変換

○廣瀬 遼¹, 藤元 勇樹¹, 原田 幸音¹, 菅本 和寛¹, 横井 春比古¹, 松本 朋子², 末永 光³, 藤原 秀彦⁴, 古川 謙介⁴
 (¹宮崎大・工・環境応用化,²宮崎大・産学地域連携セ,³産総研・生物プロセス,⁴別府大・食物栄養)
 jhirose@cc.miyazaki-u.ac.jp

【目的】 ビフェニルジオキシゲナーゼ(BDO)は、芳香環に位置特異的かつ立体選択的に水酸基を導入する酵素である。2種の異なる細菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707と*Burkholderia xenovorans* LB400由来のBDOをコードする遺伝子をランダムに組換えて得られたキメラ型BDOは、ビフェニル及びベンゼン誘導体に対して野生型BDOとは異なる基質特異性を示すことが明らかにされている。植物由来フラボノイドの一種であるフラボンに複数の野生型およびキメラ型BDOを作用させた場合の変換効率ならびに変換効率に影響を及ぼすBDOのアミノ酸残基について調べた。

【方法および結果】 上記の野生型またはキメラ型BDOを発現している大腸菌の休止菌体を基質フラボンと4h反応した後の生成物をHPLC、MSおよびNMRで分析した。フラボンからの反応生成物として、同化合物のdihydrodiol体が検出された。BDOと基質の変換効率は野生型BDOならびに各種キメラ型BDO間で異なっており、キメラ型のBDO(2003)はより効率よくフラボンを変換した。導入される水酸基の数と位置は、野生型BDOとキメラ型BDO間で相違はなかった。また、野生型または種々の変異型BDOのαサブユニットの分子モデルを構築した結果、BDOのαサブユニットの基質ポケットの入り口付近のアミノ酸残基が変換効率に影響していることが示唆された。

Bioconversion of flavone by chimeric biphenyl dioxygenases

○Jun Hirose¹, Yuuki Fujimoto¹, Yukine Harada¹, Kazuhiro Sugamoto¹, Haruhiko Yokoi¹, Tomoko Matsumoto², Hikaru Suenaga³, Hidehiko Fujihara⁴, Kensuke Furukawa⁴
 (¹Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Univ. Miyazaki, ²Coolaborative Res. Commn. Coop., Univ. Miyazaki, ³Bioproduct. Res. Inst., AIST, ⁴Dept. Food Nutri., Beppu Univ.)

Key words dihydrodiol, biphenyl dioxygenase, flavone

1P-071 *Stenotrophomonas maltophilia* 4A が産生するエステラーゼの特性

○岡南 政宏^{1,2}, 柳井 祐佳里¹, 大浦 麻里², 朝倉 紗也葉¹, 前田 真美¹, 阿野 貴司^{1,2}
 (¹近畿大・生物理工・生物工,²近畿大院・生物理工・生物工)
 okanami@waka.kindai.ac.jp

生分解性プラスチック製農業用品の効率的分解は、農業の環境負荷および従事者負担を軽減するための重要な課題の一つとなっている。細菌が産生するエステラーゼは、一般的に動植物が産生する酵素より安定性が高く、生分解性プラスチックの分解への利用が期待できる。我々は、これまでに、高いエステラーゼ活性を示す*Stenotrophomonas maltophilia* 4A株を環境中より単離している。4A株は、フィルム状にしたPBS(ポリブチレンサクシネート)系生分解性プラスチックを3週間程度で完全に分解した。

そこで、4A株が産生するエステラーゼの酵素特性を調べた。菌体から分泌されるエステラーゼは、25℃、Nutrient Brothで培養すると最も効率良く誘導された。基質特異性を調べた結果、C₁₀基質(pNP-decanoate)を最も効率的に加水分解することが分かった。一方、この酵素はpH6付近に活性のピークが見られ、25~37℃で同程度の活性を示した。この酵素は60℃で10分間処理した後も90%の活性が残存し、熱安定性が比較的高いことが分かった。これらのことは、農業で使用される生分解性プラスチックの分解利用に有用であることを示す。現在、エステラーゼ遺伝子の単離を試みているので、エステラーゼの発現調節機構および組換え酵素を用いた機能向上についても報告したい。

Properties of an esterase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* 4A

○Masahiro Okanami^{1,2}, Yukari Yanai¹, Mari Ooura², Sayaka Asakura¹, Mami Maeda¹, Takashi Ano^{1,2}
 (¹Fac. Biol.-ordt. Sci. Technol., Kinki Univ., ²Grad. Sch. Biol.-ordt. Sci. Technol., Kinki Univ.)

Key words esterase, *Stenotrophomonas maltophilia*, biodegradation, enzyme activity

1P-072 膜結合型脂肪酸不飽和化酵素の基質識別に関与するアミノ酸残基の特定

○渡邊 研志, 大野 洵, 秋 庸裕
 (広島大院・先端物質)
 aki@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 不飽和化酵素ファミリーは高度不飽和脂肪酸をはじめ、様々な構造と機能の脂肪酸の生合成を司る重要な酵素群である。その多くは膜結合型であるために精製が困難であり、立体構造は明らかになっておらず、本酵素群の多様な反応特異性を規定する構造基盤は未解明である。本酵素群の基質選択機構に関する知見を得るため、高い相同性を示す異なる基質特異性を有するラット由来Δ6及びΔ5不飽和化酵素(D6d及びD5d)をモデルとして、ドメイン交換及び部位特異的変異導入により両酵素の基質特異性の違いを規定するアミノ酸残基の特定を目指した。

【方法及び結果】 D6d及びD5dのN末端側親水領域をそれぞれ交換したキメラ酵素を酵母で発現させ、各々の基質存在下で培養して脂肪酸組成を解析したところ、当領域は基質選択に関与しないことがわかった。そこで中間及びC末端側親水領域のD6d-D5d間で異なる67アミノ酸について、D6d中の残基を個別又は複数の組み合わせでD5d型に置換したキメラ酵素の活性を解析した結果、D6d活性を消失させてD5d活性を発現させる8つの部位を特定した。一方、D6d及びD5dに加えてゼブラフィッシュ由来Δ5/6二機能性不飽和化酵素(Δ5/6Des)との配列比較により、Δ5/6DesでD5d型となっている25アミノ酸について、D6d中の該当残基をD5d型に置換したキメラ酵素を作製して活性を解析し、基質識別に重要な部位を解明した。

Identification of amino acid residues that determine the substrate specificity of mammalian membrane-bound front-end fatty acid desaturases

○Kenshi Watanabe, Makoto Ohno, Tsumehiro Aki
 (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words fatty acid desaturase, structure-function relationship