

2P-045 アルキルジアミンに作用する *Variovorax* 属菌由来アミノ基転移酵素の特徴解析

○時本 悠司¹, 満倉 浩一², 吉田 豊和²
 (¹岐阜大院・工, ²岐阜大・工・化生)
 mitukura@gifu-u.ac.jp

【目的】 環状イミンは、環状アミンの前駆体であり、 ω -アミノアルキルアルデヒドの分子内環化により合成することができる。本研究では、環状イミンを酵素合成するためにアルキルジアミンの選択的脱アミノ化を触媒する微生物酵素の探索を行っている。1,4-ジアミノブタン(ブトレッシン)を単一窒素源として用い、ピルビン酸を加えた培地で集積培養を行ったところ、土壌からブトレッシンに作用するアルキルジアミン分解菌が数菌株得られ、*Variovorax paradoxus* YT46 が高いアミノ基転移酵素活性を示した。そこで、*V. paradoxus* YT46 由来アミノ基転移酵素を精製し特徴解析を行った。

【方法と結果】 YT46 を培養して菌体懸濁液にしたのち、破碎して無細胞抽出液を調製した。酵素活性は、 α -アミノベンズアルデヒドを含む酵素反応系で Δ -ピロリンの生成に伴い合成される1,2,3,4-テトラヒドロキナゾリン誘導体を比色定量することで算出した。無細胞抽出液を硫酸分画後、各種カラムクロマトグラフィーを行ったが、酵素量が少なく、現時点では均一な精製酵素が得られなかった。そこで、部分精製酵素を用いて、最適温度を調べたところ、50℃で最大活性を示した。また、基質特異性についても検討した結果、本酵素は、ブトレッシンの他に、カダベリンやヘキサメチレンジアミンにも作用した。

Characterization of ω -transaminase from *Variovorax* strain acting on alkaldiamines

○Yuji Tokimoto¹, Koichi Mitsukura², Toyokazu Yoshida²
 (¹Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., ²Dept. Chem. and Biomol. Sci., Eng., Gifu Univ.)

Key words alkaldiamine, cyclic imine, *Variovorax paradoxus*, transaminase

2P-046 光学活性環状アミン合成に利用できるハイドロラーゼの特徴解析

○原 健介¹, 満倉 浩一², 高間 健¹, 白木 勇祐¹, 長澤 透¹, 吉田 豊和²
 (¹岐阜大院・工, ²岐阜大・工・化生)
 mitukura@gifu-u.ac.jp

【目的】 ハイドロラーゼは、ラセミ体 N-アシルアミンの光学分割に使用されている。一方、N-アシル環状アミンに対して高い立体選択性を示すハイドロラーゼは、ほとんど報告例がない。我々は、医薬品などの有用化合物に見られる環状アミン骨格に着目し、ハイドロラーゼによる光学活性環状アミンの合成を目指した。1,4-ジアセチル-2-メチルピペラジンをモデル基質として選択し、ハイドロラーゼ生成菌を探索した。その結果、4 位のアセチル基を選択的に加水分解して、(S)-1-アセチル-2-メチルピペラジン((S)-1A2MPZ)を生成するハイドロラーゼを *Microbacterium* sp. H8 に見出し、酵素精製と特徴解析を行った。さらに1A2MPZ に作用する微生物を探索した結果、*Mesorhizobium* sp. YS11 において(S)-選択的ハイドロラーゼを見出した。そこで本研究では、*Mesorhizobium* sp. YS11 ハイドロラーゼの特徴解析を行った。

【方法と結果】 YS11 を培養して菌体懸濁液にしたのち、破碎して無細胞抽出液を調製した。酵素活性は、1A2MPZ が加水分解されて生成した2-MPZ をフェニルイソチオシアネートで誘導化したのち、HPLC 分析して算出した。無細胞抽出液を硫酸分画後、各種カラムクロマトグラフィーによって、本ハイドロラーゼを単一に精製した。分子量は、約 76 kDa であり、本酵素はホモダイマー構造をとると推定した。基質特異性を検討したところ、1A2MPZ の他に1A3MPZ が良好な基質となり、また *p*-ニトロフェニルエステル類にも作用した。

Characterization of *Mesorhizobium* sp. YS11 hydrolase for the synthesis of optically active cyclic amines

○kensuke Hara¹, Koichi Mitsukura², Ken Takama¹, Yusuke Shiraki¹, Toru Nagasawa¹, Toyokazu Yoshida²
 (¹Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., ²Dept. Chem. and Biomol. Sci., Eng., Gifu Univ.)

Key words 1-acetyl-2-methylpiperazine, 2-methylpiperazine, hydrolase, (S)-selectivity

2P-047 生体触媒安定化剤への利用に向けた高溶解性イオン液体中での酵素の長期安定性の検討

○金子 恒太郎¹, 矢下 亜紀良¹, 河合 功治¹, 阿部 薫明², 吉田 靖弘²
 (¹ミヨシ油脂, ²北大院・菌・生体材料)
 kanekok@so.miyoshi-yushi.co.jp

【背景と目的】 常温で液体のイオン液体は、不揮発性、高極性、低融点等の特異的な物性から様々な分野での応用が期待されている中で、タンパク質安定化剤への応用が検討されている。その中で、我々が合成した特定の官能基を持つ4級アンモニウム型イオン液体中にタンパク質を溶解し、長期安定性を評価したところ、高い溶解性と長期安定性を示すことを見出した。今回、タンパク質より高次構造を有する酵素に対する溶解性及び長期安定性を評価して、イオン液体の生体触媒安定化剤への有用性を検討した。

【結果と考察】 合成した4級アンモニウム塩型イオン液体に対する酵素の溶解性を測定した結果、本イオン液体は既存のイオン液体よりも高い溶解性を示した。また、その溶解性は酵素の種類、イオン液体の化学構造に大きく影響された。次に、イオン液体、一般的な保存液等に溶解した酵素を25、40℃下で一定期間保存し、各期間が経過した時点における酵素活性を測定する事により、酵素の長期安定性を評価した。その結果、本イオン液体は優れた安定化効果を示し、既存のイオン液体や一般的な安定化方法より長期間、酵素の活性を保持することを確認した。

これらの結果から、本イオン液体は、長期的に酵素の活性部位をはじめとする立体構造を保持することを示唆しており、生体触媒の保存、安定化に有用性が高いと期待される。

Study of long-term stability of the enzyme in high soluble ionic liquids for the use to the biocatalyst stabilizing agent

○Kotaro Kaneko¹, Akira Yashita¹, Koji Kawai¹, Shigeaki Abe², Yasuhiro Yoshida²
 (¹Miyoshi Oil & Fat Co. Ltd., ²Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University)

Key words Ionic Liquids, biocatalyst stabilizing agent, enzyme activity, long-term stability

2P-048 遺伝子改変によるメチルサリチル酸への活性を示す可逆的サリチル酸脱炭酸酵素の作製

○熊倉 匠, 秋山 智寛, 小林 慶一, 桐村 光太郎
 (早大・先進理工・応化)
 kkohtaro@waseda.jp

【目的】 酵母 *Trichosporon moniliiforme* WU-0401 由来の可逆的サリチル酸脱炭酸酵素(EC 4.1.1.91; Sdc)は、炭酸水素カリウム(ナトリウム)存在下でフェノール類の α -位に位置選択的にカルボキシル基を導入し、酵素的 Kolbe-Schmitt 反応によりサリチル酸類を合成可能な可逆的脱炭酸酵素である[1, 2]。本研究では、部位特異的変異の導入により Sdc を改変し、高分子材料や免疫抑制剤の原料として有用なメチルサリチル酸への活性を示す改変型酵素を作製した。

【方法および結果】 Sdc の立体構造をホモロジーモデリングにより推定し、活性中心およびその周辺のアミノ酸残基の中で、基質が活性中心へ到達する際に立体障害となるかさ高いアミノ酸残基を変異導入点として選定した。とくに、基質の入口付近に位置していると考えられる 23 番目のリシン残基に着目し、これを側鎖の小さいアラニン残基に置換した K23A-Sdc を部位特異的変異導入により作製した。精製酵素を用いて比活性を測定し、K23A-Sdc の α -クレゾールへの炭酸固定活性が Sdc のそれと比較して 2.0 倍に向上し、3-メチルサリチル酸の合成活性が増大したことを確認した。さらに、Sdc では検出困難であった 3-メチルサリチル酸の脱炭酸活性を K23A-Sdc に見出した。

[1] K. Kirimura *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 394, 279-284 (2010).

[2] S. Ienaga *et al.*, Bull. Chem. Soc. Jpn., 86, 628-634 (2013).

Generation of Reversible Salicylate Decarboxylases Active toward Methylsalicylic Acids by Gene Modification

○Takumi Kumakura, Tomohiro Akiyama, Keiichi Kobayashi, Kohtaro Kirimura
 (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words carboxylation, Kolbe-Schmitt reaction, methylsalicylic acid, salicylate decarboxylase