

836 低立体選択性D-スレオニンアルドラーゼ活性の発現に必要な補酵素の同定  
 °劉 吉泉<sup>1</sup>、大川 徹<sup>1</sup>、伊藤 伸哉<sup>1</sup>、片岡 道彦<sup>2</sup>、清水 昌<sup>2</sup>、山田 秀明<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山県立大・工、<sup>2</sup>京大院・農)

[目的] *Arthrobacter* sp. DK-38由来の低立体選択性D-スレオニンアルドラーゼ (D-TA) はD-スレオ又はD-エリスロ-β-ヒドロキシ-α-アミノ酸からグリシンとアルデヒドを生成する反応、及びその逆反応を触媒する。我々は既に本酵素を精製し<sup>1)</sup>、その遺伝子のクローン化と一次構造も報告した<sup>2)</sup>。本研究では、低立体選択性D-スレオニンアルドラーゼの機能・構造解明及びその高度利用の目的で、酵素活性の発現に必要な補酵素の同定を行った。

[方法及び結果] 大量酵素を取得するため、PCRにより低立体選択性D-TA遺伝子断片を増幅した。PCR産物をpKK223-3の*tac*プロモーター下流に挿入し、*Escherichia coli* XL1-blueを宿主とし、IPTGを誘導剤として大量の低立体選択性D-TAを発現させた。更に、三段階のクロマトグラフィー操作により、電気泳動的に均一な酵素標品を得た。組み換え菌から精製した酵素は417nmにおいて吸収ピークを示したが、シスチンの添加により、この吸収ピークが消失し、330nm附近に新たな吸収ピークが生じた。尚、NH<sub>2</sub>OH存在下での透析により失活した酵素はピリドキサルリン酸 (PLP) の添加により活性を回復し、NH<sub>2</sub>OH存在下で失った417nmでの吸収ピークも再現した。このことから、本酵素はPLP酵素であることが示唆された。本酵素は単量体あたり1分子のPLPを含有し、Lys59が本酵素のPLP結合部位であることが化学修飾法により同定された。一方、精製した組み換え低立体選択性D-TAは、二価金属を含有していなかったが、Mn<sup>2+</sup>などの二価金属の添加により、D-スレオニンに対する分解活性は著しく増加した。平衡透析法を用いて分析した結果、本酵素は単量体あたり1分子のMn<sup>2+</sup>と結合できることが判明した。以上の結果から、低立体選択性D-スレオニンアルドラーゼは二価金属によって活性化される新規なPLP酵素であると考えられる。1.) Kataoka et al., *Eur. J. Biochem.* 248:385-393, 1997. 2.) Liu et al., *J. Biol. Chem.* 273:16678-16685, 1998.

Cofactor characterization of low-specificity D-threonine aldolase

°Ji-Quan Liu<sup>1</sup>, Tohru Dairi<sup>1</sup>, Nobuya Itoh<sup>1</sup>, Michihiko Kataoka<sup>2</sup>, Sakayu Shimizu<sup>2</sup>, Hideaki Yamada<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>Faculty of Eng., Toyama Pref. Univ.; <sup>2</sup>Graduate School of Agric., Kyoto Univ.)

[Key words] Threonine aldolase, Pyridoxal phosphate, metal-activated enzyme, characterization

837 低立体選択性 D-スレオニンアルドラーゼを用いた光学分割法による  
 L-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンの立体選択的合成  
 劉 吉泉<sup>1</sup>、°小谷 峰<sup>1</sup>、伊藤伸哉<sup>1</sup>、清水 昌<sup>2</sup>、山田秀明<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山県立大・工、<sup>2</sup>京大院・農)

[目的] L-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンは抗菌剤 florfenicol 合成の中間体であり、現在多段階の化学合成法により生産されている。しかし同方法では、立体特異性の制御が困難で、工業的製造の上での障害となっている。本研究では、簡便かつ効率の良い生産プロセスを確立するため、低立体選択性 D-スレオニンアルドラーゼ (D-TA) を用い、化学合成と酵素分割法を組み合わせ、L-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンの合成を試みた。

[方法及び結果] *p*-メチルチオベンズアルデヒドとグリシンをアルカリ条件下で反応させ、DL-スレオ及び DL-エリスロ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンのラセミ体混合物を合成した。これらの光学異性体の等電点の違いを利用し結晶化を行い、高純度の DL-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンを得た。次に、組み換え大腸菌から精製した低立体選択性 D-TA を用いて、0.01 mM のピリドキサル-5'-リン酸及び 0.1 mM の塩化マンガンを含む 100 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 15 ml 中、50°C で、100 mM の DL-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンの光学分割反応を行った。その結果、D-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンが完全に消失し、L-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンが理論収率 99% 以上で得られた。この生成物は、シリカカラムにより精製した。NMR、HPLC 等の手法により、得られた L-スレオ-3- (4-メチルチオフェニル) セリンの光学及び化学純度が 99% 以上であることが判明した。さらに D-TA 遺伝子を含む大腸菌細胞を用いて分割を行った際にも同様の結果が得られた。

Synthesis of L-threo-3-(4-methylthiophenyl)serine by enzymatic resolution with low-specificity D-threonine aldolase

Ji-Quan Liu<sup>1</sup>, ° Mine Odani<sup>1</sup>, Nobuya Itoh<sup>1</sup>, Sakayu Shimizu<sup>2</sup>, Hideaki Yamada<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>Faculty of Eng., Toyama Pref. Univ.; <sup>2</sup>Graduate School of Agric., Kyoto Univ.)

[Key words] Threonine aldolase, β-hydroxy-α-amino acid, synthesis