

605 糖化ヘモグロビン定量に有効な新規フルクトシリアルミノ酸オキシダーゼの検索

○吉田信行, 中澤裕子, 桂樹 徹, 谷 吉樹 (奈良先端大・バイオ)

【目的】フルクトシリアルミノ酸オキシダーゼ (FAOD) は糖尿病臨床診断マーカーである糖化タンパク測定に有用な酵素である。糖化ヘモグロビンはβ鎖 N 末端パリンが糖化を受けているが、FAOD はフルクトシリアルパリンには効率よく作用するもの、フルクトシリアルパリンヒスチジンなど糖化ペプチドに対する活性は極めて低い。今回糖化ヘモグロビンのモデルとなる糖化ペプチドに作用する FAOD の検索を試みたので報告する。

【方法および結果】モデル糖化ペプチドとしてフルクトシリアルパリンヒスチジロイシン (F-VHL) を単一の炭素源および窒素源とした培地を用い、大学構内の畑土壌サンプルから F-VHL 資化菌を単離した。単離された 13 株の F-VHL 資化菌はいずれもカビあるいは酵母であり、内 8 株の無細胞抽出液にフルクトシリアルパリンを基質とする FAOD 活性を検出することができた。これは真菌において FAOD が広く分布していることを改めて示すものである。8 株の中で *Fusarium* sp. GL2-1 株は基質特異性の異なる 2 つの FAOD を持ち、その一方が F-VHL に対しても活性を示した。

Screening of novel fructosyl-amino-acid oxidase useful for the measurement of glycated hemoglobin

○ Nobuyuki Yoshida, Yuko Nakazawa, Tohoru Katsuragi, Yoshiki Tani (Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words fructosyl-amino-acid oxidase, glycated hemoglobin, diabetes mellitus, Amadori compound, *Fusarium*

607 *Ancyllobacter aquaticus* KNK607M 株由来の蟻酸脱水素酵素の諸性質と遺伝子クローニング

○高岡康子, 難波弘憲, 長谷川淳三 (鍾化精密化研)

【目的】蟻酸と NAD から反応後容易に除去しやすい CO₂ と NADH を生産する蟻酸脱水素酵素 (FDH) は、還元酵素を用いる物質生産において補酵素再生に有用である。本研究では、高活性な FDH の取得、及び、遺伝子のクローニングについて検討した。

【方法および結果】土壌より FDH 高活性菌 *Ancyllobacter aquaticus* KNK607M 株を得て、FDH を純粋に精製したところ、本酵素は比活性 9.5 u/mg-protein、至適 pH 6.3、安定 pH 7 付近で、分子量 4.4kDa のサブユニット 2 個からなることが明らかとなった。当該酵素の N 末配列および FDH の相同性配列情報をもとに PCR、inverse PCR により遺伝子をクローニングした結果、本遺伝子は 1206bp の ORF からなり、分子量 43,895Da のタンパク質をコードすると推定された。さらに、本遺伝子を発現用ベクターに挿入して大腸菌を形質転換したところ、FDH の高発現が確認できた。

Purification and characterization of formate dehydrogenase from *Ancyllobacter aquaticus* Strain KNK607M and Cloning of the Gene

○ Yasuko Takaoka, Hirokazu Nanba, Junzo Hasegawa (Fine Chem. Res. Lab., Kanena Co.)

Key words *Ancyllobacter aquaticus*, formate dehydrogenase

606 2-クロロアクリル酸の不斉還元を触媒する新規酵素の同定○栗原達夫¹, 倉田淳志¹, 蒲池晴美², 江崎信芳¹ (¹京大・化研, ²昭和電工)

【目的】炭素-炭素二重結合の不斉還元は、光学活性化合物を合成する手法として注目される。*Burkholderia* sp. WS は、2-クロロアクリル酸 (2-CAA) の炭素-炭素二重結合を不斉還元して L-2-クロロプロピオン酸 (L-2-CPA) を生成し、さらに加水分解的脱ハロゲン反応によって D-乳酸を生成する。炭素-炭素二重結合の不斉還元を触媒する新規酵素の単離を目的として、2-CAA 代謝に関与する酵素群の同定を試みた。

【方法・結果】2-CAA または乳酸を炭素源として生育した菌体を 2-CAA を含む反応液に添加し、2-CAA の分解速度を測定した。2-CAA 生育菌体を用いた場合、乳酸生育菌体を用いた場合よりも速やかに 2-CAA が減少した。また、還元型ベンジルピオローゲンを電子供与体とした反応系で、2-CAA 生育菌体の破碎液に 2-CAA の還元活性が認められた。一方、乳酸生育菌体の破碎液には活性が認められなかった。以上の結果、2-CAA 還元酵素が 2-CAA によって誘導されることが明らかとなった。2-CAA 生育菌体と乳酸生育菌体のタンパク質を二次元電気泳動で解析した結果、3 つのタンパク質が 2-CAA で誘導されることが明らかとなった。この内の 1 つは分子量と等電点から、L-2-CPA の脱ハロゲン反応を触媒する L-2-ハロ酸デハロゲナーゼであると考えられた。残りの 2 つのアミノ酸配列と遺伝子の塩基配列を解析した結果、それぞれフマル酸還元酵素とキノン酸化還元酵素に相同性が認められた。また、両タンパク質をコードする遺伝子がクラスターを形成していることが明らかとなり、これらの 2-CAA 還元反応への関与が示唆された。

Identification of novel enzymes catalyzing asymmetric reduction of 2-chloroacrylic acid○ Tatsuo Kurihara¹, Atsushi Kurata¹, Harumi Kamachi², Nobuyoshi Esaki¹ (¹Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., ²Showa Denko)

Key words 2-chloroacrylic acid, L-2-chloropropionic acid, reductase, asymmetric synthesis, *Burkholderia*, dehalogenase

608 *Candida macedoniensis* の old yellow enzyme 遺伝子のクローニング○小高敦史¹, 片岡道彦¹, 櫻谷英治¹, 和田 大², 吉住あゆみ², 中森 茂², 清水 昌¹ (¹京大院・農・応用生命, ²福井県大・生物資源)

【目的】Ketoisophorone (2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dione; KIP) の二重結合を立体選択的に還元して 6R-levodione に変換する菌株として見出した *Candida macedoniensis* AKU4588 より、KIP 還元酵素として old yellow enzyme (OYE) を単離し、その諸性質の解明を行った (日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集, p.197)。今回この OYE 遺伝子のクローニング等を行ったので報告する。

【方法・結果】精製酵素の内部アミノ酸配列をもとに作成したプライマーを用い、PCR にて本酵素遺伝子の部分断片をクローニングした。その塩基配列をもとにインバース PCR 法を用いて、OYE 遺伝子の全塩基配列を決定した。OYE 遺伝子は 403 アミノ酸残基からなる分子量 45,890 Da のタンパク質をコードすると推定された。この結果は精製酵素のサブユニット分子量とほぼ一致した。タンパク質データベース検索の結果、*Kluyveromyces lactis* 由来の OYE (KYE1) と 80.4%、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の OYE アイソザイム (OYE1、OYE2、OYE3) と 70% 前後の高い相同性を示した。

Cloning of old yellow enzyme gene from *Candida macedoniensis*○ Atsushi Kotaka¹, Michihiko Kataoka¹, Eiji Sakuradani¹, Masaru Wada², Ayumi Yoshizumi², Shigeru Nakamori², Sakayu Shimizu¹ (¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., ²Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ.)

Key words *Candida macedoniensis*, old yellow enzyme, ketoisophorone