

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18780057  
 研究課題名 (和文) アセチル基転移酵素によるアミン類から高付加価値のあるアセチルアミド類の生産  
 研究課題名 (英文) Production of acetylamides from amines by acetyltransferase

研究代表者  
 竹中 慎治 (TAKENAKA SHINJI)  
 神戸大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：40314512

研究成果の概要：フェニレンジアミンを代謝する *Bacillus cereus* PDa-1 および 10-L-2 株由来のアリルアミン *N*-アミノアセチルトランスフェラーゼを用いてアミン類からアセチルアミド類への変換反応の検討、同酵素の精製と特性解析、同酵素のクローニングおよび解析、大腸菌形質転換株による同酵素遺伝子の発現を行った。同酵素の類縁酵素はこれまでに生体内での役割について詳細に解析されてきたが、物質生産を目指した研究報告はなかった。生産特性、酵素の特性解析、形質転換株での発現などを試みた。本酵素は、単環式アミン類だけでなく多環式アミン類に対して幅広く活性を示した。また、フェニレンジアミン類については、同化合物の 2 つのアミノ基のうち片方のみを位置選択的にアセチル化した。つづいて、大腸菌形質転換株にて同遺伝子を発現させ、親株由来の同酵素と基質特異性を含めて特性を比較し、安定性当は似通っていたが、基質特異性について相違を見出した。形質転換株を利用して、アミン類からアセチルアミド類への変換反応の検討をおこなった。さらに、変換反応に要するアセチル基供与体を検索し、アセチル CoA の代わりにアセトアニリド類を代替物として利用可能であると出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	150,000	3,650,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：微生物酵素

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに芳香族アミン類であるアミノフェノールおよびフェニレンジアミン (ジアミノベンゼン) の微生物代謝の解

明を目的としてその代謝酵素・遺伝子系を解析してきた。炭素、水素、酸素原子のみから構成される芳香族化合物の微生物代謝と比較すると窒素原子を含む芳香族アミン類の

微生物代謝では特異な代謝酵素系が働いていることが見受けられる。申請者は代謝酵素系の解明だけでなく、見出した特異な酵素反応機構を参考にその反応機構を有用物質の生産に活用することも行なってきた。

フェニレンジアミンを代謝する微生物 (*Bacillus cereus* PDa-1 株および 10-L-2 株) はアシルアミン N-アミノアセチルトランスフェラーゼ (以下アセチル化酵素) を生産し、同基質のアミノ基をアセチル化する。同酵素の特異な点は、『①フェニレンジアミンの 2 つのアミノ基のうち片方のみを特異的にアセチル化する。②フェニレンジアミンからアミノアセトアニリドへのモル変換効率は 85 ~90% である。③フェニレンジアミン以外の単環式アミン (もアセチル化する。』である。そこで、基質特異性の広いアセチル基転移酵素を用いたアミン類に対するアセチル化反応を物質生産に応用することを考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、『アセチル基転移酵素によるアミン類から高付加価値のあるアセチルアミド類の生産』を目的とする。アミン類に対して幅広い反応性を示すアセチル基転移酵素生産菌を用いて、有用物質の生産や同反応機構を用いた新たな光学分割を最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### 【アセチル基転移酵素生産菌の培養】

フェニレンジアミンおよびポリペプトンを含む培地 (PD 培地) にて同生産菌を培養した。

### 【代謝産物の生成と構造解析】

PD 培地にて培養して得た本菌の休止菌体とアミン類を反応させ、生成した代謝産物を分取 TLC にて精製した。代謝産物の構造解析は、HPLC, MS, NMR 等によった。

### 【アセチル基転移酵素の精製】

PD 培地にて培養して得た本菌の無細胞抽出液を除核酸・硫酸分画後、イオン交換または疎水クロマトグラフィー等により精製した。

### 【アセチル基転移酵素遺伝子のクローニング】

精製酵素の N 末端アミノ酸配列および類縁酵素の保存領域から PCR 用のプライマーを設計し、親株由来ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、増幅断片を得た。目的の酵素遺伝子塩基配列の決定は、PCR またはインバース PCR 法により得られた増幅断片を解析することによった。

### 【形質転換株によるアセチル基転移酵素遺伝子の発現】

同遺伝子を pBluescript KS (+) に組み込み、大腸菌形質転換株を得た。同形質転換株を LB 培地にて培養し、得られた菌体を休止菌体とし、フェニレンジアミンを含むアミン類と反応を行い、基質特異性などを親株の結果と比較した。

### 【組換え体由来アセチル基転移酵素の精製】 親株由来酵素の精製法に従った。

### 【アセチル基供与体の検索】

アセトアニリドのメチル、クロロ、カルボキシ、ヒドロキシ、ニトロ誘導体を用いて、これらの化合物がアセチル基供与体となりうるかどうか検討した。

## 4. 研究成果

アセチル基転移酵素生産菌として分離菌 *Bacillus cereus* strain PDa-1 株および 10-L-2 株を用いて研究を進め、以下の研究成果を得た。

### 【アセチル基転移酵素生産菌の培養条件の検討】

PD 培地またはポリペプトンの代わりに各種炭素源 (糖類、有機酸、天然培養基) および窒素源 (無機窒素化合物またはアミノ酸類) を添加した同培地を用いて、生育とともにフェニレンジアミンを良好に変換する各種環境因子の影響を検討した。PDa-1 株は、pH は 7.5、補助基質としてショ糖および硝酸アンモニウムを含む培地において、良好な生育とともに同基質をほぼ完全に代謝できた。一方、10-L-2 株は、pH は 5.5、補助基質としてはポリペプトンを含む培地において良好な生育とともに同基質を完全に代謝できた。  
(⇒主な発表論文②、③)

### 【各種アミン類の代謝】

休止菌体を用いて両株の基質特異性をしらべた。両株とも、芳香族アミン類 (メチル、クロロ、カルボキシ、ヒドロキシ、ニトロ誘導体) に対して置換基の位置や大きさに関係なく、アセチル化活性を示すことがわかった (図 1)。また、多環式アミン類に対しても幅広い活性を示した。

つづいて、フェニレンジアミンのメチルおよびクロロ誘導体について検討した結果、位置選択的に試験した基質をアセチル化することを見出した。(⇒主な発表論文②、③)

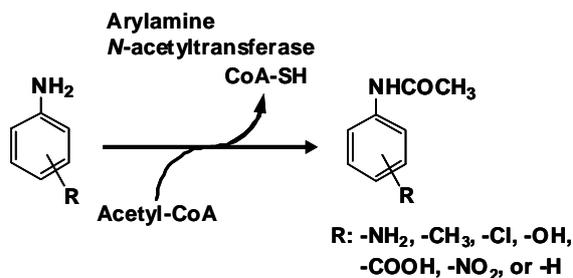


図1 酵素反応機構

【アセチル基転移酵素の精製と特性解析】

1) PDa-1 株由来アセチル基転移酵素の精製  
本酵素は不安定であったが、1mM DTT および 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液中で 1 週間以上安定であることを見出した。同酵素を硫酸分画、DE52 カラムクロマトグラフィー、POROS 50HQ カラムクロマトグラフィーおよび POROS 20PE カラムクロマトグラフィーを行った後、ゲル濾過クロマトグラフィーに供することによって本酵素を精製した。最終調製酵素は4%の収率で94倍に精製され、比活性は 3 U/mg であった。しかしながら、最終調製酵素は単一ではなかった。

本酵素の native な分子量はゲル濾過法および SDS-PAGE 法により 31,000 からなる単量体の酵素であることがわかった。(⇒主な発表論文③)

2) 10-L-2 株由来アセチル基転移酵素の精製

本酵素も不安定であったが、1mM DTT および 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液中で安定であることを見出した。同酵素を硫酸分画、DE52 カラムクロマトグラフィーに供したところ、溶出塩濃度の異なる二つのアセチル基転移酵素 (NAT-a および NAT-b) 活性を見出した (図2)。両酵素を単一に精製し、特性を明らかにした。両酵素はゲル濾過法では約 34.5 kDa であり、SDS-PAGE ではそれぞれ 31 (NAT-a) および 27.5 kDa (NAT-b) と相違が見られた。また、活性に与える pH の影響や温度安定性などについても両酵素の間で相違が見られた。さらに、基質特異性を調べたところ、ともに幅広い基質に対してアセチル化活性を示したが、5-アミノサリチル酸に対する活性について相違が見られた。

既報の論文を参考に、2 種類のアセチル化酵素を生産する微生物を検索した結果、本報告がはじめてであることがわかった。(⇒主な発表論文②)

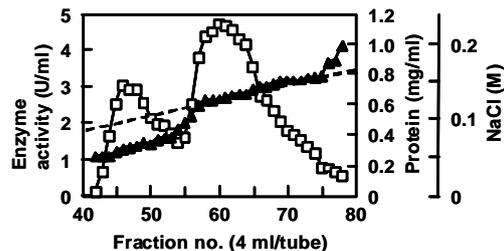


図2 NAT-a および NAT-b の DE52 カラムクロマトグラム

【アセチル基転移酵素遺伝子の解析】

10-L-2 株由来同酵素遺伝子のクローニングを試みた結果、NAT-b 遺伝子をクローニングし、解析することが出来た。

同酵素遺伝子は、768 bp からなる ORF にコードされていた。また、既報の類縁酵素とアミノ酸レベルでの類似性を調べたところ、*Bacillus anthracis* 由来の同酵素とは 93% と高い類似性を示したが、酵素の特性が詳細に報告されている腸内細菌由来の同酵素とは 22 から 26% と類似性は低かったが、活性発現に必須である Cys、His、Asp 残基については保存性が見られた。(⇒主な発表論文①)

【形質転換株によるアセチル基転移酵素遺伝子の発現】

フェニレンジアミンはそのアセチル化物と比較して不安定なため、中性下では徐々に変性し、褐色の自動酸化物質となる。一方、同アセチル化物は安定である。そこで、LB 培地中にフェニレンジアミンを添加し、培地の色の変化から、高発現株を選抜することを試みた。高発現株は親株と同様にコロニー周辺は、透明なハロー様の環が見られた。一方、プラスミドを含まない大腸菌は生育も不良で、その周辺は褐色となった (図3)。形質転換株と親株である 10-L-2 株について粗酵素のアセチル化酵素活性を比較した。親株と比較して約 2 倍となった。(⇒主な発表論文①)

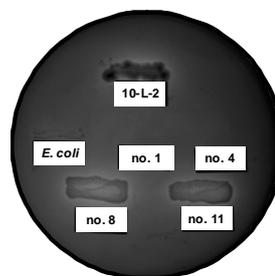


図3 アセチル化酵素遺伝子発現株の選抜

【形質転換株由来アセチル基転移酵素の特性解析】

形質転換株由来の同酵素を精製し、親株由来同酵素と特性比較した。その結果、安定性や基質特異性などに相違が見られた。(⇒主な発表論文①)

【アセチル基供与体の検索】

本酵素は、アセチル CoA をアセチル基供与体として、芳香族アミン類のアミノ基をアセチル化することでアセトアニリド類が生成する。(図 1) 酵素反応の逆反応を考えると、アセトアニリド類が本酵素のアセチル基供与体となりえると予想される。そこで、形質転換株由来の同酵素を用いてアセトアニリド類についてアセチル基供与性について検討した。(表 1) (⇒主な発表論文①)

表 1 アセチル基供与体の検索

Acetyl donor	4-Aminoacetanilide produced (mM)
Control (no acetanilide)	0.40 ± 0.04
4-Cyanoacetanilide	0.46 ± 0.02
4-Nitroacetanilide	0.79 ± 0.05
4-Chloroacetanilide	0.38 ± 0.01
4-Carboxyacetanilide	0.48 ± 0.01
Acetanilide	0.46 ± 0.05
4-Methylacetanilide	0.44 ± 0.02
4-Methoxyacetanilide	0.45 ± 0.01
4-Nitrophenyl acetate	0.47 ± 0.08

その結果、本酵素はニトロアセトアニリドをアセチル基供与体として利用し、フェニレンジアミンのアミノ基をアセチル化した。本研究の最終目標であるアセチル基転移酵素による物質変換においてアセチル基供与体の調製は重要な課題である。アセチル CoA 以外の人工物質が同反応に用いることへの知見は重要であるといえる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Takenaka, S., Cheng, M., Mulyono, Koshiya, A., Murakami, S., and Aoki, K.: Gene cloning and characterization of arylamine *N*-acetyltransferase from *Bacillus cereus* strain 10-L-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **107**, 27-32, 2009. 査読有
- ② Mulyono, Takenaka, S., Sasano, Y., Murakami, S., and Aoki, K.: *Bacillus cereus* strain 10-L-2 produces two arylamine *N*-acetyltransferases that transform 4-phenylenediamine into

4-aminoacetanilide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **103**, 147-154, 2007. 査読有

- ③ Takenaka, S., Mulyono, Sasano, Y., Takahashi, Y., Murakami, S. and Aoki, K.: Microbial transformation of aniline derivatives: regioselective biotransformation and detoxification of 2-phenylenediamine by *Bacillus cereus* strain PDa-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**, 21-27, 2006. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 竹中 慎治、村上 周一郎、青木 健次 (2008): アニリン誘導体の微生物代謝 (第 39 報) *Bacillus cereus* 10-L-2 株由来アリルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の解析および大腸菌での発現、日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集、p. 112. 2008.10.23. 名城大学
- ② Takenaka, S., Kuntiya, A., Seesuriyacha, S., Klayranug, S., and Aoki, K., (2007): Degradation of Aromatic and Nitrogenous Compounds by Thermotolerant Microorganisms. JSPS-NRCT Core University Program (1998-2008) on development of thermotolerant microbial resources and their applications, Abs., p 182-183. 2007.10.18-20 タイ
- ③ 竹中慎治、高橋由佳、Mulyono、村上周一郎、青木健次 (2007): アニリン誘導体の微生物代謝 (第 37 報) *Bacillus cereus* による芳香族アミン類からアセトアニリド類への変換、日本農芸化学会 2007 年度大会講演要旨集、p. 165. 2007. 3. 24~27 東京農業大学
- ④ Mulyono, Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K., (2006): Microbial metabolism of aniline derivatives. XXXVI. Characterization and sequence analysis of arylamine *N*-acetyltransferase from *Bacillus cereus* 10-L-2, 447th Conference of Kansai branch, Japan Society of Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Abs., p. 8.
- ⑤ Takenaka, S., Kuntiya, A., Seesuriyachan, P., Klayraung, S., Murakami, S., and Aoki, K., (2006): Microbial transformation of aniline derivatives: biotransformation and detoxification of phenylenediamines by *Bacillus cereus*. The 5th JSPS-NRCT

joint seminar on development of  
thermotolerant microbial resources  
and their applications, Abs., p. 54.  
2006. 11. 11. タイ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 慎治 (TAKENAKA SHINJI)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40314512

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者