

<平成19年度>

放線菌由来新規アシラーゼを用いたカプサイシン誘導体の 量産化と抗酸化性・抗菌性の検証

中西 一弘 ・ 今村 維克 ・ 今中 洋行

(岡山大学自然科学研究科)

1. はじめに—研究の背景と目的

申請代表者らは、最近、放線菌 *Streptomyces mobaraensis* の培養上清中から単離した新規アシラーゼが、唐辛子の辛み成分であるカプサイシン (8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide) を効率よく加水分解することを見出した¹⁾。本酵素のカプサイシンに対する加水分解活性は、既に報告されているラット肝臓由来の Carboxyesterase²⁾ やブタ腎臓由来アミノアシラーゼと比較して、100～10,000 倍程度高い。さらに、基質特異性について検討を加えたところ、本酵素はカプサイシンだけではなく、*N*-脂肪アシルアミノ酸及び *N*-脂肪アシルペプチドなどのアミド結合をも効率よく加水分解する興味深い酵素であることがわかった。最終的に、遺伝子解析の結果、本酵素は、広い基質特異性を有する新規なペニシリン V アシラーゼ (以降、本酵素を *Sm*-PVA と略する) であることが判明した³⁾。ペニシリン G アシラーゼなどの β -ラクタムアシラーゼは、アミド結合の加水分解反応を触媒するだけでなく、エステル化合物 (アシル供与体) と求核性物質を基質とするエステル交換反応をも触媒することが知られている⁴⁾。ので、*Sm*-PVA も同じ反応を触媒することが推定された。

本研究では、本酵素を用いてカプサイシン誘導体の量産化に必要な技術的基盤を確立する。カプサイシンはトウガラシに含まれる辛味成分であり、代謝亢進作用、鎮痛作用、食欲増進作用・胃酸分

泌亢進作用など様々な機能を有することが、近年明らかにされてきている^{5～7)}。しかし、カプサイシンの辛味がその利用の拡大を妨げている。カプサイシンの脂肪酸部位 (8-メチル-6-ノネン酸) が中鎖もしくは長鎖飽和脂肪酸で置換されたカプサイシン誘導体は、カプサイシンとしての機能は、程度の差はあるものの維持されるが、辛味が大幅に減少する。例えば、*N*-ラウロイルバニリルアミド (C12-vanillylamide) 及び *N*-ミリストイルバニリルアミド (C14-vanillylamide) は、カプサイシンと比較して辛みが 1/20 程度であることが報告されている⁵⁾。この様な背景の下で、国内の研究者によりカプサイシン誘導体合成反応法について研究されてきたが、未だに十分な方法は開発されていない^{8,9)}。そこで、本研究では、*Sm*-PVA を用いたカプサイシン誘導体の効率的合成に着目した。当初、1) 遺伝子組換え菌を用いた酵素の量産、2) 酵素の固定化とバイオリアクターによる大量合成方法の構築を行い、3) 調製したカプサイシン誘導体を用いて、十分な検討がなされていない抗酸化性や抗菌性の検証を最終目標としたが、下記に述べるように、遺伝子組換え菌による酵素の大量発現が、予想していた以上に難しく、酵素を大量に必要とする酵素の固定化と抗菌性に関する検討は、予定通りに行うことができなかった。現在、研究を続行しているので、別の機会に発表させて頂ければと考えている。

2. *Sm*-PVA を用いるカプサイシン誘導体合成反応のスキーム

Sm-PVA は、カプサイシン (I) のアミド結合の加水分解反応を触媒するだけでなく、エステル交換反応も触媒する¹⁰⁾。加水分解反応では、カプサイシンから 8-メチル-6-ノネン酸 (II) とバニルルアミン (III) が生成する ((1) 式)。したがって、カプサイシン誘導体を合成するためには、例えば、ラウリン酸 (IV) とバニルルアミンから、加水分解反応の逆反応により、脱水縮合して、カプサイシン誘導体であるラウロイルバニルルアミド (V) を生成することができる ((1)' 式)。しかし、(1)' 式の反応の平衡関係は、基質側 (ラウリン酸とバニルルアミン) に偏っているため、水溶液中での反応では、極めて、低い収率しか得られないが、有機溶媒の添加などにより高い収率を達成することが可能となる^{11, 12)}。実際、本反応系では、緩衝液に水不溶性有機溶媒であるヘキサンを添加すると、カプサイシン誘導体の合成収率が著しく増加する¹⁾。20 mM バニルルアミンと 200 mM ラウリン酸を基質として、ヘキサン

/100 mM トリス緩衝液, pH7 中, 37℃で反応を行うと、最大収率約 60%でラウロイルバニルルアミドが合成される。しかも、反応後期には、生成物はヘキサン中に結晶として生成する。しかし、本方法の問題点は、有機溶媒 (上記の場合はヘキサン) の添加が必要であること及び合成反応速度が低いことである。

一方、上述したように、*Sm*-PVA はエステル交換反応も触媒する。本酵素を用いると、水溶液中での反応で、中鎖・長鎖脂肪酸メチル (エチル) エステルをアシル供与体、バニルルアミンを求核試薬としてカプサイシン誘導体を、効率よく合成できることが期待される。図 1 にエステル交換反応のスキームを示す。フェノキシ酢酸メチルエステルをアシル供与体、6-アミノペニシラン酸を求核基質としたエステル交換反応によりペニシリン V を合成するモデル反応の結果によると、*Sm*-PVA は $\alpha = (k_{\text{cat}}/K_m)_P / (k_{\text{cat}}/K_m)_S$ の値が小さく、一方、 $\beta = k_4/k_3K_n$ は大きいことから、転移能が高い酵素であることが明らかにされている¹⁰⁾。

3. 酵素の構造

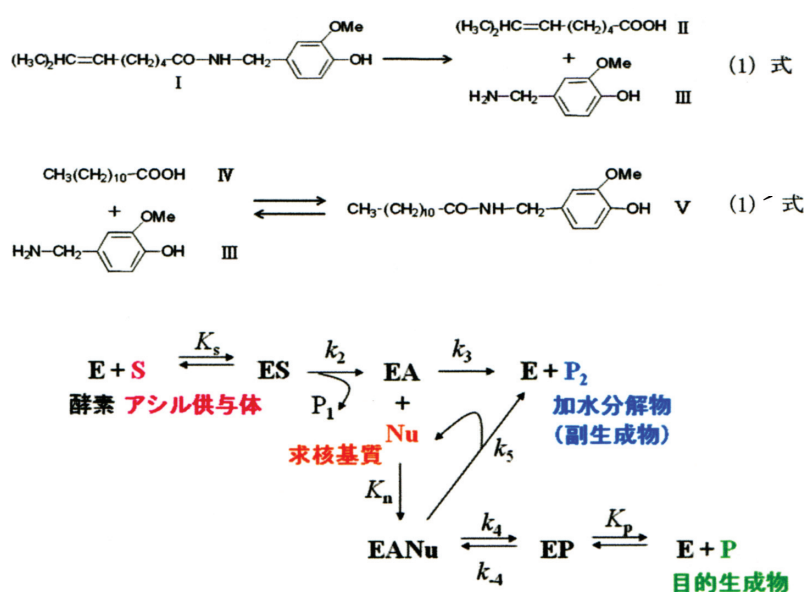


図 1 エステル交換反応モデル
カプサイシン誘導体合成反応の場合は、アシル供与体として脂肪酸メチルエステルを、求核基質としてバニルルアミンを用いる。加水分解物 (副生成物) は、脂肪酸である。

Sm-PVA の遺伝子の塩基配列及び発現タンパク質のドメイン構造は、既に、申請者らにより明らかにされている³⁾。*Sm*-PVA 遺伝子の ORF (オープンリーディングフレーム) は、2445 bp, アミノ酸配列として 814 残基である。本遺伝子により翻訳される酵素前駆体ポリペプチドは、N 末端からシグナル配列 (43 aa), α サブユニット (173 aa), リンカー領域 (28 aa), β サブユニット (570 aa) からなる。この酵素前駆体は *S. mobaraensis* の細胞膜を通過する際に、シグナル配列が切断される。細胞内で、 α サブユニット及び β サブユニットが生成・会合することにより、酵素活性体を形成し、菌体外に分泌されるものと考えられる。Signal P3.0 で調査したところ、 α サブユニットの N 末端側 16 残基が分泌のためのシグナルペプチドを構成していることも判明した。さらに、本酵素のアミノ酸配列を、DNASIS[®] Pro を用いて Multiple alignment したところ、上述したように、N-アシルホモセリンラクトナーゼ、アクレアシン A アシラーゼ、セファロスポリンアシラーゼ及びペニシリン G アシラーゼなどの β -ラクタムアシラーゼと同じ酵素前駆体の構造をとるだけではなく、比較的高い相同性を示した。さらに、*Sm*-PVA は β -ラクタムアシラーゼにみられる活性部位を形成する Ser1 β , His23 β , Val70 β 及び Asn276 β も保存していることがわかった。これらの知見に基づいて、 β -ラクタム系抗生物質に対する加水分解活性を調べたところ、本酵素はペニシリン V 及び既往のペニシリン V アシラーゼの良好な基質である、NIPOAB (2-Nitro-5-phenoxyacetamido benzoic acid) に対して極めて高い活性を示した³⁾。これらの結果から、本酵素は、広い基質特異性を有する新規なペニシリン V アシラーゼであることが判明した。

4. 実験方法

4.1 遺伝子組換え菌の調製及び *Sm*-PVA の発現と精製

Sm-PVA のような放線菌由来の酵素は、コーディング領域中に大腸菌などの宿主におけるレアコドンが多く含み、GC 含量も比較的高いことから、異種宿主を用いた大量発現系の構築は困難な場合が多い。そこで本研究では先ず、同属の放線菌 *S. lividans* TK24 を宿主、Herai らの開発した pSH19¹³⁾ を発現用ベクターとする宿主-ベクター系を利用することとした。インサートとして、*Sm*-PVA の全 ORF を含む遺伝子断片 ($\alpha\beta$), シグナルペプチドを欠失した *Sm*-PVA 遺伝子断片 ($\alpha\beta$) 及びシグナルペプチドおよびリンカーペプチドを欠失した *Sm*-PVA 遺伝子断片 ($\alpha\beta$) の 3 種類を調製した。各遺伝子断片を pSH19 に挿入して構築した発現ベクター pSH19- $\alpha\beta$, pSH19- $\alpha\beta$ および pSH19- $\alpha\beta$ を用いて、あらかじめ調製したプロトプラストの形質転換を行い、組換え *Sm*-PVA (*rSm*-PVAsl) 発現用の放線菌 (*S. lividans*/pSH19- $\alpha\beta$, *S. lividans*/pSH19- $\alpha\beta$ 及び *S. lividans*/pSH19- $\alpha\beta$) を調製した。*S. lividans*/pSH19-PVA の孢子懸濁液を 20 μ g/mL チオストレプトンを含む 30 mL TSB 培地/100 mL 坂口フラスコに植菌し、30℃で 2~3 日間培養した。 ϵ -カプロラクタムまたはイソバレロニトリルを用いて、タンパク質発現を誘導した。菌体及び培養上清を回収し、菌体懸濁液を超音波処理した後、可溶性画分を取得した。培養上清および可溶性画分を用いて SDS-PAGE ならびに活性測定を行い、目的タンパク質の発現等の検討を行った。

4.2 遺伝子組換え大腸菌の調製と *Sm*-PVA の発現

Sm-PVA とサブユニット構造が類似の大腸菌

由来ペニシリン G アシラーゼ組換え体の発現例¹⁴⁾を参照し、大腸菌を用いた発現系の構築を試みた。まず、*Sm*-PVA 遺伝子の α サブユニット及び β サブユニットをコードする遺伝子断片に制限酵素認識配列を付加し、それぞれサブクローニングした。そして、4 アミノ酸残基より構成されるリンカー (Linker) コーディング配列を間を含み、 β -Linker- α の順に配列させた遺伝子断片を pET22b ベクターに挿入し、発現用ベクター pET-SC β L α を構築した。宿主として、大腸菌のレアコドンに対応した *E. coli* Rosetta2 (DE3) (Novagen) を用いた。pET-SC β L α を用いて形質転換を行い、得られた形質転換体の培養を行った。終濃度 0.1 mM の IPTG の添加により、目的タンパク質 (r*Sm*-PVAec) の発現を誘導した。

4.3 エステル交換反応を用いたカプサイシン誘導体の合成

アシル供与体の脂肪酸エステルとして、オクタン酸メチルエステル、ラウリン酸メチルエステル及びミリスチン酸メチルエステルを、一方、バニリルアミンを求核基質として用い、エステル交換反応を行い、それぞれの飽和脂肪酸によりカプサイシンの脂肪酸部位が置換されたカプサイシン誘導体合成反応を行った。反応初期の脂肪酸エステルの濃度は 20 mM、バニリルアミンの濃度は 40 mM、酵素濃度は 4 U/mL - 反応溶液で、pH7、30℃の条件で反応を行い、反応中の基質濃度及び生成物濃度の経時変化を追跡した。脂肪酸エステル及び生成物の分析は、高速液体クロマトグラフィーにより行った。YMC-Pack C8 A-202 (4.6 mm $\times$ 150 mm) を用い、移動相としては、0.05 %リン酸を含む 50 ~ 80% メタノールを用い、210 nm で検出した。

4.4 抗酸化性の検証

カプサイシン及びカプサイシン誘導体のラウロイルバニリルアミドを、0.25% (wt/vol)、0.5%

及び 1 %に溶解したリノール酸メチルを、シヨ糖エステルを含むリン酸緩衝液 pH7.0 中に分散させてエマルジョン (終油含量; 3 %) を調製した。このエマルジョンに AAPH (2,2-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride) を添加し、脂質酸化を誘導した。37℃で 48 時間後の過酸化物価 (POV) 及びチオバルビツール酸 (TBA) を測定した。

5. 実験結果と考察

5.1 遺伝子組換え菌の調製及び *Sm*-PVA の発現と精製

形質転換体 *S. lividans*/pSH19-S α L β , *S. lividans*/pSH19- α L β 及び *S. lividans*/pSH19- $\alpha\beta$ を用いて r*Sm*-PVA_{sl} の発現を調べた。TSB 培地を用いて前培養および本培養を行った後、0.1% ϵ -カプロラクタムまたはイソバレロニトリルを添加し、30℃で 24 時間誘導を行った。図 2 に、培養上清及び可溶性画分中に含まれる酵素活性を比較した結果を示す。ネガティブコントロールである No.1 ~ 4 では目的酵素をコードする遺伝子が組み込まれていないので、全く活性が見られない。一方、形質転換体 *S. lividans*/pSH19-S α L β を用い、 ϵ -カプロラクタムまたはイソバレロニトリルで誘導した場合 (No.6, 7) に、培養上清、可溶性画分のどちらにおいても酵素活性が認められた。特に、イソバレロニトリルで誘導した場合に、培養上清において、最も高い酵素活性が認められた (1.3 U/mL)。しかし、形質転換体 *S. lividans*/pSH19- α L β 及び *S. lividans*/pSH19- $\alpha\beta$ を用いた場合には、r*Sm*-PVA_{sl} の発現は確認できなかった。

そこで、r*Sm*-PVA_{sl} の発現量を増やすため、形質転換体 *S. lividans*/pSH19-S α L β の培養において、本培養の培地組成、本培養の時間、フラスコの容量、誘導剤の濃度、誘導時間などについて検討を行った。その結果、TSB 培地中で 30℃, 2

No.	形質転換体	誘導剤 (0.1%)
1	<i>S. lividans</i>	ϵ -カプロラクタム
2	<i>S. lividans</i>	イソバレロニトリル
3	<i>S. lividans</i> /pSH19	ϵ -カプロラクタム
4	<i>S. lividans</i> /pSH19	イソバレロニトリル
5	<i>S. lividans</i> /pSH19-S α L β	なし
6	<i>S. lividans</i> /pSH19-S α L β	ϵ -カプロラクタム
7	<i>S. lividans</i> /pSH19-S α L β	イソバレロニトリル
8	<i>S. lividans</i> /pSH19- α L β	なし
9	<i>S. lividans</i> /pSH19- α L β	ϵ -カプロラクタム
10	<i>S. lividans</i> /pSH19- α L β	イソバレロニトリル
11	<i>S. lividans</i> /pSH19- α	なし
12	<i>S. lividans</i> /pSH19- α	ϵ -カプロラクタム
13	<i>S. lividans</i> /pSH19- α	イソバレロニトリル

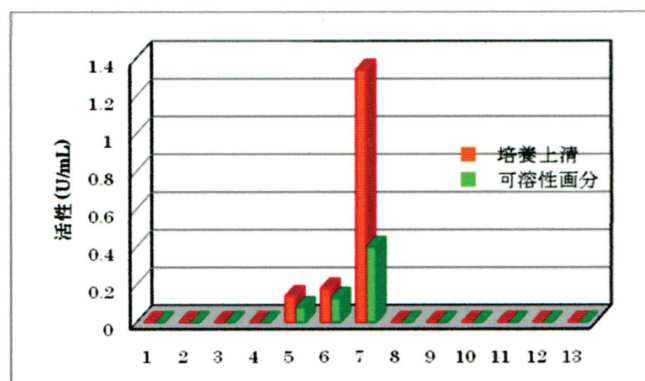


図2 rSm-PVAslの発現確認

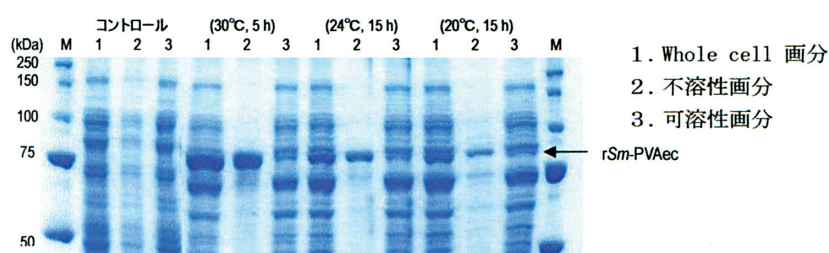


図3 SDS-PAGEによるrSm-PVAecの発現確認

～2.5日間本培養後、0.01% イソバレロニトリルで24時間誘導することにより、最大2.0 U/mLの酵素活性が得られた。しかし、野生株を培養して得られる酵素活性と比較して十分高いとはいえない。その理由の一つとして、翻訳後のタンパク質のプロセッシングに問題があるのではないかと考え、形質転換体 *S. lividans*/pSH19-S α L β の培養上清から組換えPVA (rSm-PVAsl) を精製した。このため、rSm-PVAslの比活性は、野生型PVAのおよそ半分であることが判明した。また、rSm-PVAslのN末端アミノ酸解析を行ったところ、シグナルペプチドの切断位置が野生型酵素とは異なる α サブユニットが主に発現していることが分かった。したがって、野生型PVAに比べ、rSm-PVAslの比活性が低いのではないかと考えられる。

5.2 遺伝子組換え大腸菌の調製とSm-PVAの発現

形質転換体 *E. coli* Rosetta2 (DE3) /pET-SC β L α を用いて組換えPVA (rSm-PVAec) の

発現を試みた。発現の誘導条件を20℃、15時間、24℃、15時間及び30℃、5時間とし、発現後の各種分画サンプルをSDS-PAGEに供し、rSm-PVAecの発現量、可溶化度について調べた。その結果、温度を下げることによって、rSm-PVAecの発現量は低下したものの、可溶化率の向上がみられた(図3)。そこで、可溶性画分を用いて活性測定を行ったが、目的の酵素活性は検出されなかった。本タンパク質(Sm-PVA)は野生型ではヘテロ二量体であり、適切な4次構造の形成がタンパク質の成熟過程で必須となる。一方、rSm-PVAecは一本鎖ポリペプチドとして発現させているため、4次構造の形成は必要ではなく、適切な3次構造形成のみが要求される。すなわち、活性体が得られなかった原因としてはフォールディングが不十分であることが考えられた。そこで、現在は大量に回収可能で高純度な不溶化rSm-PVAecを用いてリフォールディング条件を検討することにより、rSm-PVAec活性体が取得できるものと考えられる。

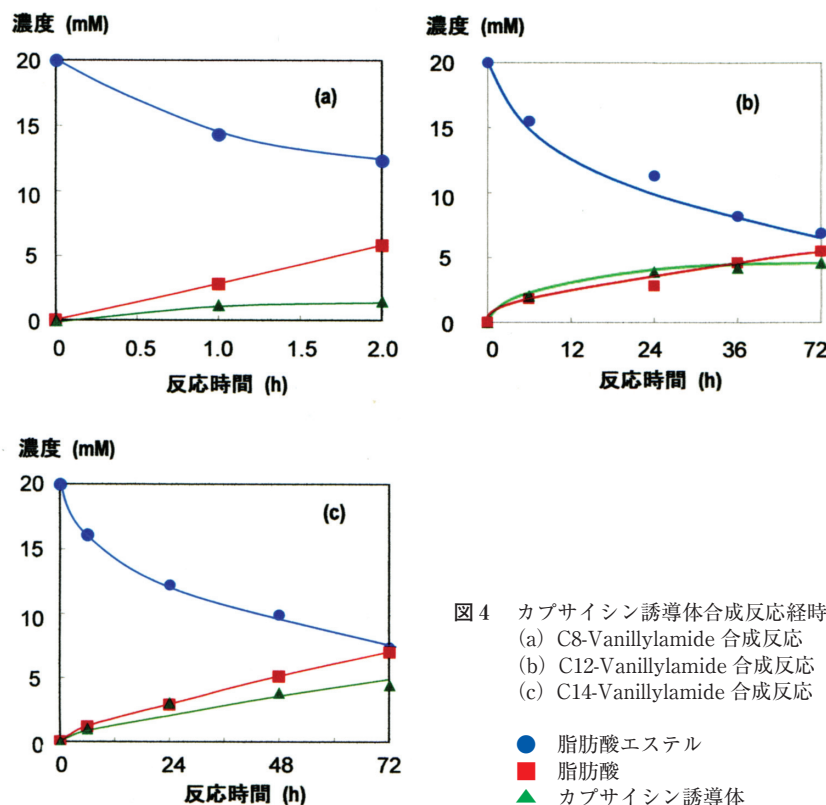


図4 カプサイシン誘導体合成反応経時変化
 (a) C8-Vanillylamide 合成反応
 (b) C12-Vanillylamide 合成反応
 (c) C14-Vanillylamide 合成反応

● 脂肪酸エステル
 ■ 脂肪酸
 ▲ カプサイシン誘導体

5.3 エステル交換反応を用いたカプサイシン誘導体の合成

図4 (a)～(c) には、アシル基転移反応によるオクタン酸メチルエステル、ラウリン酸メチルエステル及びパルミチン酸メチルエステルとバニリルアミンからのカプサイシン誘導体合成反応の経時変化を示す。いずれの場合も、反応初期から基質の飽和脂肪酸濃度が経時的に低下し、一方、目的生成物のカプサイシン誘導体と加水分解物の飽和脂肪酸が増加している。しかし、飽和脂肪酸は経時的に増加しているが、カプサイシン誘導体は最大値に漸近していることがわかる。これらの結果は、エステル化合物の生成と加水分解反応が同時に競争的に進行するエステル交換反応の典型的なパターンである。基質の違いによるエステル交

換反応の経時変化を比較すると、炭素数の少ないオクタン酸メチルエステルを用いた場合に、最もカプサイシン誘導体の合成初速度は速いものの、最大収率は10%程度で最も低くなっている。これは、基質のラウリン酸メチルだけではなく、生成物のラウロイルバニリルアミンの溶解度も高いために、加水分解反応が、より優先的に起こるためであると考えられる。表1に初期合成速度、カプサイシン誘導体の最大収率及び合成速度と加水分解速度の比、S/Hをまとめて示す。

5.4 抗酸化性の検証

まず、コントロールの何も加えない場合のPOVを測定したところ、212 meq./kgであった。一方、カプサイシン及びラウロイルバニリルアミドを1%添加した系では、コントロールと比較し

表1 アシル基転移反応を用いたカプサイシン誘導体合成反応速度

脂肪酸エステル (アシル供与体)	カプサイシン誘導体	初期合成速度 (10^5 M/h/M)	最大収率 (%)	S/H
Methyl <i>n</i> -octanoate	C8-vanillylamide	0.24	7.5	0.26
Methyl <i>n</i> -laurate	C12-vanillylamide	0.15	23	0.91
Methyl <i>n</i> -myristate	C14-vanillylamide	0.081	22	0.63

て、1/20 以下の 6.3 meq./kg 及び 8.3 meq./kg と著しく低い値を示した。

また、TBA を測定した場合には、コントロールでは、最大 33 μM に達したが、カプサイシン及びラウロイルバニリルアミドを 1% 添加した系では、約 1/100 程度の 0.4 μM 以下であり、二次酸化生成物は殆ど生成していないことが示唆された。

なお、0.5% 添加時にもカプサイシン及びラウロイルバニリルアミドはともに POV 及び TBA 値をほとんど上昇させなかったが、0.25% 添加時には、脂質酸化を完全に抑制することはできなかった。以上の結果から、合成カプサイシン誘導体のラウロイルバニリルアミドは、カプサイシンとほぼ同程度の酸化抑制効果を有することがわかった。

6. 今後の展開

本研究で取り扱った放線菌、*S. mobaraensis* 由来のペニシリン V アシラーゼは、カプサイシンの加水分解を極めて効率よく触媒するだけではなく、アシル基転移反応も触媒する。このアシル基転移反応を利用すると、水溶液中でもアミド化合物合成反応を効率よく触媒するので、食品関連素材物質の生産にとって非常に魅力的である。本研究では、飽和脂肪酸メチルエステルとバニリルアミンからエステル交換反応によりカプサイシン誘導体が合成できることを確認した。次に、*S. mobaraensis* の野生株からの酵素の生成量は極めて少量であるので、大量発現を目指して放線菌 *S. lividans* と *E. coli* を宿主とする新規なコンセプトの遺伝子組換え菌を作成した。*S. lividans* を宿主とする遺伝子組換え菌では、その程度は十分ではないもののタンパク質発現と活性発現にも成功した。しかし、精製酵素の比活性は野生株酵素の 50% 程度であった。この原因として、シグナルペ

プチドの切断箇所が野性型酵素とは異なる場所で切断されていることが示唆された。大腸菌では、放線菌を用いた発現時に比べ、発現量が著しく増加したものの、活性体の取得には至っていない。そのため、現在、大量に回収可能で高純度な不溶化 rSm-PVAec を用いてリフォールディング条件を検討し、rSm-PVAec 活性体の取得を目指している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げます。実験に使用しました放線菌発現ベクター pS19 をご供与頂きました筑波大学小林達彦教授に感謝致します。

文 献

- 1) Koreishi M., D. Zhang, H. Imanaka, K. Imamura, S. Adachi, R. Matsuno, and K. Nakanishi. A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/synthesis of capsaicins as well as *N*-acyl-L-amino acids and *N*-acyl-peptides. **J. Agric. Food Chem.**, 54, 72 (2006).
- 2) Park, Y.-H. and S.-S. Lee. Identification and characterization of capsaicin-hydrolyzing enzymes purified from rat liver microsomes. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 34, 351 (1994).
- 3) Zhang D., M. Koreishi, H. Imanaka, K. Imamura and K. Nakanishi. Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. **J. Biotechnol.**, 128, 788 (2007).
- 4) Youshko, M. I., G. G. Chilov, T. A. Shcherbakova, and V. K. Svedas. Quantitative characterization of the nucleophile reactivity in penicillin acylase-catalyzed acyl transfer reactions. **Biochem. Biophys. Acta**, 1599, 134 (2002).
- 5) Watanabe, T., T. Kawada, T. Kato, T. Harada, and K. Iwai. Effects of capsaicin analogs on adrenal catecholamine secretion in rats. **Life Sci.**, 54, 369 (1994).
- 6) Minowa, S., S. Tsuchiya, S. Horie, K. Watanabe, and T.

- Murayama. Stimulatory effect of centrally injected capsaicin, an agonist of vanilloid receptors, on gastric acid secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 428, 349 (2001).
- 7) Winter, J., S. Bevan, and E.A. Campbell. Capsaicin and pain mechanisms. *Br. J. Anaesth.*, 75, 157 (1995).
- 8) Kobata, K., K. Yoshikawa, M. Kohashi, and T. Watanabe. Enzymatic synthesis of capsaicin analogs with liver acetone powder. *Tetrahedron Lett.*, 37, 2789 (1996).
- 9) Kobata, K., M. Kawamura, M. Toyoshima, Y. Tamura, S. Ogawa, and T. Watanabe. Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives. *Biotechnol. Lett.*, 20, 451 (1998).
- 10) Koreishi M., K. Tani, Y. Ise, H. Imanaka, K. Imamura and K. Nakanishi. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics and N-fatty-acylated amino compounds by penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 202 (2007).
- 11) Nakanishi, K., Y. Kimura, and R. Matsuno. Kinetics of enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester. *Eur. J. Biochem.*, 161, 541 (1986).
- 12) Miyanaga, M., M. Ohmori, K. Imamura, T. Sakiyama, and K. Nakanishi. Kinetics and equilibrium for thermolysin-catalyzed synthesis of dipeptide precursors in aqueous/organic biphasic systems. *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 43 (2000).
- 13) Herai, S., Y. Hashimoto, H. Higashibata, H. Maseda, H. Ikeda, S. Omura, and M. Kobayashi. Hyper-inducible expression system for *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 14031 (2004).
- 14) Flores, G., X. Soberón, and J. Osuna. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. *Protein Sci.*, 13, 1677 (2004).

Fundamental studies on enzymatic synthesis of capsaicin derivatives using a novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* and elucidation of their functions

Kazuhiro Nakanishi, Koreyoshi Imamura and Hiroyuki Imanaka

(Division of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

We have recently isolated a novel acylase from the culture supernatant of an actinomycete, *Streptomyces mobaraensis* that can efficiently hydrolyze an amide bond of capsaicine (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) in addition to penicillin V, Penicillin G, *N*-fatty-acyl amino acids/peptides. On the basis of the nucleic acid/amino acid sequences, polypeptide organization, and substrate specificity, the enzyme from *S. mobaraensis* (abbreviated to *Sm*-PVA) was classified as a novel type penicillin V acylase belonging to the β -lactam acylase family. Furthermore, *Sm*-PVA catalyzes acyl-transfer reaction in reactions using methyl ester of carboxylic acid (acyl donor) and various nucleophiles to produce the corresponding amides. Thus, we planned to synthesize capsaicine derivatives by the *Sm*-PVA catalyzed acyl-transfer reaction in an aqueous solution. Capsaicine derivatives are known to possess various functions, such as enhancing energy metabolism and analgesic activity like capsaicine with much reduced pungent taste. We carried out the acyl transfer reaction in an aqueous buffer, using methyl esters of octanoic acid, lauric acid, and myristic acid as the acyl donor and vanillylamine as the nucleophile. The maximum yields of octanoyl vanillylamide, lauroyl vanillylamide, and myristoyl vanillyl amide from 20 mM fattyacid methyl esters and 40 mM vanillyl amine were 7.5%, 23%, and 22%, respectively. The synthesized lauroyl vanillyl amide showed high antioxydative function in a similar way to capsaicine. The POV value was respectively decreased to 6.3 and 8.3 meq./kg by addition of 1% capsaicine and 1% lauroyl vanillylamide from 212 meq./kg for control without additives. To increase the enzyme production, we prepared two kinds of recombinant cells of *S. lividans* and *Escherichia coli*. In the recombinant *S. lividans* cells, *Sm*-PVA was produced at a level of 2.0 U/mL. However, the specific activity of the purified enzyme was approximately a half that of the wild-type enzyme. In the recombinant *E. coli* cells, we could express to more extent by expressing the protein as a single-polypeptide by removing an internal spacer. However, the expressed enzyme did not show any activity. Refolding of the enzyme would be necessary, which is being undertaken.