

136

Enterobacter aerogenes トリプトファンゼの大腸菌内での過剰生産とトリプトファン生産への応用 (北大・農・応用菌学) ○川崎公誠, 横田 篤, 富田房男

【目的】 我々はトリプトファンゼ活性とトリプトファン生産能を有する E.aerogenes を用い、トリプトファン、インドール、アミノ酸からトリプトファンを生産する研究を行ってきた。前回の本大会ではこの遺伝子の塩基配列を決定し lacP プロモータ及び tacP プロモータで発現させたことを報告した。しかし lacP プロモータではカトリプト抑制、tacP プロモータではプラスミドが不安定になるなどの問題があった。今回はこれらを解決するため、tacP プロモータと lacP プロモータ遺伝子をもつ発現ベクターにサブクローニングした。またこのトリプトファンゼを形質転換体から精製し諸性質の検討を行った。

【方法と結果】 E.aerogenes SM-18 及び E.coli K-12のトリプトファンゼ構造遺伝子を発現ベクター pTrc99A (trcP, lacI<sup>o</sup>) にサブクローニングして、それぞれ pKT901EA, pKT951EC を得た。これらを E.coli JM109 に導入し IPTG で誘導したところいずれの株でもトリプトファンゼが菌体蛋白の約 30% に達した。また JM109/pKT901EA における比活性はトリプトファンで誘導した E.aerogenes SM-18 の約 4 倍になり、グルコースによるカトリプト抑制を受けなかった。E.aerogenes 及び E.coli トリプトファンゼを過剰生産させたこれらの形質転換体からトリプトファンゼの精製を行って諸性質を検討したところ、分解反応の至適 pH, SDS-PAGE による分子量はほぼ同様であったが熱安定性において E.aerogenes のトリプトファンゼのほうが E.coli のそれより優れていた。トリプトファン生産においては、洗浄菌体を用いてインドール、トリプトファン、アミノ酸から合成したところ JM109/pKT901EA の方が JM109/pKT951EC よりも高い生産性を示した。すなわち E.aerogenes のトリプトファンゼはトリプトファンの酵素的生産への利用において E.coli のトリプトファンゼよりも優れていることがわかった。

Overproduction of Enterobacter aerogenes tryptophanase in Escherichia coli, and its application to enzymatic production of tryptophan. O.Kosei Kawasaki, Atsushi Yokota, and Fusao Tomita. Lab. of Applied Microbiology, Dept. of Bioscience and Chemistry, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

137

Pseudomonas putida の PHT プラスミドにコードされている  
フタル酸初期分解遺伝子

○野村恭稔\*, 中川真理子\*, 小川暢男, 原島俊, 大嶋泰治 (阪大・工・応生, \*日本合成ゴム)

【目的】 我々は P.putida NMH102-2 株<sup>1)</sup> が保有する PHT プラスミドの 7-kbp EcoRI DNA 断片 (pht) にコードされている遺伝子がフタル酸初期分解に重要な役割を有していることを報告した<sup>2)</sup>。本研究は pht 遺伝子の全塩基配列を明らかにするとともに、その機能の解析を目的としている。

【方法および結果】 全塩基配列の決定により pht 遺伝子には 5 構造遺伝子 (pht1~pht5) が存在し、個々に予想されるアミノ酸配列のコンピューター検索及びサイズの異なる種々の pht 由来プラスミドを用いたトランスポゾン挿入失活変異 (Pht<sup>-</sup>) の相補性試験により、pht2 にはフタル酸オキシゲナーゼリダクターゼが、pht3 にはフタル酸オキシゲナーゼが、pht4 には 4,5-ジヒドロ 4,5-ジヒドロキシフタル酸デヒドロゲナーゼが、そして pht5 には 4,5-ジヒドロキシフタル酸デカルボキシラーゼがそれぞれコードされていることが示唆された。pht1 には他の pht 遺伝子の発現を正に調節する機能を有する蛋白、あるいはフタル酸のトランスポーター蛋白がコードされているものと考えられる。ノザンプロット解析より、pht3~pht4 オペロン及び pht5 の転写はグルコースで抑制、フタル酸で誘導されるが、一方 pht1 の転写は低レベルで構成的であることが分かった。これらの知見、及び pht1, pht3, pht5 の各々上流に極めて A:T 頻度の高い領域があることから、これら 3 カ所にプロモーター機能が存在していることが示唆された。

- 1) Nomura, Y., Takada, N., and Oshima, Y., J. Ferment. Bioeng., 67, 297-299 (1989)
- 2) Nomura, Y., Harashima, S., and Oshima, Y., J. Ferment. Bioeng., 70, 295-300 (1990)

Genes on PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in Pseudomonas putida ○ Yasutoshi Nomura \*, Mariko Nakagawa \*, Nobuo Ogawa, Satoshi Harashima, and Yasuji Oshima (Dept. Biotechnol., Osaka Univ., \* Japan Synthetic Rubber Co. Ltd.)