

552

Halomonas sp. の ectoine 生成・ectoine synthase について

○山本美穂子 沢田和久 小野比佐好 新名惇彦 高野光男 (大阪大学・工・応生)

【目的】 0.3-21%の塩濃度で生育可能な耐塩性細菌 Halomonas sp. をタイの塩土より分離した。本菌は、浸透圧ストレスによって菌体内に補償溶質として主に環状アミノ酸 ectoine を合成、蓄積する。ectoineは、aspartate- β -semialdehyde(ASA)から分岐して3段階の反応で生合成されると推測されている。

演者らは、本菌の耐塩性獲得機構を明らかにすることを目的としてまずこの生合成系各酵素の精製を進めている。その中で、ectoine生合成経路の最終段階を触媒する ectoine synthaseは、粗酵素液で調べた結果、耐塩性酵素であり、0℃でも反応するという性質を見いだしており、酵素化学的にも応用面においても興味深い。そこで今回、本酵素の精製を試みその性質について得られた結果を報告する。

【方法および結果】 Halomonas KS-3の食塩2.56Mを含む合成培地での培養菌体をLysozyme処理後、French pressで破碎し、遠心分離した上清を粗酵素液とした。酵素活性は、2,4-diaminobutyric acid(2,4-DABA)より合成した γ -N-acetyl- α , γ -diaminobutyric acid(ADABA)を基質とし、反応生成物として生じるectoine量をHPLCで定量して求めた。粗酵素液を硫酸分画後Sephacrose CL-6B、Hydroxyapatiteによるカラムクロマトで最終的に比活性、約15U/mg protein(1U= 毎分1 μ mole ectoine生成)まで精製し、SDS-PAGEで単一バンドであることを確認した。その結果、分子量約19,000、至適pH8.5-9.0であることが分かった。現在、精製した酵素のその他の諸性質については、検討中である。

Ectoine synthesis of Halomonas sp. - Purification and characterization of ectoine synthase -○M. Yamamoto, K. Sawada, H. Ono, A. Shinmyo, M. Takano
(Dept. Biotechnol., Osaka Univ.)

553

Nitrobacter agilis におけるオキサロ酢酸代謝関連酵素の分離と性質
— リンゴ酸脱水素酵素とクエン酸合成酵素 —

(日大・農獣医・農化) ○白井一仁、高橋令二、櫻庭 隆、徳山龍明

1) 目的 化学独立栄養性亜硝酸酸化菌 Nitrobacter agilis におけるTCA回路の役割については未解明の部分が多い。今回本菌のオキサロ酢酸代謝関連酵素であるリンゴ酸脱水素酵素(MDH)、及びTCA回路の律速酵素でもあるクエン酸合成酵素(CS)を部分精製し、その諸性質について明らかにした。さらに演者らのグループがすでに報告した、Nitrosomonas europaea 由来の両酵素と比較した結果について述べる。

2) 方法 Nitrobacter agilis ATCC14123株をBE-無機塩培地で培養した。French pressによる破碎菌体の可溶性画分(140,000 \times g, sup.)を硫酸分画、DEAE Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーにより分画し、MDH及びCSの部分精製酵素を調製した。MDH活性は、オキサロ酢酸還元に伴うNADHの酸化による340nmの吸光度の減少により、CS活性はDTNB存在下、HS-CoAメルカプチドの生成を412nmの吸光度増加によってそれぞれ測定した。

3) 結果 (1)MDH:可溶性画分における活性は、オキサロ酢酸還元活性を示しリンゴ酸酸化活性は認められなかった。またNADHを補酵素とし、NADPHでは活性はほとんど検出されなかった。至適反応pHは7.5-8.0であり、pH安定性は、pH 8-10の間で4℃、24時間処理における残存活性は50%であった。1mMのSDSの添加で強い活性阻害を受けた。(2)CS:反応の至適pHは8付近で、至適温度は35℃であった。熱安定性は55℃まで残存活性100%を示し60℃で30%であった。また0.1mMのCuSO₄とHgCl₂、1mM SDSの添加で強い活性阻害を受けた。(3)以上の性質を N. europaea ATCC25978株より分離した両酵素の性質と比較した。

Some properties of enzymes involving metabolism of oxaloacetic acid from Nitrobacter agilis○Kazuhito Usui, Reiji Takahashi, Takashi Sakuraba, and Tatsuaki Tokuyama
(Dept. Agr. Chem., Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., Shimouma, Setagaya-ku, Tokyo, 154)