

- 635 *Burkholderia pickettii* DTP0602株による2,4,6-トリクロロフェノール分解に関与するヒドロキシキノール1,2-ジオキシゲナーゼの精製と諸性質
○中野 修、八田 貴*、佐藤 幸子*、滝沢 昇、浄原 法蔵
(岡山理大・工、*技科研)

【目的】我々は、木材の防腐剤2,4,6-トリクロロフェノール(2,4,6-TCP)分解菌 *Burkholderia (Pseudomonas) pickettii* DTP0602株由来の2,4,6-TCPからマレイル酸までの変換に関与する酵素遺伝子(*hadA, hadB, hadC*)について解析を行っている。今回は、2,4,6-TCP分解の代謝中間体と考えられるヒドロキシキノールの環開裂に関与する酵素(*HadC*)の精製とその諸性質を検討した。

【方法及び結果】クローニングされた*hadC*を高発現ベクターpTTQ18に連結し、これを保持する大腸菌をIPTGで誘導発現させた。フレンチプレスで破碎の後、超遠心分離の上清を粗酵素液とした。その酵素は7.5% *n*-プロパノールを含んだ緩衝液中で安定性が増し、更に Fe^{2+} とアスコルビン酸の存在下で酵素活性が増大した。精製はDEAE-Toyopearl 650M、Mono Q、Superdex 200の各カラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一にした。精製酵素の分子量はゲルろ過法により68 kDaで、分子量35 kDaのサブユニットの二量体から成ることがSDS-PAGEの結果から示された。N末端アミノ酸配列を決定したところ、塩基配列から推定されたアミノ酸配列と一致した。本酵素は2,4,6-トリクロロフェノールの代謝中間体と予想される6-クロロヒドロキシキノールおよびヒドロキシキノールに対し高いオルト-開裂活性を示し、3-メチルカテコールに対してメタ-開裂活性を示した。現在、基質特異性と開裂様式を調べている。

1) H. Kiyohara *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1276-1283 (1992)

2) N. Takizawa *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 318-326 (1995)

Purification and characterization of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase involved in degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Burkholderia pickettii* strain DTP0602

○ Osamu Nakano, Takashi Hatta, Sachiko Satoh, Noboru Takizawa, Hohzoh Kiyohara, (Dept. Appl. Chem., Okayama Univ. Sci.)

【Key Words】Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase, *Burkholderia pickettii*,

- 636 トリクロロエチレン分解細菌群とそれらのオキシゲナーゼ遺伝子
(横浜国大・工・生物工、竹中工務店・技術研究所*)
小泉淳一、○松本俊英、宮地伸幸、青山冬樹、大沢武彦*、広瀬朗*

【目的】土壌細菌 *Pseudomonas* 属の中には芳香族炭化水素を分解できる株が数多く発見されており、そのうちいくつかは、トリクロロエチレン (TCE) も分解できることが報告されている。新たに自然界より得られたトルエン、および TCE 分解性 *Pseudomonas* 属細菌群からこれらの分解系を担う複数のオキシゲナーゼ遺伝子の取得を目的とした。

【方法及び結果】コスミド pWE15 を用いて、トルエン分解性 *Pseudomonas* 属細菌 17 株の内、8 株の遺伝子ライブラリーを *E. coli* XL1-Blue MR に作製した。第一次スクリーニングとしてトルエンを供給した栄養寒天培地上で、3 株のライブラリーよりカテコール蓄積組換え体を得た。獲得した組換え体 (約 40 kbp) を発現ベクター pUC118 を用いて、インディゴブルー生産をマーカーにサブクローニングし、オキシゲナーゼ遺伝子を 6.2 kbp の断片上に特定した。オキシゲナーゼ遺伝子を導入した *E. coli* JM109 の組換え体による TCE 分解能も併せて報告する。

Trichloroethylene Degradation Bacteria and their Oxygenase Genes

Jun-ichi Koizumi, ○Toshihide Matsumoto, Nobuyuki Miyachi, Fuyuki Aoyama (The Natl. Univ. of Yokohama) Takehiko Osawa, Akira Hirose (TAKENAKA R&D Inst.)

[Key Word] Trichloroethylene, Oxygenase, *Pseudomonas*, Recombinant