

413 *Corticium rolsii* と *Aspergillus awamori* var. *kawachi* の

キメラグルコアミラーゼの作製と諸性質の検討

(北大・農・応用菌学、*東大院農生科・応生工)

○永坂曜介、北本勝ひこ、須藤学、横田篤、富田房男

【目的】担子菌 *Corticium rolsii* AHU 9627 株の分泌するグルコアミラーゼは、生デンプン分解性において既存の酵素よりも優れている。我々はこれまでに cDNA の単離¹ および *Aspergillus oryzae* における発現² に成功しているが、さらにこの酵素遺伝子の有効利用を目的として、活性部位と生デンプン吸着部位を他菌株由来のグルコアミラーゼと組換えキメラ酵素を作製し検討を行う。

【方法及び結果】キメラ酵素作製の素材としてグルコアミラーゼの中でも生デンプン分解性が強く、解析の進んでいる *Aspergillus awamori* var. *kawachi* のグルコアミラーゼを選び、それぞれの酵素遺伝子のドメインを PCR によって増幅したのち連結し、キメラ遺伝子を作製した。*Aspergillus oryzae* M-2-3 株を宿主として用い、プロトプラスト・PEG 法によってキメラ遺伝子を導入した結果、得られた形質転換株の培養上清中にキメラ酵素の分泌が確認できた。現在キメラ酵素の精製および諸性質の検討を行っている。

1 Y. Nagasaka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 451-458 (1995)

2 村木ら 平成 7 年度日本生物工学会大会講演要旨集, p208 (1995)

Production and characterization of chimeric glucoamylase between *Corticium rolsii* and *Aspergillus awamori* var. *kawachi*.

○Yosuke Nagasaka, Katsuhiko Kitamoto*, Manabu Suto, Atsushi Yokota, Fusao Tomita

(Lab. Applied Microbiology, Hokkaido Univ., *Graduate School for Agriculture and Life Sciences, The Univ. of Tokyo)

【Key Words】glucoamylase, *Aspergillus awamori* var. *kawachi*, *Corticium rolsii*

414 *Pseudomonas putida* KF715 株のビフェニルジオキシゲナーゼの構造と機能解析

○木村信忠、古川謙介 (九大・農化)

(目的) PCB 分解菌のビフェニルジオキシゲナーゼ (BP Dox) は 4 つのサブユニットから構成されるが、各コンポーネント間で高い相同性が認められる。しかし、PCB をはじめビフェニル関連化合物に対する分解特異性には大きな差異がある。今回は *P. putida* KF715 株の鉄・硫黄タンパク質 (ISP 大サブユニット) の構造を明らかにし、既知の *P. pseudoalcaligenes* KF707 株および *Burkholderia cepacia* LB400 株のそれと機能比較を行った。

(方法と結果) はじめに KF707 BP Dox の BphA1 を KF715, LB400 のそれと交換したハイブリッド BP Dox を構築した。BphA1 (LB400) A2A3A4 を発現する大腸菌は広い PCB 分解スペクトルを示すが、4-chlorobiphenyl, 4-methylbiphenyl, Diphenylmethane に対しては分解活性が弱かった。一方、BphA1 (KF715) A2A3A4 発現大腸菌は PCB 分解が弱い、上記化合物に対して高い分解活性を示した。次に各種 *bphA1* 間において 5'-領域 (0.7 kb) と 3'-領域 (0.6 kb) を相互に交換し、種々のキメラ BP Dox を構築した。そのうち、BphA1 (KF707)/A1 (LB400) A2A3A4BC (KF707) 及び BphA1 (KF715)/A1 (LB400) A2A3A4BC (KF707) 発現大腸菌は、KF707 BP Dox 発現株と比べて PCB に対して広い分解スペクトルを示した。KF715 *bphA1* の塩基配列を決定した結果、予想されるアミノ酸配列は KF707 BphA1 と 2 アミノ酸残基 (Ser-324, Val-325→Thr, Ile) のみが異なり、LB400 のそれとは 18 アミノ酸が相違していた。KF715 *bphA1* の塩基配列は 971~999 及び 1032~1089 の領域の塩基配列が LB400 *bphA1* と一致していた。

Structural and functional analyses of biphenyl dioxygenase in *Pseudomonas putida* KF715

○Nobutada Kimura and Kensuke Furukawa (Dept. Agric. Chem., Kyushu Univ.)

<Key word> Biphenyl dioxygenase, hybrid enzyme, *P. putida*, *bph* gene, PCB