

1045 *Paracoccus denitrificans* の脱窒系遺伝子群の発現解析  
(名大院・工・生物機能) ○村井清人、三宅克英、安藤潤、飯島信司

【目的】 *Paracoccus denitrificans* は嫌気条件下で顕著な脱窒活性を示す。この脱窒過程は亜硝酸→一酸化窒素→亜酸化窒素→窒素という3段階の反応を経て進行するが、我々はこれまでに第1のステップを担う亜硝酸還元酵素の遺伝子 (*nirS*) をクローン化し、その大腸菌での発現に成功している。また、第2のステップを担う酸化窒素還元酵素 (*norCB*) および機能未知の ORF1、2 を *nirS* の上流に見出している。ORF1 は亜酸化窒素還元酵素遺伝子の制御遺伝子 *nosR* と相同性があり、*nor*、*nir* の発現を制御するレギュレーターとしての可能性が示唆された。今回は、これらの遺伝子群の発現についてノーザンハイブリダイゼーションを中心として検討したので報告する。

【方法及び結果】 酸素および硝酸塩が脱窒系遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるため、培養条件を変化させた際の *nir*、*nor*、ORF1 および ORF2 の発現の違いについて検討した。その結果、どの場合も嫌気条件かつ硝酸塩存在下において顕著な発現が見られた。*nir* においては *nirSECFD* に相当する 4.8kb と *nirSE* に相当する 2.7 kb のバンドが見られ、また *nor* に関しても *norCBQDEF* に相当する 5.4 kb と *norCB* に相当する 2.0 kb の長さの異なる mRNA の発現が検出された。また、ORF1 と ORF2 に関しては 3.0kb のバンドが見られ、ORF1 と ORF2 がオペロンを形成していることが確認された。

Expression of denitrification genes from *Paracoccus denitrificans*

○ Kiyohito Murai, Katsuhide Miyake, Jun Andoh, Shinji Iijima

(Dept. Biotechnol., Nagoya Univ.)

【Key Words】 *Paracoccus denitrificans*, denitrification, nitrite reductase, nitric oxide reductase

1046 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 自己融解酵素遺伝子のクローニングとその酵素学的特性  
(九大・農化) ○佐々木志織、吉野貞藏、古川謙介

【目的】 自己融解酵素 (autolysin) は微生物の伸長分裂に重要な酵素であり、枯草菌では通常と異なる転写系で制御されている。*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の自己融解酵素は、代謝が有機酸からソルベントに転換する対数増殖期から定常期にかけて、菌体外に顕著な活性の蓄積が認められた。代謝転換能に欠陥を有する菌株 (退化株) では活性の増大は認められず、本酵素の活性発現と代謝転換の関連性が示されたため、その遺伝子取得を試みた。

【方法・結果】 目的遺伝子取得のため、DEAE-cellulose を用いて精製を行った。本酵素は 1 M NaCl を含む 100% ethylene glycol 存在下で溶出し、DEAE 基への強固な結合が示唆された。精製酵素の N 末端及び内部アミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。さらに、染色体 DNA ライブラリーを用い、増幅断片をプローブとしたプライクハイブリダイゼーションを行い、目的遺伝子の完全長を含むクローンを得た。塩基配列決定の結果、その *orf* は 1,116 bp であり、N 末端領域は他菌株の自己融解酵素との相同性を示した。また、C 末端領域はコリン結合タンパクと高い相同性を示し DEAE 基への結合領域の存在が認められた。

Gene cloning and enzymatic properties of autolysin from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

○ Shiori Sasaki, Sadazo Yoshino, and Kensuke Furukawa (Dept. Agric. Chem., Kyushu Univ.)

【Key Words】 *Clostridium*, autolysin, cloning, solventogenesis