

327

Bacillus thermoleovorans B23 由来新規アルコール脱水素酵素の
遺伝子クローニングとその解析

(阪大院・工・物生、¹京大院・工・生化)
加藤智久、○宮永明日華、春木 満、森川正章、
今中忠行¹、金谷茂則

B. thermoleovorans はアルカン分解能を有する高度好熱菌であり 60~70℃の高温で石油成分を分解することができる。深度 1700~2000m の地下油田より単離した *B. thermoleovorans* B23 は中鎖長アルカンの分解能を有している。本研究では、アルカン分解に関わる酵素遺伝子の取得を目的とし、ショットガンクローニング法によるアルコール脱水素酵素遺伝子の取得を試みた。

B23 株染色体 DNA の *EcoRI* 消化物を pUC19 の同制限酵素切断部位に挿入し、大腸菌 DH5α を形質転換してライブラリーを作製した。このライブラリーを用いてアルコール脱水素酵素 (ADH) のショットガンクローニングを試みた。アッセイ用プレートとして、Schiff 試薬 (アルデヒドにより赤紫色に呈色する) と 1-テトラデカノールを L 培地に加えたものを用いた。得られた 1 株のポジティブクローンが有する挿入断片の塩基配列を決定した結果、ADH 遺伝子の一部と思われる領域を取得することができた。更に、サザンハイブリダイゼーション、インバース PCR 法により遺伝子全長をクローニングし、その塩基配列を決定した。本酵素は 249 アミノ酸残基 (推定分子量 53.7kDa) から成り、グループ II NAD(P)依存性 ADH (short chain ADH) に属することが分かった。現在、本酵素遺伝子を大腸菌内で大量発現させ、諸性質について検討中である。

Gene cloning and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Bacillus thermoleovorans* B23.

Tomohisa Kato, ○Asuka Miyana, Masaaki Morikawa, Mitsuru Haruki, Tadayuki Imanaka¹, Shigenori Kanaya (Dept. Material & Life Sci., Osaka Univ., ¹Dept. Synthetic Chem. & Biological Chem., Kyoto Univ.)

【Key Words】*Bacillus thermoleovorans*, alkane degradation, alcohol dehydrogenase

328

AMP 長鎖アルキル誘導体の Mg^{2+} 依存性殺酵母作用における acyl-CoA synthetase
阻害の意義

(大阪市大院・理) ○田中俊雄, 中山敬司, 豊田新一, 谷口誠

【目的】AMP の長鎖アルキル誘導体の 1 つである adenosine 5'-hexadecylphosphate (AMPC16) は高濃度の Mg^{2+} の存在下で殺酵母作用を発揮する。¹⁾ 本研究では酵母の acyl-CoA synthetase である fatty acid activation protein (Faap) に対する AMPC16 の作用を通して細胞膜脂質代謝における本酵素の役割および細胞外 Mg^{2+} の意義を明らかにしようとした。

【方法及び結果】AMPC16 は 10 mM の $MgSO_4$ の存在下で出芽酵母 *S. cerevisiae* の生菌数を急激に低下させると同時に細胞からの K^+ の漏出を促進した。しかし、人工膜であるリポソームに対しては Mg^{2+} 非依存的かつ微弱な活性しか示さなかった。AMPC16 処理細胞においては、 $[^{14}C]$ acetic acid の脂質画分へ取り込みは何ら阻害されなかったことから fatty acid synthetase (FAS) による acyl-CoA の *de novo* 合成は正常に機能していることが判った。次いで $[^3H]$ palmitic acid の脂質画分への取り込みを測定したところ、AMPC16 が Mg^{2+} 非依存的に Faap を阻害しうることが明らかになった。また、AMPC16 は Mg^{2+} の共存下で脂質画分からの脂肪酸の遊離を著しく促進した。 Mg^{2+} はおそらく phospholipase の活性化などによって細胞膜脂質リモデリングを促進すべく作用し、AMPC16 が Faap の阻害を介して細胞膜への acyl-CoA の供給を遮断する条件では細胞膜の構造および機能に障害が生じるものとみなされた。1) Tanaka *et al.*, *Microbiology*, **146**, 377 (2000).

Acyl-CoA synthetase inhibitor induce Mg^{2+} dependent membrane disorder

○Toshio Tanaka, Keiji Nakayama, Shin-ichi Toyota, Makoto Taniguchi (Department of Biology, Faculty of Science, Osaka City Univ.)

【Key Words】*S. cerevisiae*, acyl-CoA synthetase inhibitor, phospholipid, Mg^{2+} , fatty acid activation protein