

413 窒素固定菌 *Paenibacillus azotofixans* の窒素固定関連遺伝子の構造解析

○寺岡孝敏, 坂本秀樹, 西紋 郁, 仲宗根薫, 鈴木克行 (近畿大・工・化学環境)

【目的】窒素固定菌の分子遺伝学的研究はこれまでに、主としてグラム陰性菌である *Klebsiella* や *Rhizobium* 属などで詳細な解析が進んでいるが、グラム陽性菌に関する知見は必ずしも多くない。そこで我々はグラム可変ないし陽性菌である *Paenibacillus azotofixans* (IFO16645) の窒素固定に関わる遺伝子群の進化様式や発現調節機構を明らかにするとともに、分子育種への有効利用を目的として、本菌のニトロゲナーゼ鉄タンパク質をコードする遺伝子 *nifH* を含むオペロン領域のクローニングを試みた。

【方法・結果】はじめに、*P. azotofixans* 9 株の既知 *nifH* 部分塩基配列の比較により設計したプライマーを用いて PCR を行い、311bp の *nifH* DNA 断片を得た。この DNA 断片をプローブとして行ったサザン解析の結果、本株ゲノム上には *nifH* が 2 コピー存在することが示唆された。次に、本株ゲノムのファージライブラリーを作成し、ブラークハイブリダイゼーションにより 18 個の陽性ファージクローンを得た。これらがもつ DNA を PCR 等で解析したところ、2 種類に分類されたため、それぞれの挿入 DNA についてショットガン法による塩基配列決定を行った。

現在までに、copy1 からは約 13kb の contig が、また、copy2 については、7.6kb、4.3kb、3.2kb および 0.6kb の 4 つの contig が得られている。解析の結果、copy1 には *Klebsiella pneumoniae* の *nifE*、*nifN*、*nifB* および *nifH* の相同遺伝子が見つかった。他方、copy2 には *nifB*、*nifH*、*nifD*、*nifK* および *nifE* 遺伝子の存在が明らかとなった。

最近、*P. azotofixans* の標準株とされる ATCC35681 の *nifB* および *nifH* を含む DNA の塩基配列が報告された。*nifH* では 2 株、3 遺伝子 (タンパク質) 間とも高い相同性を持っているが両株の遺伝子構成は大きく異なっていることが判明した。

Structural analysis of the nitrogen-fixation-related genes from *Paenibacillus azotofixans*

○Takatoshi Teraoka, Hideki Sakamoto, Kaoru Nishimon, Kaoru Nakasone, Katsuyuki Suzuki (Dept. Chem. Environ. Technol., Kinki Univ.)

Key words 窒素固定, *nif*, gene organization

415 ホタルルシフェラーゼの遺伝子解析とその大腸菌におけるクローニング

○南部利勝, 窪田康男, 木村一雄, 草桶秀夫 (福井工大・工・応用)

【目的】ホタルの発光に関しては、古くから研究がなされ、ルシフェリンという化合物が、ルシフェラーゼという酵素の働きによって酸化され、その際に光を発すると知られている。ホタルルシフェラーゼは ATP 測定や、レポーター遺伝子として利用される等、幅広い用途へ展開されている。本研究では、ゲンジボタル *Luciola cruciata* のルシフェラーゼのアミノ酸配列に基づき地域間での遺伝的変異について調べた。また、大腸菌への各種ホタルのルシフェラーゼ遺伝子のクローニングを行い、発光物の創出を試みた。

【方法および結果】39 地域でのゲンジボタルの mRNA 抽出し、RT-PCR によってルシフェラーゼ cDNA を増幅しシーケンス解析を行い、アミノ酸に置換し比較を行った。その結果、アミノ酸配列の 4ヶ所に置換が認められた。これらのアミノ酸配列に基づき、ゲンジボタルのルシフェラーゼは 3 つのタイプに分類された。Type I は東日本地域、Type II はフォッサマグナ地帯と西日本の太平洋側、Type III は西日本の太平洋側と九州地域に分布した。次いで、福井県のゲンジボタルルシフェラーゼ遺伝子を RT-PCR によって増幅し、大腸菌におけるクローニングを行ったところ発光が確認された。

現在、さらに 2 つのタイプのゲンジボタル、および他の 3 種のホタルルシフェラーゼ cDNA についても、大腸菌におけるクローニングを行い、それぞれのルシフェラーゼが大腸菌での発光にどのような影響を与えるかについて検討を行っている。

Analysis and molecular cloning in *Escherichia coli* of the gene encoding luciferase from the firefly

○Toshikatsu Nambu, Yasuo Kubota, Kazuo Kimura, Hideo Kusaoke (Dept. Appl. Phys. Chem., Fukui Univ. Tech)

Key words luciferase, cloning

414 海洋性硫黄酸化細菌の Na⁺ 要求機構の解析

○東野恵美, 上村一雄, 杉尾 剛 (岡山大院・自然科学)

【目的】硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* は、還元型無機硫黄化合物をエネルギー源とし、二酸化炭素を唯一の炭素源とする好酸性化学合成独立栄養細菌であり、バクテリアリーチングにおける重要な微生物の一つと考えられている。この技術は、重金属で汚染された沿岸海域のヘドロ中の金属の可溶性に応用できる可能性があるが、これまで、好塩性でかつ好酸性の硫黄酸化細菌に関する報告はなく、海洋性化学合成独立栄養細菌における Na⁺ 要求性の機構も明らかにされていない。本研究では、好塩性、好酸性硫黄酸化細菌のパイオレメディエーションへの可能性を検討するために、好塩性化学合成独立栄養の分離を行うとともに、その Na⁺ 要求性について検討した。[方法] 海水サンプルから、2%(w/v) NaCl 添加元素硫黄無機塩培地 (pH 2.5) で良好に生育する株を単離し、生育や硫黄及び亜硫酸酸化活性に及ぼす pH、NaCl、重金属及び各種阻害剤の影響を検討した。

【結果】最適生育温度、pH 及び NaCl 濃度を 30°C、4.0 及び 2% にもつ硫黄酸化細菌の単離に成功し、SH 株と命名した。増殖は NaCl と Na₂SO₄ の添加で活性化されたが、KCl、LiCl は活性化しなかった。16S rRNA 配列では、*At. thiooxidans* と 99.4% の相同性を示したが、好塩性であるという明らかな違いがあった。一方、休止菌体による硫黄及び亜硫酸酸化活性は、NaCl、KCl 及び LiCl の添加で活性化され、プロトン及びナトリウムのイオノホア、低濃度の HQNO によって阻害された。さらに本菌はキノールオキシダーゼ活性を有していることから、亜硫酸酸化経路は塩要求性でキノンが深く関わっていることが示唆されたが、Na⁺ に対する特異性がないことから、増殖に Na⁺ を特異的に要求する部位が、ほかに存在するものと考えられ、現在検討中である。

Analysis of Na⁺-requiring mechanism in marine sulfur-oxidizing bacterium

○Emi Higashino, Kazuo Kamimura, Tsuyoshi Sugio (Grad. Sch. Natural Sci. Technol.)

Key words 硫黄酸化細菌, 海洋性細菌, *Acidithiobacillus*, 亜硫酸酸化活性, 好酸性細菌, 系統学的分類

416 *Rhodococcus opacus* RHA1 の PCB 分解系線状プラスミドの複製領域と末端領域の解析

○工藤 久, 清水 悟, 小林寛之, 宮内啓介, 政井英司, 福田雅夫 (長岡技大・生物)

【目的】強力なポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解菌である *Rhodococcus opacus* RHA1 は三種の巨大線状プラスミド pRHL1(1100 kb)、pRHL2(450 kb)、pRHL3(330 kb) を保有している。RHA1 株の多様な biphenyl/PCB 分解系酵素遺伝子 (*bph* 遺伝子) の大半は線状プラスミド上に局在しており、線状プラスミドの安定性は本菌の PCB 分解能において非常に重要な要素である。本研究ではこれら線状プラスミドの保持と複製メカニズムを明らかにするため pRHL3 の複製領域の解析と、線状プラスミドの末端領域の単離と解析を行った。

【方法と結果】すでに単離されている 6 kb の pRHL3 の複製開始領域内には *Rhodococcus* と近縁な *Mycobacterium* のプラスミドの複製開始タンパク Rep と相同性を示す *repI* が存在する。*repI* にフレームシフト変異を導入したプラスミドを作成したところ RHA1 内で複製されなかった。したがって、*repI* は複製に必須であると考えられた。また *repI* 上流の 600-bp *ApaI*-*KpnI* 断片を欠失すると複製が起らなかった。この領域に Rep1 結合領域がある事が予想された。

すでに pRHL2 の末端領域が末端が平滑であることを利用して取得されている。pRHL3 の末端領域も同様の手法で単離した。単離したクローンの塩基配列を決定したところ、本菌の pRHL2、*Rhodococcus opacus* MR22 の線状プラスミド pHG204 の末端領域と高い相同性を示した。現在詳細な解析を行っているところである。

Characterization of replication region and terminal regions from the linear plasmid of a PCB degrader, *Rhodococcus opacus* RHA1

○Hisashi Kudo, Satoru Shimizu, Hiroyuki Kobayashi, Keisuke Miyachi, Eiji Masai, Masao Fukuda (Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech)

Key words PCB, linear plasmid, replication, terminal region, degradation, bioremediation