

429 サクシノイルトレハロース脂質の生合成遺伝子の解析

○井上直幸, 野村暢彦, 間世田英明, 中島(神戸) 敏明, 中原忠篤, 内山裕夫(筑波大・応生化)

【目的】*Rhodococcus erythropolis* SD-74 株は、脂肪酸糖エステル、サクシノイルトレハロースリピッド (STL) を生産する (40g/l)。STL は、脂肪酸と糖からできた両親媒性物質 (バイオサーファクタント) である。化学合成品に代わる、環境や生き物に優しい界面活性剤として、STL は洗剤や食品、化粧品への応用が期待されている。またヒト白血病細胞に対して分化誘導作用を持つ (1) ことから、STL は動物細胞へのシグナル物質として研究が進められている。さらに、STL は脂肪酸と糖のユニークな結合を有することから、新規の糖質、脂質合成の点からも興味を持たれる。これらの応用研究を押し進めるために、本研究では STL 生合成遺伝子の取得を試みた。

【方法及び結果】SD-74 株に対し、トランスポゾン挿入による遺伝子破壊を行い、遺伝子をランダムに破壊した変異株集団を作製した。約 2600 株の変異株集団より、ヘキサデカンを含む培地中で STL の生産性を検定し、STL 非生産変異株を 6 株取得した。これらの株のトランスポゾン近隣領域の塩基配列を決定したところ、いくつかの遺伝子が同定された。現在これらの遺伝子について解析、検討を行っている。

本研究の一部は、NEDO からの平成 13 年度産業技術研究助成事業により実施された。

(1) Biosci Biotechnol Biochem 1997 Apr 61(4)609-14

Analysis of succinoyl trehalose lipid biosynthetic gene.

○ Naoyuki Inoue, Nobuhiko Nomura, Hideaki Maseda, Toshiaki Nakazima-Kambe, Tadaatsu Nakahara, Hiroo Uchiyama (Inst. Appl. Biochem., Tsukuba Univ.)

Key words biosurfactant, biosynthesis, glycolipid, *Rhodococcus erythropolis*

431 *Acetobacter xylinum* 由来内在性 β -glucosidase のセルロース合成への関与

○山下ひとみ, 田島健次, 中島克敏, 棟方正信, 高井光男(北大院・工・分子化学)

【目的】*Acetobacter xylinum*(*A. xylinum*) のゲノム DNA において、エンドグルカナラーゼ遺伝子と β -グルコシダーゼ遺伝子がセルロース合成酵素遺伝子オペロンを挟むように存在しており、これらがクラスターとして存在していることがわかっている。本研究では *A. xylinum* ATCC23769 の β -グルコシダーゼ遺伝子をクロニングし、セルロース合成への関与について検討することを目的とした。

【方法および結果】*A. xylinum* ATCC23769 の β -グルコシダーゼ遺伝子 (*bglxA*) をクロニングし、その塩基配列を決定した。ベクターを用いて過剰発現株を作製し、菌体外粗酵素液を用いて pH 依存性、基質特異性を調べた。活性は pH 4.5 以下で急激に減少し、セロトリオース以上のセロオリゴ糖のみに作用することがわかった。また相同性組換えによって β -グルコシダーゼ遺伝子欠損株を作製し、確認を PCR、活性試験によって行った。野生株と比較して、欠損株の菌体増殖は増加し、セルロース合成量は 3 分の 1 程度に減少した。構造的には、I β 成分が増加し、分子量に低下が見られた。また欠損株、野生株におけるエンドグルカナラーゼの発現量、および活性はほぼ同一であった。

これらの結果より、内在性 β -グルコシダーゼがセルロース合成に直接関与していることが示唆された。

Endogenous β -glucosidase from *Acetobacter xylinum* was involved in the cellulose synthesis.

○ Hitomi Yamashita, Kenji Tajima, Katsutoshi Nakajima, Masanobu Munekata, Mitsuo Takai (Div. Mol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words β -glucosidase, *Acetobacter xylinum*, bacterial cellulose

430 磁性細菌粒子膜局在性セリンプロテアーゼ様タンパク質の解析

○福田頼謙, 岡村好子, 竹山春子, 松永 是(東京農工大・工・生命工)

【目的】磁性細菌が生体内で合成するナノサイズの磁石 (bacterial magnetic particles : BMPs) は、脂質二重膜に覆われており、この膜上に局在する 67kDa のタンパク質 (Mms67) の解析は BMPs 形成機構の解明に重要な知見を与えるものであると考えられ、本研究では Mms67 の機能解析を目的とした。

【方法及び結果】Mms67 タンパク質の N 末端アミノ酸配列を基にプライマーを設計し、それを用いてアンカー PCR を行いプライマーウォーキングによってシーケンスを決定した。得られた 2.5 kb の配列中より、N 末端配列をコードする ORF を分離し、*mms67* 遺伝子とした。ホモロジー解析の結果、このタンパク質は膜タンパク質に見られるようなシグナルペプチド様配列を N 末端に持ち、膜上の足場タンパク質に見られる PDZ ドメインを C 末端に 2 つ持つセリンプロテアーゼであった。PDZ ドメインは、細胞膜受容体の C 末端側領域と結合する事が報告されており、シグナル伝達に関与すると考えられている。これらのことより、BMPs 膜上に局在している Mms67 が BMPs 形成の調節あるいはそのシグナル伝達に関与する可能性が推測された。さらに、このタンパク質の機能を解析するために PCR を行い、増幅した *mms67* を His-Tag 融合用のベクターへ導入した。構築したプラスミドにより形質転換した大腸菌において Mms67 を発現させた後精製し、その膜結合性セリンプロテアーゼ様タンパク質としての機能について検討した。

Characterization of serine protease like protein localized on bacterial magnetic particle membran.

○ Yorikane Fukuda, Yoshiko Okamura, Haruko Takeyama, Tadashi Matsunaga (Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agri. Tech.)

Key words BMPs specific protein, serine protease

432 Molecularly assessing growth behavior of filamentous bacteria in the sludge bulking process

○ Rui Liu¹, Takahiro Kanagawa², Shinobu Aruga¹, Shinya Kurata³, Mamoru Kawaharasaki¹ (¹AIST, ²AIST, Tokyo Inst. Technol., ³Kankyo Eng. Corp., Tokyo Inst. Technol.)

A filamentous bulking process was monitored in a bench-scale activated sludge system. Microorganisms with the same morphology as the dominant filaments were isolated from the bulking sludge. By 16S rDNA analysis, the isolates were divided into two groups, *Sphaerotilus* and *Leptothrix*. A specific probe targeting 16S rRNA of all isolates was designed and about 40% of total filaments in the bulking sludge hybridized with this probe. A specific primer set for all isolates to quantify them by real-time PCR was designed. The quantification results showed good correlation between the amount of the filaments in the sludge and sludge settling property, and suggested the possibility of an early warning system of bulking by real-time PCR.

Molecularly assessing growth behavior of filamentous bacteria in the sludge bulking process

○ Rui Liu¹, Takahiro Kanagawa², Shinobu Aruga¹, Shinya Kurata³, Mamoru Kawaharasaki¹ (¹AIST, ²AIST, Tokyo Inst. Technol., ³Kankyo Eng. Corp., Tokyo Inst. Technol.)

Key words sludge bulking, filamentous bacteria, molecular methods, real-time PCR, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*