

633 通性好気性超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis* の酸化ストレス応答機構

○天羽 拓, 跡見晴幸, 今中忠行 (京大院・工・合成生化学, CREST今中プロジェクト)

【目的】我々は好気、嫌気の両環境下で生育可能な新規な超好熱始原菌 *P. calidifontis* を単離した。超好熱菌の多くは絶対嫌気性菌であり、*P. calidifontis* は超好熱菌がどのように好気環境に適応していったかを考える上でよいモデル生物となり得る。超好熱菌の好気環境適応に関する知見を得るために、本菌内において活性酸素除去に関与する酵素の解析を行った。

【方法及び結果】好気条件下で培養した *P. calidifontis* の細胞破碎液に superoxide dismutase (SOD) および catalase 活性が認められた。そこで活性を指標に両酵素を精製し、生化学的解析を行った。Catalase は (1) 吸光スペクトル、(2) 阻害剤の影響、(3) 含有金属、(4) 一次構造から始原菌では報告例のない非ヘム型 catalase (Mn catalase) であることが判明した。一次構造をもとに相同性検索を行ったが、現在までに明らかになっている始原菌 (11 株) のゲノム中にこの酵素の orthologue は存在しなかった。

Oxidative stress response mechanism of a facultatively aerobic hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis*.

○Taku Amo, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka (Dept. Synth. Chem. Biol. Chem., Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., CREST Imanaka Project)

Key words oxidative stress, catalase, SOD, *Pyrobaculum calidifontis*, hyperthermophile, archaea

635 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT-3 の色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の精製と酵素遺伝子の同定

○川上竜巳, 里村武範, 郷田 秀一郎, 櫻庭 春彦, 大島 敏久 (徳島大)

我々は、数種類の超好熱アーキアに、DCIP などの人工色素を電子受容体とする新規色素依存性 L-プロリン脱水素酵素 (dye-L-proDH, EC 1.5.99.8) を見出し、その内 *Thermococcus profundus* 由来の酵素について遺伝子のクローニングに成功し、一次構造を明らかにした結果、本酵素は α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種類のサブユニットからなるヘテロテトラマー構造をとることが判明した。一方我々は、近縁の *P. horikoshii* において、電気泳動的に異なる、2 種類の dye-L-proDH (PDH1 及び PDH2) が存在することを見出した。そこで、*P. horikoshii* からこの 2 種類の酵素を精製し、遺伝子の同定、一次構造の解明を試みた。各種クロマトグラフィーを用いて、両酵素とも高度に精製した。精製酵素の SDS-PAGE 解析と各サブユニットの N 末端アミノ酸配列解析から、PDH2 は *T. profundus* の酵素遺伝子と類似した遺伝子群によってコードおり、同様に 4 種類のサブユニットのヘテロテトラマー構造を示すのに対して、PDH1 は 2 種類のサブユニットからなることが明らかになった。

Purification of dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3 and identification of their genes

○Ryushi Kawakami, Takenori Satomura, Shuichiro Goda, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima (Dept. Biol. Sci. Technol., Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Key words *Pyrococcus horikoshii* OT-3, dye-linked L-proline dehydrogenase

634 *Burkholderia* 属細菌の産生するアルコール脱水素酵素の諸性質

○磯部公安, 若尾紀夫 (岩手大・農生)

【目的】*Burkholderia* 属の細菌が産生するアルコール脱水素酵素の諸性質について検討した。

【方法】土壌から分離した *Burkholderia* 属の細菌を 30°C で 3 日間培養し、得られた菌体をマルチビーズショッカーで破碎して粗酵素液を調製した。酵素は各種クロマトグラフィーを用いて電気泳動で単一バンドにまで精製し (約 2000 倍)、精製酵素を用いて諸性質を検討した。酵素活性は 2-プロパノールを基質として 30°C, pH 8.5 で NADH が生成される速度を 340 nm で測定した。

【結果】本菌株が産生するアルコール脱水素酵素の分子量は約 150,000 (37,000x4) で、等電点は 5.3 付近であった。本酵素は 1,3-プロパンジオールや 2-プロパノール、2-ブタノール、2-ペンタノールなどの第二アルコールに良く作用したが、1-ブタノールなどの第一アルコールに対する相対速度は 2-プロパノールの約 10% 以下であり、第二アルコールに対する Km 値は第一アルコールに対する値よりも小さかった。還元反応ではアセトンに最も良く作用し、ヒドロキシアセトンや 4-ヒドロキシ-2-ブタノン、2-ブタノンにも良く作用した。従って、本酵素は第二アルコール脱水素酵素に分類されると考えられた。本酵素は S 体アルコールよりも R 体アルコールに対して親和性が高く、また NAD⁺ に特異的であり (Km: 0.15 mM)、NADP⁺ ではほとんど活性を示さなかった。pH 安定領域は pH6.9 付近であり、pH 7.0 で 60°C, 1 時間加熱した場合、約 85% の活性が残存し、最適反応温度は 70°C 以上であった。

Purification and some properties of alcohol dehydrogenase from *Burkholderia* sp.

○Kimiyasu Isobe, Norio Wakao (Iwate Univ./Agro-Biosci.)

Key words secondary alcohol dehydrogenase, *Burkholderia*

636 *Alcaligenes xylosoxidans* 由来の芳香族アミン脱水素酵素の精製と諸性質

○近藤徹弥¹, 近藤絵美², 安本教博², 高木一好³, 池田篤治⁴, 植松宏彰⁵ (¹愛知産技研・食品工技, ²岡山大学農大・生活科学, ³立命館大・理工, ⁴京大院・農, ⁵東洋紡・総研)

1. 目的 我々はフェネチルアミン含有培地で培養した *Al. xylosoxidans* の菌体破碎液に芳香族アミン脱水素酵素活性を見出し、本破碎液を用いたヒスタミンセンサを試作した¹⁾。今回、本菌より芳香族アミン脱水素酵素 (AADH) を精製し、特性を検討した。

2. 方法及び結果 *Al. xylosoxidans* の菌体破碎液から、硫酸分画及び各種クロマトグラフィーにより AADH を精製した。SDS-PAGE 及びゲルろ過 FPLC より、本酵素は分子量 42,300 (α) と 15,200 (β) の 2 種類のサブユニットからなる分子量 95,500 のタンパク質と考えられた。SDS-PAGE 後のタンパク質をブロット膜に転写し、redox cycling quinone staining を行ったところ、 β サブユニットにキノンが存在することが示された。ヒスタミン (基質) 及びフェナジンメトスルファート (電子受容体) に対する Km 値はそれぞれ 0.171mM と 0.0481mM であった。本酵素の最適 pH は 8.0 であった。pH4.0~10.5 で 30°C、24 時間放置したところ、pH5.0 未満で大きく活性が低下した。本酵素は 70°C まで安定であった。

1) 近藤ら: 日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 p.322(2001)

Purification and characterization of aromatic amine dehydrogenase from *Alcaligenes xylosoxidans*

○Tetsuya Kondo¹, Emi Kondo², Kyoden Yasumoto², Kazuyoshi Takagi³, Tokuji Ikeda⁴, Hiroaki Uematsu⁵ (¹Food Res. Cent. AITEC, ²Sugiyama Women's Univ., ³Ritsumeikan Univ., ⁴Kyoto Univ., ⁵Toyobo Co., Ltd.)

Key words aromatic amine dehydrogenase, histamine, *Alcaligenes xylosoxidans*