

1B14-3 *Ralstonia eutropha* H16 の細胞内可溶性 poly (3-hydroxybutyrate) 分解酵素

○安部 智子¹, 小林 照幸², 齋藤 光實²
(¹ 神奈川大院・理・生物, ² 神奈川大・理・生物)

【目的】細菌が細胞内に合成するポリエステル polyhydroxyalkanoate (PHA) は熱可塑性の高分子で、環境低負荷型のプラスチックとして注目されている。細菌 *Ralstonia eutropha* H16 は PHA の一種である poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) を細胞内で炭素源、エネルギー源として蓄積し、またある環境下では PHB を利用するための分解系が働く。本研究では、この分解に関与する酵素のうちアモルファスの PHB を分解する細胞内可溶性 PHB depolymerase の精製を試み、その性質を検討した。

【方法と結果】*R. eutropha* H16 の細胞粗抽出液を硫酸分画したのち、TOYOPEARL DEAE-650M、Q Sepharose FF カラムクロマトグラフィーを用いて収率 13% で比活性 37 倍に部分精製した。現在は次に使用する担体を検討中である。diisopropylfluorophosphate、phenylmethane sulfonylfluoride、1,4-dithiothreitol が活性を阻害し、至適 pH は 8.0 であった。Mg²⁺ 及び Ca²⁺ による活性化は見られなかった。活性を測定する場合、oligomer hydrolase を加えなければ monomer の放出はほとんど見られなかったため、この酵素の分解活性はエンド型であると考えられる。さらにこの酵素は dimer、trimer を分解せず、pentamer のような単体数の多い oligomer もほとんど分解しないことから、ポリマーに対してのみ作用し、その内部を分解する分解酵素であると結論した。

Intracellular soluble poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Ralstonia eutropha* H16

○Tomoko Abe, Teruyuki Kobayashi, Terumi Saito
(Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ.)

Key words *Ralstonia eutropha* H16, poly(3-hydroxybutyrate), intracellular PHB depolymerase

1B14-5 ミツバチ由来抗菌ペプチド「アピデシン」の高活性変異体取得

○米澤 拓也, 田口 精一
(明治大農・農化)

【目的】昆虫の生体防御システムを支える抗菌ペプチドは、天然アミノ酸から構成され、物理化学的に安定であることが特徴である。また、現在医療現場で用いられている抗生物質とは全く異なった機構で作用している可能性がある。そこで、生体に調和する抗菌物質として、従来の抗生物質との併用が、また、食品保存剤としての使用、あるいは畜産飼料への導入などとしての利用が期待される。抗菌ペプチドは、その分子量や作用機構からいくつかのグループに分類されるが、アピデシンは、ミツバチ体液内で分泌、誘導される 18 アミノ酸残基からなる塩基性ペプチドで、特にプロリンを多く含んでいる。グラム陰性菌に対し静菌作用を示すが作用機構に関してはまだ詳しいことは知られていない。今回は、アピデシンの高活性体の取得を試みた。

【方法及び結果】既に、アピデシン感受性菌である大腸菌での発現系を基盤に、宿主の成育阻害を指標としてアピデシンの抗菌活性をインビボで評価する「In Vivo Monitoring Assay System」や、高活性体を効率よくスクリーニングするための「Ampicillin Positive Screening System」を確立している。今回、進化工学的手法を用いた機能マッピングによりアピデシンの活性発現に必要な残基（保存領域）を特定し、他の可変領域にランダム変異を導入したところ、アピデシン高活性体を取得することができたので報告する。この高活性体は、静菌的作用から殺菌的作用に変換していた。

【将来の展望】今後、グラム陽性の病原菌などに対しても抗菌活性を発揮するような変異体が取得されることが期待される。

Isolation of mutants with higher activities of antibacterial peptide "Apidaecin" from *Apis mellifera*

○Takuya Yonezawa, seiti Taguti
(Meiji University)

Key words Apidaecin, Antibacterial peptide, evolutionary engineering

1B14-4 *Ralstonia eutropha* H16 細胞内ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) 分解酵素遺伝子 (*phaZ1*) の下流に存在する遺伝子のクローニングとその役割

○杉本 晶子¹, 白木 麻里², 齋藤 光實²
(¹ 神奈川大院・理・生物, ² 神奈川大・理・生物)

【目的】ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は炭素源、及びエネルギー源として様々な微生物が利用する物質の一つである。PHB 産生菌 *Ralstonia eutropha* H16 は栄養条件によっては PHB を細胞内に貯める。PHB 合成と分解に関与する酵素は精製され、構造遺伝子もクローニングされている。しかし、それらの遺伝子の発現がどの様に調節されているかは不明である。*R. solanasearum* の全塩基配列と比較すると *R. eutropha* H16 の細胞内 PHB 分解酵素遺伝子 (*phaZ1*) のおよそ 50 bp 下流に転写調節様遺伝子が存在することが判明したので、その遺伝子の機能を調べた。

【方法】*phaZ1* 遺伝子をプロンプとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、目的遺伝子を含む DNA 領域をクローニングした。この遺伝子の欠損変異株を構築し、色々な培養条件での PHB の蓄積量を野生株と比較した。【結果】目的遺伝子の塩基配列を決定した結果、この遺伝子のアミノ酸配列は対数増殖期から定常期にかけて働く転写調節遺伝子 (TetR family の遺伝子) のアミノ酸配列に類似していた。欠損変異株は、豊富な窒素源と 2% の fructose を含む培地で培養すると PHB の蓄積量が野生株に比べて有意に減少した。この結果ならびに *phaZ1* のすぐ下流に存在することを考慮すると、この遺伝子は *PhaZ1* の repressor として働いている可能性がある。

Cloning and sequencing of a gene downstream poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase gene (*phaZ1*) in *Ralstonia eutropha* H16 and its regulatory role in PHB accumulation

○Akiko Sugimoto, Mari Shiraki, Terumi Saito
(Kanagawa Univ.biol.sci.)

Key words PHB depolymerase, transcriptional regulator gene, PHB accumulation

1B15-1 進化工学による *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 合成酵素の機能改変

○高瀬 和真¹, 田口 精一^{1,2}, 土肥 義治³
(¹ 理研・高分子, ² 明大・農化, ³ 東工大院・総合理工)

【目的】一般に *Pseudomonas* 属細菌のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 合成酵素 (PhaC1) は炭素数 6 ~ 14 の 3 ヒドロキシアルカン酸 (3HA) をモノマーユニットとした PHA を合成する Type II PHA 合成酵素に分類される。しかし、本酵素は他の Type II 酵素と異なり炭素数 4 の 3 ヒドロキシブタン酸 (3HB) をモノマーユニットとして取り込み 3HB ベースの共重合体 P (3HB-co-3HA) を合成する特徴を有している。本研究では、進化工学により本酵素の 3HB 取り込み能力を強化し、共重合組成のバリエーションを拡張することを目指した。

【方法及び結果】まず、*phaC1*₆₁₋₃ 遺伝子に変異誘発 PCR により変異導入し、約 13 万クローンについて PHB 蓄積量を指標にスクリーニングを行い、PHB 蓄積能を獲得した変異遺伝子 18 クローンを得た。さらに変異点の解析から、PHB 蓄積能獲得に寄与していると推定される 4 つのアミノ酸残基を同定した。この内 Ser325 及び Gln481 について部位特異的飽和変異導入を行った結果、S325C/T、Q481K/M/R 変異が優良変異であった。またこれらの優良変異点の掛け合わせにより、野生型酵素の約 400 倍まで PHB を蓄積する酵素の創出に成功した。さらに P (3HB-co-3HA) 合成によるインビボ分析の結果から、S325 変異は酵素活性の上昇に、Q481 変異は基質特異性の変化に寄与していると推定された。

Functional alternation of PHA synthase from *Pseudomonas* sp. 61-3 by *in vitro* molecular evolutionary engineering

○Kazuma TAKASE¹, Seiichi TAGUCHI^{1,2}, Yoshiharu DOI³
(¹ Polymer Chem. Lab., RIKEN Inst., ² Sch. Agric., Meiji Univ., ³ Dept. Innov. Eng. Materials, Tokyo Inst. Technol.)

Key words *Pseudomonas* sp. 61-3, polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, error-prone PCR, substrate specificity, *in vitro* molecular evolutionary engineering