

## 2J16-3 *Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸顆粒結合タンパク質の解析

○磯田 美子<sup>1</sup>, 松本 謙一郎<sup>2</sup>, 土肥 義治<sup>2,3</sup>, 松崎 弘美<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>熊本県大・環境共生, <sup>2</sup>理研・高分子, <sup>3</sup>東工大院・総理工)

**【目的】** *Pseudomonas* sp. 61-3 は 2 種類のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を合成し、ポリ-3-ヒドロキシブタン酸 P (3HB) と炭素数 4~12 の 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) からなるランダム共重合ポリエステル P (3HB-co-3HA) とのブレンド体を別々の顆粒として蓄積する。これは 2 種類の PHA 生成系遺伝子 (*phb* と *pha*) を有するためであり、それぞれの PHA 顆粒表面には特異的に結合するタンパク質 (GA18, GA36, GA24) が存在する。本研究では、それぞれの PHA 顆粒結合タンパク質の PHA 組成認識について検討した。

**【方法と結果】** *Pseudomonas* sp. 61-3 の遺伝子組換え株を用いて、3HB と 3HA の組成比が異なる様々な共重合ポリエステルを合成させた。次いで、菌体破碎物から PHA 顆粒をそれぞれ単離し、顆粒結合タンパク質の SDS-PAGE 分析と PHA のモノマー組成分析を行った。その結果、GA18 および GA36 は 3HB 分率 87mol% 以下の PHA には結合したが、少なくとも 95mol% 以上の PHA への結合は認められなかった。一方、GA24 は 3HB 分率 87mol% 以上の PHA への特異的な結合が見られた。また、PHA 重合酵素についても検討した結果、PHA 顆粒結合タンパク質は PHA のモノマー組成のみを認識していると考えられた。

### Characterization of PHAs and their granule-associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3

○Yoshiko Isoda<sup>1</sup>, Ken'ichiro Matsumoto<sup>2</sup>, Yoshiharu Doi<sup>2,3</sup>, Hiromi Matsusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Environ. Symbiotic Sci., Pref. Univ. Kumamoto, <sup>2</sup>Polymer Chem. Lab., RIKEN Inst., <sup>3</sup>Dept. Innov. Eng. Materials, Tokyo Inst. Technol.)

**Key words** polyhydroxyalkanoate, PHA, phasin, granule-associated protein, *Pseudomonas*

## 2J16-5 ベルオキシダーゼを高効率に分泌生産する形質転換タバコの作製

○堀 満千子, 松井 健史, 仲山 英樹, 吉田 和哉,  
新名 惇彦  
(奈良先端大・バイオ)

**【目的】** 西洋ワサビ (*Armoracia rusticana*) ベルオキシダーゼ (PRX) の液胞局在性アイソザイム C (HRP C1a) は N 末端、C 末端にプロペプチド (NTPP, CTPP) を持ち、それぞれ小胞体、液胞への輸送シグナルとして機能する。フェノール系化合物の酸化重合活性を有する HRP C1a は、環境浄化植物の作出に利用できると考えられる。本研究では、HRP C1a を植物体表面のアポプラスト領域へ高レベルに分泌生産するタバコの作製を試みた。

**【方法及び結果】** CTPP を欠失させた分泌型 HRP C1a ΔC を生成する形質転換タバコの葉からタンパク質を抽出し、等電点電気泳動後に PRX 活性染色、および SDS-PAGE 後に抗 HRP C 抗体を用いたウエスタン解析を行った結果、HRP C1a がアポプラストに高蓄積されることが分かった。さらに、BY2 細胞において分泌量が多いと報告されている酵素の前駆体を持つ NTPP が、HRP C1a の高効率分泌に寄与するかどうかを調べた。各候補 NTPP を付加した HRP C1a をコードする融合遺伝子を CaMV35S プロモーターによって発現する BY2 細胞を作製し、細胞内および液体培地中のタンパク質を調べた結果、38 kDa PRX と β-D-galactanoxylase の NTPP が HRP C1a の高効率分泌に有用であることがわかった。

### High-level secretory production of peroxidase in transgenic tobacco

○Machiko Hori, Takeshi Matsui, Hideki Nakayama, Yoshida Kazuya, Shinmyo Atsuhiko  
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**Key words** *Armoracia rusticana*, propeptide, vesicular transport, phytoremediation

## 2J16-4 有機物存在下における固体ポリブチレンサクシネート分解菌の探索

○深山 和幸<sup>1</sup>, 中島(神戸) 敏明<sup>1</sup>, 坪(茂野) ゆき枝<sup>2</sup>,  
野村 暢彦<sup>1</sup>, 内山 裕夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大応生化, <sup>2</sup>科技园・さががけ 21)

**【目的】** 近年の環境問題に対する国民の関心の高まり、また食品リサイクル法施行により生物系の廃棄物をコンポスト化しようとする動きが活発化している。この際、問題となる包装資材への生分解性プラスチック (生プラ) の利用が期待されている。これまでの生プラ分解菌に関する報告の多くは、これを唯一炭素源とし、資化するものである。生プラの容器や袋を含む食品廃棄物のコンポスト化を想定した場合、栄養が豊富な環境下においてもプラスチックを分解することが望まれる。そこで本研究では、有機物存在下においても良好に分解する菌の探索を行った。また、乳化処理を行った生プラの分解に関する報告は多いが、実際には固体やフィルム状で排出されるため、固体生プラを分解する菌の探索を行った。

**【方法及び結果】** 供試生プラとしてポリブチレンサクシネート (PBS) を用いた。土壌、活性汚泥、河川などの環境中より採取した 30 サンプルを乳化した PBS を重層した Nutrient Broth (NB) 平板培地に塗布し、コロニー周辺が透明になったものを分解菌として単離した。このうち、特に大きいハローを形成した菌については、PBS フィルムを添加した NB 液体培地に接種し、フィルムを著しく分解する菌 4 株を取得した。これら 4 株を用い、様々な生プラのベレット分解試験を NB 液体培地中で行った。この結果、PBS 以外にも他の生プラを 3 日~5 日間で約 150mg~300mg 分解した。

### Screening of poly (tetramethylene succinate) degrading bacteria under nutritious condition

○Kazuyuki Miyama<sup>1</sup>, Toshiaki Nakajima-Kambe<sup>1</sup>, Yukie Akutsu-Shigeno<sup>2</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>1</sup>, Hiroo Utiyama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Inst. Appl. Biochem., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>TREST, JST)

**Key words** PBS, 生分解性プラスチック, コンポスト

## 3J09-1 形質転換植物及び培養細胞によるテトラクロロエチレンデハロゲナーゼの発現

松古 浩樹<sup>1</sup>, ○本田 宗央<sup>2</sup>, 村元 靖典<sup>2</sup>, 高見澤 一裕<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜県農技研, <sup>2</sup>岐阜県生物技研, <sup>3</sup>岐阜大農・生資利)

**【目的】** 揮発性有機塩素化合物 (VOCs) のひとつであるテトラクロロエチレン (PCE) は、全国各地の土壌・地下水から検出され、その対策が求められている。VOCs は生物による分解や再変換が可能であることから、低環境負荷とされる生物学的な浄化が有効とされているが、植物による効果的な PCE 分解に関する報告はない。そこで、PCE 分解菌である *Clostridium bifermentans* DPH-1 より PCE 分解に関与する酵素 (PCE デハロゲナーゼ) の遺伝子 (*pceC*) を単離し、植物及び培養細胞に導入することで、PCE 分解酵素の植物工場としての利用、あるいは PCE 分解能を利用したファイトレメディエーションをめざして研究を開始した。

**【方法及び結果】** 形質転換には、タバコ植物 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) 及びタバコ培養細胞 (BY-2) を用い、*pceC* を組み込んだベクターをアグロバクテリウム法により植物へ導入した。マーカー遺伝子を利用した選抜と導入遺伝子をターゲットとした PCR 法により、植物及び培養細胞において導入遺伝子の存在を確認した。これら形質転換植物及び培養細胞は、RT-PCR 法により mRNA への転写を確認した。引き続き SDS-PAGE、抗 PCE デハロゲナーゼ抗体によるウエスタンブロッティングと、これら形質転換植物及び培養細胞による PCE 分解活性について検討する。

### Expression of a tetrachloroethylene dehalogenase of *Clostridium bifermentans* DPH-1 in transgenic plants and suspension cells

Hiroki Matsufuru<sup>1</sup>, ○Munehika Honda<sup>2</sup>, Yasunori Muramoto<sup>2</sup>, Kazuhiro Takamizawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Gifu Pref. Inst. Agric. Tech., <sup>2</sup>Gifu Pref. Inst. Bio. Tech., <sup>3</sup>Fac. Agric. Gifu Univ.)

**Key words** PCE, tetrachloroethylene dehalogenase, *Clostridium bifermentans*, transgenic plant, expression