

2B10-4 枯草菌における細胞壁溶解酵素 YcdD の機能解析○楊 璋, 山本 博規, 関口 順一
(信州大・繊維・応生科)

【目的】グラム陽性の土壌細菌である枯草菌は様々な細胞壁溶解酵素を生育過程の各段階で発現している。機能未知の蛋白質である YcdD は他菌種との同源性検索の結果から、L,D-endopeptidase タイプの細胞壁溶解酵素であることが示唆された。これまでに報告された L,D-endopeptidase タイプの細胞壁溶解酵素は、胞子形成期に発現している YunA だけである。そこで、本研究では YcdD の機能解析を目的として実験を行なった。

【方法・結果】まず、ycdD の転写時期と転写量を調べるために、LacZ assay を行なった。その結果、ycdD は対数増殖期に極めて少ない転写があることが分かった。続いて、YcdD が、細胞壁溶解酵素である事を確認するため、YcdD を大腸菌により大量発現させ精製し、ザイモグラフを行なった。その結果、YcdD は枯草菌の細胞壁に対して溶解活性があることが明らかになった。次に、酵素反応の最適条件を決定し YcdD の細胞壁に対する切断部位を同定するために、HPLC 分析を行なった。その結果、YcdD は細胞壁のペプチドにおける L-Ala と D-Glu の間を切断することが分かった。これらの結果から、YcdD は対数増殖期に発現している L,D-endopeptidase であることが明らかになった。現在、YcdD 蛋白質が細胞質、膜、壁、外のどこに存在しているか、また ycdD 遺伝子がどのシグマ因子に依存しているか調べている。

Functional analysis of *Bacillus subtilis* cell wall lytic enzyme YcdD○Yao YANG, Hiroki YAMAMOTO, Junichi SEKIGUCHI
(Dept. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ.)**Key words** *Bacillus subtilis*, cell wall lytic enzyme, hydrolase**2B11-1 *Ralstonia eutropha* H16 の poly(3-hydroxybutyrate) 分解酵素 (PhaZ4) の性質**○安部 智子¹, 小林 照幸², 齊藤 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あり、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) を炭素源、エネルギー源として細胞内に蓄積し、ある環境下では PHB を分解して利用する。*R. eutropha* H16 では PhaZ1、PhaZ2、PhaZ3 の 3 種類の細胞内 PHB 分解酵素の存在が今までに確認されている。本研究では、4 番目の PHB 分解酵素の遺伝子と推測される遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子産物の性質を調べた。

[方法と結果] *R. eutropha* H16 の近縁種である *Ralstonia metallidurans*, *Ralstonia eutropha* JMP134 等において、*Ralstonia pickettii* T1 や *Paucimonas lemoignei* の細胞外 PHB 分解酵素に類似した配列が見つかった。これらは新規の細胞内 PHB 分解酵素遺伝子であると予測され、同様の遺伝子が *R. eutropha* H16 にも存在していると考えられた。*R. metallidurans* 等の配列をもとに probe を作成し、Southern hybridization を用いて目的遺伝子のクローニングを行った。塩基配列を決定した結果、細胞外 PHB 分解酵素に類似した 1,089 bp の ORF が認められた (*phaZ4*)。 *phaZ4* を含むプラスミドで *Escherichia coli* を形質転換し、遺伝子の大量発現を試みた。この *E. coli* の細胞粗抽出液は人工 amorphous PHB granules を効率良く分解した。

Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ4) in *Ralstonia eutropha* H16○Tomoko ABE¹, Teruyuki KOBAYASHI², Terumi SAITO²
(¹Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kanagawa Univ., ²Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ.)**Key words** PHB, *Ralstonia eutropha* H16, intracellular PHB depolymerase**2B10-5 *Rhodospirillum rubrum* の細胞内 PHB 分解酵素に関する研究**○小林 照幸¹, 安部 智子², 松本 篤¹, 齊藤 光實¹
(¹神奈川大・理・生物, ²神奈川大院・理・生物)

【目的】ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は種々の細菌が細胞内に炭素/エネルギー源として貯えるポリエステルであり、生分解性プラスチックとして知られている。我々はこれまでに *Ralstonia eutropha* H16 と *Rhodobacter sphaeroides* から細胞内 PHB depolymerase 遺伝子のクローニングを行った。これらの酵素については大腸菌から精製を行ない、その性質を調べている。本研究では光合成細菌である *Rhodospirillum rubrum* から *phaZ1* と *phaZ3* をクローニングし、その遺伝子産物の性質を調べた。

[方法と結果] *R. eutropha* の PhaZ1、PhaZ2、PhaZ3 のアミノ酸配列を元に BLAST search を行った結果、*R. rubrum* のゲノム配列のデータベースから PhaZ1 と PhaZ3 に似たアミノ酸配列を持つ遺伝子が見つかった。これらの遺伝子を PCR によりクローニングした後に発現ベクターを構築し、大腸菌で発現誘導をおこなった。大腸菌の粗抽出液の SDS-polyacrylamide gel electrophoresis の結果、PhaZ1 では約 45 kDa、PhaZ3 では約 31 kDa の位置にバンドが見られた。これらの分子質量はアミノ酸配列から予測される質量とほぼ一致した。大腸菌から精製した PhaZ1 と PhaZ3 は *R. eutropha* の各酵素と同様に人工非晶状 PHB 顆粒を分解した。PhaZ3 のリパーゼボックスと考えられる配列中の 110 番目のセリンを部位特異的変異によりアラニンに置換した結果、活性を失った。このことから 110 番目のセリンが活性中心であると考えられる。

Intracellular PHB depolymerases from *Rhodospirillum rubrum*○Teruyuki KOBAYASHI¹, Tomoko ABE², Atsushi MATSUMOTO¹, Terumi SAITO¹
(¹Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ., ²Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kanagawa Univ.)**Key words** *Rhodospirillum rubrum*, PHB, PHB depolymerase**2B11-2 *Ralstonia pickettii* T1 の細胞外 poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase の分泌に関する研究**○杉本 晶子¹, 白木 麻里², 畠山 幸恵², 齊藤 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 分解菌 *Ralstonia pickettii* T1 は細胞外の PHB を細胞外 PHB 分解酵素及び 3HB oligomer 分解酵素を分泌して 3HB を炭素源及びエネルギー源として利用できるグラム陰性細菌である。二つの酵素は既にクローニングされ、性質も調べられているが、発現調節及び分泌機構は殆ど調べられていない。本研究では、*R. pickettii* T1 の細胞外 PHB 分解酵素分泌機構について調べた。

[方法] トランスポゾン (Tn5) を用いて PHB の分解に変異のある株を PHB を含む寒天培地でのスクリーニングで得た。その中から PHB 分解酵素の遺伝子は正常で PHB 分解が野生株に比べて遅い変異株を得た。Tn5 をプローブとし、変異株の染色体から Tn5 の周辺領域をクローニングして Tn5 の挿入領域の塩基配列決定を行った。

[結果] この変異株は、炭素源が PHB のみの培地で培養すると、野生株に比べて PHB の分解が 5~7 日遅くなった。抗 T1 PHB 分解酵素血清を用いた実験より、PHB 分解酵素が野生株に比べて菌体外で少なく菌体内で多く見られることから、変異株は分泌系遺伝子の欠損株と考えた。更に、この変異株の染色体に挿入した Tn5 周辺領域の塩基配列を調べた結果、Tn5 により機能を失ったと考えられる遺伝子は type II 型分泌系の遺伝子に似ていた。

Secretion of extracellular poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase by *Ralstonia pickettii* T1○Akiko SUGIMOTO, Mari SHIRAKI, Sachie HATAKEYAMA, Terumi SAITO
(Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ.)**Key words** *Ralstonia pickettii* T1, extracellular poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase, protein secretion