

2A16-2 *Paenibacillus fukuinensis* 由来キチナーゼ遺伝子のクローニングと解析木元 久¹, 藤井 豊¹, 岩崎 晋和², 草桶 秀夫²
(¹ 福井大・医・生命情報, ² 福井工大・工・環境生命)

【目的】*Paenibacillus fukuinensis* はキトサナーゼとキチナーゼを同時に菌体外に分泌する新規な分離細菌である。我々のこれまでの研究では *P. fukuinensis* が産生するキトサナーゼ遺伝子について、その構造と機能を明らかにしてきた。本研究では、*P. fukuinensis* が産生する2種類のキチナーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌による大量発現および精製を行った。【方法および結果】*P. fukuinensis* の培養上清の HW-55S ゲルクロマトグラフィによって、分子量約80 kDa、約70 kDa および約45 kDaの3つのタンパク質が得られた。これらのタンパク質の活性染色の結果、80kDa と 70 kDa の2つのタンパク質はキチナーゼ活性が認められ、45 kDa のタンパク質は活性が認められなかった。活性が認められた2つのキチナーゼについて、キチナーゼ遺伝子のクローニングを行った。その結果、ChiA 前駆体は、2,538 bp のORFから構成され、845個のアミノ酸からなり、分子量88 kDaと推定された。本酵素はN末端側にファミリー 18キチナーゼドメインをもつ典型的なファミリー18糖加水分解酵素であることが判明した。ChiB 前駆体は、2280 bp のORFから構成され、759個のアミノ酸からなり、分子量80 kDaと推定された。この酵素も、N末端側にファミリー18活性ドメインをもつ典型的なファミリー18糖加水分解酵素であることがわかった。また、N末端アミノ酸配列の結果から、45 kDa のタンパク質は、chitin binding に関与しているものと推定された。

Cloning and Analysis of Chitinase Genes from *Paenibacillus fukuinensis*Hisashi KIMOTO¹, Yutaka FUJII¹, Toshikazu IWASAKI²,
Hideo KUSAOKE²
(¹Dept. Mole. Genet. Mole. Bio. Fukui Univ., ²Dept. Environ. Biotech. Fron. Fukui Univ. Tech.)**Key words** chitinase, family 18, chitin binding domain**2A16-4** *epsilon*-Poly-L-lysine (PL) 分解酵素遺伝子の取得と破壊株を用いた機能解析ポスター
発表あり○濱野 吉十¹, 吉田 豊和², 中森 茂¹, 長澤 透², 高木 博史¹
(¹ 福井県大生物資源, ² 岐阜大・工・生命工)

【目的】*S. albulus* が生産する抗生物質epsilon-poly-L-lysine (PL) は、L-リジンの epsilon- アミノ基と alpha- カルボキシル基がペプチド結合でつながった25~35残基からなる直鎖状のアミノ酸ホモポリマーである。PLの生合成機構は未だ解明されておらず、特に、その鎖長が生合成酵素と分解酵素のどちらによって制御されているのかについては不明のままである。そこで、PL 分解酵素 (PLD) の遺伝子破壊株を構築し、PL 鎖長および生産性の解析を試みた。【方法と結果】これまでに我々は、*S. albulus* から PLD を精製し、その酵素学的諸性質を明らかにしている。そこで、PLDのN末端アミノ酸配列を基にPLD遺伝子の取得を行い、本遺伝子の破壊株を構築した。次に、PL鎖長と生産性について野生株と比較したところ、通常の生産培地においては顕著な差は認められなかった。しかし、培地に緩衝液 (pH7.2) を加え PL 生産・蓄積において必須である対数増殖期以降の培地 pH の低下を遅延させたところ、野生株より高い PL 生産性を示した。しかしながら、合成された PL は破壊株においても pH 中性領域で速やかに分解されることが判明した。以上の結果から、*S. albulus* は PLD 以外にも pH 中性領域で機能する PL 分解酵素を有していることが判明した。また、PLD は PL が生産される低 pH 環境下では機能しておらず、pH 中性領域において機能し、PL を分解していることが *in vitro* 同様、*in vivo* においても明らかになった。

Cloning and characterization of the gene encoding epsilon-Poly-L-lysine(PL)-degrading enzyme○Yoshimitsu HAMANO¹, Toyokazu YOSHIDA²,
Shigeru NAKAMORI¹, Tohru NAGASAWA², Hiroshi TAKAGI¹
(¹Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ., ²Dept. Biomol. Sci., Gifu Univ.)**Key words** epsilon-poly-L-lysine, *Streptomyces albulus***2A16-3** 紅色非硫黄細菌 *Rhodospirillum centenum* の poly-3-hydroxybutyrate (PHB) 合成酵素遺伝子のクローニングと塩基配列決定ポスター
発表あり○白木 麻里, 永野 貴司, 鈴木 恵美子, 齊藤 光實
(神奈川大・理・生物)

【目的】細胞内に PHB を合成し、蓄積する細菌は数多く知られている。しかし、光合成細菌の PHB 合成に関わる酵素についてはそれほど多くの研究は行われていない。光合成細菌である *Rhodospirillum centenum* は暗条件下で好氣的に培養した際、内生胞子を形成し、内生胞子を形成する条件下で酪酸を唯一の炭素源とすると、細胞内に PHB を蓄積するという特徴がある。本研究では *R. centenum* の PHB 合成遺伝子をクローニングし塩基配列を決定した。【結果】既に遺伝子配列の明らかになっている他の菌の PHB 合成遺伝子に高く保存されている配列を参考にしてプライマーを設計し *R. centenum* の染色体 DNA を鋳型として PCR を行い約 500 bp の断片を増幅した。この断片をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションを行い約 10 Kbp の断片をクローニングし、最終的に約 3 Kbp の断片をクローニングし、遺伝子配列を決定した。決定した遺伝子配列は光合成細菌の *Rhodospirillum rubrum* の PHB synthase と 64% の相同性を示した。クローニングした断片はどの断片も *Ralstonia eutropha* H16 の β -ketothiolase, acetoacetyl CoA reductase の遺伝子とともに大腸菌内で発現させた場合 PHB を合成した。

Cloning and sequencing of poly-3-hydroxybutyrate(PHB) synthase gene from *Rhodospirillum centenum*○Mari SHIRAKI, Takashi NAGANO, Emiko SUZUKI, Terumi SAITO
(Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ.)**Key words** PHB, PHA synthase, photosynthetic bacteria**3A09-1** 青枯れ病菌に感染するバクテリオファージの単離及び解析○川崎 健¹, 永田 祥子¹, 藤原 亜希子², 藤江 誠¹,
宇佐美 昭二¹, 山田 隆¹
(¹ 広島大院・先端・生命機能, ² 広大・工・第三類)

【目的】青枯れ病菌 *Ralstonia solanacearum* は、トマト、ナス等に青枯れ病を、タバコには立ち枯れ病を引き起こす土壌伝染性の植物病原菌であり、比較的温帯な気候帯を中心に世界中に分布している。この病原菌は非常に広範な宿主域を持ち、経済的に重要な農作物を含む33科200種以上の植物に感染し甚大な被害を及ぼしている。そのため植物病原細菌としての重要性は高く様々な研究が行われているが、未だ根本的な解決法は開発されていない。そこで、当研究室では、*R. solanacearum* に感染するファージに着目し単離、解析を行っている。【方法・結果】昨年度の大会では、立ち枯れたタバコ由来の *R. solanacearum* 6株を宿主としたスクリーニングから得られた3タイプ (S, M, L type) の新規ラルストニアファージについて報告した。今回は新たに、青枯れた他の植物由来の9株の *R. solanacearum* (Race 1, 3, 4) を加え、これらファージの感染範囲を確認した。また、本年新たに得たファージ (A type) は、試した15株すべての *R. solanacearum* に感染することが判明した。このファージについての詳細は次の演題で報告する。また、これら4タイプのファージについて電子顕微鏡による形態観察を行った。さらに、S, Mタイプファージの詳細な遺伝子解析、コートタンパク質解析の結果を報告する。

Screening and characterization of novel *Ralstonia solanacearum* phages○Takeru KAWASAKI¹, Shoko NAGATA¹, Akiko FUJIWARA²,
Makoto FUJIE¹, Shoji USAMI¹, Takashi YAMADA¹
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²CHIE. Fac. Eng., Hiroshima Univ.)**Key words** *Ralstonia solanacearum*, plant pathogen, phage, host specificity