

1117-3 無機塩培地上で生育する *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株のホルムアルデヒド除去活性

○江上 裕士¹, 大畑 奈緒子¹, 吉田 信行¹, 桂樹 徹¹, 谷 吉樹², 高木 博史¹
(¹奈良先端大・バイオ, ²京都学園大・バイオ環境)

【目的】*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は極端な低栄養生育を示し、炭素源無添加の無機塩培地に良好に生育するが、CO₂を除去すると生育しなくなる。また、寒天をシリカゲルに代えた培地でも生育するため、CO₂を効率的に利用している可能性が考えられる。これまでに二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析により、N9T-4株の低栄養生育はメタノール代謝が関与していることが示唆された。今回はメタノール代謝に焦点を絞り、本菌の低栄養生育時におけるホルムアルデヒド除去について検討した。【方法及び結果】炭素源無添加、及びCO₂制限下でテトラデカン炭素源とした寒天培地でN9T-4株を生育させた。それぞれの菌体の粗抽出液にホルムアルデヒドを添加した後、経時的にホルムアルデヒドの減少量を測定した。その結果、炭素源無添加条件の粗抽出液でのみ、ホルムアルデヒドの顕著な減少が認められた。本菌にはホルムアルデヒド代謝系の存在が示唆されたが、培地中にメタノールやホルムアルデヒドを添加しなくてもホルムアルデヒド除去活性が誘導されることは興味深い。ゲノム情報が公開されている *Rhodococcus* sp. RHA1 株には、ホルムアルデヒド固定経路の鍵酵素であるヘキサロースリン酸シンターゼとホスホヘキサロイソメラーゼの存在が示唆されており、現在これらの酵素についても解析を進めている。

Formaldehyde removing activity of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 grown on an inorganic mineral medium

○Hiroshi EGAMI¹, Naoko OHHATA¹, Nobuyuki YOSHIDA¹, Tohoru KATSURAGI¹, Yoshiki TANI², Hiroshi TAKAGI¹
(¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ²Dept. Biosci. Biotech., Kyoto Gakuen Univ.)

Key words Formaldehyde, *Rhodococcus erythropolis*, Carbon dioxide

1117-5 Anammox 菌のヒドラジン酸化酵素遺伝子近傍の構造と転写解析

○西山 孝¹, 川原 優香¹, 豊本 健志¹, 島村 宗孝¹, 古川 憲治², 藤井 隆夫¹
(¹崇城大・応生命, ²熊大院・自然科学)

[目的] ヒドラジン酸化酵素 (HZO) は嫌氣的アンモニア酸化反応 (Anammox) においてヒドラジンを窒素ガスに変換する重要な酵素と考えられており、Anammox 菌の菌体内タンパク質の約 10% を占める。我々は Anammox 菌 KSU-1 株が優占種の集積培養汚泥から HZO 遺伝子 (*hzo-a*) のクローニングを行い、結果を既に報告している。その際、ゲノム中にもう 1 つの HZO 遺伝子 (*hzo-b*) の存在を認めた。本研究では *hzo-b* をクローニングし、その周辺領域と両 HZO 遺伝子の発現の解析を目的とした。【結果】*hzo-b* は *hzo-a* に 99.6% の相同性を示したが、*hzo-a* の周辺には Anammox に関連すると推察される ORF はないのに対し、*hzo-b* の上流にはヒドロキシルミン酸化還元酵素 (HAO) などのヘムタンパク質遺伝子が複数存在しており、Anammox 関連遺伝子が *hzo-b* の周辺に集積している可能性が示唆された。最近公開された Anammox 菌 *Kuenenia stuttgartiensis* のゲノム配列中には *hzo-a*、*-b* の配列と 88%、89% の相同性を示す 2 つの ORF (Kustc0694, Kustd1340) が存在していた。しかし、それぞれの遺伝子の周辺領域は、KSU-1 株の *hzo-a*、*-b* の周辺領域の構造と異なっていた。

現在、HZO の発現に対する *hzo-a*、*-b* の寄与を明らかにするために、ノーザンハイブリダイゼーション、リアルタイム PCR を用いてそれぞれの転写量の解析を行っている。

Structures of the hydrazine-oxidizing enzyme genes and their flanking regions of Anammox bacterium, and transcriptional analysis of the genes

○Takashi NISHIYAMA¹, Yuka KAWAHARA¹, Takeshi TOYOMOTO¹, Munetaka SHIMAMURA¹, Kenji FURUKAWA², Takao FUJII¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

Key words anaerobic ammonium oxidation, hydrazine, denitrification, Anammox

1117-4 放線菌 *Rhodococcus opacus* CIR2 株の salicylate 分解機構の解析

○石井 一二三¹, 小稚尾 誠², 藤原 孝義², 滝澤 昇²
(¹岡山理大・工・応化岡山理大・工・応化岡山理大・工・応化, ²岡山理大・工・応化)

放線菌 *Rhodococcus opacus* CIR2 株 (以下 CIR2 株) は γ -BHC で単離されたグラム陽性菌です。CIR2 株は Naphthalene を唯一の栄養源として生育します。Naphthalene 代謝経路は *Pseudomonas* 属の研究がされており、*Pseudomonas* 属の Naphthalene 代謝経路は naphthalene を salicylate へ変換した後、salicylate-1-hydroxylase, salicylate-5-hydroxylase によりそれぞれ catechol や gentisate へ変換されることが報告されています。CIR2 株は naphthalene を salicylate に変換した後、salicylate を gentisate へ変換します。

CIR2 株の Salicylate-5-Hydroxylase (RnoG) は、Naphthalene 代謝経路において salicylate を gentisate へ変換する酵素です。本研究では、RnoG の補因子要求性と精製の検討をしました。その結果、RnoG の活性発現には ATP, Coenzyme A, NADH を要求することがわかりました。

また、CIR2 株の線状プラスミド (500kb) のコスミドクローン pRST1 を保持する大腸菌 *E. coli* STBL2 は salicylate を gentisate へ変換し、この pRST1 から作製した pRH1 には gentisate1,2-dioxygenase (GDO) gene が存在し、この GDO 遺伝子の周辺に 4 つの ORFs が含まれています。この 4 つの ORFs の遺伝子相同性検索を行った結果、salicylate 分解遺伝子群と相同性を示しました。

このことから CIR2 株のサリチル酸変換には *Rhodococcus* sp. B4, *Streptomyces* sp. WA46 と同様な酵素が関与していることが考えられます。

Salicylate Catabolism in *Rhodococcus opacus* strain CIR2

○Kazufumi ISHII, Makoto KOJIO, Takayoshi FUJIWARA, Noboru TAKIZAWA
(Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words naphthalene, salicylate, hydroxylase

2109-1 中温と高温条件におけるグリセロールの嫌気性分解特性

○楊 英男, 塚原 建一郎, 澤山 茂樹
(産総研・バイオマス研究センター)

【目的】本研究では、ポリウレタン固定床リアクタに嫌気性難分解成分のモデル物質としてグリセロールを供給し、中温と高温条件によるリアクタのメタン発酵特性への影響を検討した。【方法及び結果】中温と高温それぞれ並行 2 個ずつ、合計 4 つのリアクタを用いて、グリセロールを 35℃ の中温と 55℃ の高温条件下、有機物負荷 0.25 g/l-reactor/d から 0.5 g/l-reactor/d、0.7 g/l-reactor/d まで徐々に増加し、半連続式で 426 日間発酵を行った。その間のバイオガス量やメタンガス濃度、DOC 濃度の変化を測定した。さらに、高温リアクタ担体に固定化した菌の走査電子顕微鏡 (SEM) 観察と菌叢のクローン解析を行った。

グリセロールの嫌気性分解について、発酵の初期段階には中温の方が良かったが、3 ヶ月後に高温条件の方が中温より良くなった。その後グリセロールの負荷を上げると共に、中温条件においての分解率は徐々に減少した。高温条件は、有機物分解率やガス化特性が優れていることが確認された。走査電子顕微鏡観察により、高温嫌気性発酵の担体に、球菌や短桿菌、長桿菌など種類の菌を固定化されることが観察された。菌叢のクローン解析の結果、バクテリアでは *Bacillus* sp., *Desulfotomaculum reducens*, *Paenibacillus* sp., *Clostridium* sp., *Ruminococcus* sp. 等、またアーキアでは *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp. の存在が確認された。特に、グリセロールを基質とした高温嫌気性消化のアーキア菌叢は、水素資化性メタン生成菌が豊富に存在していることがわかった。

Anaerobic digestion of glycerol under mesophilic and thermophilic conditions

○Yingnan YANG, Kenichiro TSUKAHARA, Shigeki SAWAYAMA
(BTRC, AIST)

Key words anaerobic digestion, glycerol, SEM, 16S rRNA