

1G11-5 放線菌由来 isochorismatase superfamily (IS) 酵素におけるラクタム加水分解活性の評価○丸山 千登勢¹, 濱野 吉十²
(¹福井大・医, ²福井県大生物資源)

【目的】最近、我々は放線菌 *Streptomyces albulus* から ST の新規耐性遺伝子 (*sttH*) を見出し、本遺伝子産物 (*SttH*) は、ST のストレプトリジンラクタムを加水分解する酵素であることを明らかにした。*SttH*は、機能未知の IS 酵素群に属しており、この family に属する酵素は、大腸菌を含め、ほとんど全ての原核生物に存在することが知られている。しかしながらその触媒機能は不明のままであり、*SttH*は IS 酵素群において唯一基質と触媒機能を同定できた酵素といえる。興味深いことに、大腸菌における IS 酵素 (YcaC) は、ST の加水分解活性を示さない。そこで、*SttH*以外のラクタム加水分解活性を有する IS 酵素の探索を試みた。

【方法と結果】ST 耐性機構として、一般的に ST のアセチル化が知られている。そこで PCR によって、ST のアセチル化酵素遺伝子を有していない ST 耐性放線菌を探索したところ、*Streptomyces noursei* を見出すことができた。また本菌株は、*S. albulus* と同様、ST との菌体反応において、ST 加水分解活性を有していることが判明した。そこで、*S. noursei* が有する ST 加水分解酵素が、IS 酵素に属する酵素か否か検証するために、本菌株のゲノムライブラリーを作製し、異種放線菌 *Streptomyces lividans* を宿主としたショットガンクローニングによって、ST 加水分解酵素遺伝子の取得を現在試みている。

Investigation of lactam hydrolysis activity in actinomycetes origin isochorismatase superfamily enzymes.○Chitose MARUYAMA¹, Yoshimitsu HAMANO²
(¹Fac. Med. Sci., Fukui Univ., ²Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ.)**Key words** streptothricin, *Streptomyces*, lactam**1G12-2 抗菌性ポリアミノ酸 epsilon-Poly-L-lysine (epsilon-PL) の生合成遺伝子のクローニング**○濱野 吉十¹, 山中 一也², 丸山 千登勢³
(¹福井県大生物資源, ²チッソ(株)・横浜研, ³福井大・医)

【目的】放線菌 *Streptomyces albulus* より epsilon-PL 生合成酵素を精製し、種々解析したところ、本酵素はチオテンプレート型の非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) であると予想された。そこで、本酵素遺伝子の取得を行い、epsilon-PL 生合成機構のさらなる解析を試みた。

【方法と結果】精製した epsilon-PL 生合成酵素の内部アミノ酸配列を決定し、その配列を基に PCR プライマーを設計した。*S. albulus* のゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、特異的に増幅する DNA 断片を取得することができた。得られた増幅断片をプローブとして用い、*S. albulus* のゲノムライブラリーより、epsilon-PL 生合成酵素遺伝子の全長を含む遺伝子断片を取得した。塩基配列の決定および相同検索を行ったところ、予想通り、本遺伝子産物の N 末領域は、NRPS の L-リジン・アデニル化ドメインと高い相同性を示した。しかしながら、興味深いことに、その他領域においては、NRPS で通常認められる C-domain (ペプチド合成触媒ドメイン) と TE-domain (チオエステラーゼドメイン) に相同性を示すドメインは存在しておらず、本酵素は新規のペプチド合成機構を有する NRPS であることが判明した。

Cloning and functional analysis of the epsilon-Poly-L-lysine (epsilon-PL) biosynthetic gene○Yoshimitsu HAMANO¹, Kazuya YAMANAKA²,
Chitose MARUYAMA³
(¹Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ., ²Chisso, ³Fac. Med. Sci., Fukui Uni.)**Key words** epsilon-Poly-L-lysine, *Streptomyces albulus*, NRPS**1G12-1 抗菌性ポリアミノ酸 epsilon-Poly-L-lysine (epsilon-PL) 生合成酵素の精製及び酵素学的諸性質と in vitro 合成**○山中 一也¹, 濱野 吉十²
(¹チッソ(株)・横浜研, ²福井県大生物資源)

放線菌 *Streptomyces albulus* によって生産される epsilon-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。epsilon-PL における L-リジンのイソペプチド結合は epsilon-PL の抗菌活性に極めて重要であり、それを構築する生合成酵素においては、L-リジンの「epsilon」と「alpha」位の認識機構、構成アミノ酸の基質特異性、ペプチド鎖長の決定機構の 3 点が特に興味深い。そこで epsilon-PL の生合成機構の解明を目的に生合成酵素の精製を行った。【方法と結果】epsilon-PL 合成活性を指標に、*S. albulus* の膜画分より各種クロマトグラフィーによって、epsilon-PL 生合成酵素を電気泳動的に単一に精製した。本酵素は分子量 270 kDa のホモダイマーであり、単一酵素のみで L-リジンから ATP 依存的に著量の epsilon-PL (10~20 mer) を生成した。また、L-リジン特異的なアデニル化活性も認められたことから、本酵素はチオテンプレート型の非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) であると強く示唆された。本研究は、単一酵素の触媒作用でアミノ酸ホモポリマーを *in vitro* 合成できた唯一の例である。その他の酵素学的諸性質についても併せて報告する。

Purification and characterization of the epsilon-Poly-L-lysine (epsilon-PL) biosynthetic enzyme○Kazuya YAMANAKA¹, Yoshimitsu HAMANO²
(¹Chisso, ²Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ.)**Key words** epsilon-Poly-L-lysine, *Streptomyces albulus*, NRPS**2G09-1 好アルカリ性細菌による乳酸の生産**TIMBUNTAM Walaiporn¹, 中島 健二², 常盤 豊²
(¹タイ国 カセサート大, ²産総研・生物機能)

【緒言】近年、自然界の物質循環に適合する生分解性プラスチックのニーズが高くなっている。また最近では、化石資源に替わって、再生可能なバイオマスから微生物や酵素を利用して、乳酸や 3-ヒドロキシ酪酸、コハク酸などの生分解性プラスチックの原料を生産することが期待されている。今回、藍染めに利用されているインジゴ染料の還元能を有する好アルカリ性細菌 *Alkalibacterium psychrotolerans* による乳酸の生産について検討したので報告する。

【方法】好アルカリ性細菌 *A. psychrotolerans* の培養は、5 リットル容のジャーファーマンタを用いて、pH を 10 に維持しながら 30℃で行った。培養液中の乳酸とグルコースは、高速液体クロマトグラフィーと酵素キットにより定量した。

【結果】3% のグルコースを含む基本培地に好アルカリ性細菌 *A. psychrotolerans* の前培養液をシードして培養を行ったところ、菌の増殖は、培養 8 時間後から活発になり 24 時間で最大に達した。培養液中のグルコースの減少にともなって、乳酸が徐々に蓄積した。48 時間培養した結果、消費グルコース当たり 88% の収率で濃度 21g/L の乳酸が得られた。

Production of lactic acid by an alkaliphilic bacterium.Walaiporn TIMBUNTAM¹, Kenji NAKAJIMA², 〇Yutaka TOKIWA²
(¹Kasetsart Univ. Thailand, ²IBRE, AIST)**Key words** lactic acid, alkaliphilic, indigo