

3H10-3 PCB分解菌 *Rhodococcus* sp. RHA1株のビフェニル下流代謝系酵素の解析

○黒田 直子, 飯野 藤樹, 政井 英司, 福田 雅夫
(長岡技科大・生物)

【目的】 RHA1株はビフェニル代謝系によりPCBを分解する。RHA1株では各ビフェニル代謝過程に複数のアイソザイムが関与しており、安息香酸とペンタジエン酸を生じる上流代謝系にかかわるアイソザイムが解明されている。本研究ではペンタジエン酸の代謝をになう下流代謝系酵素群 2-oxopent-4-enoate hydratase (BphE)、4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (BphF)、acetaldehyde dehydrogenase (BphG) におけるアイソザイムを解明することを目的とした。

【方法および結果】 RHA1株のゲノム配列からBphEで8つ、BphFで7つ、BphGで7つのアイソザイムを見出した。ビフェニルで生育した菌体から調製したRNAを用いてDNAアレイ解析をおこなったところ、*bphE1F1G1*、*bphE4F4*の構成的発現と、*bphE2F2*、*bphE3F3G3*、*bphG4*の転写誘導が示唆された。ビフェニル生育時に発現するこれらの遺伝子群を破壊するため、破壊用ベクターに各*bphEF*の部分配列を挿入したプラスミドをRHA1株に導入した。現在、破壊株の代謝活性を調べている。

Characterization of the enzymes for downstream biphenyl metabolic pathway in a PCB degrader *Rhodococcus* sp. RHA1

○Naoko KURODA, Touju IINO, Eiji MASAI, Masao FUKUDA
(Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Technol.)

Key words PCB, biphenyl, *Rhodococcus*, isozyme

3H10-5 *Rhodococcus* sp. PN1株の4-ニトロフェノールモノオキシゲナーゼ (NphA1) のX線結晶構造解析

○西村 崇弘¹, 柴田 直樹², 山本 健太¹, 樋口 芳樹²,
加藤 太郎¹, 武尾 正弘¹, 根来 誠司¹
(¹兵庫県大院・工・物質, ²兵庫県大院・生命理)

【目的】 4-ニトロフェノール (4-NP) は有機リン酸系殺虫剤の代謝物として土壌から検出される環境汚染物質である。我々は、4-NPの分解機構を解明するため、これまでに *Rhodococcus* sp. PN1株から4-NPを4-ニトロカテコール (4-NC) に変換する二成分系4-NPモノオキシゲナーゼの遺伝子をクローン化し、解析してきた。本研究ではこの酵素の触媒機構を解明するために直接基質の酸化に関わる酸化酵素コンポジット (NphA1) のX線構造解析を行った。【方法と結果】 NphA1を大腸菌で高発現させ、クロマトグラフィーで精製した。沈殿剤 1.25M 硫酸アンモニウム及び緩衝液 100mM MES (pH6.5) の条件で薄いひし形の結晶が得られた。SPring-8および高エネルギー加速器研究機構にて、ネイティブ結晶では分解能 1.9 Å、水銀誘導体では3.0 Åの回折データを取得し、位相を決定後、初期モデルの構築を行った。NphA1は、 α ヘリックスと β シートで構成されたN末端ドメインと長い α ヘリックスのみで構成されたC末端ドメインより成るモノマーが4量体を形成し、C末端の長い α ヘリックスが別のモノマーに接触し、ダイマー単位で構造を補強していることがわかった。DALI プログラムで構造類似性を示すタンパク質を検索したところ、4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (PDB:1U8V) が高い相同性を示し、そのフォールドも類似していた。

Crystal structural analysis of 4-nitrophenol monooxygenase oxygenase component (NphA1) of *Rhodococcus* sp. PN1

○Munehiro NISHIMURA¹, Naoki SHIBATA², Kenta YAMAMOTO¹,
Yoshiki HIGUCHI², Dai-ichiro KATO¹, Masahiro TAKEO¹,
Seiji NEGORO¹
(¹Grad. Sch. Eng. Univ. Hyogo, ²Grad. Sch. Life Sci. Hyogo)

Key words 4-nitrophenol monooxygenase, *Rhodococcus*

3H10-4 *Rhodococcus* sp. PN1株の第二の4-ニトロフェノール酸化酵素の機能解析

○山本 健太, 西村 崇弘, 加藤 太郎, 武尾 正弘, 根来 誠司
(兵庫県大院・工・物質)

【目的】 有機リン酸系農薬の土壌での分解代謝物として知られる 4-ニトロフェノール (4-NP) は、生物に対して強い毒性を示すため、その生分解性に強い関心がよせられている。我々は、4-NPの生分解機構を解明するために、*Rhodococcus* sp. PN1株から4-NPを4-ニトロカテコールに変換する2種類の二成分系4-NP酸化酵素の遺伝子 (*nphA1*, *nphA2* 及び *npsA1*, *npsA2*) のクローン化に成功し、前者については、既に純化タンパクを用いた機能の解析で一定の成果を得ている。そこで、ここでは、後者の4-NP酸化酵素の機能を解析するため、本酵素を構成する2種類のタンパクを精製し、その機能の解析を試みたので報告する。【方法及び結果】 既にPN1株からクローン化した4-NP酸化酵素遺伝子 (*npsA1*, *npsA2*) を含む6kbのDNA断片を鋳型に個々の遺伝子をPCR法で増幅し、ベクター pQE80L (Qiagen) に挿入した。得られたプラスミドを大腸菌に導入し、IPTG誘導条件下で培養して目的タンパクをHis-taggedタンパクとして発現させた。次に、細胞抽出液を調製し、アフィニティークロマトグラフィーで目的タンパクを精製した。両遺伝子産物は大量発現したが不溶化したため、8M尿素で変性させた後リフォールディングして精製を試みた。その結果、精製したHis-NpsA2はFADの存在下でNADHを酸化する活性を示し、その機能をHis-NpsA1へ電子を供給する電子伝達タンパクと推定した。一方、酸化酵素成分と推定されるHis-NpsA1は、変性剤濃度が低下した条件で再不溶化して沈殿するため、現在、可溶性条件を検討している。

Functional analysis of the second 4-nitrophenol hydroxylase of *Rhodococcus* sp. PN1

○Kenta YAMAMOTO, Munehiro NISHIMURA, Dai-ichiro KATO,
Masahiro TAKEO, Seiji NEGORO
(Grad. Sch. Eng. Univ. Hyogo)

Key words 4-nitrophenol, *Rhodococcus*, hydroxylase

3H11-1 CO₂依存性生育を示す *Rhodococcus erythropolis* N9T-4株のアルデヒド脱水素酵素遺伝子の破壊

○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】 原油から単離された *Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は炭素源を含まない無機塩最少寒天培地上で良好に生育するが、CO₂制限下では生育せず、本菌はCO₂依存的な低栄養性生育を示す。プロテオーム解析の結果から、現在までに無機塩培地上で生育させた時に誘導されるタンパク質を同定し、そのうちの一つ、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) はNADを補酵素とし、ホルムアルデヒドに活性を示すことを明らかにしている。今回はALDH遺伝子 (*ald*) 破壊株を作製し、機能解析を行った。

【方法および結果】 各種培地でN9T-4株を培養し、その無細胞抽出液のALDH活性を測定したところ、栄養豊富な完全培地では活性が低く、炭素源無添加の無機塩培地で最も活性が高かったことからALDHは低栄養性生育に関与していることが示唆された。さらにカナマイシン耐性遺伝子を挿入した*ald*破壊用カセットを用いて、エレクトロポレーションによりN9T-4株を形質転換した。その結果、4株の*ald*破壊株が得られ、これらの株は無機塩最少寒天培地では生育できなかったことから、ALDHがCO₂依存的な生育に関与することが示唆された。

Gene disruption of an aldehyde dehydrogenase of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 that show CO₂-dependent growth

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

Key words *Rhodococcus erythropolis*, aldehyde dehydrogenase, carbon dioxide, oligotroph