

2Ca08 *Pseudomonas aeruginosa* ME-4 由来卵殻膜分解酵素の遺伝子クローニングと発現

○竹中 慎治, 羽野 晋平, 芦田 均, 吉田 健一
(神戸大院・農・生命機能)
hakko3@kobe-u.ac.jp

【目的】卵殻膜の有効利用を図るため、これまでに *P. aeruginosa* ME-4 の生産する卵殻膜分解酵素（金属プロテアーゼ）の精製および性質と同酵素による卵殻膜の分解・可溶化について報告してきた。本報では、同遺伝子のクローニングと大腸菌での発現および卵殻膜分解物の分画について述べる。

【方法および結果】同酵素の N 末端アミノ酸配列（15 アミノ酸残基）は、*P. aeruginosa* 由来金属プロテアーゼと高い類似性を示した。同遺伝子をクローニングし、塩基配列から推定されるアミノ酸配列について既報の類縁酵素遺伝子を参考に解析した結果、ブレブロ配列をコードする領域を含む 1,494 bp から成る ORF を見出した。相同性検索の結果、*P. aeruginosa* 由来金属プロテアーゼ（耐有機溶媒性エラスターゼ）と高い類似性が見られた。同遺伝子を pET11a ベクターに導入し、大腸菌 BL21(DE3) を使って発現実験を行った。細胞抽出液はほとんど活性を示さなかったが、同抽出液を有機溶媒処理したところ、活性体を得ることができた。また、同時に宿主由来タンパク質を変性沈殿させることができ、酵素精製のステップを簡略化できた。親株および形質転換株由来精製酵素の特性を比較したところ、卵殻膜やエラスチンに対する活性や耐有機溶媒性等、類似していた。現在、組み換え酵素を用いた卵殻膜分解に与える因子の影響や生じた可溶性ペプチドの分画条件を検討している。なお、本研究の一部は、財団法人旗影会平成 24 年度研究助成により行った。文献：Cheng et al., J. Biosci. Bioeng. 107:373-378 (2009)；Takenaka et al., Biotechnol. Lett. 34:949-955 (2012)。

Gene cloning and expression of eggshell membrane degrading enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* ME-4

○Shinji Takenaka, Shinpei Hano, Hitoshi Ashida, Ken-Ichi Yoshida
(Grad. Sch. Agric.)

Key words eggshell membrane, *Pseudomonas aeruginosa*, metalloprotease

2Ca10 酢酸菌膜結合型ヘテロ三量体ソルビトール脱水素酵素の分子構築過程における小サブユニットの役割

○薬師 寿治¹, 有常 真由美¹, Soemphol Wichai², 外山 博英³, 松下一信¹
(¹山口大・農, ²コンケン大, ³琉球大・農)
juji@yamaguchi-u.ac.jp

【はじめに】酢酸菌は強い酸化能力を持ち、ビタミン C 生産の要であるソルビトールからのソルボース発酵などに利用される。細胞の外側でこの反応を触媒する FAD 依存の膜結合型ヘテロ三量体のソルビトール脱水素酵素 (SLDH) は、フラボプロテイン脱水素酵素である SldL (L), チトクロム *c* の SldC (C), 小サブユニット SldS (S) から構成される。Yamaoka らは *Burkholderia cepacia* 由来の膜結合型ヘテロ三量体フラボプロテイン・グルコース脱水素酵素 (BcGDH) を用い、S が L の安定化と輸送の両方の役割を持つことを示した。また、S の輸送シグナル配列を欠いただけの変異体でも L が形成されなかったため、S の輸送シグナル配列も L の成熟化などに関わることを示唆する。【結果と考察】私たちは、*Gluconobacter frateurii* THD32 株から *sldSLC* 遺伝子をクローニングし、SldS と SldL, SldL のみ、SldL に SldS のシグナル配列を融合させた変異体 SldL のみ、輸送シグナル配列を欠いた SldS と野生型 SldL (Δ SS-SldS/SldL), これらを発現する 4 種のプラスミドを構築した。大腸菌での発現を試みたところ、SldS/SldL と Δ SS-SldS/SldL の 2 種が活性を示した。すなわち、細胞質で機能を持つと考えられる SldS/SldL を発現させることができた。この結果は、SldS と SldL が細胞質での成熟化を経た後に外側に輸送されるという分子構築過程を支持する。

Role of the small subunit SldS in molecular maturation process of the membrane-bound heterotrimeric sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter* sp.

○Toshiharu Yakushi¹, Mayumi Aritsune¹, Wichai Soemphol², Hirohide Toyama³, Kazunobu Matsushita¹
(¹Fac. Agr., Yamaguchi Univ., ²Khon Kaen Univ., ³Fac. Agr., Univ. Ryukyus)

Key words acetic acid bacteria, twin Arg translocation, flavoprotein, molecular chaperone

2Ca09 *Bacillus subtilis* FP-133 由来耐塩性菌体外アミラーゼの精製と特性解析

○宮武 彩香, 竹中 慎治, 吉田 健一
(神戸大院・農・生命機能)
spf65yk9@ivy.ocn.ne.jp

【目的】発酵食品の製造は塩存在下で行われることが多く、製造の過程で塩濃度が増加していくため、低塩濃度から中等度の塩濃度において構造を維持し、同程度の活性を維持する酵素は産業用酵素として有用であると言える。さらに、菌体外酵素の耐塩性機構や要因が明らかになれば、遺伝子改変による耐塩性の付与や耐塩性酵素の産業利用に繋がると期待される。当研究室ではこれまでに、*Bacillus subtilis* FP-133 由来耐塩性菌体外プロテアーゼについて、一次構造から推定される高次構造からの耐塩性機構について報告した。¹⁾ 本研究では、*B. subtilis* FP-133 由来耐塩性菌体外アミラーゼ I および II を精製し、その特性を明らかにしたので結果を報告する。

【方法】2.5% 可溶性デンプン、5.0% NaCl を含む培地で培養後、培養上清を脱塩してから DE52 カラムクロマトグラフィーに供し、精製酵素を得た。酵素活性は可溶性デンプンを基質とし 3,5-DNS 法で還元糖を定量することで測定した。

【結果】FP-133 株は 2 種類のアミラーゼ I および II を生合成しており、耐塩性を調べたところ、アミラーゼ I が II よりも優れた耐塩性を有していることが明らかとなった。培養期間が短いほどアミラーゼ II の総活性が多く、逆に培養期間が長くなるとアミラーゼ I の総活性が多くなった。両酵素の N 末端アミノ酸配列 15 残基を解析したところ、完全に一致し、既報の *Bacillus* 属由来 α -アミラーゼの N 末端アミノ酸配列と高い類似性を示した。それぞれのアミラーゼの分子質量は、SDS-PAGE により 56 kDa (アミラーゼ I)、65 kDa (アミラーゼ II) であった。1) Takenaka et al., *Biosci Biotech. Biochem.* 75:148-51 (2011)

Purification and characterization of halotolerant amylases from *Bacillus subtilis* FP-133

○Ayaka Miyatake, Shinji Takenaka, Ken-Ichi Yoshida
(Grad. S. Agric.)

Key words halotolerant amylase, *Bacillus subtilis*, α -amylase

2Ca11 *Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の機能解析

○小林 豊和, 川上 和延, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
(長岡技科大)
katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) 等の含塩素有機リン酸トリエステル類は難燃剤等として広く利用されてきた。一方で、物理化学的に安定であることや種々の毒性を示すことから、環境中に浸出した TDCPP の生態系への影響が懸念されている。これまで我々は、TDCPP 分解能を有する *Sphingomonas* sp. TDK1 株を単離し、その初発分解酵素の特徴解析・クローニングを行ってきた。本酵素はこれまで分解報告のないハロアルキル系有機リン化合物への基質特異性を示したことから、我々はハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素 (dHAD) と名付けた。本研究では、TDK1 株における TDCPP 分解機構のさらなる詳細を明らかにするため、dHAD の発現条件と細胞内局在性に関する検討を行なった。

【方法及び結果】種々のリン源及びリン濃度で培養した菌体の TDCPP 分解活性を測定することで、dHAD の誘導発現条件についての検討を行なった。その結果、本酵素活性は高濃度無機リン酸の存在下において抑制され、リン源の枯渇と同時にその活性が増加することが明らかになった。次に、dHAD 中のシグナルペプチドの存在を確認するため、精製酵素の N 末端アミノ酸配列解析を行った。その結果、本酵素は切断を受け、切断後の N 末端グルタミン残基がピログルタミル化されていることが明らかになった。更に、シグナルペプチドの推定を行なったところ、dHAD はこれまでの有機リン酸加水分解酵素とは異なり Sec 経路を経由して、ペリプラズムに移行する可能性が示された。

Functional analysis of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingomonas* sp. TDK1

○Toyokazu Kobayashi, Kazunobu Kawakami, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words organophosphate, tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate, organophosphorus hydrolase, *Sphingomonas*