

2Ca12 Sphingobium sp. TCM1 株におけるハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の特徴解析

○樺澤 貴宏, 間島 亮介, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
(長岡技術大)
katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】 Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) 等のハロアルキルリン系化合物は難燃剤等として広く利用されてきた。しかしそれらはヒトを含む生物に対し種々の毒性を示し、本化合物の微生物分解に関する報告もなされていなかった。これまで我々は、TCEP分解能を有する *Sphingobium sp. TCM1* 株の TCEP 初発分解酵素 (ハロアルキルリン酸加水分解酵素, cHAD) の諸特性解析を行い、本酵素が既知の有機リン加水分解酵素とは異なる特性を持つ新規の酵素である可能性を示した。本研究では、cHAD のさらなる特徴を明らかにする事を目的とし、本酵素の菌体内における発現条件の解析と N 末端アミノ酸配列に関する解析を行った。

【方法・結果】 リン源の種類や濃度の異なる培地で培養した TCM1 株の TCEP 分解活性を測定することで cHAD の発現条件を検討した。その結果、本酵素は 20 μM TCEP または無機リンをリン源とした場合には活性に差は認められず、1 mM 無機リン存在下で培養した場合にのみその活性が抑制された。次に、本酵素の N 末端配列解析を行ったところ、推定アミノ酸配列の N 末端から 88 番目のアミノ酸で始まる配列と一致し、さらに、その成熟酵素の N 末端グルタミン残基はピログルタミル化していることが明らかになった。本酵素が TCM1 株内でプロセッシングを受けている可能性が示唆されたことから、シグナルペプチドの推定を行なったところ、本酵素は既知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している可能性が示唆された。

Functional characterization of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingobium sp. TCM1*

○Takahiro Kabasawa, Ryousuke Majima, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words organophosphorus compounds, organophosphorus hydrolase, tris (2-chloroethyl) phosphate, *Sphingobium*

2Ca14 Pseudomonas sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼをコードする遺伝子の大腸菌における異種発現

○油原 かほり, 米原 広海, 小林 慶一, 本田 裕樹, 服部 貴澄,
桐村 光太郎
(早大・理工・応化)
kkohtaro@waseda.jp

【目的】 アコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7) は、植物や *Pseudomonas* 属等の微生物に存在し、*cis*-アコニット酸と *trans*-アコニット酸の異性化反応を触媒する酵素である。*trans*-アコニット酸は機能的な高分子原料としての利用が期待される有機酸で、バイオプロセスによる生産が期待される。本研究では、*Pseudomonas sp. WU-0701* 由来アコニット酸イソメラーゼの遺伝子クローニングおよび大腸菌における異種発現を行った。

【方法および結果】 クエン酸を唯一の炭素源として利用可能な細菌として土壌より単離した *Pseudomonas sp. WU-0701* の細胞内にアコニット酸イソメラーゼ活性を検出した [1]。当該細菌の無細胞抽出液からアコニット酸イソメラーゼを比活性として 305 倍に精製した。精製酵素はゲル濾過と SDS-PAGE で分子量約 25 kDa であり、単量体の酵素と推定された。さらに、精製酵素の N 末端アミノ酸配列に基づいてアコニット酸イソメラーゼをコードする 786 bp の遺伝子をクローニングした。当該遺伝子が大腸菌で高発現させ、組換え酵素を活性のある可溶性タンパク質として取得した。組換え酵素については、*cis*-アコニット酸を基質とする *in vitro* 反応により、最適 pH 6.0、最適反応温度 37℃ と決定され、精製酵素と同一の酵素の性質を示した。

[1] 米原, 他, 2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 講演番号 3C23a09(2012).

Heterologous Expression in *Escherichia coli* of Gene Encoding Aconitate Isomerase from *Pseudomonas sp. WU-0701*

○Kahori Yuhara, Hiromi Yonehara, Keiichi Kobayashi, Yuki Honda, Takasumi Hattori, Kohtarō Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words aconitate isomerase, citric acid, gene expression, *Pseudomonas sp.*

2Ca13 クエン酸生産系細菌 *Aspergillus niger* におけるメチルクエン酸シンターゼの検出と機能解析

○小林 慶一, 本田 裕樹, 桐村 光太郎
(早大・理工・応化)
kkohtaro@waseda.jp

【目的】 Methylcitrate synthase (MCS) はメチルクエン酸回路の鍵酵素であり、真菌におけるプロピオン酸代謝に必須な酵素である。MCS はプロピオン-CoA とオキサロ酢酸の縮合によりメチルクエン酸を生成する MCS 活性を示す一方で、アセチル-CoA とオキサロ酢酸の縮合によりクエン酸を生成する citrate synthase (CS) 活性を示す可能性がある。しかし、糸状菌 *A. niger* 由来 MCS の機能やその遺伝子についての報告はなかった。本研究では、クエン酸生産系糸状菌 *A. niger* WU-2223L [1, 2] に MCS を検出し、MCS をコードする遺伝子をクローニングして利用することによりプロピオン酸代謝への MCS の寄与を明らかにした。【方法および結果】 *A. niger* CBS 513.88 由来の MCS ホモログ遺伝子 (ANI_1226134) の配列を参考に、*A. niger* WU-2223L 由来 MCS ホモログ遺伝子 (*mcsA*) をクローニングし、大腸菌で発現させた。精製した組換え MCS は 27.6 U/mg の MCS 活性、26.8 U/mg の CS 活性を示し、*A. niger* WU-2223L 由来の約 1.5 kb の *mcsA* が MCS をコードしており、当該 MCS が MCS 活性だけでなく CS 活性も示すことを明らかにした。また、*A. niger* における MCS の機能検証を目的として、*A. niger* WU-2223L 由来 *mcsA* 破壊株 (D4-1) を作製した。プロピオン酸炭素源とする条件下で親株 WU-2223L は生育したが、D4-1 は生育しなかったことから、*A. niger* においては MCS がプロピオン酸代謝に必須な酵素であることを明らかにした。

[1] Y. Honda, et al., J. Biosci. Bioeng., 113, 338-342 (2012).

[2] Y. Honda, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 1594-1596 (2011).

Detection and Functional Analysis of Methylcitrate Synthase in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*

○Keiichi Kobayashi, Yuki Honda, Kohtarō Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words *Aspergillus niger*, citric acid production, methylcitrate synthase, propionate metabolism

2Ca15 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の新規なチオ硫酸デヒドロゲナーゼの性質

○上村 一雄¹, 菊本 愛生¹, 野上 翔平¹, 高田 潤², 金尾 忠芳¹
(¹岡山大院・環境生命, ²岡山大院・自然科学)
kamimura@cc.okayama-u.ac.jp

【目的】 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二価鉄および還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源として生育する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌は、低品位の硫化鉱石から銅などの金属イオンを溶出させる技術であるバクテリアリーチングにおいて重要な役割を演じる。硫化鉱石の硫黄成分は、チオ硫酸を介して硫酸へ酸化されると考えられている。これまでに、Sox システムやチオ硫酸：キノン酸化還元酵素 (TQO) が関与する経路などが、チオ硫酸代謝経路として報告されているが、これらのチオ硫酸代謝系でキーとなる酵素の遺伝子は、本菌のゲノム中には存在しない。そこで本研究では、テトラチオン酸を反応生成物として生じるチオ硫酸デヒドロゲナーゼ (TSD) の解析を行った。【方法・結果】 TSD 活性は、フェリシアナイドを電子受容体に用いて測定した。テトラチオン酸で生育した細胞の可溶性画分から、酵素をほぼ均一に精製した。無細胞抽出液の酵素は、その活性発現に硫酸イオンを要求したが、精製酵素では硫酸イオン要求性が低下していた。精製酵素の N-末端アミノ酸配列から同定された遺伝子 (*tsd*) は、その下流に硫酸結合タンパク質、TQO ホモログ、ロダネース様タンパク質をそれぞれコードする遺伝子を持っており、TSD は本菌のチオ硫酸代謝に密接に関連している酵素であることが示唆された。大腸菌で発現させた *tsd* 遺伝子産物は、TSD 活性を示した。

Characterization of a novel thiosulfate dehydrogenase from tetrathionate-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○Kazuo Kamimura¹, Mei Kikumoto¹, Shohei Nogami¹, Jun Takada², Tadayoshi Kanao¹
(¹Div. Environ. Life Sci., Okayama Univ., ²Div. Chem. Biol. Technol., Okayama Univ.)

Key words thiosulfate dehydrogenase, acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*