

2Cp14 メタゲノム法により単離した枝葉コンポスト由来新規エステルゼの研究

○岡野 啓志, Hong Xun, 大和 紗耶, 金谷 栄子, You Dong-Ju, Angkawidjaja Clement, 古賀 雄一, 金谷 茂則
(阪大院・工・生命先端)
kanaya@mls.eng.osaka-u.ac.jp

メタゲノム法は環境中から微生物の単離を介さずに微生物由来のゲノムDNAを直接抽出し遺伝子資源を解析する手法であり、従来の手法より効率よく新規酵素を取得できる。吹田市万博記念公園では、剪定した樹木の枝葉を集積し、尿素的添加や通気攪拌により発酵させることによりコンポスト化している。このコンポストは多種多様な好熱性微生物の宝庫と考えられる。そこでこのコンポストからメタゲノムDNAを抽出し、宿主大腸菌とフォスミドベクターを用いて21,000個のクローンからなるメタゲノムDNAライブラリーを構築した。次いでエステルゼ活性検出用培地であるトリブチリンプレートを用いて、50℃でハローを形成するクローンを取得した。配列分析の結果、このクローンは既存のファミリーに属さない新規エステルゼ (LCE1) をコードする遺伝子を有していた。LCE1は485残基から成る分泌タンパク質で*S. usitatus* 由来 putative esterase と61%の相同性を示す。LCE1はNドメイン (Gln26-Phe283) とCドメイン (Gln284-Lys510) から成る。Cドメインは様々なエステルゼと高い相同性を示すことから触媒ドメインと考えられる。一方、Nドメインが高い相同性を示すのは*S. usitatus* 由来 putative esterase だけで、その構造や機能は未知である。そこでLCE1とその2つのドメインの諸特性解析や構造解析を進めることにより、本酵素の持つ機能の解明に努めている。

Study of novel metagenome-derived esterase from leaf-and-branch compost

○Hiroyuki Okano, Xun Hong, Saya Yamato, Eiko Kanaya, Dong-Ju You, Clement Angkawidjaja, Yuichi Koga, Shigenori Kanaya
(Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

Key words esterase, compost, metagenomic libraries, domain structure

2Cp16 好熱性糸状菌からのFAD依存型グルコース脱水素酵素遺伝子の探索

○小澤 一道, 佐々木 典子, 木下 菜央, 平塚 淳典, 横山 憲二
(産総研・ナノシステム)
kzmc-ozawa@aist.go.jp

【目的】フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素 (FADGDH, EC 1.1.99.10) は、FADを補酵素としてグルコースからD-グルコノ-1,5-ラクトンへの酸化反応を触媒する酵素であり、*Aspergillus oryzae*や*Aspergillus terreus* といった常温性糸状菌から発見されている。本研究では常温性糸状菌由来FADGDHよりも耐熱性に優れたFADGDHの取得を目的として、好熱性糸状菌からのFADGDH遺伝子のスクリーニングとクローニングを行なった。
【方法と結果】(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) から17種の好熱性糸状菌を購入し、スクリーニング対象種とした。既報のFADGDHの一次構造に基づいて設計した縮重プライマーを用いて好熱性糸状菌ゲノムDNAを鋳型とする縮重PCRを試みたところ、*Talaromyces emersonii* NBRC31232と*Thermoascus crustaceus* NBRC9129の2種の好熱性糸状菌から*Aspergillus*属糸状菌由来FADGDH遺伝子と高い相同性を有する遺伝子断片の増幅が確認された。このことから、*Ta. emersonii*と*Th. crustaceus*のゲノムにFADGDH遺伝子が存在することが示唆された。次に、増幅された遺伝子断片をプローブとして*Ta. emersonii*と*Th. crustaceus*のそれぞれからFADGDH全領域を包括するゲノムDNA断片のクローニングを行なった。塩基配列解析の結果、いずれのFADGDH遺伝子も4つのエクソンから構成されることが明らかとなった。

Screening of FAD-dependent glucose dehydrogenase gene from thermophilic fungi

○Kazumichi Ozawa, Noriko Sasaki, Nao Kinoshita, Atsunori Hiratsuka, Kenji Yokoyama
(NRI, AIST)

Key words glucose dehydrogenase, filamentous fungi, screening, gene cloning

2Cp15 超好熱菌アーキア *Thermoproteus tenax* 由来D-乳酸脱水素酵素の機能解析

○大井 愛実¹, 里村 武範¹, 櫻庭 春彦², 大島 敏久³, 末 信一朗¹
(¹福井大院・工・生化,²香川大・農・応生,³九大院・農・遺資工)
suyeb10@u-fukui.ac.jp

【背景・目的】色素依存性D-乳酸脱水素酵素 (Dye-DLDH) は、FADを補酵素とし、2,6ジクロロインドフェノールなどの人工の酸化還元色素を電子受容体として、D-乳酸の酸化反応を触媒する。本酵素は、これらの酸化還元色素を介して、D-乳酸と電極との電子授受が可能であるため、D-乳酸を電気化学的に簡便に検出できるバイオセンサー用素子としての利用が期待される。しかし、これらの酵素の多くは、不安定であり、構造解析などの酵素化学的性質の解析も進んでいない。そこで、Dye-DLDHの詳細な解析を進めるために、新規Dye-DLDHの探索と立体構造解析を行うことを目的として研究を行った。
【方法・結果】超好熱菌のゲノム情報よりDye-DLDHをコードしていると考えられるORFを探索した。その結果、超好熱菌アーキアである*Thermoproteus tenax*のゲノム上にDye-DLDHをコードすると考えられるORF (TTX_0794, TTX_1317) を見出すことに成功した。そこで、これらORFについて大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行った。TTX_0794の発現タンパク質を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、活性染色を行ったところ、Dye-DLDH活性の検出に成功した。現在、本酵素の詳細な酵素化学的性質の解析、結晶化条件の検討を行っている。

Functional analysis of D-lactate dehydrogenase from the hyperthermophile archaea *Thermoproteus tenax*

○Manami Oi¹, Takenori Satomura¹, Haruhiko Sakuraba², Toshihisa Oshima³, Shin-ichiro Suye¹
(¹Dept. Biotechnol., Univ. Fukui, ²Dept. Appl. Biol. Sci., Kagawa Univ., ³Dept. Gen. Eng., Kyushu Univ.)

Key words D-lactate dehydrogenase, archaea

2Cp17 ゲノム情報を元にした耐熱性色素依存性脱水素酵素の探索と機能解析

○石倉 優¹, 里村 武範¹, 櫻庭 春彦², 大島 敏久³, 末 信一朗¹
(¹福井大院・工・生化,²香川大・農・応生,³九大院・農・遺資工)
satomura@u-fukui.ac.jp

【目的】色素依存性脱水素酵素 (Dye-DH) は2,6-ジクロロインドフェノールなどの人工の酸化還元色素を電子受容体としアミノ酸、有機酸、糖などの酸化反応を触媒する酵素である。Dye-DHはこの人工酸化還元色素を介して基質の電子を電極へ導入することが可能であり、電気化学的バイオセンサのための素子やバイオマス等の生体物質を起電力とするバイオ電池用素子としての利用が期待されている。しかし、従来から研究されてきた常温生物由来のDye-DHは総じて不安定であり機能性素子としての応用例はほとんどない。近年、好熱菌から安定性の高いDye-DHが見出され、酵素機能電極用素子として注目を集めている。しかし、現在までに好熱菌由来酵素の報告例は少なく、本酵素の応用利用の律速となっている。そこで、本研究では明らかとなっている好熱菌ゲノム情報よりDye-DHをコードするORFを検索し、機能解析を行うことによって新規反応を触媒するDye-DHを見出すことを目的として研究を行った。
【実験方法及び結果】好熱菌*Pyrobaculum calidifontis*、*Thermoproteus tenax*、*Rhodothermus marinus*の3菌株のゲノム情報からDye-DH補酵素であるFAD結合モチーフを持つORFを検索しDye-DH候補を抽出した。抽出したDye-DH候補のクローニングを行い大腸菌により発現させ酵素活性の測定、結晶構造解析を行うことによって酵素の機能解析を行った。その結果、3種類の新規反応を触媒するDye-DHを見出すことに成功した。

Screening and functional analysis of novel dye-linked dehydrogenases from thermophiles

○Masaru Ishikura¹, Takenori Satomura¹, Haruhiko Sakuraba², Toshihisa Oshima³, Shin-ichiro Suye¹
(¹Dept. Biotechnol., Fukui Univ., ²Dept. Appl. Biol. Sci., Kagawa Univ., ³Dept. Gen. Eng., Kyushu Univ.)

Key words thermophile, thermostable enzyme, dye-linked dehydrogenase, biosensor