

**2Cp26** **ビフィズス菌由来ガラクトキナーゼのL-アラビノキナーゼへの変換**

○西本 完, 北岡 本光  
(農研機構 食総研)  
manishi@affrc.go.jp

【目的】ガラクトキナーゼはガラクトースとATPを基質としてガラクトース-1-リン酸およびADPを生成する酵素であり、ガラクトース代謝の初発酵素、ガラクトース血症の原因酵素として古くから研究されている。一方、ガラクトースの5位ヒドロキシメチル基が欠如したL-アラビノースを基質とし、L-アラビノース1-リン酸を生成するL-アラビノキナーゼも報告されているが、その起源は植物であり、分子量も大きく、微生物を用いた異種宿主発現は困難である。糖-1-リン酸は糖スクレオチドを合成する糖転移酵素の基質であり、糖鎖を酵素合成する上でも重要な化合物であるが、試薬として非常に高価である。そのため、様々な糖-1-リン酸の酵素合成が容易になれば、糖鎖研究の進展に大きく貢献できるだろう。そこで我々はガラクトキナーゼに着目し、その基質特異性を変換することでL-アラビノキナーゼの作出を試みた。【方法および結果】アミノ酸配列が公開されているシロイヌナズナ由来L-アラビノキナーゼおよびビフィズス菌由来ガラクトキナーゼはアミノ酸配列レベルで24%の同一性がある。ただし、ガラクトキナーゼにおいてガラクトースの6位の水酸基と水素結合しているGlu46がL-アラビノキナーゼではGlyに、また、Glu46と水素結合しているAsn42がAspという違いが見られた。そこでこれらの置換を導入したガラクトキナーゼ変異体をそれぞれ作製し、それらの酵素活性を調べた。その結果、ガラクトースに対する活性は大幅に低下したものの、E46G変異酵素においてL-アラビノースを基質としたときに新たな生成物が認められた。NMR解析の結果、本生成物はL-アラビノピラノース-1-リン酸であることが確認された。現在、変異酵素の速度論解析を行っている。

**Conversion to L-arabinokinase from galactokinase**

○Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka  
(Natl. Food Res. Inst., NARO)

**Key words** galactokinase, L-arabinokinase

**2Cp27** **膜結合型脂肪酸不飽和化酵素の精製**

○渡邊 研志, 大野 洵, 秋 庸裕  
(広島大院・先端・生命機能)  
aki@hiroshima-u.ac.jp

【目的】不飽和化酵素ファミリーは高度不飽和脂肪酸など構造及び機能的に多様な脂肪酸分子の生合成を司る重要な酵素群である。しかし、それらの多くは小胞体膜に局在しており、活性型酵素の精製が困難であったことから、反応機構や基質特異性、修飾位置選択性を規定する構造基盤は解明されていない。これまでに、互いに相同性は高いが、厳格に排他的な基質特異性を示すラット肝Δ6及びΔ5不飽和化酵素 (D6d及びD5d) をモデルとして、野生型D6dに対して部位特異的にD5d型のアミノ酸残基に変異させ、その基質変換能を解析することで基質識別に関与する複数のアミノ酸残基を特定した。その構造基盤を明らかにするため、本研究ではまず、D6dの精製法を確立することを目的とした。【方法・結果】D6d遺伝子にアフィニティタグ遺伝子を付加して発現ベクターに組み込み、メタノール質化酵母 *Pichia pastoris* へ導入した結果、リノール酸をγ-リノレン酸に変換する活性型D6dの発現が認められた。小胞体膜に局在するD6dを溶解するため、D6d発現細胞の破碎液を超速心分離して沈殿に得られたミクロソーム画分に各種界面活性剤を種々の濃度となるように加えて再度超速心分離を行った。上清に得られた可溶性D6d画分をアフィニティタグを介した精製に供したところ、CBB染色においてD6dがほぼ単一のバンドとして認められ、ウェスタンブロット解析でも陽性であった。現在、D6d結晶化に向けた更なる精製方法の検討を行なっている。

**Purification of membrane-bound fatty acid desaturase**

○Kenshi Watanabe, Makoto Ohno, Tsunehiro Aki  
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** fatty acid desaturase, yeast expression, structure-function relationship

**2Da01** ***Rhodococcus jostii* RHA1株の2,6-ジヒドロキシ安息香酸代謝酵素遺伝子群の解析**

○本井 広太, 並井 大輔, 荒木 直人, 政井 英司, 福田 雅夫  
(長岡技科大・生物)  
dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp

医薬品合成の原料である2,6-ジヒドロキシ安息香酸 (26DHBA) を化学的に合成する場合、構造異性体が副産物として生じることから、26DHBA デカルボキシラーゼの逆反応を利用した選択的26DHBA生産系の確立が望まれている。*Rhodococcus jostii* RHA1株は、26DHBAを唯一の炭素源・エネルギー源として生育するが、その代謝系は明らかにされていない。本研究では、26DHBA生産への26DHBA デカルボキシラーゼの利用を目指し、RHA1株の26DHBA代謝酵素遺伝子群の機能解析を行うことを目的とした。

RHA1株のゲノム配列を解析した結果、26DHBA代謝に関与すると考えられる26DHBA デカルボキシラーゼ (TsdA)、レゾルシノール4-ヒドロキシラーゼ (TsdB)、ヒドロキシキノール1,2-ジオキシゲナーゼ (TsdC)、マレイル酢酸レダクターゼ (TsdD)、IcR型転写制御因子 (TsdR)、MFSトランスポーター (TsdT)、および推定したヒドロラーゼ (TsdX) をコードする *tsd* 遺伝子群が見出された。逆転写PCR解析から、本遺伝子群は26DHBA生育時に転写誘導される *tsdBADC* および *tsdTX* オペロンと *tsdR* の3つの転写単位で構成されることが示された。遺伝子破壊株の解析から、*tsdA*、*tsdB*、および *tsdT* はそれぞれ26DHBA生育に必須であること、*tsd* 遺伝子群の転写はTsdRにより負に制御されることが明らかとなった。また大腸菌組換え体粗酵素の解析から、*tsdA* は26DHBA デカルボキシラーゼをコードし、*tsdC* および *tsdD* はそれぞれ26DHBA代謝中間体であるヒドロキシキノールからβ-ケトアジピン酸への変換に関与することが示された。

**Characterization of 2,6-dihydroxybenzoate catabolic pathway genes of *Rhodococcus jostii* RHA1**

○Kota Motoi, Daisuke Kasai, Naoto Araki, Eiji Masai, Masao Fukuda  
(Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

**Key words** 2, 6-dihydroxybenzoate, 2, 6-dihydroxybenzoate catabolic pathway, *Rhodococcus*

**2Da02** ***Rhodococcus erythropolis* IAM1399のヒ素耐性遺伝子群の解析**

○平田 一真<sup>1</sup>, 中野 渡 優<sup>2</sup>, 福田 雅夫<sup>3</sup>, 遠藤 銀朗<sup>2</sup>, 宮内 啓介<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東北学院大院・工・環境建設, <sup>2</sup>東北学院大・工・環境建設, <sup>3</sup>長岡技科大・工・生物)  
kmiya@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

ヒ素による環境汚染は地球規模で大きな環境問題になっている。本研究では、微生物を利用した生物学的なヒ素汚染浄化技術の開発を目的として研究を進めている。*Rhodococcus erythropolis* IAM1399は、当研究室で *Rhodococcus* 属細菌の宿主として用いている細菌であり、同じ *Rhodococcus* 属である *Rhodococcus jostii* RHA1 と比べて非常に高いヒ素耐性を示す。また、IAM1399は既知のヒ素耐性遺伝子群と相同性をもつ領域を2種類 (*ars1*、*ars2* 領域) もつことがこれまでの研究で明らかになっている。本研究ではIAM1399のヒ素耐性機構を解明するために、まず相同組換えを用いてIAM1399の *ars1* 領域を欠失させた。複数の候補株を得た後、それらの *ars1* 領域が欠失されたことをPCR及びサザン解析で確認し、得られた株をΔ*ars1* 株とした。IAM1399株またはΔ*ars1* 株のヒ素存在下での生育を調べた結果、Δ*ars1* 株はヒ素耐性を失わなかった。このことから *ars1* 領域がヒ素耐性に関与していない可能性、及び *ars1* 領域と *ars2* 領域が共にヒ素耐性に関与しており、どちらか一方が存在していれば十分である可能性が考えられた。また、Δ*ars1* 株に *ars1* 領域を導入した株を作製しそのヒ素耐性を調べたところ、ヒ素耐性は野生株であるIAM1399より高くなった。以上のことから、*ars1*、*ars2* 領域は共にIAM1399中でヒ素耐性に関与している事が示唆された。

**Characterization of arsenic resistance gene clusters in *Rhodococcus erythropolis* IAM1399**

○Kazuma Hirata<sup>1</sup>, Yu Nakanowatari<sup>2</sup>, Masao Fukuda<sup>3</sup>, Ginro Endo<sup>2</sup>, Keisuke Miyauchi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Civil Environ. Eng., Tohoku Gakuin Univ., <sup>2</sup>Dept. Civil Environ. Eng., Tohoku Gakuin Univ., <sup>3</sup>Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

**Key words** arsenic, *Rhodococcus*