

3Cp21 進化分子工学を用いた3-キヌクリジノン還元酵素の改良

○浦野 信行¹, 永井 貴大², 熊代 祥子², 清水 昌³, 片岡 道彦¹
 (¹阪府大院・生環科・応生科, ²京大院・農・応用生命, ³京都学園大・バイオ)
 kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp

【目的】*Rhodotorula rubra*由来3-キヌクリジノン還元酵素 (RrQR) は、NADPHを補酵素として3-キヌクリジノンを(R)-3-キヌクリジノールへ立体選択的に変換する酵素である。我々はこれまでにRrQRの立体構造と補酵素との結合様式を基に補酵素特異性の変換を試み、NADH要求性変異酵素を創出することに成功した。しかしながら得られた変異酵素のNADH依存性キヌクリジノン還元活性は、野生型酵素のNADPH依存性還元活性と比較して数%程度に低下していた。そこで本研究では、NADH依存型RrQR変異酵素遺伝子にランダム変異を導入することにより、酵素活性の上昇した変異酵素の取得を試みた。

【方法・結果】本酵素遺伝子にError-prone PCRを利用してランダム変異を導入し、大腸菌内で発現させ、酵素活性の上昇した変異酵素のスクリーニングを行った。その結果、反応性が上昇した変異酵素を1種取得することに成功した。変異酵素遺伝子の配列を解析したところ、アミノ酸置換はN173Iの1か所で確認された。変異酵素は親酵素に比べて熱安定性に優れており、活性の上昇は酵素の安定性の上昇に起因することが示唆された。また、得られた変異点を野生型(NADPH要求型)RrQRに導入したところ、NADH要求型変異酵素と同様に活性の上昇が観察され、この173番目のAsn残基が酵素活性/安定性に大きな影響を与える残基であることが確認された。

Improvement of 3-quinuclidinoox reductase by directed evolution

○Nobuyuki Urano¹, Takahiro Nagai², Shoko Kumashiro², Sakayu Shimizu³, Michihiko Kataoka¹
 (¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., ²Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ³Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

Key words directed evolution, enzymatic conversion, reductase, screening

3Da01 コンピテントな枯草菌のDNA取り込み速度

西村 彩乃, 田口 久貴, ○赤松 隆
 (崇城大・生物生命・応微工)
 akamatsu@bio.sojo-u.ac.jp

【目的】コンピテントな枯草菌は、生体内に近いDNAであれば、30分で全ゲノム(4215 kb)を取り込むので、DNA取り込み速度は140 kb/分以上と推定できる。一方、精製DNAの取り込み速度は、単分子解析や同時形質転換解析から、約5 kb程度であると報告されている。これらの違いを解析するために、キネティックスと細胞内に取り込まれたひとつのDNA断片による1回および2回の組み換えから取り込み速度を評価することを目的とした。

【方法および結果】コンピテントな枯草菌とDNAからなる混合溶液の経時的なサンプリング・培地への塗抹操作で転換体を得た。37℃で1晩培養後に出現する転換体は、時間とともに増加した。転換体の非選択マーカー出現割合は2分接触で、34 kb離れた距離に8.5%の連鎖が見られた。156 kb離れた距離では約2%、671 kbでは約1%の頻度で二重転換体を得られた。一方1662 kb離れた距離では、ほとんど二重転換体は得られなかった。従って、2分では671-1662 kbの取り込みが行われると推定できた。また、5分接触では1662 kb離れた距離の二重転換体は確実に見られたので、2-5分間に1662 kbは取り込まれると推定できた。

DNA uptake speed of competent *Bacillus subtilis*

Nishimura Ayano, Taguchi Hisataka, ○Akamatsu Takashi
 (Fac. Biotechnol., Sojo Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, DNA uptake speed, competent transformation, lyzed protoplast

3Cp22 anammox 菌のヒドロキシルアミン酸化酵素のX線結晶構造解析

○平 大輔¹, 中村 照也², 山縣 ゆり子², 古川 憲治³, 藤井 隆夫¹
 (¹崇城大・応生命, ²熊大院・薬, ³熊大院・自然科学)
 hira@life.sojo-u.ac.jp

嫌気性アンモニア酸化(anammox)とはアンモニアを電子供与体として亜硝酸イオンが還元され、窒素ガスを生ずる反応である。その反応過程においてはヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、anammox反応機構の全容解明には至っていない。

これまでの研究で、我々はanammox菌KSU-1株より、マルチヘムタンパク質であるヒドロキシルアミン酸化酵素(HAO)、ヒドラジン酸化酵素(HZO)を精製し、それらの性質を報告してきた。両酵素は互いに約40%の相同性を有する酵素であり、anammox反応過程の最終段階においてヒドラジンを酸化し、窒素分子を生成すると考えられている。しかし、HAOはヒドラジン、ヒドロキシルアミンを基質として酸化するが、HZOはヒドラジンのみを基質とし、ヒドロキシルアミンを酸化しない。我々は機能の相違を生じる構造的要因を明らかにするため、両酵素のX線結晶構造解析を進めてきた。本発表では、最近明らかとしたHAOの立体構造について報告する。

HAOはanammox菌KSU-1株から精製し、蒸気拡散法により結晶化を行った。単結晶を用いてSPRING-8で回折データ収集を行い、Fe-SAD法にて立体構造を決定した。HAOは8個の α ヘムを結合したモノマーによるホモ3量体を形成し、合計24個のヘムが環状に配置された特徴的な4次構造を有することが明らかとなった。また、8個の α ヘムのうち、活性中心ヘムP460にはチロシンの共有結合が確認された。現在、詳細な解析を進めている。

Crystal structure of hydroxylamine oxidoreductase of an anammox bacterium strain KSU-1

○Daisuke Hira¹, Teruya Nakamura², Yuriko Yamagata², Kenji Furukawa³, Takao Fujii¹
 (¹Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ³Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

Key words anammox, hydroxylamine oxidoreductase, hydrazine oxidoreductase

3Da02 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた抗生物質に依存しないバクテリアの選択的培養法

○廣田 隆一, 石田 丈典, 池田 丈, 黒田 章夫
 (広島大院・先端・生命機能)
 hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】バイオ燃料や物質生産のための微生物培養は、一般に目的とする微生物の純粋培養を前提としており、コンタミネーションを防ぐために培地や機器の滅菌処理、抗生物質の利用が必要である。しかしながら、培養のスケールが大きくなるほど、投入エネルギーや薬品調達のコストが高くなり、さらに抗生物質を含む廃液は耐性菌などの出現を助長する可能性があるため、その処理は厳重に管理されなければならない。そこで、安価で安全に目的株のみを増殖させることができる選択マーカーを確立することができれば、微生物大量培養における物質生産のコスト削減に貢献できると考えられる。本研究では亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)の選択マーカーとしての有効性を検討した。

【方法・結果】PtxDは亜リン酸(H_3PO_3)を酸化してリン酸(H_3PO_4)に変換する酵素である。リンは生育に必須の元素であるため、亜リン酸を利用できないバクテリアに $ptxD$ を導入することで、亜リン酸をリン源とした最少培地において選択的に増殖させることができると考えられる。*Ralstonia* sp. 4506株および*Klebsiella* sp. 4507株から亜リン酸トランスポーター遺伝子($ptxABC$)および $ptxD$ を取得し、亜リン酸を利用できない大腸菌において異種発現させ、亜リン酸をリン源としたMOPS合成培地で増殖を調べた。その結果、0.5 mM亜リン酸存在下で $ptxABC$ 発現大腸菌のみが増殖を示し、 $ptxABC$ が選択マーカーとして機能することが明らかとなった。

Application of the phosphite dehydrogenase gene as a selectable marker in bacteria

○Ryuichi Hirota, Takenori Ishida, Takeshi Ikeda, Akio Kuroda
 (Dept. Mol. Biotech., Hiroshima Univ.)

Key words phosphite, phosphite dehydrogenase, antibiotics, marker gene