

1P-063 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良

○神藤 定生¹, 早稲田 葵², 増井 寛², 細田 晃文², 田村 廣人²
 (¹名城大・理工, ²名城大・農)
 sjindou@meijo-u.ac.jp

【目的】脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため、我々は二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した。すなわち、植物由来のエチレン生成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素 (ACS) および ACC 酸化酵素 (ACO) を、セルロソームエンジニアリングで複合体化させ、合成生物学的手法によりシアノバクテリアへ導入した。結果、本細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.₇₃₀/h の効率で生産した (Jindou et al., ACS Synthetic Biology, 2014)。産業利用を目的に、さらにその生産効率を高めるため、本酵素複合体の酵素モル比改良を行った。

【方法と結果】2種のキメラ酵素サブユニット (ACS-Ctdoc および ACO-Acdoc) の複体内モル比が 1:2、2:1 となるよう、これに対応するキメラ骨格タンパク質を構築した。具体的には、すでに構築済の Cip2A へ *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium thermocellum* 由来コヘシンを連結させ、それぞれ Cip3A と Cip3B を構築した。得られた各酵素複合体をコードする遺伝子群を *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (R2-PC) 株に導入し、バイオエチレン合成活性をガスクロマトグラフィーで比較した。この結果、ACS-Ctdoc: ACO-Acdoc=1:2 のモル比となる酵素複合体を持つ組換え体が、有意に高いバイオエチレン合成活性を示したので、これを報告する。

An Engineered Platform for Bioethylene Production by a Cyanobacterium Expressing a Chimeric Complex of Plant Enzymes

○Sadanari Jindou¹, Aoi Waseda², Hiroshi Masui², Akifumi Hosoda², Hiroto Tamura²
 (¹Dept. Culture Edu., Meijo Univ., ²Dept. Env. Biosci., Meijo Univ.)

Key words *Synechococcus elongatus* PCC 7942, ethylene, synthetic biology, cellulosome

1P-065 *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分泌に関する検討

○阿部 勝正, 小林 豊和, 櫻庭 裕樹, 高橋 祥司, 解良 芳夫
 (長岡技術科大)
 katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp

【研究目的】Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) 等の含塩素系有機リン酸トリエステル類は繊維製品の難燃剤等として広く利用されてきた。その一方で、物理化学的に安定であることや発ガン性などの毒性を有することから、環境中に浸出した TDCPP が生態系へ与える影響が懸念されている。これまで我々は、野外試料中から TDCPP 分解菌 *Sphingomonas* sp. TDK1 株を単離し、その初発分解酵素であるハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素の諸特性解析・クローニングを行ってきた。本研究では、過去の研究で明らかになった本酵素シグナルペプチドに関する知見を基に、本酵素の局在、および、シグナルペプチド欠損が酵素活性に与える影響を検討した。

【方法と結果】本酵素のシグナル配列欠損発現系を構築し、大腸菌組換え体の無細胞抽出液を用いて TDCPP 分解活性測定を行った結果、シグナル配列を欠損させた発現系では完全に活性が認められなくなった。以上の結果より、本酵素はサイトゾル内においてフォールディングされない Sec 経路依存的にベリプラズム間隙へ分泌されている可能性が示唆された。次に、組換え酵素発現大腸菌における本酵素の局在について酵素活性測定とウエスタンブロットで解析を行なった。その結果、本酵素はサイトゾルとベリプラズムの両画分ではほぼ等量存在することが明らかになった。本結果について、大腸菌での過剰発現がその局在に大きな影響を与えた可能性も考えられるため、現在、発現量の調節可能な発現系を構築し、再度局在に関する検討を行なっている。

Analysis of secretion of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingomonas* sp. TDK1

○katsumasa Abe, Toyokazu Kobayashi, Yuki Sakuraba, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
 (Nagaoka Univ. Technol.)

Key words organophosphate, organophosphorus hydrolase, *Sphingomonas*, secreted protein

1P-064 *Comamonas* 属細菌由来ベンゼンモノオキシゲナーゼの機能・構造解析

○渡邊 仁¹, 山之口 ふみ子², 野口 恵一³, 尾高 雅文¹, 養田 正文¹
 (¹農工大院・工・生命工, ²農工大, ³農工大・機器分析セ)
 modaka@cc.tuat.ac.jp

【緒言】

ベンゼンで汚染された土壌や地下水の浄化に、微生物のベンゼン生分解系を利用したバイオレメディエーションが期待されている。微生物によるベンゼン分解の律速段階は、ベンゼンモノオキシゲナーゼ (BeMO) によるベンゼンのカテコールへの変換である。BeMO は、I 型と II 型に分類され、それぞれアルケン/アレンモノオキシゲナーゼとフェノールヒドロキシラーゼと類縁酵素である。いずれも α , β , γ サブユニットから構成されるヘテロ 6 量体酵素である。NADH 由来の電子を伝達するレダクターゼ、レダクターゼから電子を受けとってオキシゲナーゼに伝達するフレドキシシンと BeMO システムを構成している。本研究では、BeMO の機能・構造解析を行い、微生物のベンゼン分解機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】

ベンゼン分解能を示す *Comamonas* 属細菌から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、BeMO のユニバーサルプライマーを用いた PCR を行ったところ、*Comamonas* 属細菌が II 型 BeMO を保有していることが明らかになった。獲得した II 型 BeMO 部分配列と相同性の高いフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子配列を参考にプライマーを作製し PCR を行った結果、BeMO システムの全構成因子の遺伝子の獲得に成功した。さらに、大腸菌組換え体において、オキシゲナーゼ α , β , γ サブユニット、レダクターゼ、フレドキシシンの発現に成功した。

Functional and structural characterization of type II benzene monooxygenase from *Comamonas* sp.

○Hisashi Watanabe¹, Fumiko Yamanokuchi², Keiichi Noguchi³, Masafumi Odaka¹, Masafumi Yohda¹
 (¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Tokyo Univ. Agric. Technol., ³Instr. Anal. Center, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words bioremediation, oxygenase, hydroxylase, benzene

1P-066 *Geobacillus stearothermophilus* (GST) 由来点変異型ファルネシルニリン酸合成酵素の不斉認識機構解明

○吉田 康隆¹, サモリ ベトロス ヤサヤ¹, 鎌水 夏美¹, 草苺 美穂¹, 村上 聡¹, 波多野 豊平¹, 大谷 典正², 木島 龍朗¹
 (¹山形大院・理工・バイオ化学, ²山形大・理・物質生命化学)
 kijima@yz.yamagata-u.ac.jp

天然ゴムを筆頭にステロイドやテルペン類を構成するイソプレノイドの酵素を利用する有用生物物質生産を考える上で、ブレニルトランスフェラーゼの機能を解明することは不可欠である。これらの酵素は、厳密な鎖長決定機構により様々な鎖長のポリブレニルニリン酸を合成するが、生成物の制御を自由に設定することができれば、物質生産を思い通りに行うことが可能になる。様々な Key 化合物の前駆体であるファルネシルニリン酸 (FPP) を合成する耐熱性ファルネシルニリン酸合成酵素 (FPPs) は工業的応用が期待されており、有機合成への利用を考える上で、基質認識機能を解明することは大変重要である。我々は部位特異的変異を加えた 3 つの変異酵素の不斉基質アナログに対する反応性の検討を行い、3,7-ジメチル-8-ヒドロキシデカ-2E,6E-ジエニルニリン酸 (基質アナログ) において、S 体を優先的に取り込むことを明らかにした。この結果に基づき、SWISS-MODEL を利用して大腸菌由来 FPPs の結晶構造を鋳型としたホモロジーモデリングにて、変異体 FPPs 酵素モデルを作成しドッキングシミュレーションを行った。シミュレーションによる予測に従い、アルキル鎖長を変えた基質アナログを数種類合成し、酵素 (FPPs) による触媒活性の検証を行った。

Characterization of chiral recognition for Farnesyl Diphosphate Synthase from *Geobacillus stearothermophilus*

○Yasutaka Yoshida¹, Petrus Yesaya Samori¹, Natsumi Yurimizu¹, Miho Kusakari¹, Satoshi Murakami¹, Bunpei Hatano¹, Norimasa Ohya², Tatsuro Kijima¹
 (¹Div. Biochem. Grad. Sch. Eng. Yamagata Univ., ²Dept. mat. Biol. Dhem. Fac. Sci. Yamagata)

Key words farnesyl pyrophosphate synthase, chiral recognition, organic synthesis