

2P-061 好熱菌由来色素依存性 D- アミノ酸脱水素酵素は L- ヒドロキシプロリン代謝に関与する○里村 武範¹, 石倉 優¹, 小柳 峰史¹, 櫻庭 春彦², 大島 敏久³, 末 信一朗¹⁽¹⁾福井大院・工, ⁽²⁾香川大・農, ⁽³⁾大阪工大・工
satomura@u-fukui.ac.jp

色素依存性 D- アミノ酸脱水素酵素 (Dye-DADH) は人工の酸化還元色素を電子受容体として D- アミノ酸の酸化反応を触媒する酵素である。我々の研究室では、好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* から Dye-DADH を見出し、その詳細な酵素化学的性質の解析に成功した。本酵素は D- フェニルアラニンをも最も良好な基質とするが D- プロリン、D- ヒドロキシプロリンなど多くの D- アミノ酸にも反応性を示し広い基質特性を有していることが明らかとなっている。これまで、広い基質特異性を有する Dye-DADH は大腸菌や緑膿菌に見出されており、これら酵素をコードしている遺伝子は L- アラニンラセマーゼをコードする遺伝子とオペロンを形成していることが明らかとなっている。このオペロンは L- アラニンによって転写が誘導されることから、Dye-DADH は L- アラニン代謝に関与していることが明らかとなっている。そこで *R. marinus* 由来 Dye-DADH についても本酵素をコードしている遺伝子周辺を詳細に解析した。その結果、ヒドロキシプロリンエピメラーゼ (HypE) をコードしていると考えられる遺伝子が Dye-DADH の上流に存在していた。このことから *R. marinus* 由来 Dye-DADH は L- ヒドロキシプロリンの代謝に関与しているのではないかと予測された。そこで、本研究では *R. marinus* 由来 Dye-DADH、HypE の詳細な機能解析を行い、これら酵素群の生理機能の解析を行うことを目的として研究を行った。

Dye-linked D-amino acid dehydrogenase is involved in L-hydroxyproline metabolism○Takenori Satomura¹, Masaru Ishikura¹, Takashi Koyanagi¹, Haruhiko Sakuraba², Toshihisa Ohshima³, Shin-ichiro Suye¹⁽¹⁾Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., ⁽²⁾Fac. Agric., Kagawa Univ., ⁽³⁾Fac. Eng. Osaka Inst. Technol.)**Key words** thermophile, D-amino acid, L-hydroxyproline metabolism, Dye-linked dehydrogenase**2P-063 好熱菌酵素の効率的低温高活性化改変法の開発**

○赤沼 哲史, 木村 彦乃, 筒井 聡志, 内山 清, 八木 創太, 山岸 明彦

(東葉大・生科)

akanuma@toyaku.ac.jp

【背景と目的】酵素は触媒パワーの大きさ、高い基質特異性と反応特異性、環境への低負荷等、産業利用上の多くの利点がある。好熱菌酵素は優れた耐熱性を有するが、常温ではほとんど活性を示さない場合が多い。我々は好熱菌酵素の高い耐熱性を損ねずに、低温での活性を向上させる効率的方法の開発を進めている。

【方法】好熱菌 *Thermus thermophilus* と大腸菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) のアミノ酸配列を比較すると、176 部位で同じアミノ酸が保存され、169 部位では異なっている。また、大腸菌 IPMDH には計 18 アミノ酸残基の挿入がある。そこで、大腸菌 IPMDH と比較してアミノ酸が異なる *T. thermophilus* IPMDH の部位に、大腸菌型のアミノ酸を導入した。その際、1) 立体構造上近い部位のアミノ酸置換は複数個同時に導入した、2) 活性中心から 8 Å 以内の部位についてのみアミノ酸置換を導入した、3) 大腸菌 IPMDH に見られる挿入アミノ酸を挿入した変異体も作製した。変異型酵素を精製し、低温活性を野生型酵素と比較した。

【結果と考察】*T. thermophilus* IPMDH の 25℃ における触媒活性を約 10 倍向上させるアミノ酸置換の組み合わせを 2 通り同定した。好熱菌酵素と常温生物由来相同酵素のアミノ酸配列を比較して、両者で異なるアミノ酸の多くは、進化の過程で活性とは無関係にランダムに蓄積した、種系統分化に起因するものであると予想される。本実験で用いた方法は、両者で異なるアミノ酸の中から活性の違いに関わるアミノ酸を効率的に探索できる方法と言える。

Establishment of an effective strategy to improve the low-temperature activity of a thermophilic enzyme

○Satoshi Akanuma, Hikono Kimura, Satoshi Tsutsui, Kiyoshi Uchiyama, Sota Yagi, Akihiro Yamagishi

(Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Key words thermostable enzyme, thermophile, low-temperature activity, mutagenesis**2P-062 温泉由来超耐熱性エンドグルカナーゼの特性解析**○西村 明日香¹, 大熊 二郎¹, 須田 みぎわ¹, 広瀬 佳嗣¹, 加藤 友彦², 柴田 大輔², 近藤 康弘¹
⁽¹⁾ホンダ・リサーチ・インスティテュート, ⁽²⁾かずさ DNA 研
kondohy@jp.honda-ri.com

【背景と目的】セルラーゼによるリグノセルロースの加水分解過程は一般に反応時間が長く、多量な酵素が必要とされる。そこで耐熱性酵素を用いた高温反応により加水分解速度を上昇させ、反応時間の短縮及び酵素量の削減等が可能かどうかを検証する目的で高温温泉土壌より各種セルラーゼ遺伝子の単離を試みた。本研究では至適温度 80℃ 以上の新規エンドグルカナーゼの単離とその特性解析を目的とした。

【方法】メタゲノム解析により既知エンドグルカナーゼ酵素 (EG) と類似したアミノ酸配列を持つ ORF を同定し PCR により候補遺伝子配列を単離した。大腸菌により候補タンパク質を発現させ高温での CMC 分解活性測定によるスクリーニングを行なった。

【結果と考察】スクリーニングにより新規の塩基配列を持つ超耐熱性 EG、AR19M-113-4 が単離された。この酵素はアーキア *Thermophilum pendens* Hrk 5 由来の GH ファミリー 12 に属する EG (Accession NO. YP_921079) と最も高い相同性があり (41%)、β-グルカン (大麦由来) および Lichenan に対し高い加水分解活性を示し、CMC、PSA、PNPC にも加水分解活性を示した。至適温度は基質により異なり β-グルカンでは 100℃、PNPC では 110℃であった。酵素の熱安定性は半減期 (活性が無処理区の 50% に低下するブリンキュベーション時間) が 80-90℃ で 24 時間以上、95℃ および 99℃ ではそれぞれ約 40 時間および 12-13 時間であり、GH12 に属する EG としては世界最高レベルの至適温度、耐熱性の超耐熱性 EG であることが明らかとなった。

Isolation and characterization of a novel thermostable endoglucanase from hot spring○Asuka Nishimura¹, Jiro Okuma¹, Migiwa Suda¹, Yoshitsugu Hirose¹, Tomohiko Kato², Daisuke Shibata², Yasuhiro Kondo¹⁽¹⁾Honda Res. Inst. Japan Co., Ltd, ⁽²⁾Kazusa DNA Res. Inst.)**Key words** Metagenome, endoglucanase, thermostable enzyme**2P-064 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 に高温下クロラムフェニコール耐性を付与する変異プラスミド**○鈴木 宏和^{1,2,3}, 小林 淳平^{1,2}, 田藤 実咲³, 古川 恵¹, 八木 寿梓^{2,4}, 大城 隆^{2,3}⁽¹⁾九大院・農, ⁽²⁾鳥取大院・工・化生応工, ⁽³⁾鳥取大・工・生応工, ⁽⁴⁾鳥取大・工・GSC)

hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp

【背景】我々は、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 細胞内の DNA 変異を利用した、酵素耐熱化指向性の酵素遺伝子分子進化を研究している。これまでにクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子 (*SAcat*) などを実験対象とし、高温で機能する Cm 耐性プラスミド pGKE75-*SAcatE1* および pGKE75-*SAcatE1'* を創出した。本研究では、これらプラスミドの特性評価を行った。

【実験と結果】pGKE75-*SAcatE1* には *SAcat* 遺伝子内に変異が見出された。本遺伝子 *SAcatE1* の発現産物は野生型の *SAcat* 発現産物よりも熱安定であったが、比活性はほとんど変わらなかった。pGKE75-*SAcatE1* を有する *G. kaustophilus* 細胞は、pGKE75-*SAcat* を有する細胞よりも効率よい Cm 耐性を示した。ただし 65℃ ではいずれも機能しなかった。pGKE75-*SAcatE1'* を有する細胞は 65℃ でも効率よい Cm 耐性を示し、その全塩基配列を決定したところ、*SAcatE1* 遺伝子内やプロモーター領域に変異は見出されず、大腸菌用の複製レプリコン (pUC レプリコン) に 2ヶ所の変異が見出された。pGKE75-*SAcatE1'* が *G. kaustophilus* に高温 Cm 耐性を付与する理由として、プラスミドの細胞内コピー数もしくは安定性が変化した可能性が考えられ、それらの詳細な解析を行っている。

Plasmid variants that confer chloramphenicol resistance on *Geobacillus kaustophilus* HTA426 at high temperatures○Hirokazu Suzuki^{1,2,3}, Jyumpei Kobayashi^{1,2}, Misaki Tanabiki³, Megumi Furukawa¹, Hisashi Yagi^{2,4}, Takashi Ohshiro^{2,3}⁽¹⁾Fac. Agric., Kyushu Univ., ⁽²⁾Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., ⁽³⁾Dept. Biotechnol., Fac. Eng., Tottori Univ., ⁽⁴⁾GSC, Fac. Eng., Tottori Univ.)**Key words** *Geobacillus kaustophilus*, chloramphenicol, pUC replicon