

1P-033 大腸菌を用いたヘムタンパク質の異種発現に与えるアミノレブリン酸合成酵素の影響

○熊丸 さち¹, 北岡 卓也², 一瀬 博文²
⁽¹⁾九大院・生資環, ⁽²⁾九大院・農
 ichinose@agr.kyushu-u.ac.jp

【緒言】プロトポルフィリン IX 鉄錯体 (ヘム) は生物が普遍的に合成する化合物であり、多様なタンパク質と複合化して様々な生体反応に利用される。ヘムタンパク質には二次代謝産物合成酵素のシトクロム P450 (P450) など生物機能の多様性を支えるヘム酵素も数多く存在する。また、ヘムタンパク質の有用機能を活用したバイオプロセス構築や異種高発現技術の開発に興味を持たれる。ヘムタンパク質の異種発現において、ヘム合成経路の制限因子である 5-アミノレブリン酸 (ALA) を培地に添加することで、発現レベルは飛躍的に向上することが報告されている。本研究では、ヘムタンパク質の異種高発現技術の改良を目指し、ALA 合成酵素 (ALAS) を利用した ALA を過剰発現する大腸菌を創出した。ALAS 発現株をヘムタンパク質生産に向けた宿主細胞として利用するにあたり、ヘムタンパク質および ALAS 発現株の共培養による異種高発現について検討した。

【方法と結果】光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 由来の ALAS 遺伝子を pCDF-Duet ベクターに連結し、ALAS 発現プラスミドを構築した。*Escherichia coli* C41 (DE3) を宿主として ALAS 異種発現株を樹立し、シトクロム b5 と共発現させたところ、ALA 添加培養時 (0.5 mM) と比べ、発現レベルを大きく向上させることができた。一方、P450 との共発現時には ALAS の過剰発現が P450 の発現を阻害することが明らかになった。そこで *E. coli* BL21 star (DE3) を宿主にした ALAS 異種発現株と P450 異種発現株との共培養を行ったところ、P450 の異種高発現が可能であった。

Effects of 5-aminolevulinic acid synthase on heterologous expression of heme proteins in *Escherichia coli*

○Sachi Kumamaru¹, Takuya Kitaoka², Hirofumi Ichinose²
⁽¹⁾Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ⁽²⁾Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words heme protein, *Escherichia coli*, 5-aminolevulinic acid

1P-034 *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼの諸性質検討と遺伝子の同定

○丸海老 純也, 油原 かほり, 小林 慶一, 桐村 光太郎
 (早大・先進理工・応化)
 kkohtaro@waseda.jp

【目的】*trans*-アコニット酸は大豆や小麦などの植物に検出され、機能性高分子原料としての利用が期待される。アコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7; AI) は、植物や *Pseudomonas* 属等の微生物に存在し、*cis*-アコニット酸と *trans*-アコニット酸の異性化反応を触媒する酵素である [1, 2]。本研究では、*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼの諸性質検討および遺伝子の同定を行った。

【方法および結果】*trans*-アコニット酸やクエン酸を唯一の炭素源として利用可能な細菌 *Pseudomonas* sp. WU-0701 (NBRC 110970 として寄託) を土壌より単離し、当該細菌の細胞内に AI 活性を検出した [1]。無細胞抽出液から精製した AI はゲル濾過と SDS-PAGE の両者で分子量約 25 kDa であり、単量体の酵素と推定された。精製酵素の最適反応 pH は 6.0、最適反応温度は 37°C であった。さらに、精製酵素の N 末端アミノ酸配列に基づいて AI をコードする 786 bp の遺伝子 *ais* (GenBank accession no. LC010980) をクローニングした。*ais* は N 末端側の 22 アミノ酸を推定ペプチド移行シグナルペプチドとして含む 262 アミノ酸残基から成るポリペプチドをコードしていることを明らかにした。AI は ABC トランスポーターのモリブデン酸輸送タンパクと 80~90% の相同性を示すものの、他のタンパク質との相同性は低く、AI が極めて特異的な酵素であることを示唆した。

[1] K. Yuhara *et al.*, FEBS J., (submitted).
 [2] 油原, 他, 日本生物工学会大会講演要旨集, p.28 (2013).

Enzymatic Characterization and Gene Identification of Aconitate Isomerase from *Pseudomonas* sp. WU-0701

○Junya Maruebi, Kahori Yuhara, Keiichi Kobayashi, Kohtaro Kirimura
 (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words aconitate isomerase, *cis*-aconitic acid, *trans*-aconitic acid, *Pseudomonas* sp.

1P-035 海藻分解菌 *Microbulbifer* sp. KIT-19 株の分離とそのアルギナーゼの精製に関する研究

○庄山 創太, 大箸 信一, 袴田 佳宏
 (金工大・ゲノム研)
 yhakamada@neptune.kanazawa-it.ac.jp

近年、バイオエタノールの生産により穀物価格の上昇が問題となっている。そこで、食糧とは競合しない海藻をバイオエタノールの原料として利用することに着目した。海藻のぬめり成分分解酵素であるアルギナーゼを生産する海洋性細菌 *Microbulbifer* sp. KIT-19 株を分離した。KIT-19 株由来のアルギナーゼをカラムクロマトグラフィーにより部分精製し、部分精製酵素の性質を調べた。石川県の海岸から海水サンプルを採取し、ワカメ 0.5 g を唯一の炭素源とし、0.2% 硝酸ナトリウム、0.006% リン酸水素二カリウム、0.001% クエン酸鉄を含んだ培地で集積培養を繰り返し、海藻分解菌を単離した。その微生物の形態観察および 16S rDNA (約 1.5 kbp) の塩基配列を決定し、国際塩基配列データベースを用いて同源性検索を行った。その結果、*Microbulbifer elongates* と相対率 99.5% を示したことから、単離菌を *Microbulbifer* sp. KIT-19 株と命名した。種々の窒素源を用いて培養した結果、硝酸ナトリウムを窒素源として培養した場合、最もアルギナーゼ活性が高かった。この時のアルギナーゼ活性は 2.68U/mL であった。その培養上清を粗酵素液とした。アルギナーゼ活性測定は、アルギン酸を基質として DNS 法により行った。酵素活性における NaCl の添加効果を調べたところ、100 mM NaCl 添加時に酵素活性が 2.52 倍になった。Toyopeal DEAE-650M により部分精製の酵素の最適温度は 40°C、最適 pH は 9.0 であった。また、pH7.8 における Tris、Hepes、Phosphate 緩衝液を用いた場合の酵素活性に有意差は認められなかった。

Isolation and partial purification of arginase from marine bacterium *Microbulbifer* sp. KIT-19

○Sota Shouyama, Shinichi Ohashi, Yoshihiro Hakamada
 (Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words alginate, marin bacterium

1P-036 *Rhodobacteraceae* 科に属する *Falsirhodobacter* sp. alg1 の新規アルギン酸リアーゼ AlyFRB の特性評価

○モリ テツシ^{1,2,6}, 高橋 真美^{2,6}, 田中 礼士^{3,6}, 柴田 敏行^{3,6}, 成年 張⁴, 黒田 浩一^{5,6}, 植田 充美^{5,6}, 竹山 春子^{1,2}
⁽¹⁾早大・理工, ⁽²⁾早大・ナノライフ機構, ⁽³⁾重大院・生資, ⁽⁴⁾水産研・中央研, ⁽⁵⁾京大院・農, ⁽⁶⁾JST・CREST
 moritets@aoni.waseda.jp

我々は褐藻を用いたバイオエタノール生産に向け、褐藻の主成分であるアルギン酸を高効率に分解できる酵素および細菌の探索を行ってきた。これまでに新規のアルギン酸分解菌である *Falsirhodobacter* sp. alg1 を発見し、さらにこのバクテリアからアルギン酸を単糖に分解できるアルギン酸リアーゼ AlyFRB をコードする遺伝子の獲得に成功した。本研究では、この AlyFRB のさらなる解明をめざし特性評価を行った。alg1 株のゲノム解析の結果から AlyFRB の配列を特定した後、His-tag を用いてタンパク質を精製した。このタンパク質を用いて、反応温度 (25-45°C)、反応時間 (0.5-24 時間)、カチオンの要求性 (Na, Mg, K イオン) および pH 条件 (pH3-10) の検討を、DNS 法および TLC を用いて行った。DNS 法および TLC の結果、AlyFRB は 50 mM MOPS 中では、カチオンの非存在下の場合もカチオン存在下の場合と同等の活性が見られた。また、AlyFRB は 25-35°C において、高効率に高分子のアルギン酸リアーゼを単糖にまで分解できることが確認され、pH6-9 において、活性を示した。以上の結果から、AlyFRB は高分子のアルギン酸リアーゼを直接、単糖まで分解する活性をもつことがわかった。さらに、より多様なアルギン酸リアーゼ遺伝子のメタゲノムライブラリーからの取得も試みた。

Highly efficient alginate lyases from *Falsirhodobacter* sp. alg1

○Tetsushi Mori^{1,2,6}, Mami Takahashi^{2,6}, Reiji Tanaka^{3,6}, Toshiyuki Shibata^{3,6}, Seinen Cho⁴, Kouichi Kuroda^{5,6}, Mitsuyoshi Ueda^{5,6}, Haruko Takeyama^{1,2}
⁽¹⁾Dept. Sci. Eng., Waseda Univ., ⁽²⁾Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., ⁽³⁾Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., ⁽⁴⁾NRIFS, ⁽⁵⁾Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁽⁶⁾CREST, JST)

Key words *Falsirhodobacter*, alginate lyase, metagenome