

シクロパラフィン系資化性菌の遺伝学的研究(その4) - *Aeromonas* sp. KUC-5N

125 株由来のシクロパラフィン分解系プラスミドについて

(関西大・工) 伊吹昌久, 谷 剛, 高田敏幸, 長谷川喜衛, 徳山 泰

1. 目的 我々は *Aeromonas* sp. KUC-5N 株由来のシクロパラフィン分解系プラスミド上にコードされるシクロパラフィン系化合物分解酵素遺伝子の解明を目的とし、今回、1) シクロペンタノンの酸化酵素(シクロペンタノンモノオキシゲナーゼ: CPMO)に関与する遺伝子の特性、2) ホスト領域の2本について検討した結果、若干の知見が得られたので報告する。

2. 方法 *Aeromonas* sp. KUC-5N 由来のシクロパラフィン分解系プラスミドとして、*pCA1* [*CBOL*, *CBON*⁺, *CBCA*⁺, *CBCA*⁺] 及び一部資化能の欠落した *pCA2* [*CBOL*, *CBON*⁻, *CBCA*⁺, *CBCA*⁺] の2種のプラスミドを用いた。又、CPMOの抽出及び酵素活性法は従来の方法に従った。

3. 結果 *pCA1* 上にコードされる CPMO 合成遺伝子の発現、すなわち *pCA1* を含有菌の CPMO の生産はシクロペンタノン(*CBON*)存在下でのみ起こり、*CBON* 以降の一連の代謝産物である5-バレロラクトンなどでの培養菌では起こさなかった。次に、*pCA1* の複合伝達領域と CPMO 合成遺伝子群領域の位置関係を調べる為に、*pCA1* 及び CPMO 合成遺伝子群の欠落した *pCA2* を *Aeromonas* sp. を宿主菌として *E. coli* *CBOL* に対して複合伝達を行った結果、両プラスミド共ほぼ同頻度で複合伝達が行ったことより、両者の領域は互いに関与していることが示唆された。又、*pCA1* のホスト領域について検討した結果、グラム陽性菌である *Arthrobacter globiformis* では発現しなかったが、グラム陰性菌では *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter calcoaceticus* にシクロパラフィン系に対する資化能が認められたことから、*pCA1* はグラム陰性菌に対して広いホスト領域を有することから考えられる。すなわち、この形態転換株の CPMO の生産量は、*Aeromonas* sp. KUC-5N における CPMO 生産量の約1/2であった。(女校) 1984年 日本微生物学会年会発表 P407

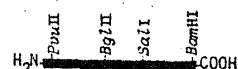
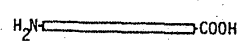
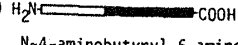
Genetic analysis of cycloparaffins-utilizing bacterium (NO.4)
-Cycloparaffins-degradative plasmid from *Aeromonas* sp. KUC-5N.-
Masahisa Ibuki, Takashi Tani, Toshiyuki Takata, Yoshie Hasegawa, and Tai Tokuyama
Faculty of Engineering, KANSAI UNIV.

ハイブリッド酵素作製による酵素の性質の改変

126 ナイロンオリゴマー分解酵素とその類似蛋白質間のハイブリッド酵素の作製 - (阪大・醸酵) 張 玉臻, 中村俊一, 神崎直之, 藤山和仁, 根来誠司, 岡田弘輔

1) 目的 酵素蛋白質を人為的に改良するためには、酵素分子内のどの部位と操作するのが効果的か、どの領域が活性に顕著な影響を与えるのか等をあらかじめ検討する事が必要となる。ナイロンオリゴマーの分解に関与する 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase (EII) は、その構造遺伝子とともに、88%の相同性を有する類似蛋白質(EII')の遺伝子も同一プラスミド(pOAD2)上に存在するため、上記の問題を検討する上での良いモデル系となる。本研究では、その最初のステップとして、両者に共通な制限酵素切断部位で組み換える事により、蛋白質分子内の特定の部位のみが EII 或いは EII' となったハイブリッド酵素を作製し、その諸性質を EII, EII' 酵素と比較検討した。

2) 方法及び結果 両遺伝子に共通な *Pvu* II, *Bgl* II, *Sal* I 部位で組み換えを行ない、種々のハイブリッドプラスミドを作製した。その中で最も活性の高い Hyb-10 蛋白質 (pHK10 保持株により生産) を精製した。EII, Hyb-10 は、N-4-aminobutyryl-6-aminohexanoic acid (4-6) 及び N-6-aminohexanoyl-4-aminobutyric acid (6-4) の両基質に活性を有するのに対し、EII' は 6-4 に対しては比較的高い活性を示すが、4-6 には活性が検出されず、基質特異性に若干の差異が認められた。又、Hyb-10 は EII より熱安定性が低下していた。

	Enzyme	Relative activity		
		4-6	6-4	6-6
EII	H ₂ N-  -COOH	4	15	100
EII'	H ₂ N-  -COOH	<2	40	100
Hyb-10	H ₂ N-  -COOH	4	16	100

4-6: N-4-aminobutyryl-6-aminohexanoic acid
6-4: N-6-aminohexanoyl-4-aminobutyric acid
6-6: 6-aminohexanoic acid linear dimer

1. Kinoshita et al. Eur. J. Biochem. 116, 547 (1981)
2. Okada et al. Nature 306, 203 (1983)
3. Negoro et al. J. Bacteriol. 155, 22 (1983)

Alteration of Enzyme Characteristics with Hybrid Genes of Nylon-Oligomer Hydrolase and Its Analogous Enzyme
Yu-Zhen Zhang, Shunichi Nakamura, Naoyuki Kanzaki, Kazuhito Fujiyama, Seiichi Negoro, and Hirotsuke Okada
(Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565)