

162 Cycloketone oxygenase に関する研究 (その6) — *Nocardia* sp. KUC-7N の生産する Cycloketone oxygenase 遺伝子の発現について
(関西大・工) 高寺 貴香, 小西 一宏, 長谷川 喜衛, 徳山 泰

1) 目的 *Nocardia* sp. KUC-7N は, cyclopentanone (C₅ON) 培養では NADH 及び NADPH 依存性を示す 2 種類の oxygenase (NADH-5N, NADPH-5N) を, 一方 cyclohexanone (C₆ON) 或いは cycloheptanone (C₇ON) 培養では NADPH 依存性 oxygenase (NADPH-6N) のみを生産し, これら 3 種の oxygenase は, 各々の酵素特性から異なる oxygenase であることが明らかとなった。今回は, これらの oxygenase の発現を遺伝子レベルで解明することを目的とし, cycloketone の代謝に関与する plasmid の検索及びその遺伝子発現調節モデル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 溶菌は, 完全培地にグリシンを添加し培養した菌体を用い, アルカリ溶菌法により行った。酵素の誘導・実験に際しては, 従来の無機塩培地に cycloketone 或いはその代謝関連物質を基質として 0.1~0.5% 添加して培養し, 得られた培養菌体より無細胞抽出液を調製した。cycloketone の分解に関与する酵素の活性測定は, 常法により行った。

3) 結果 本菌を溶菌し電気泳動を行ったところ plasmid のバンドが 1 本検出された。さらに, この plasmid を CsCl-EtBr 超遠心分離法により精製し, *Rhodococcus rhodochrous* に Transformation を行ったところ, cycloketone に生育可能な Transformant が得られ, また Transformant から調製した粗 DNA から同様の plasmid バンドが得られたことから本 plasmid が cycloketone の代謝に関与する分解系 plasmid であることが明らかとなった。一オキシプロピラフィニ系化合物の酸化能に関与する一連の酵素誘導の実験結果より, これらの oxygenase 遺伝子には異なるプロモーターが存在することが示唆されたが, 現在, 詳細に検討中である。

The study of cycloketone oxygenase (part 6) -Manifestation of the cycloketone oxygenases from *Nocardia* sp. KUC-7N.
*Takahide Takadera, Kazuhiro Konishi, Yoshie Hasegawa, Tai Tokuyama.
Faculty of engineering, Kansai university

163 水素細菌 *Alcaligenes hydrogenophilus* のヒドロゲナーゼ誘導

(阪大・薬) 〇漆原正浩, 関 洪基, 梅田房子, 八木清仁, 三浦喜温

1 目的 水素細菌 *Alcaligenes hydrogenophilus* は, 既に報告してきたように 2 種の membrane bound (m-Hase), soluble hydrogenase (s-Hase) を有し, その構造遺伝子の情報は, 巨大プラスミド pAH1 (分子量 220Md) 上に存在する。本菌の両 Hase は誘導酵素であり, その誘導は数種の因子によって影響を受けている。今回は両 Hase 誘導に及ぼす有機物の影響について検討したので報告する。

2 方法 本菌を各種条件下で培養し, mid log phase で集菌した。洗菌後, sonicator で菌を破壊し, 100,000g, 1 hr で membrane, soluble 成分に分離した。m-Hase は methylene blue, s-Hase は NAD の還元速度で活性値を測定した。

3 結果 *A. hydrogenophilus* の両 Hase は, 水素, 酸素, 炭酸ガス (ク:2:1) の混合ガス下で独立栄養的に培養した際, 高い活性を示したが, 従属栄養的に培養した際には, 活性は認められなかった。有機物を培地中に添加し, 混合ガス下で培養した際には, 活性の低下が見られた。またプラスミド pAH1 を, *Pseudomonas oxalaticus* OX1 に接合伝達させても, 水素依存性, 有機物に対する感受性の変化は見られなかった。有機物に対する感受性はその種類によって異なり, フルクトースと比較して, 酢酸では非常に強い低下を示した。フルクトース存在下, 従属栄養的に培養しても両 Hase を合成する変異株 (Hox^c) を NTG 処理により単離した。しかし, この株においても, 酢酸存在下では, 活性はほとんど見られなかった。現在, *Rhizobium* のヒドロゲナーゼ誘導に強く抑制的に働く TCA サイクルのメンバーの影響についても検討中である。

Induction of hydrogenase in *Alcaligenes hydrogenophilus*
Masahiro Urushihara, Honki Min, Fusako Umeda, Kiyohito Yagi and Yoshiharu Miura
Department of Biochemical Engineering, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565