

360 *Acinetobacter calcoaceticus* F46 由来 3,4-dihydrocoumarin hydrolase による過酢酸の分解

(京大院・農・応用生命) ○本田孝祐、片岡道彦、清水 昌

【目的】我々はこれまでに細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* F46 より芳香族ラクトン加水分解活性と過酸化水素の存在下で種々の有機化合物のハロゲン化を触媒する haloperoxidase 活性を持ち合わせた多機能酵素である 3,4-dihydrocoumarin hydrolase (DHase) を発見している。DHase によるハロゲン化は反応系に酢酸等の有機酸を必要とすることなどから、本酵素によって触媒される有機酸と過酸化水素からの過酸の生成と、生じた過酸の酸化力による非酵素的なハロゲン化によるものと考えられている。我々は本酵素の生理的意義がこの逆反応である過酸の分解にあるのではないかと考え、今回 DHase 遺伝子破壊株を用いた検討などを行い、本酵素の生理的機能の解明を試みたので報告する。

【方法と結果】遺伝子導入法として電気穿孔法を用い、相同組換えによって F46 株の DHase 遺伝子を破壊した。本遺伝子破壊株が親株と比べ、過酢酸存在下で顕著な生育阻害を受けた一方で、DHase を発現させた大腸菌では過酢酸に対する耐性が上昇していたことより本酵素が *in vivo* において過酢酸の無毒化に寄与している可能性が示唆された。また、ノーザン解析の結果、DHase 遺伝子は下流の catalase 遺伝子とともに 1 つのポリシストロニック mRNA として転写されており、同一プロモーターによる転写調節を受けていることが明らかになった。このことから DHase (過酸 + 水 → 有機酸 + 過酸化水素) と catalase (過酸化水素 → 水 + 酸素) が過酸に対する一連の防除機構を担っている可能性が示された。

Degradation of peracetic acid catalyzed by 3,4-dihydrocoumarin hydrolase from *Acinetobacter calcoaceticus* F46. ○Kohsuke Honda, Michihiko Kataoka, Sakayu Shimizu (Div. Appl. Life. Sci., Grad. Sch., Kyoto Univ.)

【Key Words】*Acinetobacter calcoaceticus*, peracetic acid, 3,4-dihydrocoumarin hydrolase, haloperoxidase, catalase

361 緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* M1 株由来 イソクエン酸脱水素酵素に関する研究 (京大院工・合成生化、CREST 今中プロジェクト)
○金尾忠芳、河村峰子、福居俊昭、跡見晴幸、今中忠行

【目的】絶対嫌気性光合成独立栄養細菌 *Chlorobium limicola* は、その炭酸固定反応に還元型 TCA 回路を用いることが提唱された最初の細菌である。しかしながら現在まで、*C. limicola* に関する還元型 TCA 回路の研究は、各酵素の精製や性質の検討、遺伝子の解析など十分に行われていない。我々は還元型 TCA 回路の炭酸固定酵素の一つ、イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) に着目し、当研究室にて単離された *C. limicola* M1 株を用いて本酵素遺伝子を獲得し、更に大腸菌内での発現を試みた。

【方法及び結果】*C. limicola* M1 株の無細胞抽出液に本酵素活性を検出した。近縁種である *C. tepidum* がモノマー IDH を持つことから、モノマー IDH に保存された配列を基にプライマーを作成し、M1 株のゲノムライブラリーから IDH 遺伝子を単離した。IDH 遺伝子は、2,226 bp で 741aa (80,465 Da) のタンパクをコードしていた。この遺伝子を大腸菌内で大量発現させ、陰イオン交換、ゲル濾過カラムにより精製した。精製した IDH について脱炭酸反応、炭酸固定反応の両方の諸性質を検討した。本酵素の炭酸固定反応が、回路の中間代謝物であるオキサロ酢酸によって強く阻害されることから、還元型 TCA 回路の制御に関わると考えられた。

Studies on isocitrate dehydrogenase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* strain M1

○Tadayoshi Kanao, Mineko Kawamura, Toshiaki Fukui, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka (Dept. Synth. Chem. and Biol. Chem., Grad. School Eng., Kyoto Univ., CREST Imanaka project)

【Key Words】isocitrate dehydrogenase, reductive TCA cycle, *Chlorobium limicola*, carbon dioxide fixation