

3P-1033 *Bacillus* 属由来重合酵素による PHA 分子量変化メカニズムの解析

○百武 真奈美, 斉藤 雄太, 富澤 哲, 柘植 丈治
(東工大院・総理工)

【緒言】 生体内高分子の一つであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の分子量は、その合成を触媒するPHA重合酵素の種類によって様々である。一般的に、これらの酵素をPHA合成・分解能を持たない大腸菌株内で機能させて得られるPHAの分子量は、合成が終了した培養後半では変化しない。しかし一部の*Bacillus*属微生物由来のPHA重合酵素を用いた場合に、培養時間の経過に伴う分子量変化が確認された。この分子量変化について詳細な機構は明らかになっていない。そこで本研究では*Bacillus cereus* YB-4由来PHA重合酵素¹を用いて、この分子量変化について新たな知見を得ることを目的とした。

【方法】 *B. cereus* YB-4由来PHA重合酵素の活性中心であるシステイン残基を置換することで重合不活性の酵素を作製し、これと他の活性型PHA重合酵素が共発現する大腸菌株を構築した。この遺伝子組換え大腸菌を、炭素源としてグルコース(20 g/L)を含むLB培地中で培養し、蓄積されるPHAの解析を行った。PHAの蓄積量をガスクロマトグラフィーにより、分子量をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により測定した。

【結果・考察】 GPC分析の結果、PHA重合酵素を共発現させた大腸菌株が蓄積するPHAの分子量は、培養時間の経過に伴い低下することが確認された。一方、共発現に用いた活性型のPHA重合酵素のみを機能させて得られたPHAは高い分子量を有していた。これらの結果より、*B. cereus* YB-4由来PHA重合酵素により分子量低下が引き起こされている可能性が示唆された。

1 Mizuno et al., *Polym. Degrad. Stab.* in press.

Study on molecular weight change of PHA synthesized by *Bacillus cereus* YB-4 PHA synthase

○Manami HYAKUTAKE, Yuta SAITO, Satoshi TOMIZAWA, Takeharu TSUGE

(Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol.)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Bacillus cereus*, site-directed mutagenesis

3P-1035 環境 DNA からの 1,3,1,4-β-グルカナーゼ遺伝子 *c103* のクローニングと大腸菌での発現

○米光 裕¹, 竹中 翔太², 稲葉 慧², 隅澤 杏介², 西岡 美幸¹, 関本 文音¹, 玉置 光佳里¹
(¹ 和歌山高専・物質, ² 和歌山高専・専攻科)

【目的】 1,3,1,4-β-グルカナーゼはビール製造工程等で使用されるが、熱による失活が問題であり、耐熱性の高い酵素が必要となる。我々は、培養系を経ずに、直接土壌や堆肥から得た環境DNAを鋳型にPCR法を用いて1,3,1,4-β-グルカナーゼ遺伝子のクローニングを試み、複数の新規1,3,1,4-β-グルカナーゼ遺伝子断片 (ORFの一部) を得た¹⁾。本研究では、それら遺伝子断片の中で、比較的耐熱性の高い*Bacillus macerans*の1,3,1,4-β-グルカナーゼ遺伝子と相溶性の高い (66%) *c103*について、ORFの全長鎖を取得後、大腸菌で発現させ、C103の特性を調べた。

【方法と結果】 遺伝子*c103*のORF全長鎖はTAIL-PCR法により得た。次いで、*c103*をpBluscriptにサブクローニングした後、*Escherichia coli* DH5α株中にてIPTG誘導により発現させた。この菌体よりのC103粗抽出液を用いて至適温度および至適pHを調べた。なお、酵素活性は、基質リケンからの遊離還元糖量をジニトロサリチル酸法を用いて測定することより求めた。その結果、C103の至適温度は50℃付近、至適pHは7付近とわかり、これらは*B. macerans*の1,3,1,4-β-グルカナーゼとほぼ同等であった。現在、C103を精製し、熱安定性や基質特異性などについて調べている。

1) 米光他, 日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集, p309

Cloning and expression of 1,3,1,4-beta-glucanase gene *c103* from environmental DNA in *Escherichia coli*

○Hiroshi YONEMITSU¹, Syota TAKENAKA², Satoshi INABA², Kyosuke SUMIZAWA², Miyuki NISHIOKA¹, Ayane SEKIMOTO¹, Hikari TAMAKI¹

(¹Dept. Material Sci., Wakayama Natl. Col. Tech., ²Adv. Eng. Fac., Wakayama Natl. Col. Tech.)

Key words 1,3,1,4-beta-glucanase, environmental DNA, cloning, expression

3P-1034 多糖類分解活性を有する中等度好熱菌の分離と解析

○上田 純子, 渡邊 啓子, 山本 修一, 黒沢 則夫
(創価大院・環境)

多糖類は、地球上でもっとも大量に生産されるバイオマスであり、最大の未利用資源でもある。今回われわれは、セルロース分解活性を指標に剪定枝堆肥から分離した新規な中等度好熱菌TC22-2b株について、16S rDNA塩基配列に基づく進化系統解析、生理学および化学分類学的性質の解析を行うとともに、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース(CMC)、コロイダルキチン、キシラン、デンプン分解活性を調べた。TC22-2b株は、*Paenibacillus elgii*に最も近縁であったが、それらの16S rDNAの相同性は93%であったことから、本株は*Paenibacillus*属の新種または新属のBacillaceae科細菌であると推定された。TC22-2b株は芽胞形成および運動性を示す好気性桿菌であり、至適生育温度は50~55℃、至適生育pHは7~8であった。NaCl濃度3.5%まで増殖することができ、また炭素源としてセロビオース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、ラクトース、マルトース、マンノース、メリビオース、ソルビトール、スクロース、トレハロース、キシロースを利用できる。主要脂肪酸はiso-C16:0 (28.6%)、n-C16:0 (21.8%)、anteiso-C15:0 (18.1%)であった。微結晶セルロースの分解活性は検出されなかったが、その他の多糖類すなわちCMC、コロイダルキチン、キシラン、デンプンの分解活性を示した。現在これらの多糖類分解特性についてより詳しく調べている。

Isolation and characterization of moderately thermophilic glycolytic bacterium

○Junko UEDA, Keiko WATANABE, Shuichi YAMAMOTO, Norio KUROSAWA

(Grad. Sch. Env., Univ. Soka)

Key words thermophilic bacterium, glycolytic enzyme, *Paenibacillus*, novel species

3P-1036 *Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼのシグナル・ペプチドは大腸菌による糸状菌キシラナーゼの細胞外生産を可能にする

○太田 一良, 田中 秀典, 山川 大輔, 浜砂 裕則, 藤本 仁寿
(宮崎大・農・応生科)

【目的】 二形性真菌*A. pullulans* ATCC 20524株由来キシラナーゼXynIのシグナル・ペプチドは大腸菌シグナル・ペプチダーゼIの認識部位モチーフAla(-3)-X-Ala(-1)を連続して3回の繰り返した配列を持つ。本報では、このシグナル・ペプチドを糸状菌キシラナーゼと融合させ、融合タンパク質の大腸菌での発現量と分泌量を評価した。

【方法および結果】 *xynI*遺伝子のシグナル・ペプチドのコード領域と糸状菌*Penicillium citrinum*由来キシラナーゼ遺伝子*xynA*の成熟酵素コード領域の融合遺伝子*xynE::A*を大腸菌用発現プラスミドpET-26b(+)に挿入し、pEXP401を構築した。このプラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入した形質転換体*E. coli*(pEXP401)をM9培地(400 ml)に接種し、30℃で振とう培養 (120 rpm) した。培養液のOD (660 nm) が0.6に達した時点で、発現を誘導するためIPTGを添加し、さらに12時間培養した。培養液1 ml 当たりのキシラナーゼ活性は、細胞抽出液画分で4.29 U、上清画分ではその4倍高い16.8 Uであった。また、培養液上清から精製した菌体外キシラナーゼのN末端アミノ酸配列から、XynIのシグナル・ペプチドは4ヶ所で切断されたことが示唆され、その内2ヶ所はAla-X-Alaモチーフに合致した。各組換え酵素は506~652 U/mg の高い比活性を示した。

Signal peptide of *Aureobasidium pullulans* xylanase allows extracellular production of fungal xylanase by *Escherichia coli*

○Kazuyoshi OHTA, Hidenori TANAKA, Daisuke YAMAKAWA, Hironori HAMASUNA, Hirohisa FUJIMOTO

(Dept. Biochem. Appl. Biosci., Miyazaki Univ.)

Key words *Escherichia coli*, secretory production, filamentous fungi, xylanase