

遺伝子操作による光合成微生物の炭酸固定能増強の研究

Study for the enhancement of carbon-dioxide-fixation-ability of photosynthetic microorganisms by gene cloning

代表研究者 京都大学理学部教授 香月裕彦
Prof., Faculty of Sci., Kyoto Univ. Hirohiko KATSUKI

協同研究者 京都大学理学部講師 加藤哲也
Lecturer, Faculty of Sci., Kyoto Univ. Tetsuya KATO

京都大学理学部助手 泉井桂
Assist., Faculty of Sci., Kyoto Univ. Katsura IZUI

京都大学理学部助手 西野徳三
Assist., Faculty of Sci., Kyoto Univ. Tokuzo NISHINO

Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) catalyzes the following CO_2 -fixation reaction: phosphoenolpyruvate + $\text{HCO}_3^- \rightarrow$ oxaloacetate + HPO_4^{2-} . We have been studying with intent (i) to clone the gene (*ppc*) for PEPC of photosynthetic micro-organisms as well as of *Escherichia coli*, (ii) to incorporate the gene into multicopy-number plasmids, and then (iii) to transform the organisms with the obtained hybrid plasmids to confer them an ability of enhanced CO_2 -fixation.

1. Characterization of the *ppc* gene of *E. coli*—The *ppc* gene coding for PEPC of *E. coli* was subcloned into the plasmid pBR 322 to give the plasmid pS2. The PEPC content in the cells of *E. coli* bearing pS2 was 20 times as high as the wild strain. The nucleotide sequence of the *ppc* gene was determined by the Maxam-Gilbert method. From the sequence (2649 base pairs), the primary structure of PEPC subunit was deduced. The subunit was found to be composed of 883 amino acid residues, having a molecular weight of 99061. The validity of the deduced amino acid sequence was supported by the amino acid composition and amino acid sequence of N- and C-terminal regions of PEPC. The initiation point of transcription of the *ppc* gene was found to be located at 91 or 92 base pairs upstream the initiation point of translation by the S1 nuclease mapping method. The nucleotide sequence of the -10 and -35 regions (region recognized by RNA polymerase) were fairly in accordance with the consensus sequence hitherto reported. Deletion analysis of the flanking region upstream the *ppc* gene showed that the -50 th to -140 th region contributes significantly to the expression of this gene.

2. Properties of PEPC's of two photosynthetic micro-organisms—The properties of PEPC's of two blue-green algae (*Anacystis nidulans* and *Spirulina siamense*) and one green alga (*Chlorella regularis*) were studied in comparison with that of *E. coli*. Analysis of the reaction products of $^{14}\text{CO}_2$ -fixation in *A. nidulans* and *C. regularis* showed that the fixation was mainly due to PEPC reaction. The enzyme of the latter organisms was fairly stable, but that of the former was very labile. The enzyme of the former was found to be stabilized by the addition of 20% glycerol. The enzymes of both organisms were characterized. The latter enzyme was inhibited by the compounds such as L-malate, fumarate and succinate, but the former enzyme seemed to have no allosteric effector so far as examined.

3. Cloning of the *ppc* gene of *A. nidulans* and determination of its nucleotide sequence—At first, an attempt was made to get the *ppc* DNA of *A. nidulans* by the DNA-DNA hybridization technique using the *ppc* DNA of *E. coli* as a probe. But it was unsuccessful. The cloning was performed by the shot gun method. The chromosomal DNA fragments were ligated to an *E. coli* vector, pBR322. They were introduced into *E. coli* K802 (r^- , m^+) for the preparation of gene library of *A. nidulans*. The plasmid DNA was used for the transformation of the Glu^- phenotype

of *E. coli* PCR1 (*ppc*). The cultivation of the transformant produced PEPC characteristic for *A. nidulans*. The enzyme did not undergo a regulation by the compounds such as acetyl-CoA and L-aspartate which are allosteric effectors of the *E. coli* enzyme. In addition, it was confirmed by Southern blotting method that the DNA fragments obtained originated from the chromosomal DNA of *A. nidulans*. Nucleotide sequence of the cloned *ppc* gene of the alga was determined by the "dideoxy method" using M13 phage. From the sequence of the coding region of the *ppc* (3051 base pairs), the amino acid sequence of PEPC subunit was deduced. The subunit was found to be composed of 1017 amino acid residues, having a molecular weight of 117290. No big difference was found in codon usage between *A. nidulans* and *E. coli* except for the usage with high frequency of CCC for proline and AAG for lysine in *A. nidulans*.

The amino acid sequence of *A. nidulans* PEPC was compared with that of *E. coli* PEPC. There was observed about 30% homology as a whole and 40% homology in the C-terminal halves. The higher extent of homology in the C-terminal halves might suggest that these halves of the polypeptides are responsible for the formation of the catalytic domain.

4. Construction of shuttle vector between *E. coli* and *A. nidulans* cells—A shuttle vector which can autonomously replicate both in *E. coli* and *A. nidulans* cells was constructed by ligation of a small inherent plasmid of *A. nidulans* with *E. coli* plasmid vector pBR328. It was possible to transform *A. nidulans* cells by using of this vector conferring resistance to chloramphenicol.

研究目的

石油資源の枯渇や食糧不足が取りざたされる現代において、太陽エネルギーと二酸化炭素という無尽蔵な二つの資源をより効率良く利用できるような高能率光合成作物を育種することは、時代の要請である。しかし、高等植物を育種する場合を考えると、世界的に利用可能な土地が減少していること、天候の影響を受けやすいこと、などの問題がある。この点、適当な光合成微生物を用いることができれば、自動制御下に効率良く、食糧ならびに物質の生産を行なうことが可能である。しかしながら、現状では、十分な性質を持つ光合成微生物は見いだされていない。

我々は大腸菌 (*Escherichia coli*) のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (ホスホエノールピルビン酸 + $\text{HCO}_3^- \rightarrow$ オキサロ酢酸 + オルトリン酸の反応を触媒する、以下 PEPC と略す) の遺伝子 (*ppc* と記す) のコピー数を増やすことにより、PEPC 量を増加させ、その結果、培養 1 l 当たり 3 g ものグルタミン酸を生産させることに成功した。本菌を突然変異などにより、グルタミン酸から生合成される種々の物質の生産に利用することは十分に可能である。また、PEPC は炭酸固定能の高い一群の高等植物 (C4-植物) において、直接、炭酸固定に与る酵素として重要であ

り、分子育種のためのターゲットの一つとされている。しかし未だその遺伝子は、高等植物からクローニングされていない。

本研究の目的は、上記の見地から、光合成微生物の中から適当なものを選択し、遺伝子操作により活性を高め、炭酸固定能を増強し、炭酸からの有用物質生産のための出発点となるべき菌をつくり出すことにある。そのための研究の進め方として、1) *E. coli* の *ppc* の構造に関する知見を集積する一方、2) 光合成微生物の PEPC の酵素学的性質を調べてターゲットとすべき光合成微生物を決定する。その結果、らん藻 *Anacystis nidulans* を選定したが、上記の目的を達成するための戦略として、図 1 に示すように多コピーのプラスミド・ベクターを用いて、*A. nidulans* 中での *ppc* の遺伝子量 (gene dosage) を高めることにより、PEPC 活性を上げることにした。そこで、3) *A. nidulans* の *ppc* をクローニングし、その構造を調べると同時に、4) *A. nidulans* と *E. coli* 間のシャトル・ベクターを作成することにした。

研究経過と成果

1) 大腸菌の *ppc* の解析

Clarke と Carbon による *E. coli* の遺伝子銀行から *ppc* を保持するプラスミド pLC20-10 を同定し、これより *ppc* を含む *Sal I* 断片 (4.4 kb

Strategy

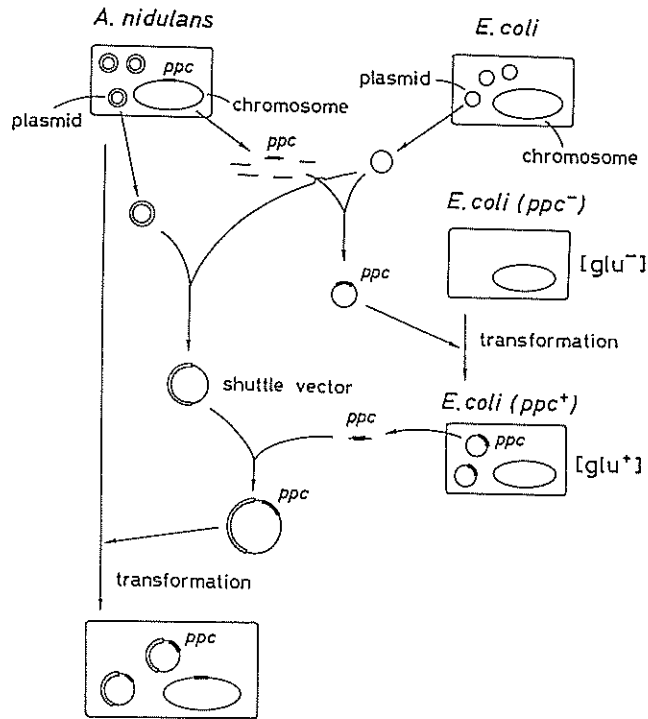


図 1. ラン藻 (*A. nidulans*) の *ppc* 遺伝子のクローニングとその遺伝子のコピー数を増加させる方法.

(kilobase pairs を kb と略す) を大腸菌のベクター pBR322 にサブ・クローニングしたプラスミド pS2 を得た(図 2)。pS2 保持菌においては

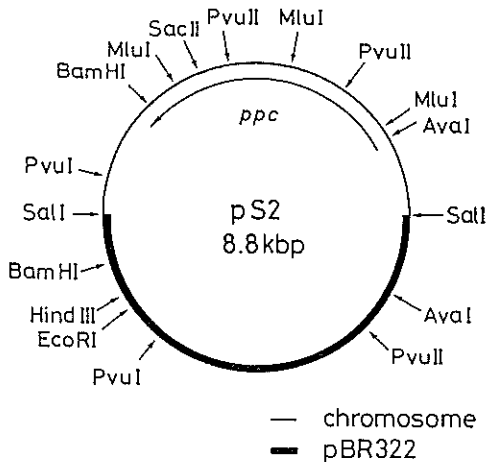


図 2. 大腸菌 (*Escherichia coli*) の *ppc* 遺伝子を含むプラスミド (pS2) の制限酵素切断点地図.

PEPC の細胞内含量は、非保持菌より約 20 倍増加していた。pS2 について、いくつかの欠失変異株 (deletion mutant) を作成し、これを *ppc* 欠損変異株 (*ppc*⁻ 株) に導入した。これらのプラスミド保持菌の無細胞抽出液中の PEPC 活性の有無、およびプラスミドによってコードされるタンパク質を特異的に標識する“Maxicell 法”により解析した結果、pS2 上の *ppc* の領域とその転写方向は、図 2 の矢印で示すようになっていたと予測された。

さらに詳細な解析をするために、pS2 の *ppc* を含む *Sal* I 断片 (4.4 kb) について、Maxam-Gilbert 法により、その全塩基配列を決定した。そのうち PEPC をコードしている部分をそれから導かれる全アミノ酸配列とともに、図 3 に示す。図には DNA の 2 本鎖のうち、sense strand のみを示す。これによって、*E. coli* の PEPC のサブユニットは 2649 bp (base pairs を bp と略す) から

TTACTTGGGGCGATTTTAAACATTTCCATAAGTACCGCTTATTAAAGCCGCTGTAATTAATGACGTAAATTCCTGCTATTTATTGTTGCTGAAAGCGATTTCGCACCATTTGCGG 1-20

TCACCGCTTTACCTGGCTTTATAAAGACGACGAAAGCAAAAGCCCGACATATTCGCGCCAATCGCAGTGAAGGATACAGGGCTATCAAACGATAAAGATGGGCTGCTGGGGTAAT 1-1

ATG AAC GAA CAA TAT TCC GGA TTG CCT AGT AAT GTC ACT ATG CTC GGC AAA GTG CTG GGA GAA ACC ATC AAG GAT GCG TTG GGA GAA CAC 90
Met Asn Glu Gln Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Asn Val Ser Met Leu Gly Lys Val Leu Gly Glu Thr Ile Lys Asp Ala Leu Gly Glu His 30
ATT CTT GAA CGC GTA GAA ACT ATC CGT AAG TTG TCG AAA TCT TCA CGC GCT GCC AAT GAT GCT AAC CGC GAG GAG TTG CTC ACC ACC TTA 180
Ile Leu Glu Arg Val Glu Thr Ile Arg Lys Leu Ser Lys Ser Ser Arg Ala Gly Asn Asp Ala Asn Arg Gln Glu Leu Leu Thr Thr Leu 60
CAA AAT TTG TCG AAC GAC GAG CTG CTG CCC GTT GCG CGT GCG TTT AGT CAG TTC CTG AAC CTG GCC AAC ACC CGC GAG CAA TAC CAC AGC 270
Gln Asn Leu Ser Asn Asp Glu Leu Leu Pro Val Ala Arg Ala Phe Ser Gln Phe Leu Asn Leu Ala Asn Thr Ala Glu Gln Tyr His Ser 90
ATT TCG CCG AAA GGC GAA GCT GCC AGC AAC CCG GAA GTG ATC GCG CCG ACC CTG CGT AAA CTG AAA AAC CAG CGC Asp GAA TAC ACC GAA GAC 360
Ile Ser Pro Lys Gly Glu Ala Ala Ser Asn Pro Glu Val Ile Ala Arg Thr Leu Arg Lys Leu Lys Asn Gln Pro Glu Leu Ser Glu Asp 120
ACC ATG AAA AAA GCA GTG GAA TCG CTG TCG CTG GAA CTG GTC CTC ACG GGT CAC CCA ACC GAA ATT ACC CGT GGT ACA CTG ATC CAC AAA 450
Thr Ile Lys Lys Ala Val Glu Ser Leu Leu Val Leu Thr Ala His Pro Thr Ser Glu Ile Thr Arg Arg Thr Leu Ile His Lys 150
ATG GTG CAA GTA AAC GCG TGT TTA AAA CAG CTC AAT GAA AAT ATC GCT GAC TAC GAA CAA AAC CAG CTG ATG CGT GCG CTG CCG CAG 540
Met Val Glu Val Asn Ala Cys Leu Lys Gln Leu Ser Lys Asn Lys Asp Ile Ala Asp Tyr Glu His Asn Asp Leu Met Arg Leu Arg Glu Gln 180
TTG ATC GCG CAG TCA TGG CAT ACC GAT GAA ATC CGT AAG CTG GCT CCA AGC CCG GTA GAT GAA GCC AAA TGG GCG TTT GCG GTA CTG GAA 630
Leu Ile Ala Gln Ser Trp His Thr Asp Glu Ile Arg Lys Leu Arg Pro Ser Pro Val Asp Glu Ala Lys Trp Gly Phe Ala Val Val Glu 210
AAC AGC CTG TGG CAA GGC GTA CCA AAT TAC CTG CCG GAA CTG ACA CAA AAC GAA GAA CTG TGG GAA CCG CTC TAC AAA CTG CCG CTC GAA TTT 720
Asn Ser Leu Trp Gln Gly Val Pro Asn Tyr Leu Arg Glu Leu Asn Glu Gln Leu Glu Glu Asn Leu Gly Tyr Lys Leu Pro Val Glu Phe 240
GTT CCG CTC CGT TTT ACT TCG TGG ATG GCG GAC CCG GAC GGC AAC CCG AAC GTC ACT GCG GAT ATC ACC CCG CAC GTC CTG CTA CTC 810
Val Pro Val Arg Phe Thr Ser Trp Met Gly Gly Asp Arg Asp Gly Asn Pro Asn Val Thr Ala Asp Ile Thr Arg Arg Val Lys Cys Phe Gly Val Pro Leu 270
AGC CCG TGG AAA GGC ACC GAT TTG TTC CTG AAA GAT ATT CAG GTG CTG GTT TCT GAA CTG TCG ATG GTT GAA GCG ACC CCG CTA GAT CTC 900
Ser Arg Trp Lys Ala Thr Asp Leu Phe Leu Lys Asp Ile Gln Val Leu Ser Glu Leu Ser Met Val Leu Glu Ala Thr Pro Glu Leu Leu 300
CGC CTG GTT GCG GAA GAA GGT GCG GCA GAA CCG TAT CCG TAT CTG ATG AAA AAC CTG CGT TCT CCG CTG ATG GCG ACA CAG GCA TGG CTG 990
Ala Leu Val Gly Glu Glu Gln Ala Glu Gln Pro Tyr Arg Tyr Leu Met Lys Asn Leu Arg Ser Arg Leu Met Ala Thr Gln Ala Trp Leu 1330
GAA GCG CCG CTG AAA GGC GAA GAA CTG CCA AAA CCA GAA GGC CTG CTG ACA CAA AAC GAA GAA CTG TGG GAA CCG CTC TAC GCT TGC TAC 1080
Glu Ala Arg Leu Lys Gly Glu Glu Leu Pro Lys Pro Glu Gly Leu Leu Thr Gln Asn Glu Glu Leu Trp Glu Pro Leu Tyr Ala Cys Tyr 360
CAG TCA CTT CAG CCG TGT GGC ATG GGT ATT ATC GCG AAC GGC GAT CTG CTC GAC ACC CTG CCG CCG GTG AAA TGT TTC GGC GTA CCG CTG 1170
Gln Ser Leu Gln Ala Cys Gly Met Gly Ile Ile Ala Asn Gly Asp Leu Leu Asp Thr Leu Arg Arg Val Lys Cys Phe Gly Val Pro Leu 390
GTC CGT ATT GAT ATC CGT CAG GAG AGC ACG CGT CAT ACC GAA GCG CTG GCG GAG CTG ACC CCG TAC CTC GGT ATT GCG GAC TAC GAA AGC 1260
Val Arg Ile Asp Ile Arg Gln Glu Ser Thr Arg His Thr Glu Ala Leu Gly Glu Thr Arg Tyr Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Ala Cys Tyr 420
TGG TCA GAG GCC GAC AAA CAG CCG TTC CTG ATC CCG GAA CTG AAC TCC AAA CGT CCG CTT CTG CCG CCG AAC TGG CAA CCA AGC GCC GAA 1350
Trp Ser Glu Ala Asp Lys Gln Ala Phe Leu Ile Arg Glu Leu Asn Ser Lys Arg Pro Leu Leu Pro Arg Asn Trp Gln Pro Ser Ala Glu 450
ACG CCG GAA GTG CTC GAT ACC TGC CAG GTG AIT GCC GAA GCA CCG CAA GGC TCC ATT GCC GCC TAC GTG ATT TCG ATG GCG Ser AAA ACG CCG 1440
Thr Arg Glu Val Leu Asp Thr Cys Gln Val Ile Ala Glu Ala Pro Gln Gly Ser Ile Ala Ala Tyr Val Ile Ser Met Ala Lys Thr Pro 480
TCC GAC GTA CTG CCG GTC CAC CTG CTG AAA GAA GCG GGT ATC GCG TTT CCG ATC CCG GTT GCT CCG CTG TTT GAA ACC CTC GAT GAT 1530
Ser Asp Val Leu Ala Val His Leu Leu Leu Lys Glu Ala Gly Ile Gly Phe Ala Met Pro Val Ala Pro Leu Phe Glu Thr Leu Asp Asp 510
CTG AAC AAC GCC AAC GAT GTC ATG ACC CAG CTG CTC AAT ATT GAC TGG TAT CGT GCG CTG ATT CAG GCG AAA CAG ATG GTC ATG ATT GGC 1620
Leu Asn Asn Ala Asn Asp Val Met Thr Gln Leu Leu Asn Ile Asp Trp Tyr Arg Gly Leu Ile Gln Gly Lys Gln Met Ala Met Ile Gly 540
TAT TCC GAC TCA GCA AAA GAT CCG GGA GTG ATG GCA CGT TCC TGG GCG CAA TAT CAG GCA CAG GAT GCA TTA ATC AAA ACC TGC GAA AAA 1710
Tyr Ser Asp Ser Ala Lys Asp Ala Gly Val Met Ala Ala Ser Trp Ala Gln Tyr Gln Ala Gln Asp Ala Leu Ile Lys Thr Cys Glu Lys 570
CGC GGT ATT GAG CTC ACG TTG TTC CAC GGT CCG GCG GGT TCC ATT GGT CCG GCG GCG CCA CCT GCT CAT CCG GCG CTG CTC CAA CCG 1800
Ala Gly Ile Glu Leu Thr Leu Phe His Gly Arg Gly Ser Ile Gly Arg Gly Ala Pro Ala His Ala Ala Leu Leu Ser Gln Pro 600
CCA GAC CTG AAA GCG GGC CTG CCG GTA ACC GAA CAG GCG GAG ATG ATC CCG TTT AAA TAT GGT CTG CCA GAA ATC ACC CTC ACC GCG 1890
Pro Gly Ser Leu Lys Gly Gly Leu Arg Val Thr Glu Gln Gly Glu Met Ile Arg Phe Lys Tyr Gly Leu Pro Glu Ile Thr Val Ser Ser 630
CTG TCG CTT TAT ACC GCG CCG ATT CTG GAA GCC AAC CTG CTG CCA CCG CCG GAG CCG AAA GAG AGC TGG GGT CCG ATT ATG GAT GAA CTG 1980
Leu Ser Leu Tyr Thr Gly Ala Ile Leu Glu Ala Asn Leu Leu Pro Pro Glu Pro Lys Glu Ser Trp Arg Arg Ile Met Asp Asp Glu Leu 660
TCA GTC ATC TCC TGC GAT GTC TAC CCG GGC TAC GTA CGT GAA AAC AAA GAT TTT GTG CCT TAC TTC CCG TCC GGT ACC CCG GAA CAA GAA 2070
Ser Val Ile Ser Cys Asp Val Tyr Arg Val Arg Glu Asn Lys Asp Phe Val Pro Tyr Phe Arg Ser Ala Thr Pro Glu Gln Glu 690
CTG GGC AAA CTC CCG TTG GGT TCA CGT CCG GCG AAA GGT GCG CCA ACC GCG GCG GTC GAG TCA CTA GCG GCT ATT CCG TGG ATC TTC CCG 2160
Leu Gly Lys Leu Pro Leu Gly Ser Arg Pro Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Gly Val Glu Ser Leu Arg Ala Ile Pro Trp Ile Phe Ala 690
TGG ACG CAA AAC CGT CTG ATG CTC CCG GCG TGG CTG GGT GCA GGT ACG GCG CTG CAA AAA GTG GTC GAA GCG GAA CAG ACC GAG CTG 2250
Trp Thr Gln Asn Arg Leu Met Leu Pro Ala Trp Leu Gly Ala Gly Thr Ala Leu Gln Lys Val Val Glu Asp Gly Lys Gln Ser Glu Leu 750
GAG GCT ATG TGC CCG GAT TGG CCA TTT TTC TCG ACG CGT CTC GGC ATG CTG GAG ATG GTC TTC GCC AAA GCA GAC CTG TGG CTG CCG GAA 2340
Glu Ala Met Cys Arg Asp Trp Pro Phe Phe Ser Thr Arg Leu Gly Met Leu Phe Ala Lys Ala Asp Leu Trp Leu Ala Glu 780
TAC TAT GAC CAA GCG CTG GTA GAC AAA GCA CTG TGG CCG TTA GGT AAA GAG TTA CCG AAC CTG CAA GAA GAA GAC ATC AAA GTG GTG CTG 2430
Tyr Tyr Asp Gln Arg Leu Val Asp Lys Ala Trp Pro Leu Gly Lys Glu Leu Arg Asn Leu Gln Glu Glu Asp Ile Lys Val Val Leu 810
CGC ATT GCC AAC GAT TCC CAT CTG ATG GCG GAT CTG CCG TGG ATT GCA GAC TCT ATT CAG CTA CCG AAT ATT TAC ACC GAC CCG CTG AAC 2520
Ala Ile Ala Asn Asp Ser His Leu Met Ala Asp Leu Pro Trp Ile Ala Glu Ser Ile Gln Leu Arg Asn Ile Tyr Thr Asp Pro Leu Asn 840
GTA TTG CAG GCC GAG TTG CTG CAC CCG TCC CCG CAG CCA GAA AAA GCG CAG GAA CCG GAT CCT CCG GTC GAA CAA GCG TTA ATG GTC 2610
Val Leu Gln Ala Glu Leu Leu His Arg Ser Arg Gln Ala Glu Lys Glu Gly Gln Glu Pro Asp Pro Arg Val Glu Gln Ala Leu Met Val 870
ACT ATT GCC GCG ATT CCG GCA GGT ATG CGT AAT ACC GCG TAA TCTTCTCTCTGCAACCCCTGCTCTTTTCGCGGAGGGTITTCGAAATACTCTGTTCTTAA 2715
Thr Ile Ala Gly Ile Ala Ala Gly Met Arg Asn Thr Gly STP

CACCCCTCGTTTCAATATATTTCTGTCGCACTTTTATTCAAATCTGAAATATACCTTCAGATATCCTTAAGGAATTCGCTGTAACATTCGCGCATATTTTTCAGACAGGTTCTTACTA 2834

TGCATTCACAGAGTCCAGGCTAAACCTCTTTT 2868

図 3. *Escherichia coli* の *ppc* の塩基配列とそれから導かれる PEPC の全アミノ酸配列, 転写開始点を ↑ で, 転写終結の特徴的構造を (→←) で示す.

なる DNA を翻訳領域とし, 883 個のアミノ酸残基から成るポリペプチド (分子量 99.061) であることが示された。これとは別に, タンパク化学的

方法により, アミノ酸組成, N-末端から 9 残基のアミノ酸配列, C-末端から 4 残基のアミノ酸配列が決定されており, 今回塩基配列から求めた結果

と一致したので、図3に示した結果の正しいことが確認された。これまで植物界、微生物界を通じて PEPC の一次構造に関する知見は全くなかったが、本研究によって初めて明らかにされたわけである。*E. coli* の PEPC は、多くのアロステリック・エフェクターを持つ酵素として知られているが、一次構造が解明されたいくつかのアロステリック酵素の中でも、今回の *E. coli* の PEPC は最大級のものである。

次に *ppc* の転写開始部位 (プロモーター部位) を調べた。細胞内に含まれる mRNA を抽出し、これと *ppc* DNA とのハイブリダイゼーションを行なった後、S1 スクレアゼによって1本鎖部分を除去し、電気泳動を行なうことによって mRNA と対合する DNA 部位を同定するという S1 スクレアゼ・マッピング法によった。この結果、転写は翻訳開始点より、91 ないし 92 塩基上流から開始されることがわかった (図3において↑で示す)。また、この転写開始点は、*in vitro* で転写した際の結果とも一致した。RNA ポリメラーゼの結合に必要なとされる “-10” および “-35” 領域の塩基配列は、それぞれ CTTTAT および TTGACG と推定された。この知見は、中心代謝系の酵素遺伝子としては初めてのものであるが、これまで *E. coli* について consensus sequence とされてきた配列とかなりよく似ていることがわかった。この結果、*ppc* 遺伝子は、一つの独立した転写単位 (オペロン) を構成し、クローン化さ

れた 4.4 kb の DNA 断片中に完全に含まれることが明らかになった。図4にはその概要を示す。

本酵素の細胞内レベルは、培養に用いる炭素源化合物の種類によって約 10 倍変動する。そこで、*ppc* の発現調節機構を明らかにする目的で、*ppc* のプロモーター部位、およびその上流部分の役割について調べた。まず、培地中の炭素源化合物を変化させたり、緊縮制御が発動される条件にしたりした時の転写開始点の影響を調べた。しかし、これらの変化によって転写開始点が変わることはなかった。次に、この発現調節における上流部分の役割を調べるために、クローン化 DNA を上流端から転写開始点の方向に種々の長さで欠失させた一連のプラスミドを調製し、それらのプラスミド保持菌を、glucose 培地、succinate 培地、およびポリペプトン-酵母エキス培地 (L-broth) で生育させ、本酵素のレベルを測定した。図5に結果を示す。この結果より、*Sal* I 断端より約 600 bp 切除しても本酵素レベルはほとんど影響を受けないことがわかった。しかし、転写開始点より 140 bp 以内まで切除されると、glucose 培地および succinate 培地でのレベルは、約 1/2 まで徐々に低下したのち急激に上昇し、-35 領域に達するとゼロになった。この時に L-broth の菌では、レベルの低下は見られず、約 4 倍の急な上昇のみが認められた。これらの結果は “-10” および “-35” 領域の位置を確認するとどまらず、-50 から -140 の領域も *ppc* の発現調節に関与して

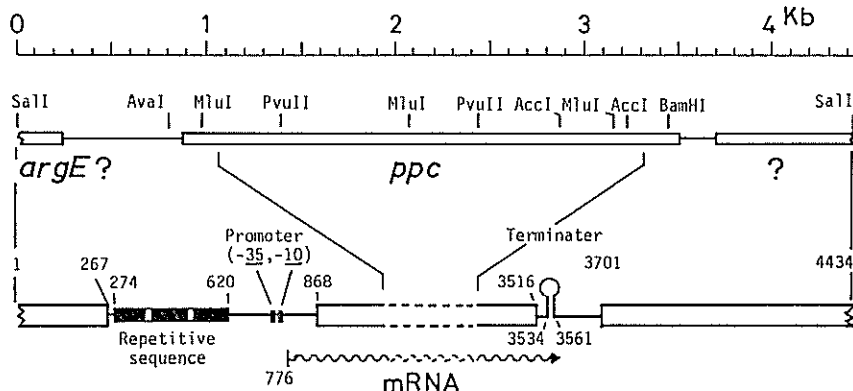


図4. 大腸菌 *ppc* 遺伝子の構成 (オペロン構造)。

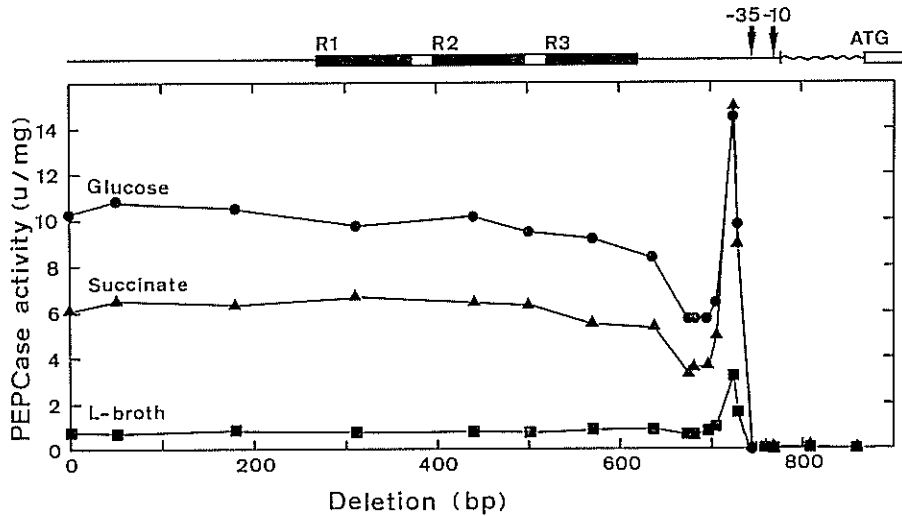


図 5. *ppc* 遺伝子の発現に及ぼす欠失変異の影響. *ppc* 遺伝子の上流部分の DNA を上流から種々の長さに欠失させたプラスミドを調製し、それらのプラスミドによって合成される PEPC のレベルを、種々の培養条件下で調べた。

いることを示すたいへん興味深い知見である。また、プロモーター領域の塩基配列の一部が、cyclic AMP の受容体タンパク (CRP) 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列と共通していることが見いだされ、*ppc* 遺伝子の発現制御に cyclic AMP-CRP 制御系の関与する可能性が示唆された。

2) いくつかの光合成微生物の PEPC の性質
2種類のラン藻 (*A. nidulans*, *Spirulina siamese*) および緑藻 (*Chlorella regularis*) の PEPC について、大腸菌のそれを対照としながら研究を行なった。無細胞抽出液中の PEPC 活性は、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) に依存した放射性重炭酸 ($[^{14}\text{C}]\text{HCO}_3^-$) の酸不揮発性物質への取り込みにより調べ、反応生成物は、ペーパークロマトグラフィーにより分析した。*A. nidulans* および *C. regularis* からは高い活性が認められ、反応生成物もリンゴ酸、フマル酸、アスパラギン酸が大部分であった。しかし、*S. siamese* からは高い炭酸固定活性が認められたが、その PEP 依存性は低く、反応生成物も大部分が糖リン酸エステル画分に見いだされた。同一組成の反応混液を用いたときの比活性 (1 単位は、 $1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ タンパク) は、大腸菌, 0.011; *A. nidulans*, 0.066; *C. regularis*, 0.22 であった。*C. regularis* の PEPC

は比較的安定であったが、*A. nidulans* のそれは、非常に不安定であった。そこで、*A. nidulans* の PEPC の安定化条件を探したところ、20% グリセロールに顕著な安定化効果があることが明らかとなった。

比較的安定であった *C. regularis* の PEPC について部分精製を行ない、若干の酵素学的性質を検討した。至適 pH は 8.0、基質およびコファクターの K_m 値は、それぞれ、PEP, 0.53 mM; $\text{KHCO}_3 < 0.2 \text{ mM}$; Mg^{2+} , 0.18 mM であった。エフェクター感受性については、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸などの C_4 -二塩基酸および、D-および L-ホスホ乳酸などの基質アナログによるのみ有意の阻害を受けた。*E. coli* の PEPC のアロステリックエフェクターであるアセチル-CoA、アスパラギン酸などに対しては、非感受性であった。セファロース 6B を担体としたゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、*C. regularis* の PEPC の分子量は 30 万余と推定された。

3) *Anacystis nidulans* の *ppc* のクローニング
および塩基配列決定

2) において PEPC 活性が検出されたこと、および、原核生物であることなどを考慮して、光合成微生物として単細胞性ラン藻の *Anacystis*

nidulans を選定し、その *ppc* のクローニングをすることにした。*A. nidulans* は、光合成微生物のなかでは、その宿主-ベクター系が最もよく開発されたものである。まず、DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより、*E. coli* の *ppc* DNA と *A. nidulans* の *ppc* DNA がハイブリッドを形成し得るか否かを検討したが、低いホモロジーをも検出できる条件においてもハイブリダイズしなかった。すなわち、*E. coli* *ppc* DNA をプローブに用いたハイブリダイゼーションによって、*A. nidulans* の *ppc* をクローニングすることはできないことがわかった。次に、*E. coli* の *ppc* 欠損株 (PCR1) の表現型 (グルタミン酸要求性) を相補することを指標として、*A. nidulans* の *ppc* のクローニングを試み、成功した。以下にその詳細を記す。*A. nidulans* 6301 株ゲノム DNA を制限酵素 *Sau*3AI で部分分解した後、アガロースゲル電気泳動にかけて 4-20 kb の長さの DNA の分画を調製し、これを *Ban* HI で消化した *E. coli* のベクタープラスミド pBR 322 の DNA に組み

込んだ。このプラスミド DNA をまず、*E. coli* K 802 (r^- , m^+) に導入して、*E. coli* の修飾系によって DNA を修飾し、*E. coli* の制限系によって分解されないようにした。この修飾されたプラスミド DNA を、K 802 のプラスミド保持菌より調製し、*ppc* 欠損株 PCR 1 の形質転換に供した。約 12000 個の組換体について探したところ、グルタミン酸要求性を失わせるプラスミドが 5 個得られ、それらを、pA 111, pA 171, pA 172, pA 181, pA 182 と命名した。これらのプラスミドを保持する PCR 1 株を培養し、20% グリセロール存在下に細胞を破砕して無細胞抽出液を調製した。それらの酵素活性を測定したところ、確かに PEPC 活性が認められ、活性の安定性およびアロステリックエフェクターに対する感受性において、*A. nidulans* の酵素の特徴を示し、明らかに *E. coli* のものとは異なっていた。この酵素の酵素学的性質については後述する。また、Southern ブロット解析により、これらのプラスミドに組み込まれた DNA 断片が、*A. nidulans* ゲノムの

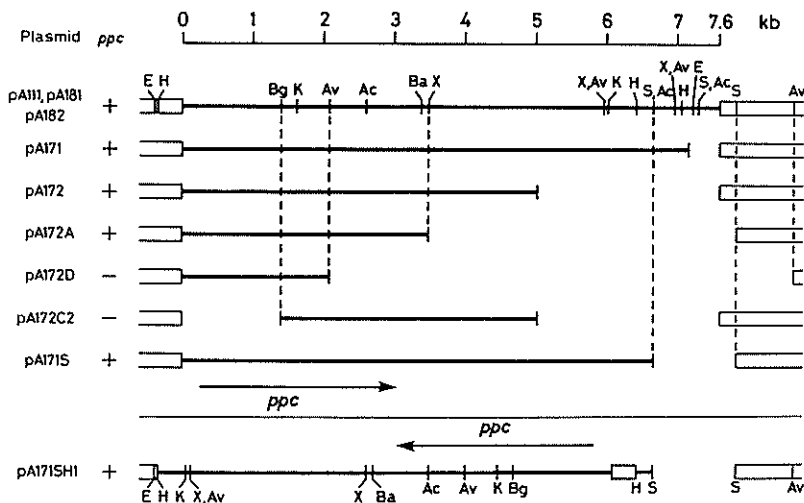


図 6. *Anacytosis nidulans* の *ppc* を含む DNA 断片の制限酵素切断点地図と種々の欠失変異・逆位変異の導入による *ppc* の位置変異の解析。白ぬきのバーはベクター pBR 322 の部分を示し、黒線はクローニングされた *A. nidulans* の DNA を示す。*ppc* 欠損株を相補する能力のあるプラスミドを +、ないものを - で示す。プラスミド pA 171 SH 1 は、他のすべてのものとはベクターに対する組み込み方向を逆にしたものである。矢印は“maxicell”法から推定した *ppc* のおよその位置と転写方向を示す。制限酵素名は略号で示す；E=*Eco* RI, H=*Hin* dIII, Bg=*Bgl* II, K=*Kpn* I, Av=*Ava* I, Ac=*Acc* I, Ba=*Bam* HI, X=*Xho* I, S=*Sal* I。

kb の DNA 断片を, pA171 および pA172 は, それぞれ 7.2 kb および 5.0 kb の DNA 断片を組み込んでいた。切断点地図よりクローン化された DNA 断片は, いずれも共通部分を含んでおり, しかも組み込み方向が一定であることがわかった。pA172 についてさらに欠失変異を導入することによって解析した結果, *ppc* は図に pA172A として示すような 3.5 kb の領域に含まれることが明らかとなった。さらにこの DNA をベクター DNA に対して逆向きに挿入すると酵素レベルが低下することから, *A. nidulans* の *ppc* のプロモーターは *E. coli* 内で効率良く発現されず, むしろベクターのテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターによって, 大部分の転写が行なわれていることが示唆された。

さらに, “Maxicell 法” によってプラスミドにクローン化された遺伝子産物の同定を行ない, *A. nidulans* の PEPC は分子量約 11 万のポリペプチドをサブユニットとすることを明らかにした。また, 欠失変異を導入したプラスミドについても, 同様に “Maxicell 法” を行ない, 不完全なポリペプチドを同定することにより, *ppc* の領域とその転写方向は図 6 の矢印のように推定された。

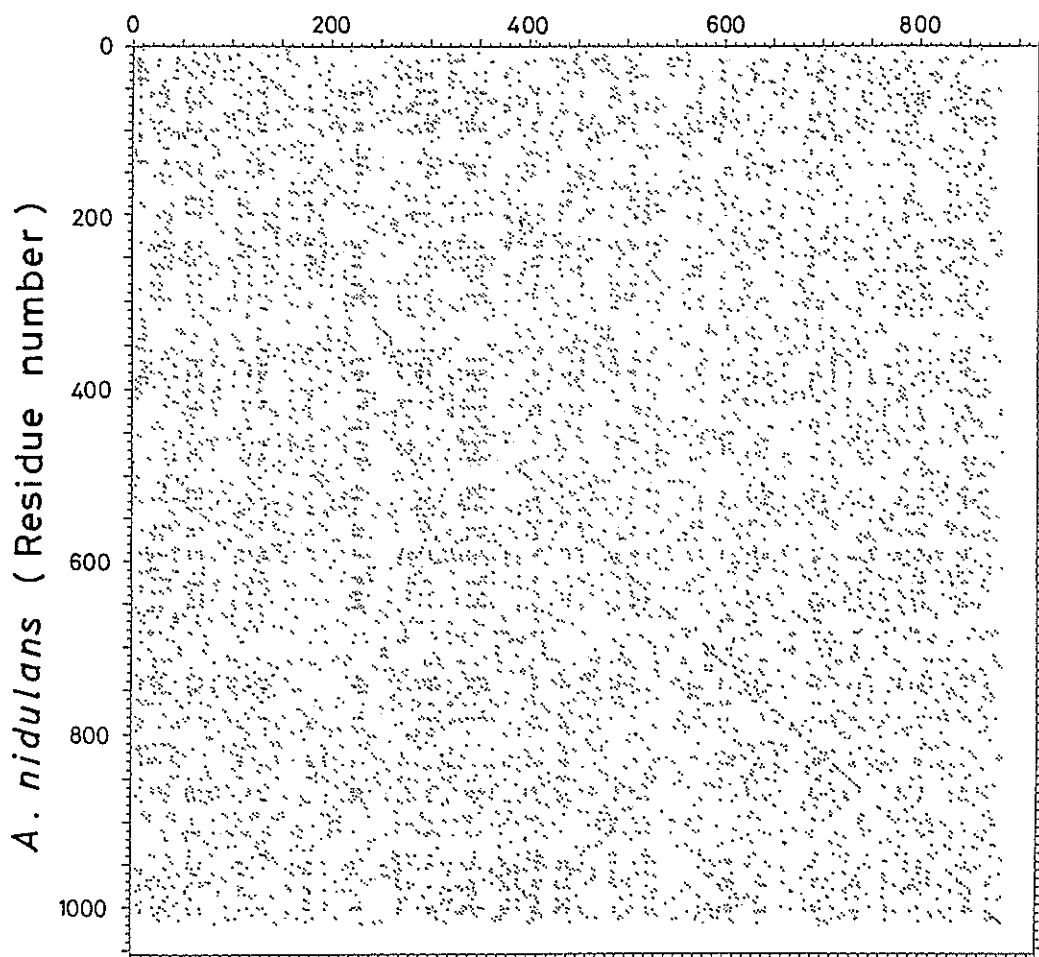
このクローン化された *ppc* についてその全塩基配列を明らかにした。すなわち, *ppc* を含む, pA172 *Hind* III-*Xho* I 断片, 3957 bp の配列を M13 ファージを用いた dideoxy 法により決定した (図 7)。上流の 348 bp はベクターに用いた pBR 322 に由来している。Maxicell 法により, *ppc* の遺伝子産物の分子量は約 11 万と推定されたが, 十分な大きさを持つ open reading frame (ORF) は一つしかなく, それから導かれるアミノ酸配列を塩基配列の下に一文字表記で示した。これは, 先に推定した *ppc* の領域, 転写方向と一致したので, この ORF が *ppc* の reading frame であると結論した。これは 3255 bp から成り, 上流側 117 bp はベクター中に含まれていた。しかしながら, 分子量が約 11 万であること, 10 bp 上流に Shine-Dalgarno 配列に似た配列 AGGGAAT が見られること, *A. nidulans* 由

来部分に入っていること, という 3 点を考えて, 現時点では図中に○印で囲んだメチオンンから翻訳されるのであろうと推測している。この場合, 構造遺伝子は 3051 bp となり, 1017 アミノ酸残基, 分子量 117,290 となる。また, C-末端から下流 32 bp のところから, 矢印で示すような 2 回転対称構造が見られ, 転写終結と関連していると推定された。

A. nidulans ppc と *E. coli ppc* について, codon usage を比較したところ, 大きな差異は認められなかった。ただし, *A. nidulans* においては, プロリンの codon として CCC, リジンの codon として AGG が多用されていた。この傾向は, 篠崎, 杉浦らによって決定された *A. nidulans* のリブソーム 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの large サブユニットと small サブユニット遺伝子においても見られるので, これらは *A. nidulans* の “最適コドン” を反映しているのであろう。

E. coli の PEPC は多くのアロステリック・エフェクターを持つのに対して, *A. nidulans* の PEPC は, 調べた限りでは, アロステリック・エフェクターをもたないようであった。この大きな差が何に由来するのか興味を持たれるが, 今回の研究で両者の一次構造についての比較が可能となった。図 8 はいわゆるドットマトリクス法によって両者を比較したものである。横軸に 883 残基からなる *E. coli* の PEPC のアミノ酸配列を並べて, アミノ酸残基の一致したところにドットを打った結果を示す。ただし, この場合には連続した 3 残基のうち, 2 残基が一致すればその 3 残基の位置にドットを打つようにした。この図からわかるように, *A. nidulans* の側で 490 番目の残基あたりから C-末端にかけて相同性の高い部分がほぼ連続していることがわかる。そのほかに, 210 残基あたりと 320 残基あたりにも短い相同な部分がみられる。両酵素のアミノ酸残基ができるだけ一致するようにギャップを入れて並べると, 全体としては約 30% のアミノ酸残基が一致し (相同性 30%), 487 残基目から C-末端にかけては約 40% の相同性がみられる。さらに, 両酵素

E. coli (Residue number)



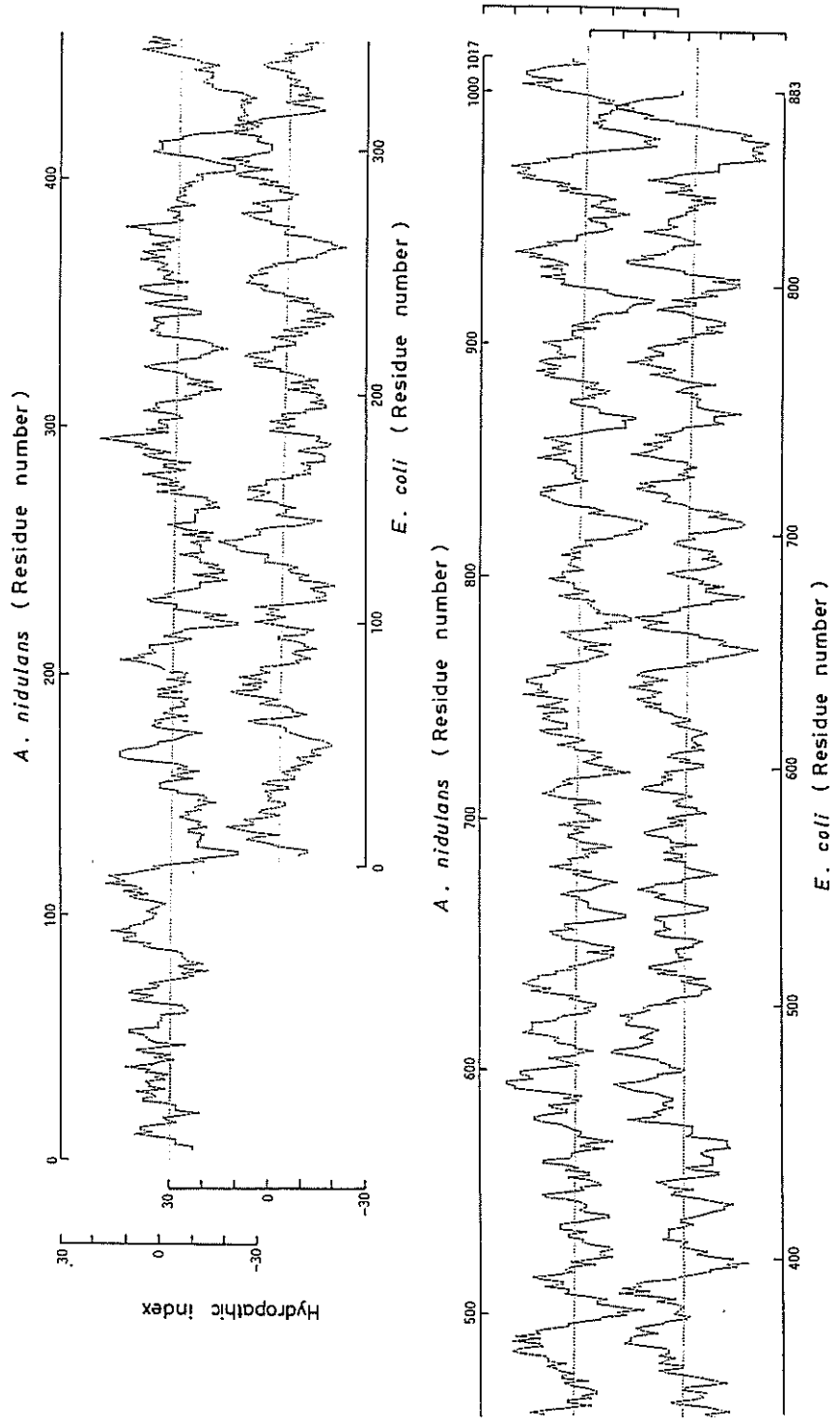
Stringency : 2 out of 3

図 8. ドットマトリクス法によるラン藻と大腸菌の PEPC のアミノ酸配列の比較, 相同性の高い部分は対角線近くに直線状にあらわれている。

のアミノ酸配列を比較するために, Kyte と Doolittle の方法による Hydropathy profile を求めた (図 9)。この方法では, アミノ酸の極性, 非極性などの性質によって配列の特徴を示すことができるので, 個々のアミノ酸の種類が同じでなくても物理化学的な性質が似ているか否かを比較することができる。この Hydropathy profile の比較によっても *A. nidulans* の 460 番目の残基あたりから C-末端にかけて両者はよく一致し, 高

次構造においてもかなりよく似ているのではないかと想像される。同じ触媒活性を持ちながら, アロステリックな調節能が全く異なっていることから, 一つの可能性として, 触媒部位が一次構造上, 主に C-末端寄りの部分に, アロステリックな性質を担う部分が主に N-末端寄りの部分に存在するのではないかと考えられる。

クローン化した *A. nidulans ppc* の遺伝子の構造を解析する一方でこの *ppc* をクローン化した



Span Length : 9

図 9. ラン藻と大腸菌の PEPC におけるアミノ酸配列の Hydrophobic Profile による比較.

プラスミドを保持する *E. coli* (PCR1/pA172) を用いて、*A. nidulans* の PEPC の酵素学的研究を進めた。PCR1/pA172 においては、*A. nidulans* と比べて、粗酵素液中の PEPC の比活性が約 10 倍であった。*A. nidulans* は培養に時間がかかり、また色素を多く持つため精製の初期段階で PEPC 活性を分光学的に測定することが困難であることも合わせて考えると、*A. nidulans* の PEPC を研究するために PCR1/pA172 を用いると非常に便利であることがわかる。その際、PCR1/pA172 においてつくられる PEPC が、*A. nidulans* でつくられる PEPC と本当に同じであるのかが問題であるが、調べた限りでは相違は認められなかった。PCR1/pA172 からの PEPC の精製は不安定なこの酵素を安定化させるために、20% エチレングリコール存在下に、通常の方法に従って行ない、約 90% の純度にまで精製できた。それについて酵素学的性質を調べた。PEP、 Mg^{2+} に対する K_m 値は、それぞれ 1.2 mM、2.2 mM であった。PEP に対する K_m 値は、*E. coli* の PEPC よりかなり小さかった。種々の PEPC について既に知られている活性調節因子およびそれらの類縁化合物に対する感受性を調べたところ、

A. nidulans の PEPC は、基質アナログによる阻害を受けた以外は全く阻害を受けなかった。セファロース CL-6B を担体とするゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって、分子量は 44 万と推定されたが、先の Maxicell 法で求めたサブユニットの分子量約 11 万と考え合わせて、活性酵素は四量体として存在することが示唆された。

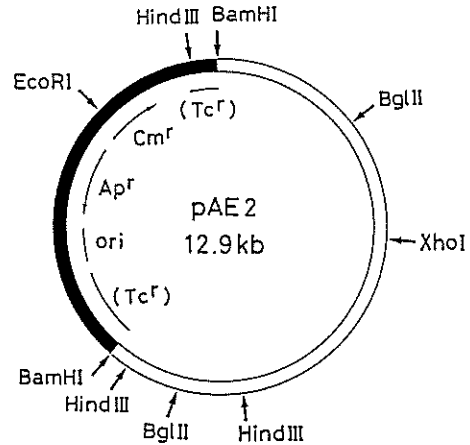


図 10. ラン藻と大腸菌の両方において増殖できるシャトルベクター。黒ぬり部分は大腸菌由来のプラスミド、白ぬきの部分はラン藻由来のプラスミド。

Anacystis nidulans R2

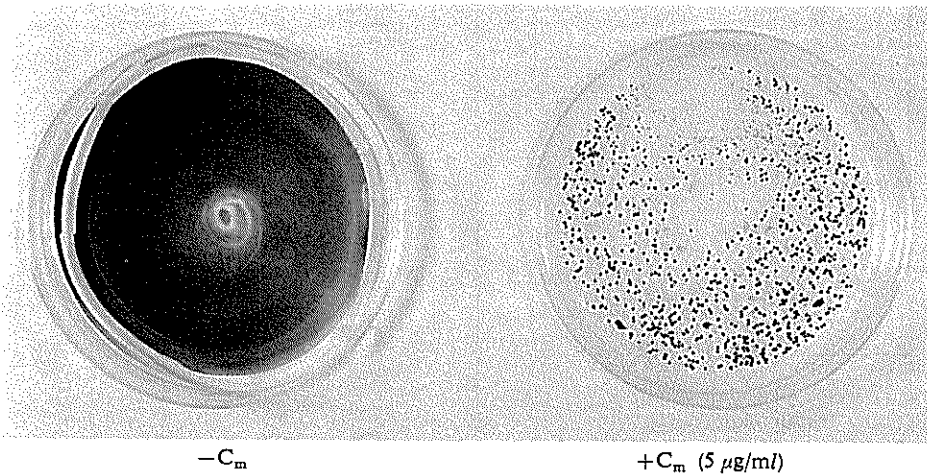


図 11. シャトルベクター pAE2 によるラン藻の形質転換。Anacystis nidulans R2株は培地中に加えたプラスミド DNA をとりこむ性質を有する。pAE2 は抗生物質クロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子をもつので図右のように、このプラスミドによって形質転換を受けた細胞は Cm 存在下でも生長できるようになり、多くのコロニーを生じる。

4) *A. nidulans* と *E. coli* 間のシャトル・ベクターの開発

A. nidulans R2 株と *E. coli* K-12 株間のシャトル・ベクターは、すでにいくつかの研究室で開発されているが、本研究室においても、類似の方法によってシャトル・ベクターを作成した。*A. nidulans* 6301 株より調製した 8 kb のプラスミド DNA を *E. coli* のプラスミド DNA (pBR 328) に制限酵素 *Bam* HI 部位で連結して、ハイブリッド・プラスミド pAE2 を作成した (図 10)。この DNA を *A. nidulans* R2 株に導入し、pBR 328 に含まれる遺伝子の働きによって、クロラムフェニコールに対する耐性を賦与することができた (図 11)。さらに形質転換株より閉環状 DNA を分離・分析した結果、pAE2 が確認され、pAE 2 がシャトル・ベクターとして働いていることが確かめられた。

今後の課題

今回の研究によって、*A. nidulans* *ppc* のクローニングおよび *A. nidulans* のベクターの作成に成功したので、図 1 のスキームに従って *A. nidulans* 細胞中の PEPC 含量を増大させるという試みが実行可能となった。今後は、実際にこれを行ない、PEPC 活性は増大しているか、光合成的炭酸固定量が増大しているか、成長への影響はどうか、などを検討していく予定である。また、1) 図 1 に示したスキーム、以外にも、2) *A. nidulans* の *ppc* のプロモーター部位の改変により、*ppc* の転写量を増す、3) *ppc* の構造遺伝子に改変を加え、PEPC タンパク自体の活性を増す、などのアプローチが考えられ、1) について良い結果が得られない場合は、これらの方法についても検討したい。

その他にも、以下に述べることを行なっていきたい。*E. coli* の *ppc* の調節に関してプロモーター上流部の関与が示唆されたが、プロモーターからこの領域にかけて、site directed な塩基置換を行なうなどしてより詳細な解析を行なうと同時に、発現量の増大を試みる。*E. coli* と *A. nidulans* の PEPC の一次構造の比較の結果、保存されている領域、されていない領域が明らかになったの

で、この知見をもとに遺伝子操作によって PEPC の改良を試みる。PCR 1/pA 172 を用いて *A. nidulans* の PEPC の高度精製が可能となったので、N-末端配列を決定し、翻訳開始点を明らかにするなどのタンパク化学的研究を進める。などである。

以上のように、今回の研究によって、*E. coli* と *A. nidulans* の PEPC とその *ppc* 遺伝子に関する知見が蓄積された。PEPC は、C4 経路による炭酸固定に関与することから植物育種における重要なターゲットの一つになっていることを考えると、これらの成果が今後いろいろな局面において寄与することが期待できる。

謝辞 この研究は昭和 57 年から 60 年の 3 年間にわたる日産科学振興財団の研究助成によるものである。この助成により研究を大きく発展させることができ、さらに次のステップへの大きな基盤を築くことができた。ここに同財団および選考委員の方々に深甚の謝意を表する次第である。種々の光合成微生物の菌株や菌体を恵与していただき、また、種々有益な助言を賜った次の方々に厚くお礼申し上げたい。務台方彦氏と山田弘生氏 (以上ヤクルト中央研究所)、鈴木彌彦氏、山崎圭治氏と浜田三郎氏 (以上大日本インキ化学工業)、杉浦昌弘氏と篠崎一雄氏 (以上名古屋大学理学部)、本研究を進めるに当たり、京都大学理学部化学教室生物化学研究室に在籍した下記の方々の大いなるご協力をいただいた。ここに深く感謝の意を表する。小滝 努、藤田信之、佐邊壽孝、石鳥純男、三輪哲也、浅野雅秀、栗山正人、片桐文章、平井圭介、村田卓也の諸氏。

研究発表

- 1) K. Izui, H. Sabe, and H. Katsuki: Increased synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in a strain of *Escherichia coli* bearing a ColEI-*ppc*⁺ hybrid plasmid. *FEBS Letters*, 133, 311-315 (1981).
- 2) K. Izui, N. Fujita, and H. Katsuki: Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Hydrophobic chromatography using specific elution with allosteric inhibitor. *J. Biochem.*, 92, 423-432 (1982).
- 3) T. Isono and T. Katoh: Cylindrical phycobiosomes from a blue-green alga, *Anabaena*

- variabilis*. *Plant & Cell Physiol.*, **23**, 1347-1355 (1982).
- 4) 藤田信之, 石島純男, 松田義宏, 泉井 桂, 香月裕彦: 炭酸固定酵素 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの反応機構——基質ホモログの利用による解析, 第 33 回タンパク質構造討論会, 講演要旨集, p. 81-84 (1982).
 - 5) 佐邊寿孝, 三輪哲也, 泉井 桂, 香月裕彦: 大腸菌 PEP carboxylase 遺伝子 DNA の解析, 第 55 回日本生化学会大会, 生化学, **54**, 661 (1982).
 - 6) 泉井 桂, 佐邊寿孝, 三輪哲也, 藤田信之, 香月裕彦: 大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (*ppc*) のクローニング, 第 5 回日本分子生物学会年会, 講演要旨集, p. 74 (1982).
 - 7) K. Izui, Y. Matsuda, I. Kameshita, H. Katsuki and A. E. Woods: Phosphoenolpyruvate Carboxylase of *Escherichia coli*. Inhibition by Various Analogs and Homologs of Phosphoenolpyruvate, *J. Biochem.*, **94**, 1789-1795 (1983).
 - 8) T. Kodaki, N. Fujita, I. Kameshita, K. Izui and H. Katsuki: Phosphoenolpyruvate Carboxylase of *Escherichia coli*. Specificity of Some Compounds as Activators at the Site for Fructose 1,6-Bisphosphate, One of the Allosteric Effectors, *J. Biochem.*, **95**, 637-642 (1984).
 - 9) S. Ishijima, N. Fujita, H. Sabe, K. Izui and H. Katsuki: Improved Method for Large Scale Purification of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase of *Escherichia coli* K-12 *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 27-33 (1984).
 - 10) N. Fujita, T. Miwa, S. Ishijima, K. Izui and H. Katsuki: The Primary Structure of Phosphoenolpyruvate Carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide Sequence of the *ppc* Gene and Deduced Amino Acid Sequence, *J. Biochem.*, **95**, 909-916 (1984).
 - 11) N. Fujita, K. Izui, T. Nishino and H. Katsuki: Reaction Mechanism of Phosphoenolpyruvate Carbonylase. Bicarbonate-Dependent Dephosphorylation of Phosphoenol- α -ketobutyrate, *Biochemistry*, **23**, 1774-1779 (1984).
 - 12) T. Isono and T. Kato: Subparticles of *Anabaena* Phycobilisomes. I. Reconstitution of Allophycocyanin Cores and Entire Phycobilisomes, *Plant & Cell Physiol.*, **24**, 357-363 (1983).
 - 13) 石島純男, 藤田信之, 三輪哲也, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの末端一次構造について”, 第 30 回日本生化学会近畿支部例会, 生化学, **55**, 1245 (1983).
 - 14) 三輪哲也, 梶谷正行, 石浜 明, 藤田信之, 佐邊寿孝, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ 遺伝子のプロモーターについて”, 第 6 回日本分子生物学会年会講演要旨集, p. 45 (1983).
 - 15) 藤田信之, 三輪哲也, 石島純男, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 *ppc* の塩基配列”, 第 56 回日本生化学会大会, 生化学, **55**, 833 (1983).
 - 16) 小滝 努, 藤田信之, 亀下 勇, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのフルクトース 1,6-二リン酸結合部位の特異性”, 第 56 回日本生化学会大会, 生化学, **55**, 815 (1983).
 - 17) 石島純男, 田口正明, 平井圭介, 難波雄二郎, 花岡正男, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼに対する単クローニング抗体の作製とその結合効果の解析”, 第 56 回日本生化学会大会, 生化学, **55**, 815 (1983).
 - 18) 栗山正人, 泉井 桂, 香月裕彦: “*Chlorella* のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼについて”, 第 56 回日本生化学会大会, 生化学, **55**, 793 (1983).
 - 19) 藤田信之, 三輪哲也, 石島純男, 佐邊寿孝, 泉井 桂, 香月裕彦, 梶谷正行, 石浜 明: “大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの全一次構造”, 第 34 回タンパク質構造討論会講演要旨集, 105-108 (1983).
 - 20) 磯野高敬, 加藤哲也: “フイコビリソーム・コアの構成単位とその再構成”, 日本植物生理学会講演要旨集, p. 79 (1983).
 - 21) 加藤哲也, 磯野高敬: “フイコビリソーム 亜粒子間の解離・会合の平衡”, 日本植物生理学会講演要旨集, p. 80 (1983).
 - 22) 岡樹一郎, 植木龍夫, 加藤哲也: “X 線小角散乱法によるフイコビリソーム亜粒子の形態”, 第 21 回生物物理学会年会講演要旨集, p. 97 (1983).
 - 23) 磯野高敬, 加藤哲也: “亜粒子構成から考えるフイコビリソームの構造”, 第 48 回日本植物学会大会講演要旨集, p. 104 (1983).
 - 24) H. Sabe, T. Miwa, T. Kodaki, K. Izui, S. Hiraga and H. Katsuki: Molecular cloning of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene, *ppc*, of *Escherichia coli*. *Gene*, **31**, 279-283 (1984).
 - 25) K. Izui, T. Miwa, M. Kajitani, N. Fujita, H. Sabe, A. Ishihama and H. Katsuki: Promoter analysis of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **13**, 59-71 (1985).
 - 26) T. Kodai, F. Katagiri, M. Asano, K. Izui and H. Katsuki: Cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from a cyanobacterium, *Anacystis nidulans*, in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **97**, 533-539 (1985).
 - 27) F. Katagiri, T. Kodaki, N. Fujita, K. Izui and H. Katsuki: Nucleotide sequence of the

- phosphoenolpyruvate carboxylase gene of the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *Gene*, **38**, 265-269 (1985).
- 28) S. Ishijima, F. Katagiri, T. Kodaki, K. Izui, H. Katsuki, K. Nishikawa, H. Nakashima and T. Ooi: Comparison of amino acid sequences between phosphoenolpyruvate carboxylases from *Escherichia coli* (Allosteric) and *Anacystis nidulans* (Non-allosteric): Identification of conserved and variable regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 436-441 (1985).
- 29) 平井圭介, 栗山正人, 村田卓也, 小滝 努, 片桐文章, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌に組み込まれたラン藻 *ppc* によってコードされた PEP カルボキシラーゼ”, 第 57 回日本生化学会大会, 生化学, **56**, 611 (1984).
- 30) 香月裕彦, 田口正明, 森川 実, 村井忠司, 泉井桂, 徳重正信: “大腸菌の解糖・糖新生及び末端酸化系における制御”, 第 57 回日本生化学会大会, 生化学, **56**, 575 (1984).
- 31) 小滝 努, 片桐文章, 浅野雅秀, 泉井 桂, 香月裕彦: “ラン藻の PEP カルボキシラーゼ遺伝子 (*ppc*) のクローニング”, 第 57 回日本生化学会, 生化学, **56**, 935 (1984).
- 32) 石島純男, 藤田信之, 泉井 桂, 香月裕彦: “大腸菌 PEP カルボキシラーゼの活性に必須な Cys 残基を含むペプチドの同定”, 第 57 回日本生化学会大会, 生化学, **56**, 974 (1984).
- 33) 片桐文章, 小滝 努, 藤田信之, 泉井 桂, 香月裕彦: “ラン藻 *Anacystis nidulans* の PEP カルボキシラーゼ遺伝子 (*ppc*) の塩基配列”, 第 7 回日本分子生物学会年会, 講演要旨集, p. 74 (1984).
- 34) 藤田信之, 三輪哲也, 泉井 桂, 香月裕彦, 石浜明: “大腸菌 *ppc* 遺伝子の発現調節——プロモーター上流域の構造および必須領域の推定”, 第 7 回日本分子生物学会年会, 講演要旨集, p. 80 (1984).
- 35) 加藤哲也, 久米直明: “フィコビリゾームの安定性に関する可溶性成分”, 日本植物学会第 49 回大会, 講演要旨集, p. 162 (1984).
- 36) 加藤哲也: “高塩濃度下の光化学反応”, 日本植物生理学会第 25 回年会, 講演要旨集, p. 144 (1985).
- 37) 磯野高敏, 加藤哲也: “フィコビリゾームの 115 KD 蛋白 (いわゆる anchor protein) の機能”, 日本植物生理学会第 25 回年会, 講演要旨集, p. 184 (1985).
- 38) 石島純男, 片桐文章, 小滝 努, 藤田信之, 泉井桂, 香月裕彦, 西川 建, 中島広志, 大井龍夫: “アロステリックおよび非アロステリックな二種類のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの一次構造の比較”, 第 36 回タンパク質構造討論会, 講演要旨集 (13-16) (1985).
- 39) H. Katsuki, T. Kodaki, F. Katagiri, K. Izui, M. Asano and N. Fujita: Cloning of the PEP carboxylase gene of *Anacystis nidulans* and primary structure of the enzyme deduced from its nucleotide sequence. *Proc. 13th International Congress of Biochemistry*, Amsterdam, The Netherlands Abstracts, MO 667 p. 194 (1985).
- 40) K. Izui, T. Kodaki, F. Katagiri, N. Fujita, T. Miwa, S. Ishijima, K. Hirai, M. Kuriyama and H. Katsuki: PEP carboxylase of *Synechococcus* 6301 (*Anacystis nidulans*): Cloning and sequencing of the *ppc* gene, and comparison with the *E. coli*. *ppc* gene. *5th International Symposium on Photosynthetic prokaryotes*, Grindelwald, Switzerland Abstracts, p. 31 (1985).