

1E16-4 セロピオース加リン酸分解酵素の固定化に関する研究

○荒木 雅人^{1,2}, 多田 功生¹, 鈴木 聡¹, 楠本 憲一¹,
天野 良彦², 柏木 豊¹
(¹食総研, ²信州大・工・物質)

【目的】cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) はセロピオースを加リン酸分解し、glucose 1-phosphateおよびglucoseを生成する反応を触媒する。同時に逆反応によってヘテロオリゴ糖が生成することが知られている。本酵素は、細菌 *Cellvibrio gilvus* の菌体内に存在し、その菌体抽出液から得られるが、酵素生産性が低いため、酵素の大量生産ならびに安定化が望まれている。本研究では、本酵素を各種の不溶性担体に固定化し、酵素の安定性、酵素化学的性質を検討した。(方法と結果) 細菌 *Cellvibrio gilvus* ATCC13127のゲノムDNAからcellobiose phosphorylase (CBPase) 遺伝子をクローニングし、大腸菌発現ベクター pET3dに組み込み、組換えプラスミド pET3d-CBP を作成した。本組換えプラスミドにより形質転換株を取得し、大腸菌によるCBPase生産系を構築した。菌体抽出液から硫酸沈殿により粗酵素を調製し、得られた粗酵素を CNBr 活性化アガロース担体、Epoxy活性化アガロース担体、Thiopropyl活性化担体等の不溶性固定化担体に結合させた。このうち、Thiopropyl 活性化担体に結合させたものは、蛋白質の約70%が結合し、活性保持率は約2%であった。これは活性発現に必要な-SH基が結合反応によってブロックされ活性低下が起こるためと考えられた。得られた固定化酵素について温度安定性、酵素化学的性質を検討している。なお、本研究は生研センター異分野融合研究事業の支援を受けたものである。

Immobilization of cellobiose phosphorylase on insoluble gel beads

○Masato ARAKI^{1,2}, Sawaki TADA¹, Satoshi SUZUKI¹,
Ken-ichi KUSUMOTO¹, Yoshihiko AMANO², Yutaka KASHIWAGI¹
(¹Natl. Food Res. Inst., ²Dept. Chem. Mat. Eng., Shinshu Univ.)

Key words cellobiose phosphorylase, immobilization, *Cellvibrio gilvus*

1E17-1 有機溶媒耐性酵母の耐性関連遺伝子の解析

○黒田 浩一, 松井 健, 寺西 真也, 平山 尚, 植田 充美
(京大院・農・応用生命)

【目的】酵母は様々な物質変換反応を行うことができる生体触媒として有用であるが、有機溶媒には弱い。そこで、我々は有機溶媒下、すなわち野生株では生育できない環境でも通常通り生育する出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてその特徴について調べた。バクテリアにおける有機溶媒耐性機構の1つとして細胞表面の変化が報告されているが、この有機溶媒耐性酵母においても野生株と比べて細胞表面の有機溶媒に対する親和性の変化が見られている (1)。しかし、耐性機構の詳細な分子メカニズムについてはまだ分かっていないため、本研究ではDNAチップを用いた転写レベルでの網羅的解析を行い、有機溶媒耐性獲得機構を明らかにしようとした。【方法と結果】通常の培地で生育させた野生株、通常の培地で生育させた有機溶媒耐性株、有機溶媒を含む培地で生育させた有機溶媒耐性株を用いて、DNAチップにより遺伝子発現プロファイルの比較を行い、野生株の耐性化による遺伝子発現の変化と耐性株における有機溶媒による遺伝子発現への影響を検出した。今回は、転写レベルの変化をまとめ、耐性をもたらすと考えられる 14 個の遺伝子の特定とその翻訳産物の特性についてまとめるとともに、耐性の再構築戦略について遺伝子レベルで考察を行った。(1) Miura et al. Appl. Environ. Biotechnol. 66, 4883-4889 (2000)

Analysis of genes involved in organic solvent tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*

○Kouichi KURODA, Ken MATSUI, Shinya TERANISHI,
Takashi HIRAYAMA, Mitsuyoshi UEDA
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words organic solvent tolerance, DNA chip, profiling, *Saccharomyces cerevisiae*

1E16-5 イオン性液体中におけるセルロースの酵素分解

村上 理彦, ○北川 尚美, 米本 年邦
(東北大院・工・化工)

【緒言】近年新規な溶媒として注目されているイオン性液体は、常温付近で液体状態にある溶融塩であり、カチオン種とアニオン種から構成される。イオン性液体は、蒸気圧を持たず、有機物や無機物、高分子など多様な物質を溶解させるため、有機反応や難溶性物質の酵素反応の溶媒としての利用も期待されている。酵素によるセルロース分解は、バイオマスの有効利用法の一つであるが、反応速度が非常に遅いことが問題となっている。この一因として、セルロース分解酵素が水溶性であるのに対し、基質であるセルロースが水に不溶であることが挙げられる。本研究では、セルロースがイオン性液体に溶解するという報告¹⁾に基づき、これを溶媒としたセルロースの酵素分解実験を試みた。【実験と結果】まず、アニオン種の異なる数種のイオン性液体に対するセルロースの溶解性を比較した。その結果、セルロースを溶解させるにはアニオンサイズが小さいイオン性液体が適していることが分かった。次に、セルロースを溶解させたイオン性液体中で酵素分解を行い、分解に及ぼすイオン性液体のアニオン種や酵素種、初期基質濃度および酵素濃度の影響について検討した。そして、分解速度を向上させるためには、アニオンの求核性が低いイオン性液体を用いること、結晶性セルロースに対する活性が高いセルラーゼを用いること、反応系に添加する総酵素濃度を増加させること、が有効であることを明らかにした。1) R.P.Swatloski et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4974 (2002)

Enzymatic Degradation of Cellulose in Ionic Liquid

Masahiko MURAKAMI, ○Naomi SHIBASAKI-KITAKAWA,
Toshikuni YONEMOTO
(Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words cellulose degradation enzyme, cellulase, ionic liquid

1E17-2 *manXYZ* 遺伝子導入による大腸菌の有機溶媒耐性度の向上

○栗本 昌樹, 清水 一憲, 大河内 美奈, 本多 裕之
(名大院・工・生物機能)

【目的】近年、有機溶媒-水二相系を利用した微生物の発酵技術を、医薬品合成などの反応プロセスに利用する研究が進んでいる。このプロセスでは微生物が有機溶媒に対して耐性を持つことが重要となる。われわれは微生物の有機溶媒耐性機構の解明を目指して、DNAマイクロアレイで大腸菌の有機溶媒接触後の時系列遺伝子発現データを取り、これまでに *glpC*, *purR*, *fruA* などの遺伝子が有機溶媒耐性の獲得に関連していることを発見した。これらはいずれも糖の代謝反応の一部に関連した遺伝子であったため、本研究ではPhosphotransferase systemを担う遺伝子に焦点を絞り、その中でも発現量変化の著しかった *manXYZ* に注目して評価を行った。【方法および結果】大腸菌 JA300株に遺伝子導入し、ヘキサン重層によるコロニー形成法で耐性度を評価した。*manX*, *manY*, *manZ* をそれぞれ単独で導入した場合は耐性度に変化はなかったが、*manXYZ* を共発現させた場合は耐性度が向上した。炭素源をグルコースからマンノースに代えても同等の耐性度の向上が認められた。これらのことから、*ManXYZ* の働きが有機溶媒耐性度に関連していることが示唆された。続いてヘキサン接触30分後の細胞内ヘキサン濃度を測定したが、*manXYZ* 導入によるヘキサン取り込み量の減少は見られなかった。引き続き、*manXYZ* 導入による有機溶媒耐性度向上の機構について検討中である。

Increase of organic solvent tolerance by overexpression of *manXYZ* in *Escherichia coli*.

○Masaki KURIMOTO, Kazunori SHIMIZU, Mina OKOCHI,
Hiroyuki HONDA
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words *Escherichia coli*, organic solvent tolerance, *manXYZ*