

21a10 気生微細藻類によるプロテアーゼの生産およびその性状評価

阿部 克也, ○根岸 宏充, 小野 擴邦
(工学院大・工・化学応用)

【目的】演者らは、比較的生育条件の厳しい陸上の基物に着生する気生微細藻類のユニークな生体機能に着目し、これらの一部が有機窒素を栄養源として生育することを見出した。本研究では、新たに山岳地帯から気生微細藻類を単離した結果、プロテアーゼを産生していると考えられるいくつかの藻株を得ることができた。そこで、気生微細藻類が産生するプロテアーゼの性状について検討を行ったので報告する。

【方法】気生微細藻類は、無機窒素源であるNaNO₃を加えたBold's basal (BB)液体培地において前培養を行った。有機窒素源としてカゼイン(乳由来)を用いた0.01%カゼイン添加BB液体培地に藻体を加え、初期pH8.0、培養温度25±2℃、および光強度40 μE/m²sの条件下で振とう培養した。藻体および培地を経時的に回収し、生育量および培地中タンパク質の測定を行った。さらに、白濁させたCaCl₂-カゼイン寒天平板培地および培養を行った培地へのカゼイン再添加により、培地中に分泌されたプロテアーゼの確認を行った。

【結果】回収した培地についてSDS-PAGEを行ったところ、カゼインの分解は培養開始から4日目以降で見られた。そこで、4日目および6日目におけるカゼイン添加液体培地の上清を平板培地に滴下し、24時間静置したところ滴下した周囲に透明環が見られた。また、カゼインの再添加においてもカゼインの分解が見られたことからプロテアーゼの分泌が確認された。現在、気生微細藻類が産生したプロテアーゼの性状について培地条件の違いによる検討も行っている。

Production and characterization of protease by aerial microalgae

Abe Katsuya, ○Negishi Hiromitsu, Ono Hirokuni
(Dept. Appl. Chem., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, protease, polypeptide

21a11 光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 由来カロテノイド分解酵素のカロテノイド分解活性の解析

○稲葉 淳, 吉田 一之, 須田 紘, 上田 俊策, 前田 勇
(宇都宮大・農・応生化)

【背景及び目的】

我々はこれまで、光合成細菌を宿主とし、カロテノイド合成遺伝子をレポーター系として利用してカロテノイド蓄積に伴う色調変化を示す微生物センサーを開発してきた。今回我々は、光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 ゲノム中にカロテノイド分解酵素遺伝子 *carotenoid cleavage dioxygenase(ccd)*を見出し、カロテノイド分解に伴う脱色反応を微生物センサーのレポーターとして利用できるのではないかと考えた。よって本研究では*Rhodospseudomonas palustris* CGA009由来CCDのカロテノイド色素分解及び分解活性を解析し、レポーター遺伝子として微生物センサーに応用することを目的とした。

【方法及び結果】

カロテノイド分解活性を確認するために、カロテノイド合成能が付与された大腸菌に*ccd*を導入したところ、リコペンの赤色が脱色された。さらに、*ccd*を導入した大腸菌からカロテノイド画分を抽出し、HPLCにより分解産物の検出を行った。その結果、*ccd*を導入することによりリコペンの大幅な減少が確認され、分解産物由来と思われる新たなピークが検出された。これらの結果から、CCDがリコペンを分解することが明らかとなった。現在、分析機器を利用し、分解産物の詳細な構造を解析している。

本研究はNEDOの産業技術研究助成を受けて行われた。

Functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase from *Rhodospseudomonas palustris*

○Atsushi INABA, Kazuyuki YOSHIDA, Hiromu SUDA,
Shunsaku UEDA, Isamu MAEDA
(Dept. Appl. Bioschem., Utsunomiya Univ.)

Key words carotenoid cleavage dioxygenase, carotenoid, *Rhodospseudomonas palustris*

21a12 大腸菌の抗菌性陽イオン界面活性剤耐性機構の解析

○中田 訓浩, 土戸 哲明, 松村 吉信
(関西大・化学生命工)

【目的】当研究室では、臭化セチルトリメチルアンモニウム塩 (CTAB) に対して耐性を示す自然突然変異株 *Escherichia coli* OW66 を取得している。さらに、DNAマイクロアレイによるゲノム塩基配列解析の結果、*oppB*、*ycdR*、2463104-2463113 locus、*rpoN*、*rpoB*、*rpoC*、*soxR* で挿入/欠失/置換変異が観察された。本研究では、これら変異のCTAB耐性への関与を特定することを目的とした。

【方法・結果】温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により種々の変異遺伝子組換え株を構築し、これら組換え株のCTAB耐性能をMIC法で評価した。この結果、全ての変異遺伝子が、CTAB耐性に関与していることが示唆されたが、どの一遺伝子変異株もOW66株が示す高いCTAB耐性は有していなかった。当研究室では、CTAB処理によって細胞の呼吸活性が阻害される事を報告している⁽¹⁾。また、*soxR*は、細胞のスーパーオキシド耐性に関与する*soxRS*レギュロン調節因子である。そこで、*soxR*および*soxS*発現量を定量RT-PCR法で調査した。野生株と比較して、OW66株でこれらの発現量の増加が観察され、レギュロン制御を構成性に行っていた。2-D PAGE解析の結果、本レギュロン下にあるMn-SODの合成量がOW66株で増加していることが確認された。これらの結果より、CTAB処理によって発生する活性酸素種のストレス応答能の向上が、OW66株の耐性機構の一つとして考えられた。

⁽¹⁾ Ishikawa *et al.*, J Appl Microbiol., 93, 302-9, 2002

Resistant mechanism to antibacterial cationic surfactants in *Escherichia coli* cells

○KUNIHIRO NAKATA, TETSUAKI TSUCHIDO,
YOSHINOBU MATSUMURA
(Dept. Life Sci. Biotech., Kansai Univ.)

Key words CTAB resistance, reactive oxygen species, *soxR*

21a13 Formulation and validation of logistic growth model for aquatic macrophytes

○Rabin MALLA¹, Nobuyuki NAGAO²,
Yashuhiro TANAKA³, Kazuhiro MORI⁴

⁽¹⁾Dept. Civil & Environ. Engineering, Yamanashi Univ.,
⁽²⁾Saiku Kogyo Co. Ltd., ⁽³⁾Dept. Civil & Environ. Engineering,
Yamanashi Univ., ⁽⁴⁾Dept. Civil & Environ. Engineering,
Yamanashi Univ.)

Simple logistic growth model requiring lesser data are desirable over complex and data demanding growth models. So our objective is to formulate and validate a simple and cost effective growth model for aquatic macrophytes. The optimal equation types for variables like temperature, light and nutrient were incorporated in a logistic growth model. Among a number of equation types, equation types resulting in better performance were selected as equation types for the model. The floating macrophytes water hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms), duckweed *Spirodela polyrhiza* and emergent macrophytes purple loosestrife *Lythrum salicaria* and common reed *Phragmites australis* were raised in a pond of the Yamanashi Prefectural Wood Park at Kanegawa from 2003 to 2007. Discrepancies in model simulations that remained at maximum ±8% in 2006 were narrowed to almost ±1% by revising mortality constants and optimum light intensity parameters. Also the photoperiod was revised as the ratio of sunshine duration in a day to the maximum sunshine duration in a plant growth season. Simulated biomass for macrophytes during 2005-2006 was in close agreement with the observed biomass. However in 2006, the model overestimated the biomass by 7% in case of common reed. The model was validated using the observed biomass data of 2007. This study indicated that the performance of simple logistic growth model is promising tool as the discrepancies between observed and simulated biomass is only about ±10%.

Formulation and validation of logistic growth model for aquatic macrophytes

○Rabin MALLA¹, Nobuyuki NAGAO², Yashuhiro TANAKA³,
Kazuhiro MORI⁴

⁽¹⁾Dept. Civil & Environ. Engineering, Yamanashi Univ., ⁽²⁾Saiku Kogyo
Co. Ltd., ⁽³⁾Dept. Civil & Environ. Engineering, Yamanashi Univ., ⁽⁴⁾Dept.
Civil & Environ. Engineering, Yamanashi Univ.)

Key words growth model, purple loosestrife, Yamanashi