

1P-045 かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus glaucus* MA0196 由来アスパルティックプロテアーゼの特性解析

○仙波 弘雅¹, 竹中 慎治¹, 小山 大², 土居 幹治², 吉田 健一¹
(¹神戸大院・農, ²マルトモ)
bright-zu-kunft@kcc.zaq.ne.jp

【目的】

我々は、かつお節のかび付けに伴う色相変化の機構を明らかにすることを目的とし、かび付けに用いられる *Aspergillus* 属の生成する脱色因子の特性解析を行ってきた。その結果、*Aspergillus repens* MK82 株の生成するアスパルティックプロテアーゼが脱色因子であることを見出した¹⁾。同製造工程では、複数種の *Aspergillus* 属のカビが使用される。発酵中の枯節から分離されたカビの生産するプロテアーゼの性質を比較した結果、*A. glaucus* MA0196 株由来プロテアーゼは MK82_ プロテアーゼとは異なる酵素学的性質を有することを見出したので報告する。

【方法および結果】

MA0196 株由来プロテアーゼについて各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素は MK82_ プロテアーゼと同じくミオグロビンおよびヘモグロビン溶液を脱色した。本酵素の分子量はゲルろ過法で 243,000 であることがわかった。また、PAS 染色から糖タンパク質であることが明らかとなった。同酵素を PNGase 処理して SDS-PAGE に供すると、分子量は 46,000 となった。本酵素は pH 2.0 で最大活性を示し、pH 3.0 ~ 6.0 の範囲で安定であった。プロテアーゼ阻害剤の中で Pepstatin A により顕著な阻害が見られた。活性に与える pH の影響、pH 安定性、阻害剤の影響試験結果等を参考に、本酵素はアスパルティックプロテアーゼに属すると思われる。現在、MA0196_ プロテアーゼの性質について MK82_ プロテアーゼ等と比較しながら特性解析を進めている。1) J. Sci. Food Agric. 2013; 93:1349-1355.

Purification and characterization of aspartic protease from *Aspergillus glaucus* MA0196

○Hironori Senba¹, Shinji Takenaka¹, Dai Koyama², Mikiharu Doi², Ken-ichi Yoshida¹
(¹Grad. Sch. Agric., Kobe Univ., ²Marutomo Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus glaucus*, aspartic protease, bonito, decolorisation

1P-047 *Aspergillus aculeatus* 由来 Cel7B のセロビオヒドロラーゼとの相乗作用

○矢部 夕紀, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
(阪府大院・生環科・応生科)
takashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

本研究室で *A. aculeatus* より精製された Cel7B は Avicel 分解において cellobiohydrolase (CBH) と相乗作用を示す。Cel7B は多くの CBHI と同様 GH7 に分類される触媒ドメイン (CD) を持つが、cellulose-binding domain (CBD) を持たない点で多くの CBHI と異なる。これまで CBD の存在がセルロース分解に対してプラスに作用するといふ多くの生化学的実験結果が報告されている。しかし *Trichoderma reesei* 由来 CBHI によるセルロース分解について AFM を用いて観察した研究によって、CBD によるセルロースへの結合が必ずしも分解へとリンクしておらず、単純に CBD によって結合能が上がるだけでは加水分解効率の上昇に結び付かないことが示された。そこで本研究では、CBHI から CBD を欠損させた CBHIΔCBD の Avicel 分解に対する CBH との相乗作用について Cel7B と比較することで、Cel7B が CBH と相乗作用を示すのは CBD を欠損しているためなのか、それとも Cel7B の CD 自身の作用なのかを明らかにすることを目的とした。

A. aculeatus 由来 cel7B, cbhIΔcbd, cbhI, cbhII 遺伝子は糸状菌の高発現ベクターである pNAN8142 に挿入し、*A. oryzae* で発現させた。培養上清から各種クロマトを経て各種酵素を精製した。CBHI, CBHII, 両者の混合物に対して Cel7B または CBHIΔCBD を様々なモル比で混合し、Avicel 分解に対する相乗作用を検討したところ、どの組合せでも相乗作用が観察されたが、CBHIΔCBD よりも Cel7B の方が高いことがわかった。つまり、CBHI は CBD を欠損させることで CBD を有する CBHI と相乗作用を持つと共に Cel7B の CD 自体も相乗作用に寄与していることが示唆された。

Synergism between Cel7B and cellobiohydrolases from *Aspergillus aculeatus*

○Yuki Yabe, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
(Dep. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words cellobiohydrolase, cellulose-binding domain

1P-046 *Aurantiochytrium limacinum* (mh0186 株) の培養経過時間におけるカタラーゼ活性

○岡戸 ゆう, 林 雅弘, 田岡 洋介
(宮崎大・農・海洋生環)
yousuketao@cc.miyazaki-u.ac.jp

ラビリンチュラ類の分布域には熱帯から亜熱帯の地域も含まれている。紫外線が降り注ぎ、高水温である上記の環境では活性酸素が発生しやすい。一方で、本生物群の細胞内には酸化されやすい高度不飽和脂肪酸が豊富に含まれていることが確認されている。過酷な環境下での生存を可能にしていることと細胞内に高度不飽和脂肪酸を多量に蓄えていることは、ラビリンチュラ類が細胞内に抗酸化物質を有している可能性が示唆される。本研究では抗酸化物質として酵素の一つであるカタラーゼを対象とした。ラビリンチュラ類の一種である *Aurantiochytrium limacinum* (mh0186 株) を用いて、カタラーゼの有無を確認するとともに培養時間に伴うカタラーゼ活性の変動をモニタリングした。B1 平面培地で 28℃, 72 時間で培養した菌体と 3% H₂O₂ 溶液を混合し、気泡の発生によりカタラーゼの有無を確認した。また、同株を 500ml 坂口フラスコ (100mlGY 培地, 28℃, 110min⁻¹) で培養した。培養後 24, 48, 60, 72 時間で菌体を回収し、培養経過時間毎の乾燥菌体重量とグルコース濃度及び菌体抽出液中のタンパク量とカタラーゼ活性を測定した。カタラーゼ活性は H₂O₂ の分解を 240nm の吸光度の減少をみることで測定し、mg タンパク質当りの比活性で表した。今回の実験では 20℃, 1min で 1μmol の H₂O₂ を分解する酵素活性を 1unit とした。その結果、カタラーゼ試験は陽性を示した。また、培養に伴い乾燥菌体重量は増加し、培養開始 60 時間後で最大値を示した。カタラーゼ活性では培養開始から 48 時間後に最大値を示した。

Effect of incubation time on the catalase activity of *Aurantiochytrium limacinum* (mh0186).

○Yu Okado, Masahiro Hayashi, Yousuke Taoka
(Dept. Marine Biol. Environ. Sci., Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words antioxidant, catalase, *Aurantiochytrium limacinum*

1P-048 液-液界面バイオリアクターによる 11α-Hydroxyprogesterone の合成

○飛坂 未緒^{1,2}, 小田 忍², 大箸 信一²
(¹金工大院・工・バイオ化学, ²金工大・ゲノム研)
odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

ステロイド工業は 8,000 億円産業といわれ、医薬の中で一化学構造群としては抗生物質に次いで大きな生産額であり、ステロイド医薬品は健康と生殖管理のために幅広く利用されている重要な化合物群である¹⁾。しかし、ステロイド類は水に不溶性であるうえに微生物に対して強力な毒性を発現することが知られており、現在においてもなお、高濃度で生産することは困難である。そこで本研究では、黄体ホルモンである progesterone の 11 位を *Rhizopus oryzae* NBRC5781 のもつ P450 monooxygenase により立体選択的に水酸化することによって、各種ステロイド医薬の合成中間体として有用な 11α-hydroxyprogesterone を高生産することを目的とした。

Progesterone の微生物変換を行うデバイスとして、液-液界面リアクター (L-L IBR)²⁾ を用いた。11α-Hydroxyprogesterone 生産量の向上のために、培養条件の最適化を行った結果、最適炭素源は glucose、最適窒素源は soytone、炭素源と窒素源の至適濃度はそれぞれ 2% と 0.5% であった。また、培養温度は 28℃、初発培地 pH は 3.0 が最適であった。最適条件下、培養 11 日目において基質濃度 9 g/L の progesterone から約 1.2 g/L の 11α-hydroxyprogesterone を得られた。

- 1) Manosroi, J., Chisti, Y., and Manosroi, A., Appl. Biochem. Microbiol., **42**, 479 (2006)
- 2) Oda S, and Isshiki K., Process Biochem., **42**, 1553 (2007)

Synthesis of 11α-hydroxyprogesterone with a liquid-liquid interface bioreactor

○Mio Tobisaka^{1,2}, Shinobu Oda², Shinichi Ohashi²
(¹Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., ²Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Rhizopus oryzae*, P450 monooxygenase, interface bioreactor