

**3P-095 沖縄県各地からの酸化酵素を生産する土壌放線菌の単離**

○崎原 健吾<sup>1</sup>, 田邊 俊明<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>沖縄高専・専・生資工, <sup>2</sup>沖縄高専・生資工)  
 tanabe@okinawa-ct.ac.jp

放線菌は二次代謝産物として各種の抗生物質や生理活性物質、耐熱性酵素など産業上有用な物質生産を行う。これらは医薬・農業・香粧品などの分野で広い応用が期待される。そのため新規に菌株を探索する意義は依然として高いといえる。一方、沖縄県は亜熱帯性の気候であり生物多様性の高い地域とされる。このような生物多様性は土壌中の微生物叢にも及んでいると推定され、沖縄県内から他県にはない放線菌株が見いだせる可能性は高い。そこで、様々な産業応用へ対応できる沖縄放線菌ライブラリーの構築を目指し、沖縄県内各離島から土壌放線菌の単離を行った。

沖縄県内の23島から、GPSを用いて位置確認しながら各島の全域を網羅するように土壌サンプルを採取した。土壌からの放線菌単離は下記のように早川らの方法に従った。採取してきた土壌サンプルは常温で一週間自然乾燥させた。乾燥させることにより放線菌に胞子を形成させた。乾燥後の土壌サンプルのSDS処理を行い放線菌以外の微生物を死滅させた。上清をHV(フミン酸、ビタミン類)培地へ植菌し、30℃で培養した。HV培地上に単離出来た放線菌株は、胞子形成の後、マイクロチューブスラントおよび胞子懸濁液を-80℃で保存した。

沖縄本島および沖縄県内各離島より土壌サンプルを1755得た。HV培地に単離出来た放線菌株は1113株になった。これらについて各種の性能試験を行い、どのような用途に向いた菌株であるか明らかにし、有望株の選定を行う。また、有望株のリボソームRNA遺伝子の塩基配列解析、マウス、パルダニオを用いた安全評価試験を行い、選定した放線菌による物質生産と産業応用を図る。

**Isolation of Actinomycetes producing oxidase from soil in Okinawa**

○Kengo Sakihara<sup>1</sup>, Toshiaki Tanabe<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Bioresour. Eng. Crs., Adv. Crs., ONCT, <sup>2</sup>Bioresour. Eng., ONCT)

**Key words** actinomycetes, oxidase

**3P-097 耐熱性 Protein Disulfide Isomerase を用いた効率的なビスフェノール A の回収**

○秀瀬 涼太, アミール アルシェハリ, 今岡 進, 藤原 伸介  
 (関西学院大院・生環科学研セ)  
 fujiwara-s@kwansei.ac.jp

ビスフェノール A(BPA)は、産業上有用な化合物である一方、内分泌攪乱化学物質として知られ、極めて低濃度(2.5 ppm以下)でホルモン受容体に結合またはホルモンの代謝系に干渉することで生体システムを攪乱する。このため、BPAを効率よく回収、除去するシステムの構築が望まれている。BPAは、a, b, b', a', cの5つのドメインから成るヒトProtein disulfide isomerase (PDI)のb'ドメインに結合する1)。興味深い事に、ヒトPDIのb'ドメインは、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のPDIホモログであるTK1085(TkPDI)のN末端領域と構造が類似しており、TkPDIがBPAと結合する可能性が考えられた。一般に、超好熱菌由来タンパク質は通常の条件下では変性しにくい。本研究では、実用的かつ高効率なBPAの回収システムの開発を目指し、TkPDIのBPA結合能と熱や変性剤に対する安定性を解析した。

His-tagを付加したTkPDIとヒトPDIを大腸菌でそれぞれ発現させ、Ni-キレートカラムで精製した。表面プラズモン共鳴を用いた解析により、TkPDIはBPA結合を有していた。さらに、ヒトPDIのBPAに対する解離定数K<sub>D</sub>は1.78 μMであった一方で、TkPDIのK<sub>D</sub>は0.74 μMであったことから、TkPDIはヒトPDIよりもBPAと高い結合親和性を有していた。円二色性解析から、TkPDIはヒトPDIと異なり4M尿素や90℃の熱に対して安定に構造を保っていた。TkPDIは有効なBPAの回収素子に応用できると思われる。

1) Hashimoto et al., J. Biochem., 151(1), 35-45 (2012)

**Application of heat-tolerant protein disulfide isomerase for an efficient trapping of bisphenol A.**

○Ryota Hidese, Alshehri Amira, Susumu Imaoka, Shinsuke Fujiwara  
 (Res. Center Environ. Biosci., Kwansei Gakuin Univ)

**Key words** Bisphenol A, Protein disulfide isomerase, *Thermococcus kodakarensis*, Bioremediation

**3P-096 アスファルテン分解系状菌の分離及び分解能の評価**

○大槻 祐人  
 (立命館大・生命・生工)  
 kubo@sk.ristumei.ac.jp

重質な炭化水素成分のアスファルテンは高分子で複雑な構造であるため、微生物による分解を受けにくい。一部の糸状菌は、木質の細胞壁の構成成分であるリグニンを分解することが知られており、リグニンはアスファルテンと構造が類似しているため、リグニン分解系状菌はアスファルテンを分解する可能性があると考えられた。本研究ではリグニンを分解する糸状菌を分離し、その菌株のアスファルテン分解能の評価をした。

各環境サンプルを用い、リグニンを含む寒天培地上で生育し、リグニン分解系状菌を31菌株単離した。単離した糸状菌をリグニンが含まれる液体培地または寒天培地に植菌し、培養後にそれぞれを280 nmで培養液の吸光度を測定し、各糸状菌のリグニン分解率を算出したところ、13菌株がリグニンを分解することがわかった。そのうち4株がリグニンを40～50%程度分解した。このリグニン高分解菌株をアスファルテンが含まれる液体培地および寒天培地で培養し、油分を抽出した後にそれぞれを乾燥重量法及びTLC-FID分析によりアスファルテン分解能を評価した。寒天培養の条件ではアスファルテンをいづれの菌株でも分解できなかったが、液体培養ではITO25株のアスファルテン分解率が17%と高い水準を示した。

**Isolation and characterization of asphaltene degrading fungi**

○Yuto Otsuki  
 (Dept. Biotechnol., Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** Lignin, Asphaltene, Filamentous bacterium

**3P-098 *Bdellovibrio*属細菌の細菌溶菌性を活用した下水汚泥の減容技術の開発**

○三宅 啓太, 前田 恵成  
 (九工大院・生体工)  
 m963061k@edu.life.kyutech.ac.jp

[背景・目的] *Bdellovibrio bacteriovorus* (以下*Bdellovibrio*属細菌)は、グラム陰性の細菌に寄生して侵入し、その内部から宿主細菌を溶菌する特性を持つ細菌である。すなわち、「宿主細菌を内部から破壊して死滅させる」と新しい細菌処理技術になる可能性を持っている。本研究では、この*Bdellovibrio*属細菌を利用した効果的な汚泥減容技術を開発するため、下水余剰汚泥に対する減容試験を行い、本菌株の溶菌効果について検証した。

[方法] LB培地で培養した*Bdellovibrio*属細菌を単離し、濃度調整した下水余剰汚泥に添加した。下水汚泥を温度別にて10日間培養し、減容率を測定した。汚泥からDNAを抽出し、RT-PCRにて汚泥内におけるDNAの発現量を測定した。

[結果] 下水汚泥の濃度を10%と25%に調整した下水余剰汚泥に回収した*Bdellovibrio*属細菌を添加し培養したところ、10%下水汚泥において汚泥減容の向上が見られた。汚泥内のDNA抽出し、RT-PCRを用いて発現量を測定したところ、*Bdellovibrio*属細菌を投与していない下水汚泥内において*Bdellovibrio*属細菌が存在していることが示唆されたものの、汚泥中における*Bdellovibrio*属細菌のスクリーニングを行ったところ、いまのところ*Bdellovibrio*属細菌を探索することはできなかった。この結果より、添加した*Bdellovibrio*属細菌が汚泥減容に関与していることが示された。現在は、添加した汚泥の菌叢分析を行い、詳細な解析を行っている。

**Development of the sludge reduction technology using strain lysis of a bacterium of *Bdellovibrio* strain**

○Keita Miyake, Toshinari Maeda  
 (Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

**Key words** *Bdellovibrio bacteriovorus*, sludge reduction