

3P-171 スエヒロタケを用いた固体バイオマスからの糖化発酵同時進行によるL-リンゴ酸の生産

○長根 江里¹, 高野 真希², 星野 一宏²
 (¹富山大院・理工・生命工, ²富山大院・理工)
 khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】 現在、バイオマスから生物変換により有用な化学物質を製造することが期待されている。特に、L-リンゴ酸は、清涼飲料の酸味料、減塩醤油や薬剤の原材料としての利用が期待されている。現在、この製造法は化学合成および酵素反応の組み合わせにより製造されているが、以前より *Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) を用いた好気発酵により Glucose から生産されることが知られていた。そこで本研究では、*S. commune* の加水分解酵素の分泌と酸化発酵を利用した糖化発酵同時進行 (CBP) により、各種バイオマスからの L-リンゴ酸を直接させることを検討した。

【方法・結果】 本研究で使用した菌株は *S.commune* NBRC 4928 である。培養は 25 mL、28℃、好気振盪により行った。固体バイオマスは可用性デンプン、コーンスターチ、 α -セルロースなどを 100 g/L の濃度で使用した。コーンスターチを用いたとき、培養 15 日目に 0.57 U/mL の α -Amylase 活性と 0.16 U/mL の Glucoamylase 活性が確認でき、L-リンゴ酸は 21.6 g/L 生産できた。一方、 α -セルロースを用いたとき、培養 15 日目に 2.19 U/mL の β -Glucosidase 活性と 0.17 U/mL の Cellobiohydrolase 活性、1.77 U/mL の *endo*- β -Glucanase 活性が確認でき、L-リンゴ酸は 12.3 g/L 生産できた。これらの結果から、*S.commune* はバイオマス加水分解酵素を分泌するとともに、好気発酵を行い L-リンゴ酸を直接生産できることがわかった。

Production of L-malic acid from solid-biomass by consolidated bioprocessing with *Schizophyllum commune*

○Eri Nagane¹, Maki Takano², Kazuhiro Hoshino²
 (¹Dept. Life Sci. Eng., Grad. Sch. Sci. Eng. Edu., Univ. Toyama, ²Grad. Sch. Sci. Eng. Edu., Univ. Toyama)

Key words L-malic acid, *Schizophyllum commune*, CBP, biomass

3P-173 寒天ゲル-有機溶媒界面における糸状菌の有機溶媒耐性

○小田 忍, 杉谷 彩香, 大箸 信一
 (金沢工大・ゲノム研)
 odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】 近年、水-有機溶媒二相系微生物変換の研究に関連して、微生物と有機溶媒との関係についての研究が盛んに行なわれている。しかしながら、微生物と有機溶媒との関係についてのこれまでの研究の多くは細菌を対象としており、糸状菌と有機溶媒との関係に関する体系的な報告は極めて少ない。本研究では、寒天平板と有機溶媒との固-液界面における各種糸状菌の生存性と増殖性について検討した。

【方法と結果】 PDA 平板中央に各種カビマットの切片 (20 株; 1 x 1 mm) を植菌し、ただちに有機溶媒 (13 種; log P = 1.76 ~ 6.80) を平板上に重層した。溶媒の揮発を避けるため容器 (50 ml) は密栓し、2 日毎に内部の気相を空気 30 ml で置換しつつ、25℃で静置培養した。培養時間は、各株、有機溶媒非重層系のコロニーが容器内壁に達する直前に設定した。培養後に有機溶媒を除去し、増殖株についてはコロニー径をデジタルノギスで計測した。その後平板表面をヘキサンで洗浄し、所定時間培養を継続した後に同様の観察・計測を行った。その結果、log P = 5.12 の hexyl ether では供試株全てが増殖し、同 4.25 の isoamyl ether では 14 株、同 4.13 の 2-ethylhexyl acetate でも 6 株の増殖が確認された。特に *Penicillium* 属の高い溶媒耐性が確認された。一方、重層溶媒除去後の継続培養では、多くの株で log P = 3.21 の isobutyl ether や同 1.76 の *tert*-butyl acetate 除去系で旺盛な増殖が認められた。以上の結果より、ゲル-強毒性有機溶媒界面においても、多くの糸状菌胞子が生存していることが確認された。

Solvent-tolerance of fungal cells located on an interface between an agar-plate and an organic solvent

○Shinobu Oda, Ayaka Sugitani, Shinichi Ohashi
 (Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words filamentous fungi, organic solvent, immobilization, biofilm

3P-172 チチタケ由来シス型プレニルトランスフェラーゼのクローニングと昆虫細胞による発現

○横田 早希¹, 水村 仁美², 家田 偉史³, 中村 武志⁴, 大谷 典正⁴, 後藤 猛¹
 (¹秋田大学院工資, ²秋田大工資, ³山形大院・理工, ⁴山形大理)
 syokota@gipc.akita-u.ac.jp

市販の天然ゴムは、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) のラテックスからのみ得られ、タイヤ等のゴム工業製品に不可欠な天然材料である。しかし、安定供給への不安が懸念されており、*in vitro* 合成系確立が望まれている。一方で、*Lactarius* 属キノコもラテックス状でゴムを産出する。パラゴムノキと比較すると低分子量体であり、両末端基を含む分子構造は NMR で詳細に解析され、分岐構造をとらないことが分かっている。本研究ではチチタケ (*Lactarius volemus*) に着目し、ゴム生合成に関与すると推測されるシス型プレニルトランスフェラーゼのクローニングとその発現系構築を行った。

まず、チチタケを試料として RNA を抽出し、PCR により ORF 786 bp の遺伝子 *LvCPT* を単離した。次に大腸菌での発現系構築を試みた。種々の発現ベクターを検討し、目的の組換え *LvCPT* (30 kDa) の大量発現に成功した。得られた組換え *LvCPT* の触媒機能を、放射性ラベルしたモノマーの取り込み活性から検討したが、優位な活性は確認できなかった。そこで次に、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて組換え *LvCPT* の生産を試みた。組換えバキュロウイルスの構築には pFastBac I ベクター (Invitrogen) を使用した。C 末端に付加した His タグによるウェスタンブロッティングの結果、目的の組換え *LvCPT* の生産が確認された。

Molecular cloning and expression in insect cells of cDNA encoding *Lactarius volemus cis*-prenyltransferase

○Saki Yokota¹, Hitomi Mizumura², Takeshi Ieda³, Takeshi Nakamura⁴, Norimasa Ohya⁴, Takeshi Gotoh¹
 (¹Grad. Sch. Eng. Resour. Sci., Akita Univ., ²Fac. Eng. Resour. Sci., Akita Univ., ³Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., ⁴Fac. Sci., Yamagata Univ.)

Key words *cis*-prenyltransferase, molecular cloning, baculovirus, insect cell

3P-174 上皮成長因子受容体を特異的に認識する Affibody 提示バイオナノカプセルの開発

○江澤 僚将¹, 西村 勇哉², 石井 純², 荻野 千秋¹, 近藤 昭彦¹
 (¹神戸大院・工・応化, ²神戸大・自科・研究環)
 akondo@kobe-u.ac.jp

薬剤動態を制御可能なドラッグデリバリーシステム (DDS) は、高い治療効果と同時に強い副作用を低減するための技術として注目されている。

薬剤送達キャリア候補の 1 つである B 型肝炎ウイルス (HBV) 由来のバイオナノカプセル (BNC) は、脂質二重膜及び HBV 由来の表層抗原 L タンパク質から成る中空粒子であり、HBV 同様肝細胞を特異的に標的化する。

これまでの研究において、L タンパク質の肝細胞認識部位を削除し、リガンドとして結合性タンパク質を組み込むことで肝細胞以外の癌細胞を標的化できる BNC が報告されている。そこで、本研究では新たなリガンドとして、様々な受容体に結合する変異体の報告がされている黄色ブドウ球菌プロテイン A 中の Z ドメイン由来 Affibody に着目した。多くの癌細胞に発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) に特異的に結合する Affibody: ZEGFR (Z1907) をリガンドとして表層提示した BNC を構築し、キャリアとしての能力を評価した。

生成した [Z1907]₂-BNC を蛍光標識し、EGFR 発現細胞である A431 と EGFR 非発現細胞である MCF-7 に添加した。フローサイトメーターによる蛍光強度測定より、[Z1907]₂-BNC の EGFR 発現細胞への特異性を確認した。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察では、A431 において細胞内に蛍光が観察された。一方、MCF-7 では蛍光は観察されなかった。このことから [Z1907]₂-BNC は EGFR 発現細胞において細胞内に導入されることがわかった。

Development of affibody-displaying bio-nanocapsule for specific delivery to EGFR-expressing cells

○Ryosuke Ezawa¹, Yuya Nishimura², Jun Ishii², Chiaki Ogino¹, Akihiko Kondo¹
 (¹Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words drug delivery system, bio-nanocapsule, affibody, EGFR