

**3P-183 Sortase A を用いた酵素の配向同時固定化技術の開発とその応用**

○松本 拓也, 秦 悠斗, 田中 勉, 近藤 昭彦  
(神戸大院・工・応化)  
096t473t@stu.kobe-u.ac.jp

複雑なシステムを持つタンパク質複合デバイスを構築する上では、異なる複数種のタンパク質を同時かつ高配向に固定化する手法が必要であるが、現在、このような手法に関する報告例はあまりない。本研究では、ストレプトアビジンを介在させることで、2種類のタンパク質を同時かつ高配向に固定化する手法を開発した。具体的には、ストレプトアビジンのC末端に Sortase A の認識配列である LPETG モチーフ (LP tag) を導入し、SortaseA を用いることによって、N末端上にオリゴグリシン配列 (G tag) を導入したグルコース酸化酵素を連結した。次に、ビオチン化させた西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) をストレプトアビジン上に結合させることで、2種類の酵素を同時に固定化した。実際に、作製した微粒子を用いることで、溶液中に存在するグルコースを検出することに成功した。ここで、本固定化法では、目的タンパク質へオリゴグリシン配列あるいはビオチンを導入する必要があるが、本研究では、更に G tag を付与したエンドグルカナラーゼ (EG)、ビオチンリガーゼ (Bir A) を用いて部位特異的にビオチン化した  $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL) をそれぞれ磁性微粒子上に固定化した。本技術を用いることで、セルラーゼの非結晶領域をランダムに切断する EG、オリゴ糖をグルコースに加水分解する BGL を微粒子上で近傍に固定化することができることから、酵素の近接効果が発揮され、可溶性セルロースを基質とした場合、EG、BGL をそれぞれ別々の微粒子上に固定化したものを混合した場合よりも、効率よくグルコースを分解することができた。

**Oriented co-immobilization of enzymes through sortase A mediated-methodology**

○Takuya Matsumoto, Yuto Hata, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo  
(Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

**Key words** immobilized enzyme, protein engineering, cellulase

**3P-185 亜リン酸を利用したバクテリアの選択的培養法の開発**

○小野 敏志, 廣田 隆一, 池田 丈, 石田 文典, 黒田 章夫  
(広島大院・先端物質)  
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

【目的】バイオ燃料や物質生産のための微生物培養は、一般に目的微生物の純粋培養を前提としており、コンタミネーションを防ぐために培地や機器の滅菌処理、抗生物質の利用が必要である。しかし、培養のスケールが大きくなるほど、投入エネルギーや薬品調達のコストが高くなり、さらに抗生物質を含む廃液は耐性菌などの出現を助長する可能性がある。そこで、安価で安全な選択マーカーを確立することができれば、微生物大量培養における物質生産のコスト削減に貢献できると考えられる。本研究では亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) のバクテリアにおける選択マーカーとしての有効性を検討した。

【方法・結果】PtxD は亜リン酸 ( $H_2PO_3$ ) を酸化してリン酸 ( $H_2PO_4$ ) に変換する酵素である。リンは生育に必須の元素であるため、亜リン酸を利用できないバクテリアに *ptxD* を導入することで、亜リン酸をリン源とした最少培地において選択的に増殖できると考えられる。*Ralstonia* sp. 4506 株から取得した亜リン酸トランスポーター遺伝子 (*ptxABC*) および *ptxD* を pUC プラスミドにクローニングし、亜リン酸を利用できない大腸菌において異種発現させ、亜リン酸をリン源とした MOPS 合成培地で増殖を調べた。その結果、*ptxABCD* 発現大腸菌は増殖を示した。また、*ptxABCD*/pUC プラスミドは選択物質として亜リン酸を使用した方が、アンピシリンを使用した時よりも安定に保持された。さらに、他のバクテリアと競合培養を行った結果、*ptxABCD* 発現大腸菌が優先して増殖することが明らかになった。現在大腸菌以外のバクテリアにおける有効性を確認している。

**Application of phosphite for selective cultivation of microorganisms**

○Satoshi Ono, Ryuichi Hirota, Takeshi Ikeda, Takenori Ishida, Akio Kuroda  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** phosphite, phosphite dehydrogenase, marker gene, selective cultivation

**3P-184 オカラと廃食用油を用いた好気高温固体発酵システムへの好熱性油脂分解菌の添加効果**

○岩瀬 徳康<sup>1</sup>, 山田 千早<sup>1</sup>, 松岡 真生<sup>1</sup>, 西田 茂雄<sup>2</sup>, 祥雲 弘文<sup>1</sup>, 若木 高善<sup>1</sup>, 伏信 進矢<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>環清技研エンジニアリング)  
bxa03567@nifty.com

【背景と目的】日本国内における廃食用油の年間発生量は約 45 万 t と推定され、このうち、事業系から排出されるものはほぼ回収されているものの、数万 t が再生利用困難として廃棄されている。また、一般家庭からの回収率は低く、約 10 万 t がゴミや下水として廃棄されている。一方、豆腐製造における副産物であるオカラは、中・小規模の製造所においては産業廃棄物として処分されている。しかも、オカラは含水率が 80% を超える高含水率食品加工残渣であり、保管や運送における腐敗やコストの問題が、リサイクルの大きな妨げとなっている。そこで我々は、廃食用油の資化による微生物の発酵熱を利用しつつオカラを乾燥させることで、飼料や燃料へと再利用する新規な好気高温固体発酵システムの構築を目指している。

【方法と結果】固体発酵槽中の発酵オカラを微生物源とした集積培養により、好熱性油脂分解菌を単離した。これを大量培養、集菌し、好気高温固体発酵システムに添加した。発酵乾燥中の脂質の含有量、含水率、pH、排気中の酸素および二酸化炭素濃度、使用電力を経時的に測定し、廃食用油の微生物による分解と、好熱性油脂分解菌の添加効果を評価した。

**Effect of supplementation of a thermophilic lipolytic microbe for a high-temperature aerobic solid-state fermentation system with okara and used cooking oil**

○Noriyasu Iwase<sup>1</sup>, Chihaya Yamada<sup>1</sup>, Masaki Matsuoka<sup>1</sup>, Shigeo Nishida<sup>2</sup>, Hirofumi Shoun<sup>1</sup>, Takayoshi Wakagi<sup>1</sup>, Shinya Fushinobu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Kanseigiken Engineering)

**Key words** okara, used cooking oil, solid state fermentation

**3P-186 *Aspergillus nidulans* における  $\alpha$ -1,3-グルカン欠失株の細胞壁構造と培養性状の解析**

吉見 啓<sup>1</sup>, 〇一杉 昌玄<sup>2</sup>, 稲葉 梓<sup>2</sup>, 笠原 紳<sup>3</sup>, 阿部 敬悦<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東北大・未来研, <sup>2</sup>東北大院・農, <sup>3</sup>宮城大・食産業・環境システム)  
m-hitosugi@niche.tohoku.ac.jp

我々は糸状菌の細胞壁多糖  $\alpha$ -1,3-グルカン (AG) の機能に着目し、*Aspergillus nidulans* において 2 種の AG 合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*) の機能解析を進めてきた。これまでに、本菌の AG 合成には *agsA* はほとんど機能しておらず、主に *agsB* が機能していることを明らかにしている。今回、*agsB* および *agsA* *agsB* 破壊株において細胞壁の構造を解析したので、その結果について報告する。まず、これら破壊株の細胞壁からは完全に AG が欠失しており、この AG 欠失により  $\beta$ -グルカナラーゼとキチナーゼ活性を有する Lysing Enzymes や細胞壁染色剤 Congo red に対する感受性が上昇していることが明らかになった。また、これら AG 欠失株は、液体振盪培養において菌糸が培地中に分散する特徴を示したので、その高密度培養性状についても解析した。

**Analysis of the cell-wall compositions and the growth characteristics in the alpha-1,3-glucan defect mutants of *Aspergillus nidulans***

Akira Yoshimi<sup>1</sup>, 〇Masahito Hitosugi<sup>2</sup>, Azusa Inaba<sup>2</sup>, Shin Kasahara<sup>3</sup>, Keietsu Abe<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>NICHE, Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>3</sup>Dept. Environ. Sci., Miyagi Univ.)

**Key words** *Aspergillus nidulans*, cell wall, alpha-1, 3-glucan, growth characteristics