

## 2H15-5 *Helicobacter pylori* urease に対するいくつかの天然型抗体酵素

○ 〇三 恵美, 山田 由紀子, 宇田 泰三  
(広島県大, 科技団CREST)

**【目的】** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) のウレアーゼは、*H. pylori* の胃粘膜への着生に不可欠な酵素である。演者らは *H. pylori* ウレアーゼに対するモノクローナル抗体27種類を作製したが、そのいくつかを三次元立体構造解析を行った結果、いくつかの抗体L鎖に触媒三ツ組残基様構造が存在すると推察された。そこで、これらについて天然型抗体酵素としての性質を調べた。

**【方法】** 抗体の三次元構造はSGI上でAbM(Oxford Molecular Ltd.)を使用して構築し、次いでDiscover IIによりエネルギーを最小化した。酵素活性の評価は、HpU抗体軽鎖(0.8 mM)とその抗原ペプチド(SVELIDIGGNRRIFGFNALVD) 80 μMを反応温度25°C、リン酸緩衝液中で反応させ、ペプチドの濃度変化をHPLCにより分析した。

**【結果】** 可変領域に触媒三ツ組残基様構造を持つと推定された抗体のうち、*H. pylori* urease に対するHpU-9、およびHpU-18抗体は、いずれもペプチド基質に対する分解反応試験の結果、全てのL鎖でこれまで得られたと同様の2相性の反応プロファイルを示しながらペプチド基質を完全に分解した。この時、反応生成物をMALDI-TOF-MASSで解析したところ、多くのペプチド分解産物が確認された。一方、触媒三ツ組残基様構造が存在しないと推定されたH鎖では分解反応は進行しなかった。urease分子に対する反応性も併せて検討したので、HpU-9、およびHpU-18抗体軽鎖の抗体酵素としての特徴について述べる。

### Natural catalytic antibodies cleaving of the peptide of *Helicobacter pylori* urease

○ Emi Hifumi, Yukiko Yamada, Taizo Uda  
(Hiroshima Pref. Univ., CREST of JST)

**Key words** *H. pylori*, urease, monoclonal antibody, catalytic antibody

## 2H16-1 コーヒー滓を担体とする微生物菌叢による生ゴミ連続分解処理

○ 粟冠 真紀子<sup>1</sup>, 成木 嘉之<sup>2</sup>, 木村 哲哉<sup>1</sup>, 粟冠 和郎<sup>1</sup>, 大宮 邦雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>三重大学資,<sup>2</sup>東京コーヒーロースター)

コーヒー滓に生ゴミと鶏糞を添加して、家庭用生ゴミ処理機を用いて発酵させたところ、温度が55°Cまで上昇しその後緩やかに下降する現象が確認された。発酵温度が室温まで低下した発酵コーヒー滓を生ゴミ分解用の種菌とした。約60%の水分を含んだコーヒー滓5kgを水酸化カルシウムでpH8に調整し、これに種菌0.8kgを加えよく攪拌後、0.1m<sup>3</sup>容の生ゴミ処理機を用いて、生ゴミを月曜から金曜まで一日2~3kgを連続的に投入し、攪拌送風を制御しながら159日間分解処理した。この間、三ヶ月目と五ヶ月目に各5kgのコーヒー滓を添加した。その結果、生ゴミ総投入量266kg、160日目の生ゴミ処理機内容物重量13.4kgとなった。使用したコーヒー滓の総重量が15.8kgであることから、投入した生ゴミはほとんど分解されたと推察された。この間pHは4~7の間で変動した。しかし、有機酸系の臭気が強く発生したことから、臭気の低減のためには処理槽内のpH低下を防ぐ必要があると考えられた。そこで、担体とするコーヒー滓をpH7.6のリン酸緩衝液(14mM)を用いて膨潤させ、これに種菌を加えたもの10kgに対して一日2~3kgの生ゴミを連続投入して80日間分解処理をした。この結果、内容物のpHは6.5前後と安定し、有機酸系の臭気は前実験の2分の1前後に抑えられ、臭気ガス発生量の低減に成功した。以上の結果は、コーヒー滓は微生物担体と成りうること、担体に緩衝能を持たせることにより安定した生ゴミの連続分解が可能になることを示唆している。

### Usefulness of Coffee Grounds as a Microbial Habitat for Garbage Degradation

○ Makiko SAKKA<sup>1</sup>, Yoshiyuki NARUSUE<sup>2</sup>, Tetsuya KIMURA<sup>1</sup>, Kazuo SAKKA<sup>1</sup>, Kunio OHMIYA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Mic Univ.,<sup>2</sup>TCR)

**Key words** coffee grounds, microbial habitat, phosphate buffer

## 2H16-2 マイクロアレイ技術を応用した植物病原細菌検出方法

○ 北河 恵美子<sup>1</sup>, 小原 達也<sup>2</sup>, 畔上 耕児<sup>2</sup>, 岩橋 均<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>産総研,<sup>2</sup>中央農研)

**【目的】** 現在、対象微生物の存在の有無の判断には、PCRが汎用されている。この方法では、対象に対してそれぞれ1セットずつの特異的プライマーを用意する必要がある事から、多検体、多対象の検出を行うことが容易ではない。また、相当する断片の増幅で判定を行う為、増幅断片長が近似している場合の断定が困難である。DNAマイクロアレイを使用する事により、対象微生物数が多い場合でも同時に特異的な検出が可能であると考え、微生物検出用アレイの作成及び実験方法の検討を行った。モデルケースとして植物(イネ)病原細菌を対象とした。

**【方法及び結果】** 16S配列は微生物の同定に使用され、データベースが整備されている反面、配列が高く保存されているために、特異的配列を選択することが困難な場合と考えられる。このため、より識別性の高いと考えられる16S-23S間領域(ITS: internal transcribed spacer region)から塩基配列が特異的でありTm温度が均一となる様なオリゴヌクレオチドを選択し、それぞれをプローブとしてガラス上に固定することで植物(イネ)病原細菌検出用アレイを作成した。ユニバーサルプライマーで16SとITS領域を含む断片を非選択的に増幅し蛍光色素での標識を行い、検出用アレイにハイブリダイズさせてプローブ毎のシグナルを検出した。対象微生物を特異的に検出するための方法の検討を試みた。

### Microarray technology for detection of plant pathogenic bacteria

○ Emiko Kitagawa<sup>1</sup>, Tatsuji Ohara<sup>2</sup>, Koji Azegami<sup>2</sup>, Hitoshi Iwashashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>AIST,<sup>2</sup>NARC)

**Key words** microarray, detection, pathogen

## 2H16-3 麹菌の環境中における生存性について

○ 楠本 憲一, 栗原 洋子, 木村 多江, 鈴木 聡, 柏木 豊  
(食総研)

**【目的】** 麹菌は我が国の重要な醸造用微生物であり、酵素生産菌としても利用されているが、環境中における生存形態等についてはほとんど知見がない。そこで、麹菌の環境中における生存性を検討することとし、まず土壌中及び水道水中における本菌の消長を調査した。

**【方法及び結果】** 麹菌として、*Aspergillus oryzae* NRI 1599より、他の糸状菌との区別や検出が容易な薬剤(ピリチアミン)耐性株を10株取得した。その中で、形態的に親株と同一と考えられるPTR-1株を供試菌株として使用した。土壌(川砂, 黒土)について、オートクレーブ滅菌の有無で3種類の処理区を作成した。土壌各5gをねじ付きのプラスチック容器に入れ、これにPTR-1株の胞子約10<sup>6</sup>個を接種混合後、軽くふたをして25°Cで90日間保温した。定期的に土壌を採取し、無菌水を添加して抽出し、選択培地上に塗布後、出現したコロニー数を計数した。その結果、麹菌は3ヶ月間、供試した土壌中で生存が確認された。それぞれの処理区で試験期間中に麹菌数の変動が見られた。また、回分式培養装置(10L)に未殺菌の水道水を5L入れ、PTR-1株の胞子を5×10<sup>7</sup>個接種し、通気攪拌しつつ20°Cで培養した。定期的に液を採取して培養後コロニー数を計数したところ、7日間で菌数は約4分の1に減少した後、約2ヶ月間生存が確認された。このことから、麹菌は土壌環境中および水道水中で、極めて生存性が高いことが明らかになった。現在、さらに詳細なデータを取得中である。  
○ Ken-Ichi Kusumoto, Yohko Kurihara, Tae Kimura, Satoshi Suzuki, Yutaka

### Survivability of koji molds in the environment

○ Ken-Ichi Kusumoto, Yohko Kurihara, Tae Kimura, Satoshi Suzuki, Yutaka Kashiwagi  
(National Food Research Institute)

**Key words** koji molds, *Aspergillus oryzae*, survivability, soil, water