

日本

Nippon Nōgeikagaku Kaishi

農芸化学

会誌

2001 Mar. **75** 卷 臨時
増刊 号

2001 年度大会
(京都)

講演要旨集

- 大会関連記事 ————— ●巻頭
- 一般講演発表 ————— ●1
- 受賞講演 ————— ●391
- シンポジウム ————— ●441
- 新製品・新技術セミナー ————— ●543
- 人名索引
- キーワード索引 ————— ●巻末



社団法人

日本農芸化学会

Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

<http://www.soc.nacsis.ac.jp/jsbba>

NNKKA75(S)

IR3p12 *Neurospora crassa* の産生する β -1,6-glucanase 遺伝子のクローニング
 ○小山 誠司、阿部 敬規、中島 佑 (東北大学院、応生科)

【目的】 β -1,6-glucanase は β -glucan の β -1,6-glycoside 結合を加水分解する酵素であるが、報告例が少なく、またクローニングされた例も *Trichoderma harzianum* 由来のもののみとなっている。アカバシカビ *N. crassa* は液体培養上清中に β -1,6-glucanase を産生することが知られており、Hiura らにより精製され、諸性質について報告がなされている¹⁾。本研究では本酵素の酵素化学的な性質や生理的な機能を明らかにすることを目的とし、本酵素遺伝子のクローニングを行い塩基配列を決定した。

【方法と結果】*N. crassa* IFO 6068 株の N-vogel 液体培地の 10 日間培養上清中から調製された精製 β -1,6-glucanase を用いて、N 末端および内部アミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列を基に primer を設計し、ゲノム DNA に対し PCR を行ったところ、約 650 bp の断片が得られ、その推定されるアミノ酸配列中に精製酵素から決定されたアミノ酸配列を含んでいた。*N. crassa* cDNA library を λ ZAP II を用いて作製し、ブランクハイブリダイゼーション法により PCR 産物を鋳型としたプローブをもちいてスクリーニングを行った。その結果ポジティブなシグナルが得られ、これをクローン化して塩基配列を解析したところ、全長の β -1,6-glucanase cDNA であることがわかった。また本酵素は、*T. harzianum* 由来の β -1,6-glucanase とは相同性を示さなかった。現在この cDNA を用いて大腸菌による蛋白質の発現を試みている。

1) Hiura, N., Nakajima, T. & Matsuda, K. *Agr. Biol. Chem.* **51**, 3315-3321 (1987)

IR3p13 β -1,6-グルカナーゼの精製と酵母細胞壁タンパク質解析への利用
 ○嶋津 下蔵仁、伊藤 清
 (国保庁醸造研)

【目的】酵母の細胞壁には多くの種類のタンパク質が含まれており、さまざまな機能を担っている。これらの細胞壁タンパク質の多くは、GPI アンカータンパク質として合成された後、 β -1,6-グルカンを経由して細胞壁に結合していることが知られている。このため、多くの細胞壁タンパク質は不溶性であるが、細胞壁を β -1,6-グルカナーゼで処理することによって溶離させることができる。しかし、この目的に最適な精製 β -1,6-グルカナーゼは市販されていない。本研究では、 β -1,6-グルカナーゼ活性の高い市販酵母溶解酵素「ウェスターゼ」から β -1,6-グルカナーゼの精製を行い、酵母細胞壁タンパク質の調製への利用を検討した。

【方法及び結果】陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー及び陽イオンクロマトグラフィーを経て、「ウェスターゼ」から電気泳動的に単一な状態にまで β -1,6-グルカナーゼを精製した。精製酵素は、 β -1,6-グルカンを特異的に加水分解した。また、精製酵素によるブツツクの分解産物を HPLC で分析した結果、この酵素はエンド β -1,6-グルカナーゼであることが示された。精製 β -1,6-グルカナーゼで酵母細胞壁を処理すると、細胞壁タンパク質が遊離してくることが確認できた。本酵素は、酵母細胞壁タンパク質の解析に有用であると考えられる。

IR3p14 シロアリキノコ由来リグニン分解酵素遺伝子のクローニング
 ○前田芳政**、大熊盛也***、太田口和久*、工藤俊章**、***
 (*東工大院・理工、**理研・微生物、***科技园・ICORP)

【目的】自然界においてある種のシロアリは巣内にキノコ(担子菌)を栽培しているが、このキノコの役割は殆ど解明されていない。この共生系ではリグニンセルロースの効率的な分解が行われていることから、シロアリでは分解困難なリグニンの分解に共生キノコが関わっている可能性が高いと考えられる。本研究ではオオシロアリタケ(*Termitomyces albuminosus*)を用い、シロアリとキノコとの共生関係を解明することを目的とした。

【方法および結果】他の担子菌において報告されているリグニン分解酵素マンガンペルオキシダーゼ(MnP)遺伝子配列情報を元にデザインしたプライマーを用い、オオシロアリタケ染色体 DNA に対し PCR を行ったところ、約 0.6kb の DNA 断片の増幅が確認された。この増幅断片をクローニング後、塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を調べたところ、MnP の活性部位として高く保存されている部位を含むものが 2 種得られた。更に、この 2 種の塩基配列を元にデザインしたプライマーを用い、オオシロアリタケ poly(A) RNA に対し RT-PCR を行った。増幅断片をクローニング、RFLP 解析を行ったところ、2 種の DNA 断片が得られた。これらの塩基配列はゲノムより得られた DNA 断片からイントロンと予想される部位を除いた配列とそれぞれ 99% および 100% の相同性が得られた。

IR3p15 シロアリタケ *Termitomyces albuminosus* ATCC 42010 より単離されたペルオキシダーゼの諸性質
 ○城島 透¹⁾、大熊盛也²⁾、工藤俊章^{1,2)} (1)科技园・ICORP、²⁾理研・微生物)

シロアリタケ (*Termitomyces* 属) は、キノコシロアリと共生する担子菌である。シロアリタケの共生系における役割の 1 つとして、リグニンを分解し、シロアリの体外消化器官として働くことが提案されている。白色腐朽性担子菌は、種々のペルオキシダーゼを産生することでリグニンを分解しており、シロアリタケの菌体外ペルオキシダーゼに興味を持たれた。本研究では、*T. albuminosus* ATCC 42010 から、新規ペルオキシダーゼが単離されたので報告する。

T. albuminosus を yeast carbon base, 12 mM ammonium tartrate 培地で 20 日間培養し、その培養液よりペルオキシダーゼ (TaP) を単離精製した。TaP は、分子量 67kDa (SDS-PAGE) の単量体酵素であり、過酸化水素存在下、2,6-dimethoxyphenol、ABTS を酸化するが、lignin peroxidase の基質であるベラトリルアルコールおよび manganese peroxidase の基質である Mn²⁺ は酸化できなかった。ABTS 酸化における pH の影響を検討したところ、pH=2.3 において最大活性を示した。N 末端アミノ酸配列を決定し、相同性検索を行ったところ、子う菌 *Geotrichum candidum* より単離されたペルオキシダーゼ DyP と 68% の相同性を示した。TaP は、既知の担子菌由来の酵素と異なる特徴を有していた。

IR3p16 Purification and characterization of isocitrate lyase from a wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown in a glucose-rich medium
 ○Erman Munir, Jeong-Jun Yoon, Toshiaki Tokimatsu, Tekefumi Hattori, Mikio Shimada
 Wood Research Institute, Kyoto University

Recently, isocitrate lyase (ICL) and malate synthase (MS) as the glyoxylate key enzymes have been shown to play an important role as the constitutive enzymes in oxalate biosynthesis in wood-rotting basidiomycetes.¹⁾ However, literature survey has revealed that there is no example of purification and characterization of ICL from any of basidiomycetes. ICL from the wood-rotting fungus *F. palustris* grown on glucose has been successfully purified as a homogeneous protein by several steps of column chromatographies (76-fold purification and 23% yield). The native enzyme has a molecular mass of 186 kDa and the denatured enzyme has a molecular mass of 60 kDa as determined by SDS-PAGE. In consistent with other microbial ICLs, the enzyme from *F. palustris* required Mg²⁺ (K_m 90 μ M) and SH reagents for the optimal activity (pH 7.0). K_m for isocitrate was 1.6 mM. Among metabolites tested for inhibiting the enzyme activity, oxalate was the strongest inhibitor (K_i 37 μ M), which may control the enzyme activity as a major physiological metabolite.

1) E. Munir et al.: *J. Wood Science*, **47** (2001) (in press).

IR3p17 *Penicillium herquei* の産生するキシラナーゼ
 西尾治美、氏田 稔*、佐藤浩昭*、船橋 透、
 原 彰 (名城大農・応生化、*農学ハイテクリサーチセ)

【目的】バイオマスへの有効利用を目的として、八郎湖土壌から分離した *P. herquei* は豊富なセルラーゼ、グルカナーゼ、キシラナーゼ、ポリガラクトゾナーゼ等の多様な分解酵素を分泌したが、同種の菌株について調べたところ IFO4674 株が同様の性状を示すことが分かった。本報告では、IFO4674 株のキシラナーゼの生産性、精製および諸性質について報告する。【方法および結果】 IFO4674 株のキシラナーゼ生産性を調べたところ、キシラン 1.5% 濃度で 3 日間の培養で最大の生産性を示すことが分かった。キシラナーゼの最大生産条件下で培養した培養液を、硫酸塩析、DEAE Bio-Gel および CM Bio-Gel によるイオン交換クロマトグラフィーおよび Superdex 75 μ g によるゲルろ過により処理し、P1, P2, P3 の 3 種の酵素を得た。このうち、P1 と P3 は電気泳動的に均一であった。最適 pH は、P1 が 5.5~6.5、P2 と P3 が 3.0~4.5 の範囲にあり、最適温度はそれぞれ 50℃ にあった。これらの酵素について、プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を調べ、また基質特異性について、MALDI-MS を用いて分析した結果を報告する。