

### 3E12-1 *Aspergillus oryzae* のキシリトールデヒドロゲナーゼ (*xdhA*) 遺伝子の破壊による xylitol 生産

○服部 興二<sup>1</sup>, 中村 浩平<sup>1</sup>, 北本 則行<sup>2</sup>, 鈴木 徹<sup>3</sup>, 高見澤 一裕<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大・農, <sup>2</sup>愛知産技研・食工技セ, <sup>3</sup>岐阜大・生命セ)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* を用い、キシランからキシリトールの生産を検討した。麹菌は D-キシロースをキシロースレダクターゼによりキシリトールに変換し、その後、キシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) により D-キシロースに酸化され、ペントースリン酸経路に入る。通常ではキシリトールの蓄積は生じない。我々は、これまでに XDH 活性をコードしている 2 つの遺伝子 *xdhA*, *ladA* のクローニングとその発現について報告してきた。今回は麹菌によるキシリトール生産を目指し、*xdhA* 及び *ladA* 遺伝子破壊株を作製し、キシリトール生産を検討した。

【方法及び結果】*xdhA* 遺伝子と *ladA* 遺伝子の CDS 部分に *A. oryzae* の *pyrG* 遺伝子を挿入した遺伝子破壊株用ベクターを作製した。これを、*A. oryzae* に導入、相同組換えを行い、*xdhA* 及び *ladA* 遺伝子の破壊株を作製した。*xdhA* 破壊株では炭素源として D-キシロースやキシリトールを用いた培地で生育速度が減少し、*ladA* 破壊株では L-アラビノース培地でほとんど生育しなかった。*xdhA* 破壊株は親株である KBN616 株と比較して、D-キシロースから約 3 倍のキシリトール生産量を示し、キシリトール収率は約 40% であった。現在、より高いキシリトール収率を目指すために、*xdhA*, *ladA* のダブル欠損株を作成している。

#### Xylitol production by destruction of xylitol dehydrogenase(*xdhA*) gene in *Aspergillus oryzae*

○Koji HATTORI<sup>1</sup>, Kohei NAKMURA<sup>1</sup>, Noriyuki KITAMOTO<sup>2</sup>,  
Toru SUZUKI<sup>3</sup>, Kazuhiro TAKAMIZAWA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Gifu Univ., <sup>2</sup>Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst.,  
<sup>3</sup>Biosci Res. Center, Gifu Univ.)

**Key words** xylitol, *Aspergillus oryzae*, xylitol dehydrogenase

### 3E12-2 ヒゲカビ chitin deacetylase 遺伝子のコウジカビおよびアカパンカビにおける発現

○米村 晃子, 長島 敏幸, 村山 肇子  
(関東学院大・工)

キチンを脱アセチル化して得られるキトサンは、医療材料や機能性食品、化粧品、土壌改良剤として用いられ、年々その需要が高まっている。現在キトサンの生産には、キチンを高濃度のアルカリ処理によって脱アセチル化する方法が用いられているが、その際に生じる高濃度アルカリ廃液が問題である。それに代わる方法として、本研究ではキチンを脱アセチル化してキトサンを生成する酵素、chitin deacetylase に着目した。接合菌ヒゲカビは細胞壁の主成分としてキチンとキトサンを含み、chitin deacetylase を持つ珍しい菌類の一種である。しかし、ヒゲカビの菌糸体抽出液中の chitin deacetylase は 0.012 units/mg protein と少量である。そこで、ヒゲカビ chitin deacetylase 遺伝子をコウジカビおよびアカパンカビに導入し、chitin deacetylase を大量に発現させることを考えた。ヒゲカビの chitin deacetylase 遺伝子はクローニングしたところ、シグナル配列を持った 459 アミノ酸をコードすることが分かった。この遺伝子をコウジカビで発現させるため、プロモーターとストップコドン以下の末端部分はコウジカビアミラーゼ B 遺伝子由来の配列を使用した。アカパンカビでの発現にはプロモーターと菌体外に分泌されるためのシグナル配列、ストップコドン以下の末端部分としてアカパンカビインベルターゼ遺伝子由来の配列を使用した。これらの結果について報告する。

#### Expression of chitin deacetylase gene from *Phycomyces blakesleeana* in *Aspergillus oryzae* and *Neurospora crassa*

○Akiko Yonemura, Toshiyuki Nagashima, Tadako Murayama  
(Coll. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

**Key words** chitin deacetylase, *Aspergillus oryzae*, *Neurospora crassa*

### 3E12-3 新規細菌粘着蛋白質の分子解析

○石川 聖人<sup>1</sup>, 高田 修平<sup>1</sup>, 堀 克敏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>名工大院・工, <sup>2</sup>JST さきがけ)

【目的】本研究室では、細菌の表面付着機構の解明のため、高い固体付着能力を有するグラム陰性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 の研究を進めている。Tol 5 細胞には、アンカーと周毛性繊維の 2 種類の粘着性ナノファイバーが存在する。Tol 5 株のトランスポゾン挿入変異体である T1 株は、付着力の著しい低下と両ファイバーの欠損が認められた。本研究では、T1 株のトランスポゾン挿入部位を解析し、付着関連遺伝子を明らかにすることを目的とした。

【実験・結果】T1 株のトランスポゾン挿入部位を解析し、ファイバーの生成への関与が推定される 68bp の染色体断片を得た。この断片の塩基配列をもとに、インバース PCR 用のプライマーを設計し、68bp の周辺約 5kb の Tol 5 遺伝子断片を増幅し、クローニングした。塩基配列解析の結果、トランスポゾンはいくつかの病原性細菌で粘着蛋白質として報告されているオートトランスポーターアドヘンシと相同性を持つ構造遺伝子上に挿入されていることが明らかとなった。約 5kb の断片上には、3,959bp の構造遺伝子断片とそのプロモーター領域が含まれていたが、蛋白質のコード領域の途中で切れていた。そこで既知となった領域で DNA プローブを設計し、サザンハイブリダイゼーションや PCR 等により目的遺伝子の検出を行い、遺伝子を抽出、クローニングすることで目的の遺伝子全長約 10kb を明らかにすることができた。配列解析からこの粘着蛋白質の分子量が巨大であることやアミノ酸数百残基からなるモチーフが数回繰り返されるなど、既報のオートトランスポーターアドヘンシにはない独自の特徴を持っていることがわかった。

#### Molecular analysis of a novel bacterial adhesin

○Masahito ISHIKAWA<sup>1</sup>, Shuhei TAKADA<sup>1</sup>, Katsutoshi HORI<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Tech., <sup>2</sup>PRESTO, JST)

**Key words** autotransporter, adhesin, *Acinetobacter*, bacterial nanofiber