

1p-AM1 嫌気性細菌の機能を駆使したバイオマスの有効利用

○大宮 邦雄

(名城大・農学ハイテクリサーチセンター)

嫌気性細菌を数株単離し、1) これらのセルロース系バイオマス分解酵素および遺伝子を解析し、新規の酵素やドメインの機能を見いだした。これに基づいて、2) セルロソームのコヘシン・ドックリンの種特異的結合機能を応用した酵素の配列（人工酵素の構築）と CO₂ 固定への応用、3) イネ植物体にセルラーゼ遺伝子を導入しイネ藁の消化促進、および 4) ヒドロゲナーゼ強化組換え菌による水素ガス生産を行うための基盤研究を行った。

1. 嫌気性細菌由来のセルラーゼ遺伝子とその酵素機能の解析

セルロースを炭素源とする培地を用いて、反芻胃嫌気性細菌 *Ruminococcus albus* をジャーファーマンターで嫌気培養する条件を確立して多量の菌体と酵素液を確保し、エンドグルカナーゼ EgI を単離精製し、その遺伝子 *egI* をクローニングし解析した。さらに本菌の *egIV* の触媒ドメイン領域を、堆肥より単離した *Clostridium stercorarium* のキシラナーゼ遺伝子のセルロース結合ドメイン領域に連結しキメラのセルラーゼを構築することにより、EgIV に不溶性セルロースへの吸着能を付与し、分解活性を高めた。また、タイ国の堆肥より単離した *Clostridium josui* (新種)、*C. stercorarium* および *C. thermocellum* から 20 数種のセルラーゼやキシラナーゼ遺伝子を単離し解析した。

2. セルロソーム形成機構の解析と人工酵素の構築

C. josui や *C. thermocellum* の酵素複合体（セルロソーム）を構成する骨格タンパク質にはコヘシンが存在し、これらは酵素を結合するサイトであるドックリンとの結合特異性が高いことを明らかにした。これらの中から結合特性が異なる 3 種のコヘシンを選び、キメラの骨格タンパク質を遺伝子組換え法で構築し、それぞれのコヘシンに対結合するドックリンが特異的に結合することを証明した。ついで一種のドックリンにギ酸デヒドロゲナーゼを結合した融合酵素を生産し、設計どおりにキメラ骨格タンパク質上に配列できることを確認し、酵素の逐次反応を効率的に進め CO₂ 固定を行うための人工酵素複合体構築の基礎を築いた。

3. 嫌気性細菌酵素の植物での発現と消化性の促進 イネ藁の消化性を高め飼料化の可能性を探るために、*C. stercorarium* のキシラナーゼ遺伝子をイネカルスに導入した。本遺伝子のシグナル配列はイネでも機能したために、発現したキシラナーゼが細胞外に分泌され組換えイネは 2 週目に枯死した。このため、シグナル領域をはずすとキシラナーゼは細胞内に貯留され、稲の生育は野生株と同程度となった。この組換えイネはヤギ反芻胃において微生物の吸着性が高まり、消化性が向上した。

4. 遺伝子組換えによる嫌気性キチン分解細菌の水素生産能の改善

エビ殻やキチンを分解し水素ガスを生産する *Clostridium paraputrificum* を海浜土壌から単離した。本菌は 1 モルの N-アセチルグルコサミンから 1.7 モルの水素ガスを生産した。本菌の形質転換系を構築し、親株のキチナーゼやヒドロゲナーゼ活性を強化し、水素ガス生産能を 1.7 倍高めることに成功し、未利用資源からクリーンなエネルギー物質を回収する基礎を確立した。また、ゴミ固形燃料 (RDF) や生ゴミから水素生産能の高い嫌気性菌を見出し、その生産条件を確立している。

Effective utilization of biomass by anaerobic bacterial functions

○Kunio OHMIYA

(Agric High Tech Res Center, Meijo Univ.)

Key words anaerobes, biomass, cellulose degradation enzyme, hydrogen production

1p-AM2 生物磁石の利用に関する基礎的研究

○松永 是

(東京農工大院・工)

近年、バイオプロセスによって形成される無機材料“バイオミネラル”に関する研究が注目されている。バイオミネラルの核形成、結晶成長などを遺伝子・タンパク質レベルで解明することで新たなバイオミネラル創製やバイオプロセスの構築が可能となる。筆者らは脂質膜で覆われたマグネタイト(磁性細菌粒子)を生合成する磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株の分離・純粋培養に成功し、磁性細菌において初めて遺伝子組み換え系を確立した。マグネタイト合成に関与するタンパク質の解析を行った結果、磁性細菌粒子膜に局在する鉄輸送タンパク質 MagA、膜小胞形成に関与する MpsA、Mms16 を見いだした。また、マグネタイトの結晶化を司るタンパク質 Mms6 を発見し、マグネタイトの形態を制御していることを明かにした。これらの成果をもとに膜小胞内で Mms6 を使い、MagA が輸送する鉄イオンを原料としてマグネタイトが結晶成長する生物磁石の形成機構を提案した。現在、磁性細菌の全ゲノム解析のデータを基にマグネタイト合成に関与する遺伝子及びタンパク質の網羅的な解析を行い、結晶形成の全過程の解明が進行中である。さらに磁性細菌への遺伝子導入技術を利用し粒子膜に有用タンパク質をディスプレイした磁性細菌粒子の生合成技術を確立した。この技術を用いてプロテイン A や G タンパク質共役受容体をディスプレイした磁性細菌粒子の作製に成功している。さらに磁性細菌粒子を磁性担体として用いた SNPs 解析装置、糖尿病診断装置を構築している。SNPs 解析装置については、骨粗鬆症の診断やマグロの魚種判別などで実証され、本年度実用化を予定である。

Basic research on utilization of biomagnet

○Tadashi MATSUNAGA

(Dept. of Biotech., Tokyo Univ. Agri. Tech.)

Key words biomineralization, magnetic bacteria, nano-sized magnetite