

1C13-3

斎藤賞受賞講演

微生物による石油成分系化合物の代謝研究とその多角的应用研究

○野村 暢彦
(筑波大院・生命環境)

n-アルカン、難分解性多環芳香族などの石油成分あるいはその化合物などを代謝しうるグラム陰性・陽性菌について、分子生物学的解析を中心に基礎研究を広く進めてきた。さらに、それらの基礎研究から得られた知見をもとに多角的な応用研究を行った。当研究室で炭化水素質化性細菌として分離された *Rhodococcus* sp. SD-74 株は、炭化水素 (*n*-アルカン等) を栄養とし菌体外に大量のバイオサーファクタントを生産することが示された (40 g/l)。このバイオサーファクタントは、トレハロースを糖骨格とし、これにコハク酸と脂肪酸がエステル結合した、サクシノイルトレハロースリビッド (STL) と同定された。その生分解性による安全性から、重油汚染の拡散・除去剤としてのマズプロダクトとしても期待されている。一方、STL の生理活性を探索したところ、ヒト白血病細胞を分化誘導すること、さらに糖骨格へ結合する脂肪酸の長さによって、ガン細胞に与える影響が異なるといったことが明らかとなった。STL は、界面活性剤、パイレメ資材、医薬品、高機能素材などの有用物質として様々な分野への応用が期待される。そこで、SD-74 株の STL 生合成経路について遺伝子工学的手法を用いて解析を行った。その結果、アルカン代謝系、糖新生系さらに糖・アシル-CoA 合成が関与することがわかり、かつ、それらの遺伝子の取得に成功した。そこで、それらの遺伝子を SD-74 株に導入し各系の発現を強化することで STL 生産能の向上を試みたところ STL 生産能が 2 倍上昇した。

石油中の難分解性物質の中でもアルキル化多環芳香族は分解されにくいことや、世界各地の石油成分さらにその各精製油において総炭素数 2~4 のアルキル化多環芳香族類が非常に多く存在することが報告されている。しかし、これまでのほとんどの多環芳香族類の微生物分解の研究は、モデル基質としてアルキル化されていない多環芳香族類についてのみ行われてきた。当研究室で分離された *Sphingomonas paucimobilis* TZS-7 による、種々のアルキル化多環芳香族の分解特性について、詳細な解析を進めた。結果、TZS-7 株がアルキル化多環芳香族を含む種々の多環芳香族に対して、高い分解活性を示すことが明らかとなった。つまり、これは TZS-7 株が石油成分中の種々の多環芳香族に対して、その広範囲な基質を許容しうる宿主細胞であるとともに、それらに対する代謝酵素遺伝子 (群) を有している事を示している。そこで、発想を転換し、この細胞の性質あるいは代謝酵素遺伝子 (群) を分子育種することにより、種々多環芳香族のモノヒドロキシ体へのバイオコンバージョンを試みた。種々多環芳香族のモノヒドロキシ体は、OH 部位において分子修飾を簡便に行うことが可能であるため医薬・化学さらに IT 産業の原料として期待できる。特に種々の含硫多環芳香族のモノヒドロキシ体は、導電性ポリマー合成のためのモノマーとして有用である。結果、TZS-7 株の分子育種に成功し、種々の含硫多環芳香族からのモノヒドロキシ体生産そして新規導電性ポリマー合成系の構築に成功した。

石油成分などを基質にしうる微生物を利用した有用物質の生産あるいは処理などの応用を念頭に進めてきた。しかし、本成果は分解経路あるいは合成経路の代謝を基礎的に解析し、そこから有用物質・有用酵素の発見あるいは高生産に繋がった経緯があり、基礎から (予想もしなかった) 応用が生まれることを経験した。また、そこには IT 分野などの異分野の研究者との出会いが不可欠であった。今後も、大学の特徴を生かし、学際的に研究を進めるよう努力していきたい。

Analyses and applications of microorganisms utilizing petroleum elements and its compounds

○Nobuhiko NOMURA
(Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words petroleum, bioconversion, molecular breeding, biosurfactant

1C13-5

細菌由来 P450 遺伝子の大腸菌における機能発現系の構築

ポスター
発表あり○野館 美保, 久保田 光俊, 三沢 典彦
(海洋バイオ研)

【背景】近年、細菌のゲノム解析などから新規 P450 遺伝子が数多く見つっているが、その機能解析には多くの時間が必要とされる。一因として、相性のよい P450 電子供与タンパク質を特定し難いことが挙げられる。我々は、P450 と P450 還元酵素領域が融合して 1 本のポリペプチド鎖として存在する *Rhodococcus* sp. 由来の P450RhF に着目し、本酵素の還元酵素領域を利用し、融合タンパク質として機能発現させる系の構築を試みた。【方法及び結果】P450RhF の還元酵素領域遺伝子をゲノム DNA より増幅・単離し、N 末端側に種々の P450 遺伝子を挿入できる P450 機能発現用ベクター (pRED) 系を構築した。ファミリーの異なる 2 種類の細菌由来 P450 (P450cam, P450bzo) を用いて、この系の有効性を検証した。すなわち、融合化 P450 は大腸菌内で可溶性タンパク質として生産され、その光学的性質から機能性酵素であること、さらに、融合化 P450 を生産する大腸菌は本来の基質を変換できることがわかった。また、機能の報告が無い *Alcanivorax borkumensis* 由来の CYP153A (P450balk と命名) に本系を適応し、融合化 P450balk 生産大腸菌を用いて、幾つかの基質の変換能を調べた。その結果、P450balk がアルカン、特に *n*-オクタンやシクロヘキサンを基質として、アルコール体へと変換できることがわかった。以上の結果より、本系が多種類の細菌由来 P450 への電子伝達系として機能できる可能性が強く示唆された。

【謝辞】本研究は、(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて「ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライブラリーの構築」プロジェクトの一環として実施したものである。

Construction of functional expression system for cytochrome P450 genes derived from bacteria.

○Miho NODATE, Mitsutoshi KUBOTA, Norihiko MISAWA
(MBI)

Key words P450, bioconversion, electron donor

1C14-1

Phanerochaete chrysosporium 由来 P450/P450 レダクターゼ融合タンパク質 PcCYP17a の機能解析○志水 元亨¹, 松崎 美美子¹, 廣末 慎嗣², 有沢 章², 恒川 博², 割石 博之¹
(¹ 九大院・農, ² メルシャン 生物資源研)

【目的】白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のゲノムプロジェクトが終了し、そのゲノム中には少なくとも 154 の P450 遺伝子を有することが明らかとなった。さらに、P450 と P450 レダクターゼの融合タンパク質についても 7 種存在していた。これまで、P450 と P450 レダクターゼの融合タンパク質の機能については、*Fusarium oxysporum* 由来の P450foxy や、枯草菌の P450 BM-3 について報告されており、飽和脂肪酸の水酸化 (ω -1 ~ ω -3 位) を行うことが知られている。しかしながら、*P. chrysosporium* における機能については明らかとなっていない。そこで本研究では、*P. chrysosporium* 由来 P450/P450 レダクターゼ融合タンパク質である PcCYP17a の機能解析を行った。【方法および結果】大腸菌を用いて異種発現を行い、得られたリコンビナントタンパク質を用いて炭素鎖長 9 から 18 までの飽和脂肪酸を基質として反応を行った。その結果、炭素鎖長 9 から 15 までの飽和脂肪酸については ω -1 ~ ω -6 位を水酸化したのに対し、炭素鎖長 16 から 18 までの飽和脂肪酸については ω -1 ~ ω -4 位を水酸化した。また、炭素鎖長 9 から 18 までの飽和脂肪アルコールに対しても同様であった。このことから、P450foxy や P450 BM-3 と比較して、PcCYP17a は広い基質水酸化能を有していることが明らかとなった。

Molecular Characterization of PcCYP17a from the White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*○Motoyuki SHIMIZU¹, Fumiko MATSUZAKI¹, Shinji HIROSUE², Akira ARISAWA², Hiroshi TSUNEKAWA², Hiroyuki WARIISHI¹
(¹ Fac. Agric., Kyushu Univ., ² Mercian Bioresource Laboratories)

Key words Basidiomycete, P450, P450 BM-3, P450foxy