

2L10-4 照井賞受賞講演 嫌気性菌のエネルギー代謝制御による有用物質の効率的生産

○中島田 豊
(広島大院・先端・生命機能)

嫌気性微生物は単独または複数の種で、様々な炭素源、エネルギー源から、アルコール、有機酸、そしてバイオガス（水素、メタン）など、様々な有用物質を生産する。これは嫌気性微生物それぞれが持つ特徴的なエネルギー代謝経路を用いて増殖に必要なエネルギー（ATP）を得たのち、不必要となった還元力（電子）を様々な代謝産物の形で放出するからである。我々は、このような嫌気性微生物のエネルギー代謝の特徴を活かして、付加価値の高い光学活性化合物生産に取り組み、*Paenibacillus polymyxa*を用いた(R,R)-2,3-ブタンジオール生産の効率化を達成するとともに、*Paracoccus denitrificans*によるアセト酢酸エステルからのβ-ヒドロキシ酪酸エステルの嫌氣的不斉還元反応を見いだした。さらに、生ごみや木質系バイオマスなどの糖質系廃棄物のみならず、多種多様な有機廃棄物を有効利用するためには、有機廃棄物を直接、目的産物に変換するのではなく、1)一反、水素やメタンなどのバイオガス（特に水素）として高収率に回収し、2)回収ガスを嫌気性微生物のエネルギー代謝機能を活かして、より高付加価値な化合物に変換する技術が有効と考え、バイオガスの生産・利用技術を検討した。

発酵水素生産を目的として単離した通性嫌気性菌 *Enterobacter aerogenes* のNADH再酸化経路を、遮断または抑制した変異株を作製し、最大理論収率2mol-H₂/mol-glucose近くまで水素生産収率を向上させた。また、高速水素生産プロセスとして、自己凝集性を利用した固定床型リアクターシステムを開発し、グルコースから60mmol/L/h、グリセロールを用いた場合は80mmol/L/hという高速水素生産を達成した。そこで、バイオディーゼル製造工程で発生する高濃度グリセロールを含む廃液を基質とした、水素-エタノール同時発酵法による廃油の完全エネルギー化を検討し、廃液を用いた場合でも60mmol/L/hの高速水素生産が可能であることを示した。さらに、純粋菌での知見を生かし、水素生産微生物群を活用した水素・メタン二段発酵法の検討を行った。

回収したバイオガスのうち、メタンは水蒸気改質により合成ガス（H₂, CO, CO₂の混合ガス）とした後、化学触媒または微生物により水素に変換できることから、水素を中心としたバイオガス利用技術を検討した。水素を還元力、二酸化炭素を炭素源としてエネルギーを獲得し成育する嫌気性微生物に的を絞ってその代謝産物を探索したところ、酢酸とともにエタノールを生産する高熱性微生物 *Moorella* sp. HUC-221株を単離し、エタノール生成条件および生成経路を解析した。次に、最適培養条件、酢酸阻害特性、およびリアクターを用いた菌体の高密度培養法を検討し、エタノール生産性の向上を図った。さらに、中間代謝産物であるアセチルCoAからのエタノール生成に関与すると考えられる酵素遺伝子をクローニング、大腸菌内で発現させ、実際のエタノール生成を確認した。今後、HUC-221株への遺伝子導入法を確立することにより、さらなるエタノール生産性の向上が見込まれる。

嫌気性微生物は培養が難しい、特別な装置を必要とするなどと思われがちであり、伝統的な発酵および嫌気性廃水処理分野を除き、その利用は未だ発展途上と言える。しかし、地球上の大部分は嫌気的であり、さらにユニークで有用な微生物が発見される可能性は高い。そのような微生物の代謝系を生かしたモノづくりの技術が、研究レベルに留まるのではなく実社会で広く活用されるように、今後とも生物学と工学の両面から積極的にアプローチしてゆきたい。

Efficient production of useful compounds by controlling energy metabolism of anaerobic bacteria

○Yutaka NAKASHIMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words energy metabolism, anaerobes, biogas, ethanol fermentation

2L11-1 *Acinetobacter* sp. 由来ヘミセルラーゼの性質

○勝又 雅子¹, 岡崎 渉²
(¹ザ・カミング,²東洋大 生命)

[目的] *Acinetobacter* sp. RL-37は、基質が異なってもすべての培養液中に、マンナーゼ活性、キシラーゼ活性、CMCase活性があることが認められたことから、これらの精製酵素についてタンパクの同一性の有無を調べた。[方法及び結果] 前報に従ってRL-37について各酵素の精製を行ったところ、ローカストビーンガムを基質として培養を行ったものでは、それぞれ1種のマンナーゼ活性、キシラーゼ活性、CMCase活性が認められた。バーチウッドキシランを基質として培養したものは、1種のマンナーゼ活性、2種のキシラーゼ活性、4種のCMCase活性が認められた。CMC-Naを基質として培養したものは、1種のマンナーゼ活性、2種のキシラーゼ活性、2種のCMCase活性が認められた。ローカストビーンガムで培養して得られた各酵素の同一性を調べたところ、分子量やイオン性の違いからすべて異なるタンパクであったが、培養基質をローカストビーンガムやバーチウッドキシラン、CMC-Naのいずれに換えても、マンナーゼ活性やキシラーゼ活性を持つタンパクは同一のものであった。また、マンナーゼ活性を持つタンパクは、疎水性の強いものであった。さらにキシラーゼ活性を持つタンパクは親水性のものであり、分子量は3万以上のものであった。

Characterization of Hemicellulase from *Acinetobacter* sp.

○Masako KATSUMATA¹, Wataru OKAZAKI²
(¹THE COMING, ²Dept. Life Sciences, Toyo Univ.)

Key words *Acinetobacter*, mannanase, xylanase, CMCase

2L11-2 根頭がんしゅ病拮抗菌の分離と機能解析

○山本 賢三, 讃井 美智子, 藤江 誠, 宇佐美 昭二, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)

[目的] 桜やバラに根頭がんしゅ病を引き起こす土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* は植物細胞を形質転換するため、病原菌を取り除いても腫瘍が直らず、防除のためには感染前の土壌からの除菌が重要とされている。現在、土壌の抗生物質処理、加熱処理などが行われているが、より安価で安全な方法が求められている。そこで、自然中より *A. tumefaciens* の増殖、感染を阻害する土壌細菌を分離・解析し、根頭がんしゅ病を防御する方法を開発することにした。[方法・結果] 園芸土壌より *A. tumefaciens* NT4株を指標菌として、増殖を阻害する細菌を20種分離した。16S rRNAの塩基配列の決定により、5種は *Pseudomonas putida*, *P. alcaligenes* を含む *Pseudomonas* 属細菌であり、他は *Flavobacterium* 属細菌、*Enterobacter* 属細菌、*Stenotrophomonas* 属細菌であることを明らかにした。他の *A. tumefaciens* 菌株や *Agrobacterium* 属細菌に対する増殖阻害効果を調べたところ、菌種により阻害効果が異なること、混合処理により増殖阻害効果が高まることを明らかにした。また、病原菌に対する増殖阻害効果の結果として、タバコに対して根頭がんしゅ抑制効果が確認された。現在、ほぼ全ての *Agrobacterium* 属細菌に対して、強い溶菌効果を示す *Flavobacterium* 属細菌の原因遺伝子の分離を行っている。

Isolation and characterization of soil bacteria suppressing crown gall disease

○Kenzo YAMAMOTO, Michiko SANAI, Makoto FUJIE, Shoji USAMI, Takashi YAMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, crown gall, soil bacteria