

3P-2131 放線菌 *Rhodococcus erythropolis* におけるメタノール誘導型プロモーターの解析

○加川 雄介¹, 三谷 恭雄², 中島 信孝², 田村 範子²,
田村 具博^{1,2}
(¹北大院・農・応生科,²産総研)

【目的・背景】

Rhodococcus erythropolis は、有機溶媒耐性能や多様な触媒能を示す微生物である。これより、本菌は多目的用途に利用可能な次世代宿主として期待される菌である。現在まで水溶性物質を対象とした微生物変換例は多数実用化に至っているが、水に難溶性物質を対象とした変換例は実用化に至っていない。そこで、有機溶媒へ水に難溶性物質を溶かした後、培養液へ添加して反応系へ導く手法を確立するため、本菌における有機溶媒応答タンパク質や遺伝子の解析が重要である。

【方法・結果】

Rhodococcus erythropolis において、培養液へのメタノール添加により、イソクエン酸リアーゼ(ICL)が発現誘導されることがわかった。この発現機構を理解するため、icl上流域(300bp)を用いプロモーター活性測定を行った。その結果、メタノールによる発現誘導は、icl上流200bp以上の領域が必要であり、100bpまで短くすると誘導剤の有無にかかわらず構成型プロモーターとして機能することが示された。この構成型プロモーターは、メタノール依存的な遺伝子発現より更に強力な転写活性を示した。この発現機構を更に解析した結果、icl上流300bpには53kDaのタンパク質が結合し、それは *Corynebacterium* 属細菌の転写因子RamBと高い相同性を示した。そして、更なる解析の結果、reRamBの結合部位はcgRamBのそれとは多少異なっていることが示唆された。また、ramB欠損株はメタノールによりICLが発現誘導されなかったことから、RamBはメタノールによるICLの発現誘導に必須であることが示唆された。

Analysis of methanol-inducible promoter in the Actinomycete, *Rhodococcus erythropolis*

○Yusuke KAGAWA¹, Yasuo MITANI², Nobutaka NAKASHIMA²,
Noriko TAMURA², Tomohiro TAMURA^{1,2}
(¹Divi. Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.,²AIST)

Key words *Rhodococcus*, methanol, promoter

3P-2133 マンガンペルオキシダーゼ生産における遺伝子発現及び細胞外タンパク質の解析

○藤原 伸哉¹, 額縁 由香菜², 櫻井 明彦², 畑下 昌範³
(¹福井大・産学官,²福井大院・工・生応化,³若狭湾エネ研)

【目的】白色腐朽菌が分泌するリグニン分解酵素は、有害物質処理への応用が期待されている。そのため、大量生産に向けた様々な検討が行われているが、その生産を調節するメカニズムがほとんど解明されていないことが障壁の一つとなっている。そこで本研究では、白色腐朽菌L-25株によるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 生産へのマンガンやアミノ酸の影響を遺伝子の転写と細胞外タンパク質の発現により解析した。

【方法及び結果】MnP生産は、Potato Dextrose Brothを基本とする培地を用いた振盪培養法 (30°C, 150 rpm) により行った。MnP遺伝子の発現はreal-time RT-PCR法により解析した。ジルコニアビーズを用いた菌体破碎により回収したRNAは、市販のキットにより逆転写した。MnP遺伝子の増幅には、*Bjerkandera* sp. の versatile peroxidase (accession no. AY217015) の配列を基に作製したプライマーを用いた。解析の結果、マンガン0.05~0.15 mMの添加により、MnP遺伝子の転写量が約1.5倍に増加し、MnP生産が転写レベルで誘導されることが明らかとなった。一方、MnP生産を阻害するアミノ酸の一つであるフェニルアラニン1 g/Lの添加では、MnP遺伝子の転写が阻害された。二次元電気泳動法による細胞外タンパク質の解析では、マンガンの添加、非添加で異なる泳動パターンが得られ、幾つかのタンパク質の発現が異なることが明らかとなった。そのため、これらのタンパク質がMnP生産の調節に関与している可能性が予想される。

Analyses of gene expression and extracellular protein during manganese peroxidase production by white-rot fungus

○Shinya FUJIIHARA¹, Yukana KOKETSU², Akihiko SAKURAI²,
Masanori HATASHITA³
(¹Innov. Soc. Acad. Coop., Univ. Fukui,²Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui,³WERC)

Key words white-rot fungus, manganese peroxidase, real time RT-PCR, 2D electrophoresis

3P-2132 バイオマスを原料とした *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵生産

○鈴木 由麻, 多田 清志, 山内 太, 菅野 亨, 堀内 淳一
(北見工大・工・バイオ環境)

【目的】リグノセルロース系バイオマスは、加水分解によりグルコース・キシロースを含む発酵性の糖類を生じる。一方、酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* は、グルコース及びキシロースからそれぞれキシリトール及びアスタキサンチンの生産能を有する。このため本酵母を用いることにより、バイオマス加水分解物から1バッチで効率的にキシリトールとアスタキサンチンを同時生産するバイオプロセスの構築が可能と考えられる。本研究では、酵母 *X. dendrorhous* を用いたキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵について基礎的検討を行った。

【実験方法及び結果】バイオマスとしてコーンコブを用いた。コーンコブの加水分解は、コーンコブ42 gに75% 硫酸を60 g加え50°Cで30 min反応させた後、蒸留水を添加し硫酸濃度を30%とし85°Cで60 min反応させた。その結果、グルコース濃度 45.7 g/L及びキシロース濃度44.6 g/Lを含む加水分解液が得られた。次に、同量のグルコース及びキシロース濃度を含むYPM培地を用いたキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵について検討を行った。5L ジャーファーメンターを用い、25°C、pH 5.0、好気条件下で培養を行ったところ、アスタキサンチン及びキシリトール生産が行われた。その結果、最大アスタキサンチン生産量及び最大キシリトール濃度はそれぞれ3.99 mg及び9.18 g/Lになった。これらのことから、*X. dendrorhous* を用いたキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵が可能であることが明らかになった。

Simultaneous fermentative production of xylitol and astaxanthin by using *Xanthophyllomyces dendrorhous*

○Yuma SUZUKI, Kiyoshi TADA, Hiroshi YAMAUCHI, Tohru KANNO,
Jun-ichi HORIUUCHI
(Dept. Biotechnol. Environ. Chem., Kitami Inst. Technol.)

Key words simultaneous fermentative production, xylitol, astaxanthin

3P-2134 黒麹菌・黄麹菌のゲノム解析

町田 雅之^{1,15}, 小池 英明^{1,15}, 喜久里 育也^{2,15}, 照屋 盛実^{3,15},
鼠尾 まい子^{4,15}, 佐藤 友紀^{2,15}, 塚原 正俊^{4,15}, 藤森 一浩^{1,15},
三輪 友希乃^{4,15}, 矢野 修一^{4,15}, 今田 有美^{4,15}, 和地 陽二^{2,15},
神野 浩二⁵, 堀川 博司⁵, 細山 哲也⁵, 河原林 裕^{1,15}, 山田 修⁶,
坂本 和俊⁶, 本田 裕樹⁷, 服部 貴澄⁷

(¹産総研生物プロセス,²沖縄科学技術振興センター,³沖縄県工業技術センター,⁴トロピカルテクノセンター,⁵製品評価技術基盤機構,⁶酒類総研,⁷早稲田大学理工学術院,
⁸金沢工大,⁹アサヒビール,¹⁰東京大学大学院情報生命科学,
¹¹東京大学大学院新領域創成科学,¹²東北大学大学院農学研究科,¹³日本醸造協会,¹⁴近畿大,¹⁵沖縄先端バイオ)

黒麹菌 (*Aspergillus awamori*) は、沖縄の泡盛醸造に利用される代表的な産業微生物である。この高い物質生産能力は、近縁の麹菌も含め重要な特徴の一つであり、今後多様な有用物質の生産として応用できる。*A. awamori* NBRC 4314 (RIB2604) のゲノム塩基配列 (全長34.7 Mb) は、NITEでSanger法により決定した。また沖縄県の先端バイオ・プロジェクトにより、次世代型シーケンサーを用いて、複数の *A. awamori* および *A. oryzae* のゲノムを解析した。これらのゲノム情報を、比較解析の結果、種によって保有する遺伝子や変異が導入される部位に大きな違いがみられ、微生物株の性質を決定する要因の解明につながるかと期待される。

Genomic analysis of *Aspergillus awamori* and *oryzae*

Machida Masayuki^{1,15}, Koike Hideaki^{1,15}, Kikuzato Ikuya^{2,15}, Teruya Morimi^{3,15},
Nezuo Maiko^{4,15}, Satou Yuki^{2,15}, Tsukahara Masatoshi^{1,15}, E. Fujimori Kazuhiro^{1,15},
Miwa Yukino^{4,15}, Yano Shuichi^{4,15}, Imada Yumi^{4,15}, Wachi Youji^{2,15}, Jinno Koji⁵,
Horikawa Hiroshi⁵, Hosoyama Akira⁵, Kawarabayashi Yutaka^{1,15},
Yamada Osamu⁷, Sakamoto Kazutoshi⁷, Honda Hiroki⁷, Hattori Takasumi⁷

(¹Natl. Inst. Adv. Indust. Sci. Technol.,²Okinawa Indust. Technol. Center,³Tropical Technol. Center,⁴Okinawa Sci. Technol. Promotion Center,⁵Natl. Inst. Technol. Eval.,⁶Natl. Res. Inst. Brewing,⁷Waseda U.,⁸Kanazawa Inst. Technol.,⁹Asahi Breweries,¹⁰U. Tokyo,¹¹U. Tokyo,¹²Tohoku U.,¹³Brewing Soc. Japan,¹⁴Kinki U.,¹⁵Okinawa Cutting-edge Genome Project)

Key words genome, metabolism