

2Ap19 セルラーゼとリグニンの相互作用解析

○高田 理江¹, 吉岡 康一¹, 小島 基², 築瀬 英司², 渡辺 隆司¹
 (¹京大・生研,²鳥取大・工・生工)
 twatanab@rish.kyoto-u.ac.jp

リグノセルロースの酵素糖化発酵では、糖化酵素の使用量を抑えることが必要であり、このために酵素の基質へのアクセシビリティを高めると同時に、酵素の前処理物への非生産的吸着を抑えることが重要である。しかしながら、セルラーゼのリグニンへの吸着挙動は十分解明されていない。そこで、本研究では、セルラーゼとリグニンの相互作用の解明を目的とし、以下の研究を行った。まず、リグニンとセルロース、それぞれに吸着させたセルラーゼのどちらが新たに添加した基質に対して反応性に富むかを分析した。セルラーゼを広葉樹酵素糖化残渣から抽出したリグニンとセルロースにそれぞれ加えて所定の時間インキュベートし、反応後沈殿を回収して酵素の吸着量を測定した。次に、等濃度のセルラーゼが吸着したリグニンとセルロースの残渣に新しいセルロースを加え、糖化率を測定した。その結果、リグニンに吸着した酵素の方が新しい基質に対して低い活性を示すことを見出した。次に構造の異なるモノコンポーネントセルラーゼとリグニンとの親和性の違いを調べるために、糖質結合モジュール(CBM)を除いた触媒モジュールのみからなるセルラーゼを大腸菌で異種発現させ、それぞれ糖化残渣リグニンとの結合を解析した。その結果、酵素によってリグニンへの親和性の違いが観察されたことから、リグニンに吸着しにくい酵素の構造が存在することが示唆された。さらに、バルブ中のリグニンによる糖化の阻害の影響をみるため、セルロースに、抽出法の異なるリグニンを添加して、糖化の阻害を比較したところ、リグニンの構造により阻害の影響が異なることが示された。

Analysis of interaction between cellulase and lignin

○Rie Takada¹, Koichi Yoshioka¹, Motoki Kojima², Hideshi Yanase², Takashi Watanabe¹
 (¹RISH, Kyoto Univ.,²Dept. Biotech., Tottori Univ.)

Key words cellulase, lignin, bioethanol

2Ap21 海水より分離した中度好塩性細菌 *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成に関する研究

○山口 夏美¹, 柘植 丈治², 水野 康平¹
 (¹北九州高専・物化,²東工大院・総理工)
 mizuno@kct.ac.jp

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、細菌の細胞内で生合成、貯蔵される生分解性プラスチックの1種である。PHA合成のうち重合に関与する合成酵素PhaCの新規探索を行うことが新規なポリマーの物性発見へとつながると期待できる。そこで、未知種が多く、新規なPHA合成酵素を有することが期待できる海洋性細菌を分離して、そのPHA合成遺伝子を取得することを目的とする。

【方法・結果】脂溶性の蛍光物質であるNile-Redの細胞内蓄積を指標として、海水よりPHA合成細菌の分離を行った結果、PHA合成分離株O-1を取得した。分離株O-1の16S rRNA遺伝子の全長配列解析を行い、菌種の遺伝子同定を行った結果、*Halomonas* sp. (AM945668)と98% (1173/1185bp)の相同性を得られたため、*Halomonas* 属であると考えた。*Halomonas* sp. O-1は、グラム陰性桿菌で運動性を有しており、生育適条件は、30℃、pH6~8で、15wt%NaClまで生育可能であった。糖質化性試験より、Glycerol, Galactose, Glucose, Fructose, Maltose, Sucrose, Trehalose, Turanose, D-Fucoseを資化することが分かった。次にHPLCを用いて、菌体内蓄積P(3HB)含量を測定した結果、少量のP(3HB)を蓄積していた。また、*phaC*遺伝子断片をクローニングし、解析を行った結果、*H. elongata* DSM 2581のPhaCと相同性が62%であった。

Characterization of a PHA producing moderate halotolerant bacterium *Halomonas* sp. O-1 isolated from seawater.

○Natsumi Yamaguchi¹, Takeharu Tsuge², Kouhei Mizuno¹
 (¹Dept. Mat. Sci. Chem. Eng., Kitakyushu Natl. Col. Tech.,²Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol.)

Key words polyhydroxyalkanoate, *Halomonas*, *phaC*

2Ap20 遺伝子組換え大腸菌による超高分子量 PHA 生産の効率化と生合成酵素活性

○廣江 綾香¹, 柘植 謙爾², 板谷 光泰², 柘植 丈治¹
 (¹東工大院総理工,²慶応大)
 hiroe.a.aa@m.titech.ac.jp

<背景・目的>

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、再生可能な植物資源や二酸化炭素から微生物によって合成されるバイオポリエステルのひとつであり、生分解性に加え、生体適合性・熱可塑性を示すことから、環境負荷の小さいプラスチック材料として幅広い用途への応用が期待されている。遺伝子組換え大腸菌によって合成される重量平均分子量が300万g/molを超える超高分子量PHAは、高強度な繊維やフィルムに加工できる点から、PHA用途拡大に貢献する材料として注目されているが、現状では超高分子量PHAを効率的に生産することは難しい。これまでの研究で、我々は*Ralstonia eutropha*のPHA合成関連遺伝子(*phaABC*)をコードするプラスミドを導入する際に、その遺伝子順序を様々に変えることで、PHAの生産量と分子量が様々に変化することを見出している。そこで、今回これら生産性が異なる遺伝子組換え大腸菌株のPHA生合成酵素活性を解析することにより、活性レベルがPHA生産に与える影響を評価し、高生産化と高分子量化を同時に達成する指針となる情報を得ることを目的とした。

<方法と結果>

PHA生合成酵素であるチオラーゼ(PhaA)、レダクターゼ(PhaB)、ポリメラーゼ(PhaC)の活性は、各遺伝子組換え大腸菌株の粗酵素液を用いて分光学的に測定した。その結果、モノマー供給系であるPhaABの活性レベルがPHA生産性に与える影響は低く、PhaC活性がPHA生産性の律速となる因子であることが示唆された。PhaCの活性レベルと生産量は正の相関を、PhaCの活性レベルと分子量は負の相関を示した。

Ultra-high-molecular-weight PHA production and activities of its biosynthesis enzymes

○Ayaka Hiroe¹, Kenji Tsuge², Mitsuhide Itaya², Takeharu Tsuge¹
 (¹Sci. Eng., Titech,²Keio Univ.)

Key words Polyhydroxyalkanoate, phaABC, Enzyme activity

2Ap22 *Aeromonas caviae*由来ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子の変異解析

○渡辺 世利子, 一宮 洋介, 柘植 丈治
 (東工大院総理工)
 watanabe.y.av@m.titech.ac.jp

【緒言】

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の一種に3-ヒドロキシブタン酸(3HB)と3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)の共重合体がある。この共重合体は一般的なPHAであるP(3HB)とは異なり柔軟な性質を示し、3HHx分率の増加に伴い柔軟性が向上する。土壌細菌*Aeromonas caviae*は上記共重合体の合成能を有しており、*A. caviae*よりクローニングされたPHA合成系遺伝子群(*phaPCJ_{Ac}*)を導入した組換え*Escherichia coli*においても上記共重合体の合成が可能である。先行研究によってPHAの物性改善を目指したPHA重合酵素(PhaC_{Ac})への変異導入が様々行われ、野生型とは異なる性質を示す改変型酵素が取得されてきた。

【目的】

先行研究で改変型PhaC_{Ac}を作製する際、PhaC_{Ac}の変異効果以上に、3HHx分率およびPHA収量が顕著に向上する組換え大腸菌が取得された。そこで本研究では、この大腸菌からプラスミドを単離し、*A. caviae*由来PHA合成遺伝子群の変異点を特定するとともに、その変異効果を検証することを目的とした。

【方法と結果】

塩基配列を解析した結果、PhaC_{Ac}以外にも、PHAグラニュール結合性タンパク質(PhaP_{Ac})に変異があることがわかった。そこで、それぞれの変異点を分離して変異効果を検証した結果、PhaP_{Ac}への単独変異でもPHA収量およびPHA中の3HHx分率を共に増加させることを確認した。これらの知見は、PHAの生産性向上およびモノマー組成制御において極めて有用である。

Mutation analysis of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Aeromonas caviae*

○Yoriko WATANABE, Yosuke ICHINOMIYA, Takeharu TSUGE
 (Dept. Innov. Eng. Mat., TOKYO Inst. Technol.)

Key words polyhydroxyalkanoate, monomer composition, *Aeromonas caviae*