

2Bp06 メタノールを原料とした共重合ポリヒドロキシアルカン酸生成のための代謝改変

○折田 和泉, 西川 浩太, 中村 聡, 福居 俊昭
(東工大院・生命理工・生物プロセス)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物が菌体内に蓄積するポリエステルであり、生分解性プラスチックとしての実用化が期待されている。*Methylobacterium extorquens* AM1 は代表的なメチロトロフであり、メタノールを単一炭素源として、最も一般的な PHA であるポリ (3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] ホモポリマーを生成する。しかし、P(3HB) は固くて脆い性質を有することから物性の向上が必要である。また、本菌の P(3HB) 蓄積率は *Ralstonia eutropha* などの PHA 生産菌と比較して著しく低い。そこで本研究では、メタノールを原料にして物性が改善された共重合 PHA を高効率生産する菌株の構築を目的として、本菌の代謝改変を行った。
【方法と結果】PHA 合成酵素遺伝子を広基質特異性酵素をコードする外来遺伝子に置換した組換え株 (AMIC_{Ac} 株) は、第二モノマーユニットとして 3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HHx) を低分率ながら含む共重合 PHA をメタノールから生成し、かつ野生株に比べて PHA 蓄積率が向上していた。PHA 蓄積率のさらなる向上を目的として、本菌がコードする 3 つの PHA 分解酵素遺伝子を単独、二重、三重で破壊したところ、予想に反していずれの破壊株についても PHA 蓄積率に変化は認められなかった。また、3HHx 分率の向上のために、3HHx-CoA 生成に関わると推定される酵素遺伝子を発現した株を作製した結果、AMIC_{Ac} 株と比較してメタノールでの生育速度は低下したものの 3-ヒドロキシヘキサン酸分率が 1.5 倍程度向上した株を取得した。

Metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymer from methanol

○Izumi Orita, Kouta Nishikawa, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Technol.)

Key words biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, methylothrop, *Methylobacterium extorquens*

2Bp08 ポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* のメタボローム解析

○福居 俊昭¹, 長 健太¹, 原田 和生², 中山 泰宗³, 折田 和泉¹,
馬場 健史³, 中村 聡¹, 福崎 英一郎³
(¹ 東工大院・生命理工・生物プロセス, ² 阪大院・薬, ³ 阪大院・工・生命先端)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】バイオマスを原料として微生物が生成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、生分解性の環境低負荷型プラスチック素材として有望である。一方で、物性の優れた PHA 共重合体の効率的な生成や組成制御を行うためには PHA 生成を含めた代謝の全体像を把握することが必要と考えられる。本研究では PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* のメタボローム解析を行った。

【方法および結果】フルクトースまたはオクタン酸を炭素源として培養した *R. eutropha* H16 株 (野生株) の菌体から代謝物を抽出し、キャピラリー電気泳動 - 3 連四重極質量分析装置を用いた Multiple Reactions Monitoring 法により代謝物の分離・同定および定量を行った。その際には ¹³C-標識代謝物抽出液を内部標準とした相対定量によって、培養条件による変化を評価した。その結果、菌体フェーズ (増殖期、PHA 蓄積期、定常期) や炭素源 (フルクトース、オクタン酸) に依存した代謝物濃度の変化を見出した。興味深いことに、フルクトースを炭素源とした菌体においても中長鎖ヒドロキシアルカン酸ユニットの前駆体となる炭素鎖長 6~8 の脂肪酸β-酸化中間体が検出された。また、実サンプルではイオン化抑制による定量値変動を考慮しなければならないものの、各代謝物フラグメントのシグナル強度から増殖期や PHA 蓄積期の *R. eutropha* 菌体内において蓄積される代謝物プールを推定した。

Metabolomic analysis of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha*

○Toshiaki Fukui¹, Kenta Chou¹, Kazuo Harada², Yasumune Nakayama³,
Izumi Orita¹, Takeshi Bamba³, Satoshi Nakamura¹, Eiichiro Fukusaki³
(¹Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Technol., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ³Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

Key words biodegradable plastic, biomass, polyhydroxyalkanoate, metabolomics

2Bp07 補充経路改変による *Ralstonia eutropha* ポリヒドロキシアルカン酸生成能への影響

○清水 理恵, 折田 和泉, 中村 聡, 福居 俊昭
(東工大院・生命理工・生物プロセス)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】微生物がエネルギー貯蔵物質として生成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は生分解性バイオマスプラスチックとしての利用が期待されている。水素細菌 *Ralstonia eutropha* は炭素源から生成したアセチル-CoA を前駆体として、代表的 PHA であるポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)] を効率的に生成することで知られている。本研究では *R. eutropha* におけるアセチル-CoA から P(3HB) 生成へのフラックス強化を目的とし、補充経路の改変に着目した。
【方法および結果】 *R. eutropha* 野生株である H16 株のゲノム情報から、補充経路への関与が推定されるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Ppc)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (Pck)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (Pyc) の各遺伝子破壊株を作製し、フルクトースを炭素源とした窒素源制限培地における増殖および P(3HB) 生成について検討した。その結果、*ppc* の破壊によって PHA 蓄積率が約 25% 増加した。一方で *ppc* 破壊株では本培地における増殖速度が顕著に低下していたが、TCA サイクル中間体の有機酸や関連したアミノ酸の添加、およびプラスミドベクターを用いた *ppc* 発現によって増殖能が回復した。興味深いことに、*ppc* 破壊株では、野生株が P(3HB) を生成しない窒素源非制限時においても P(3HB) を高度に蓄積した。これらのことから、フルクトース生育時の *R. eutropha* における補充経路には Ppc が主に機能することが示され、補充経路の遮断による PHA 生産性向上の可能性が示唆された。

Effects of modification of anaplerotic pathway on polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Ralstonia eutropha*

○Rie Shimizu, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Technol.)

Key words biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, anaplerotic pathways, metabolic engineering

2Bp10 ハッサク葉に含まれる傷害誘導性物質の単離と同定

○浅井 智紀¹, 松川 哲也¹, 石原 亨², 梶山 慎一郎¹
(¹近畿大院・生物理工,²鳥取大農・生資環)
tmatsu@waka.kindai.ac.jp

【目的】カンキツ類は果樹として世界的に栽培される商業的価値の高い植物の一つであり、生産性向上のための防御物質に関する研究が行われている。カンキツ類から単離されている防御物質の多くは、収穫後の果実への傷害や病原菌の感染により誘導される物質であり、レモンやグレープフルーツにおいてはスコパロンやスコボレチンが誘導されることが知られている。しかし、果実以外の部位や日本在来種から単離された防御物質に関する報告は少ないのが現状である。そのため、本研究では日本在来種であるハッサクを対象とし、傷害を受けた葉において誘導される物質の検出および同定を試みた。

【方法と結果】 5 mm 角に切断したハッサク葉を蒸留水に浸して 72 時間静置し、傷害処理葉とした。対照として、切断せずに 72 時間静置した葉を用いた。得られた植物材料にメタノールを加えて抽出したものを粗抽出液として HPLC 分析に供した。その結果、傷害処理葉では未処理葉に見られないピークが認められたため、粗抽出液を順相オープンカラムクロマトグラフィーにより 20 画分に分離し、逆相分取 HPLC により誘導ピークを含む画分から化合物を単一のピークになるまで精製した。精製された 2 種の化合物の内、1 つは hesperetin であることが明らかとなり、もう一つは対称構造を持つフェニリクスであることが示唆された。現在、構造解析を詳細に進めており、この結果も併せて報告する。

Isolation and characterization of wound-induced compounds in *Citrus hassaku* leaves

○Tomonori Asai¹, Tetsuya Matsukawa¹, Atsushi Ishihara², Shin'ichirou Kajiyama¹
(¹Grad. Sch. Biol. Sci. Technol., Kinki Univ., ²Sch. Biores. Environ. Sci., Tottori Univ.)

Key words *Citrus hassaku*, leaf, wound, isolation