

21a15 微生物二相培養系に用いる新規培養装置の検討

○滝口 昇^{1,2}, 柴田 優作², 田島 誉久³, 加藤 純一³
 (¹金沢大・理工・自然システム,²金沢大院・自然科学・物質工学,
³広島大院・先端・生命機能)
 ntaki@t.kanazawa-u.ac.jp

【目的】資源・エネルギー面での化学プロセスに対するバイオプロセスの有用性はよく知られているが、有機溶媒と疎水性物質の毒性によりバイオプロセスにおける生産物質の多くは親水性のものに制限されてきた。バイオプロセスによって生産できる物質の領域を疎水性物質にまで拡大するためには、二相培養系が有効であると考えられているが、酸素や基質供給および生産物の抽出のための十分なかくはんと微生物に対する疎水性物質の毒性を抑制するための二相の適切な分離という対立する課題を同時に解決する必要がある。本研究では、多孔性の隔壁を用いた培養装置がこの課題を解決しうるかどうかにあてて検討を行った。

【方法および結果】隔壁は丸孔60°千鳥タイプのパンチングメタル(孔径1mm, 開孔率22.6%)を用い、隔壁の高さを二層の界面に合わせて調節出来るように作製した。1.0Lの水(1-ブタノール飽和)と0.3Lの1-ブタノール(水飽和)を充填した2L培養槽を用いてその分離能と酸素供給について検討したところ、隔壁は酸素供給に影響を及ぼすことなく、二相の過剰な混合を抑制できる可能性が示された。水:1-デカノール二相系において*Pseudomonas putida* T57の増殖に対する影響を検討したところ、隔壁を用いた場合に最終菌体濃度が2倍以上に改善されており、隔壁の効果が示された。

Development of novel cultivation apparatus for two-liquid-phase system

○Noboru Takiguchi^{1,2}, Yusaku Shibata², Takahisa Tajima³, Junichi Kato³
 (¹Sch. Nat. Sys., Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ.,²Div. Material Eng., Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ.,³Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words bioreactor, two-liquid-phase system, *Pseudomonas putida* T57

21p03 低環境負荷型のアセチルグルコサミン生産を目指した *Paenibacillus* 属細菌のイオンビーム変異育種

○大西 浩平¹, 森山 展行², 能登 亜由美², 畑下 昌範³, 高城 啓一³, 木元 久⁴, 末 信一郎¹
 (¹福井大院・工・生応化,²エル・ローズ・HS事業部,³若狭湾エネ研,⁴福井県大院・生物資源)
 suye110@u-fukui.ac.jp

近年、キチンの分解産物であるGlcNAcが様々な生理活性を持つことが明らかとなり、健康機能性食品として注目されている。しかし、キチンは工業的に強酸によりGlcNAcにまで低分子化されおり、中和工程において大量の塩を生じるため、環境への負荷が高く問題となっている。我々はこれまでに低環境負荷型GlcNAc製造技術開発を最終目的として、キチン分解微生物である*Paenibacillus* sp. FPU-7株の変異育種を行ってきた。本研究では微生物発酵によるGlcNAcの製造及びキチン分解活性の向上を目的とし、イオンビーム照射によるキチン分解活性向上株の変異育種を行った。

まず、キチン分解活性向上株取得のため、キチン分解能力を指標としてハローアッセイを行った。その結果、高いキチン分解能を有する変異体を4株取得した。次に、この4株について抗キチナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、野生株と比較し、より多量のキチナーゼを分泌していることが明らかとなった。さらに変異株を用いてカニ殻由来のキチンを分解し、生じた分解物についてHPLCを用いGlcNAcと(GlcNAc)₂の定量を行ったところ、変異株No. 4において野生株と比較し1.7倍のキチン糖化率が確認された。

Eco-friendly acetylglucosamine production in ion beam mutant breed *Paenibacillus* sp.

○Kohei Onishi¹, Noriyuki Moriyama², Ayumi Noto², Masanori Hatashita³, Keiichi Takagi³, Hisashi Kimoto⁴, Shin-ichiro Suye¹
 (¹Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Univ. Fukui,²Division of Health Science ELLE ROSE Co., Ltd.,³Wakasa Wan Energy Res. Center,⁴Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ.)

Key words chitin, GlcNAc, enzyme reaction, ion-beam mutation

21p01 酵母のメタノール代謝制御の分子メカニズムの解明とその応用

○中川 智行
 (岐阜大・応用生物・応用生命)
 t_nakaga@gifu-u.ac.jp

植物バイオマスや温暖化ガスであるCH₄やCO₂から直接合成できるメタノールは、水とCO₂にまで完全酸化される環境負荷の少ないクリーンな炭素源の一つである。つまり、メタノールを出発原料とした高効率な発酵生産系が実現できれば、直接的な「カーボンニュートラルな物質循環システム」への寄与が期待できる。よって、メタノールを利用できるメチロトロフ酵母は、低環境負荷型発酵生産系の構築に向けた極めて重要な鍵微生物であり、本酵母の細胞機能を最大限に有効活用する技術の開発が今後、生物工学分野における大きな柱の一つになるものと考えている。このような背景から、演者らはメチロトロフ酵母の産業利用に向けた分子基盤の構築として、酵母のメタノール代謝の制御メカニズムを詳細に解析し、本酵母の産業応用の可能性を探索した。

I. 細胞内毒性管理と酸素認識に立脚したメタノール代謝制御機構

演者らは、メチロトロフ酵母のメタノール代謝制御の最重要ポイントが、1) 強い毒性を持つ代謝中間体ホルムアルデヒド (FA) の細胞内毒性管理と、2) メタノール酸化酵素 (AOD) と呼吸鎖の酸素消費バランスの調節にあることを示した。これらメタノール代謝制御の分子メカニズムに関する知見は、高メタノール・低酸素下では十分に細胞機能を発揮できないメチロトロフ酵母の分子育種や産業利用に向けた極めて重要な基盤的情報である。

(1) AODアイソザイムとメタノール代謝酵素群の統括的な活性発現による細胞内FA管理

AODアイソザイムは、メタノールおよび酸素に対するK_m・V_{max}が異なる2種のサブユニットから成る9種の分子種で構成される。本アイソザイムは両サブユニットの構成比により分子活性が調節でき、どのような環境でもメタノール酸化を一定にできる優れた細胞内FAレベル制御系であった。また、AODアイソザイムとメタノール代謝酵素群は発現オーダーが協調的に制御され、その発現量もメタノールおよび酸素濃度に応じて決定されていた。また、これら酵素群の細胞内局在を厳密に制御することでその活性発現が調節されていた。このように統括的なメタノール代謝の活性発現制御システムが細胞内FAレベルを巧みに管理し、円滑なメタノール代謝を実現していることを示した。

(2) 細胞内酸素消費バランスの制御によるメタノール代謝制御

メタノール代謝では呼吸鎖が酸素センサーとして機能し、呼吸鎖活性に応じてAODアイソザイムの活性発現を制御することで細胞内酸素消費バランスを整え、適切な酸素代謝を行っていた。これは、ミトコンドリアが自身の活性状態に応じて代謝上流のAODの酸素消費を、核を介して制御する巧妙なメタノール代謝制御機構である。また、呼吸鎖因子シトクロムcの発現もAOD活性が関与しており、両者は互いに代謝状態を確認しあい、メタノール代謝の酸素消費バランスを巧みに制御していることを示した。

II. メチロトロフ酵母の物質生産系への応用

演者らは2つのAODアイソザイムプロモーターを活用し、生産量と発現時期を炭素源により制御できる新規タンパク質生産系を開発した。また、転写因子Mig1がAODのグルコース抑制を制御することを示し、その知見を応用したグルコース抑制解除型タンパク質生産系も構築し、メチロトロフ酵母の新たな産業利用の可能性を示した。

以上、本研究はメチロトロフ酵母のメタノール代謝制御機構を分子・細胞レベルで明確にし、本酵母の新たな活用と現在まで成しえなかった「スーパーメチロトロフ酵母」の分子育種への道を切り拓いた。これら基盤的研究は低環境負荷型発酵生産系の実現など、生物工学分野の進展に貢献するものである。

Regulation of methanol metabolism in the methylotrophic yeast and its application

○Tomoyuki Nakagawa
 (Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

Key words methylotrophic yeast, methanol metabolism, alcohol oxidase isozyme, metabolic regulation