

2S-Cp02 深海由来酵母が生産する糖脂質の分子デザイン○小西 正明^{1,2}¹北見工大, ²海洋研究開発機構)

konishim@mail.kitami-it.ac.jp

【背景と目的】発表者は、これまで深海由来の環境サンプルから有用微生物を探索してきた。微生物由来界面活性物質（バイオサーファクタント、BS）の生産菌を探索したところ、新規構造を有している糖脂質を生産するバクテリアの分離 (unpublished data) や糖脂質型のバイオサーファクタントとして知られるマンノシルエリスリトールリピッド (MEL) を効率的に分泌生産できる *Pseudozyma hubeiensis* SY62 株を分離することができている (Konishi et al. JBB 2010 & JBB 2012)。MEL は β -D-mannopyranosyl-meso-erythritol 構造を中心にマンノースの水酸基へ、アセチル基や脂肪酸がエステル結合した構造を有している。一部の MEL 同属体は優れた界面活性能だけでなく、生理活性、免疫賦活活性などを有することが報告されている。しかし、MEL の分子構造は生産菌の代謝酵素の特異性への依存割合が大きく、代謝生産能力の高い株を獲得しても、生産物の分子構造を自由に設計し、効率的かつ選択的な生産をすることが難しかった。解決策として、代謝酵素を遺伝的に操作して、中間体の選択的生産や代謝酵素への変異の導入による代謝制御が挙げられるが、研究例の少ない *Pseudozyma* 属真菌の特定の遺伝子クローニングは大変な手間を要した。研究例の少ない微生物においても、近年の大量シーケンシング技術の発展により、ドラフトゲノム解析と PCR により、簡便に遺伝子クローニングが可能となった。そこで、ドラフトゲノム解析を活用し、*P. hubeiensis* SY62 株の MEL 代謝遺伝子をクローニングし、遺伝子破壊や変異導入などによる代謝工学的的手法による MEL 分子構造のデザイン技術の確立し、新規構造の MEL 同属体の合成やそれらの新機能探索を目論んでいる。【結果と考察】Illumina 社 HiSeq を用いた 5Gb スケールのペアエンドシーケンシングを行いアセンブルした結果、72 個の contig が得られ、18.44 Mb の配列データを取得した。すでに MEL 合成代謝遺伝子が同定されている *Ustilago maydis* 521 株の配列を利用して、アミノ酸相同性の高い遺伝子クラスターを同定した。これらの遺伝子は PCR 反応で容易に増幅することができ、クローニングが可能であった。クローニングした DNA を用いて、SY62 株の MEL 合成代謝遺伝子の破壊による中間体の合成や変異導入について検討を進めている。

Molecular design of microbial glycolipid produced by deep-sea yeast○Masaaki Konishi^{1,2}¹Kitami Inst. Technol., ²JAMSTEC)**Key words** glycolipid, deep-sea, *Pseudozyma*, biosurfactant**2S-Cp03 耐熱性亜リン酸デヒドロゲナーゼの発見とその利用**

○廣田 隆一, 黒田 章夫

(広島大院・先端物質)

hirota@hiroshima-u.ac.jp

リンは -3 から +5 価までの酸化数をとることが可能であり、様々な酸化状態で存在する。現在の酸化的な地球環境では、多くのリンは最も酸化された状態のリン酸 (H_3PO_4 , +5 価) あるいはそのエステル化合物として存在する。そのため、生物が利用するリンはリン酸であるとの認識が一般である。ところが、バクテリアには次亜リン酸 (H_2PO_3 , +1 価) や亜リン酸 (H_2PO_3 , +3 価) などの還元型のリン酸を利用するものが存在し、さらには亜リン酸の酸化によって得られるエネルギーを利用して独立栄養的に増殖するものも発見されている。このような還元型リン酸の微生物代謝は、これまでほとんど注目されていなかったが、近年関連研究の報告が増加しており、またリン資源の有効利用という観点からも非常に興味深いものである。

演者らは、リンの生物循環における未知経路の解明と、還元型リン酸の酸化酵素として発見された亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) の工学的利用という観点から還元型リン酸の微生物代謝を研究している。PtxD による亜リン酸の酸化は、エネルギー的に非常に進行しやすく ($\Delta G^\circ = -63.3 \text{ kJ/mol}$)、ほぼ不可逆的に NADH 生成に反応が偏っている。この反応は、強力な補酵素再生反応として NAD(P)H 依存型酵素反応を用いた物質生産に利用できるほか、リン資源の有効利用に貢献するバイオ技術に利用できる可能性がある。しかしながら、これまでに報告されていた *Pseudomonas stutzeri* 由来の PtxD (PsPtxD) は安定性が悪く、工学的利用に適さなかった。そこで我々は、PtxD を有する好熱性亜リン酸酸化細菌の単離を試み、45°C で旺盛に増殖する *Ralstonia* sp. 4506 株を単離した。本講演では、4506 株由来の耐熱性 PtxD (RsPtxD) の単離と、NAD(P)H 再生酵素としての利用、そして PtxD を選択マーカーとした微生物の選択的培養技術など、還元型リン酸を利用する事で新たに開けるバイオテクノロジーの可能性について紹介したい。

(1) *Ralstonia* sp. 4506 株の単離と RsPtxD の取得

様々な環境試料を対象として亜リン酸を唯一のリン源とした MOPS-グルコース合成培地で集積培養を行い、45°C で増殖する亜リン酸酸化細菌 *Ralstonia* sp. 4506 株を単離した。4506 株が有する RsPtxD は、PsPtxD に比べて 45°C では約 3,450 倍の熱安定性を示し、触媒効率 (V_m/K_m) は 6.7 倍であった。また、反応阻害物質の影響を受けにくく大腸菌での可溶性発現レベルが高いなど、工学的利用に適した数々の利点を有していることが明らかとなった。さらに NAD 結合領域への変異導入によって NADP に対する基質特異性を高め、NADPH 再生酵素としても開発することに成功している。

(2) PtxD を利用した微生物の選択的培養技術開発への試み

リンは全ての生物の必須元素であるが、ほとんどの生物は亜リン酸をリン源として利用する事が出来ない。そのため栄養源のリン源を亜リン酸に置換した生育条件では、PtxD を持つ生物のみを選択的に増殖させることができる。これはある意味当然のことではあるが、革新的なバイオ技術として利用できる可能性がある。例えば、これを微生物に適用すれば、抗生物質を利用せずさらには滅菌を簡易化することができ、コストやエネルギー投入量を抑えた培養が可能になる。また、亜リン酸は産業廃棄物として多量に廃棄されていることから、リン資源の有効利用にも貢献できる可能性がある。本講演では、バクテリア、酵母などの例を挙げてこれらの取り組みについて併せて紹介する。

Discovery, characterization and application of a thermostable phosphite dehydrogenase

○Ryuichi Hirota, Akio Kuroda

(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words phosphite, phosphite dehydrogenase, cofactor regeneration