

3P-159 枯草菌フィターゼ分泌の高度効率化

○辻 祥吾, 田中 耕生, 竹中 慎治, 吉田 健一
(神戸大院・農)
kenyoshi@kobe-u.ac.jp

フィチンは穀類や豆類の主要なリン酸の貯蔵形態として米ヌカ等に多く含まれ、フィターゼにより脱リン酸化され、完全に脱リン酸化されるとミオイノシトールとなる。ミオイノシトールそれ自体ビタミンに準ずる利用価値があり、またアルツハイマー病治療薬として期待されるシロイノシトールの原料ともなる。我々は、未利用バイオマスである米ヌカ中のフィチンをミオイノシトールへと変換するために活用するフィターゼを、枯草菌を用いて高効率に分泌生産させる技術の開発を目指した。枯草菌 168 株は元来フィターゼ活性を示さない。一方その類縁菌である納豆菌はフィターゼ活性を有することが知られている。そこで、枯草菌に納豆菌由来のフィターゼ遺伝子を導入したが、その N 末領域には枯草菌由来の 173 種の分泌シグナル配列をランダムに融合してライブラリー化した後、フィチンを含む寒天プレートにコロニーを形成させ、コロニー周囲のフィチンが分解されて現れるハローの大小によって分泌フィターゼの量を評価するスクリーニングの方法論を立ち上げた。高いフィターゼ活性を与える選抜株の分泌シグナル配列は、特定のものに収斂する傾向が明らかなため、フィターゼ分泌効率の分子育種的最適化が達成された。このようにして、選抜されたフィターゼ活性の強い株を液体培養し、その培養上清をゲル電気泳動ならびに免疫学的解析に供したところ、分子量約 40 kDa のフィターゼが検出された。一般に酵素分泌量は培養条件の調整によって増加させることが可能であり、現在はその検討を進めている。

Optimizing secretion of phytase from *Bacillus subtilis*

○Shogo Tsuji, Kosei Tanaka, Shinji Takenaka, Yoshida Kenichi
(Dept. Agrobiosci., Kobe Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, phytin, phytase, secretion

3P-161 βグルコシダーゼ提示大腸菌を用いたプトレシン生産経路の構築

○池田 直樹, 宮本 菜里, 田中 勉, 近藤 昭彦
(神戸大院・工・応化)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

化合物生産を行うため様々な生物から取得したタンパク質、酵素を組み合わせる新たな生合成経路を考案、構築することに関心が向けられており、プトレシンはその目的化合物の 1 つである。プトレシンは特に石油由来原料を用いたナイロンの代替原料として期待されている。そこで本研究ではグルコースの前駆体であるセロビオースからのプトレシン生産に取り組んだ。大腸菌 JCM20137 株に β グルコシダーゼ (BGL) を表層提示することで、大腸菌自身にセロビオースを分解させグルコースへの糖化を可能とした。表層提示とは膜に局在する性質を持つアンカータンパクと目的の働きをするターゲットタンパク (BGL) を融合発現させることで膜表面にターゲットタンパクを提示する技術である。この BGL を表層提示した大腸菌に、プトレシン生産能を向上させるためプトレシンの前駆体であるオルニチンを脱炭酸する酵素オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) を過剰発現させた。アンカータンパクをコードする遺伝子に大腸菌由来の *blc*、BGL をコードする遺伝子に *Thermobifida fusca* YX 由来の *Tfu0937*、ODC をコードする遺伝子に大腸菌由来の *speC* を用いたベクター pHLA-*speC*-*blc*-*Tfu0937* を構築した。構築ベクターを大腸菌 JCM20137 株に導入し、セロビオース資化能を持ったプトレシン生産菌株 JCM20137 pHLA-*speC*-*blc*-*Tfu0937* を創製した。そしてセロビオース 20 g/l を炭素源としてプトレシン生産検討を行った。BGL を提示していない株では菌体増殖は見られなかったが、JCM20137 pHLA-*speC*-*blc*-*Tfu0937* では菌体増殖が見られ、またプトレシン 0.08 mM の生産に成功した。

Direct putrescine production from cellobiose using *Escherichia coli* displaying beta-glucosidase

○Naoki Ikeda, Mari Miyamoto, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo
(Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words *Escherichia coli*, putrescine, beta-glucosidase

3P-160 シトクロム P450 発現大腸菌の増殖と酵素活性に及ぼす培養条件の影響

○森中 涼平¹, 山地 秀樹¹, 今石 浩正²
(¹神戸大院・工・応化, ²神戸大・遺伝子実験セ)
yamaji@kobe-u.ac.jp

シトクロム P450 (CYP) は微生物から植物、動物まで生物界に広く存在する一群のヘムタンパク質で、多様な薬物代謝や異物代謝の中心的役割を担うことが知られている。CYP は種々の基質に対して位置・立体選択性の高い酸化反応を触媒するため、有機合成が困難な有用物質の生産への応用が期待されている。CYP の活性発現には、電子伝達タンパク質、NADPH などの補酵素、および脂質膜環境が必要である。本研究ではヒト CYP1A2 および NADPH-シトクロム P450 レダクターゼを共発現する組換え大腸菌を組成の異なる培地や温度で培養し、培養後の菌体を whole cell biocatalyst として用いる酵素反応を行い、培養条件が菌体増殖や酵素活性に及ぼす影響を検討した。まず、LB 培地、2 × YT 培地、TB 培地、グリセロールを添加した LB 培地、および緩衝能を付与した 2 × YT 培地を用いて増殖挙動および酵素活性を比較した結果、TB 培地およびグリセロールを添加した LB 培地を用いた場合に CYP の比活性は顕著に高くなり、到達菌体濃度は TB 培地で最大となることがわかった。次に、グリセロール濃度を変えた TB 培地を比較したところ、グリセロール濃度が 1.2% の場合に酵素活性はもっとも大きくなった。グリセロール濃度が 1.2% の TB 培地を用いて培養温度を検討した結果、30℃ で培養した場合に酵素活性が最大となることがわかった。

Effects of culture conditions on growth and cytochrome P450 expression of *Escherichia coli*

○Ryohei Morinaka¹, Hideki Yamaji¹, Hiromasa Imaishi²
(¹Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Res. Ctr. Environ. Genomics, Kobe Univ.)

Key words cytochrome P450, *Escherichia coli*, whole cell biocatalyst, bioconversion

3P-162 Construction of a shortcut lactate production pathway by synthetic metabolic engineering

○Qianqin Zhu¹, Kenji Okano¹, Kohsuke Honda^{1,2}, Hisao Ohtake¹
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²PRESTO, JST)
hohtake@bio.eng.osaka-u.ac.jp

As a novel technology for flexible design of a bespoke metabolic pathway, we have proposed a concept termed synthetic metabolic engineering (SME). Use of mesophiles producing thermophilic enzymes at high temperature results in denaturation of indigenous proteins and elimination of undesired side reactions; consequently, highly selective and stable biocatalytic modules can be readily prepared. By rational combination of those enzymatic modules, a stoichiometric lactate production via a chimeric Embden-Meyerhof pathway coupled with the malate/lactate dehydrogenase has been demonstrated. To adapt SME to a practical application, elimination of used amount of biocatalytic modules is an important challenge. In this study, we newly designed a shortcut lactate production pathway via non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway coupled with lactate dehydrogenase (LDH) and demonstrate lactate production by using only eight enzymatic modules.

The eight *Escherichia coli* strains harboring either one of the seven glycolytic enzymes and LDH from thermophilic bacteria or archaea were constructed. After heat treatment of the recombinant cells, enzymatic activity, heat stability, and affinity to substrate and co-factor of each biocatalytic modules were evaluated. Lactate production by rational combination of the eight enzymatic modules is now under consideration.

Construction of a shortcut lactate production pathway by synthetic metabolic engineering

○Qianqin Zhu¹, Kenji Okano¹, Kohsuke Honda^{1,2}, Hisao Ohtake¹
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²PRESTO, JST)

Key words synthetic metabolic engineering, thermostable enzyme