

1P-204 Aspergillus niger E-1 株におけるキシラン分解酵素の解析

○井上 琴美, 高橋 結, 村上 周一郎
(明治大・農・農化)
smura@isc.meiji.ac.jp

【目的】これまでの研究で、ハイロジェントルキツネザルの糞より分離した *Aspergillus niger* E-1 株では、7 種の xylanase 遺伝子の存在が明らかとなっているが、xylosidase 遺伝子についてその詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、本菌における xylosidase 遺伝子の存在とその発現について解析し、比較のために xylanase 遺伝子の発現についても調べた。

【方法】*A. niger* CBS513.88 株の推定 xylosidase 遺伝子の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用い、PCR 法により目的 xylosidase 遺伝子を増幅し、シーケンス解析した。次に、0.5% xylan を炭素源とする培地 (pH 5.5) で、2~5 日間の培養で得られた菌糸体から mRNA を調製し、RT-PCR を行った。

【結果】本菌には、推定 xylosidase 遺伝子は 6 つ存在していた。そのうち、alpha-xylosidase 遺伝子については *xlsA*、他の 5 つの beta-xylosidase 遺伝子については、遺伝子サイズの小さい順に *xlsF*~*V* と命名した。2~5 日間の培養において、培養経過に伴って beta-xylosidase 活性は上昇し、xylanase 活性の発現とは異なる挙動を示した。推定される全コーディング領域を増幅できるプライマーを用いた RT-PCR において、6 つの xylosidase 遺伝子の発現を確認することができなかった。しかし、増幅するサイズを小さくしたところ、*xlsA* については、培養 2~5 日間において発現が確認された。また、*xlsIV* は、培養 2、3 日目のサンプルにのみ発現が確認され、*xlsV* においては、培養 2~5 日の間にわずかに発現が確認された。*xlsI*~*III* は、いずれの条件においても発現を確認することができなかった。一方 xylanase 遺伝子は、いずれの時期においても 4 つの遺伝子の発現が確認された。

Study on xylan-degrading enzymes from *Aspergillus niger* E-1

○Kotomi Inoue, Yui Talahashi, Shuichi Murakami
(Fac. Agriculture, Meiji Univ.)

Key words *Aspergillus niger*, xylosidase, xylanase

1P-206 CO₂ から共重合 PHA を合成する水素酸化細菌組換え株の育種

○藏富 友博¹, 平尾 峻¹, 松崎 弘美², 外村 彩夏², 田中 賢二¹
(¹近大・産理工・生物環境化学, ²熊本県大・環境共生)
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【目的】3- ヒドロキシ酪酸のホモポリエステルである PHB は生分解性プラスチック素材として知られているが、他のヒドロキシアルカン酸を含む共重合ポリエステル PHA のほうが物性は優れている。我々は、水素酸化細菌の遺伝子組換えにより、CO₂ から共重合 PHA を合成する微生物の創出を目指している。【方法・結果】*Ralstonia eutropha* H16 の野生株と PHB 合成能欠損変異株、および当研究室で独自に分離した *Ideonella* sp.Onga に、*Pseudomonas* sp.61-3 株の PHA 重合酵素の遺伝子 (*phaC1*) と 3HA-CoA を供給する酵素 3- ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼの遺伝子 (*phaG*) を大腸菌の *lac* プロモーター下流に挿入したプラスミド pRKmKSc-C1G や、これに *R.eutropha* H16 (野生株) の 3HB 供給酵素遺伝子 *phbAB* を挿入した pRKmKSc-C1GAB をそれぞれ導入した。これら組換え株について、H₂ と CO₂ を基質とする化学合成独立栄養条件下での増殖とポリエステル蓄積率、ポリエステルのモノマー組成等を比較した。

Breeding of hydrogen-oxidizing bacteria for Biosynthesis of PHA from CO₂

○Tomohiro Kuratomi¹, Ryo Hirao¹, Hiromi Matsusaki², Ayaka Hokamura², Kenji Tanaka¹
(¹Dept. Biol. Environ. Chem., Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., ²Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words *Ralstonia eutropha*, polyhydroxyalkanoate, hydrogen-oxidizing bacteria

1P-205 キシロース資化性 *Enterobacter* 属細菌の遺伝子組換えによる PHA 生合成

○松本 活樹¹, 南部 友香¹, 松崎 弘美², 田中 賢二¹
(¹近大・産理工・生物環境化学, ²熊本県大・環境共生)
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【目的】我々は、リグノセルロースの主要構成単糖であるキシロース資化能に優れた *Enterobacter* 属細菌 (*Enterobacter* sp.TF) を分離しており、この菌を用いてキシロースから生分解性プラスチック素材としてよく知られるポリヒドロキシ酪酸 (PHB) や、より柔軟性に優れた共重合 PHA を効率よく合成する遺伝子組換え株の創出を目指している。

【方法・結果】*Enterobacter* sp.TF は、キシロースのほか多様な種類の単糖を資化し、無機塩キシロース培地での比増殖速度が 0.7h⁻¹ を超えるが、PHB を合成蓄積しない。この菌に *Pseudomonas* sp. 61-3 株の PHA 重合酵素の遺伝子 (*phaC1*) と 3HA-CoA を供給する酵素 3- ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼの遺伝子 (*phaG*) を大腸菌の *lac* プロモーター下流に挿入したプラスミド pRKmKSc-C1G や、これに *R.eutropha* H16 (野生株) の 3HB 供給酵素遺伝子 *phbAB* を挿入した pRKmKSc-C1GAB を導入した。得られた組換え株はポリエステルを蓄積したがその蓄積率は低く、構成モノマーのほとんどは 3- ヒドロキシ酪酸であった。現在、菌体外代謝産物や PHA 生合成系酵素の活性について検証している。

Biosynthesis of PHA from xylose by recombinant *Enterobacter* sp.TF

○Katsuki Matsumoto¹, Yuka Nanbu¹, Hiromi Matsusaki², Kenji Tanaka¹
(¹Dept. Biol. Environ. Chem., Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., ²Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words xylose, *Enterobacter*, polyhydroxyalkanoate

1P-207 糖質からの C₆ ユニット含有共重合ポリエステル生合成に向けた *Ralstonia eutropha* の代謝改変

インソムファン チャヤティップ, 謝 歆, 御船 淳, 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】柔軟性に優れたポリ ((R)-3- ヒドロキシブタン酸 -co-(R)-3- ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-co-3HHx)] の微生物生産には植物油または脂肪酸が炭素源として利用されている。一方で、重要なバイオマスである糖質を原料とした P(3HB-co-3HHx) の生合成はバイオプラスチック生産の多様性、C₆ ユニット生成のための代謝工学の観点から興味深い。本研究では PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* の代謝改変によるフルクトースからの P(3HB-co-3HHx) 生合成について検討した。

【方法および結果】我々は以前に放線菌由来クロトニル-CoA カルボキシラーゼ / レダクターゼ (Ccr) を導入した組換え *R. eutropha* において、Ccr によって生じたブチリル-CoA とアセチル-CoA との縮合を介して C₆ ユニットが生成することを見出したが、その効率は低かった。詳細な検討を加えた結果、主要アセトアセチル-CoA レダクターゼ遺伝子 *phaB1* の破壊と *Aeromonas caviae* 由来 PHA シンターゼ変異酵素遺伝子 *phaC_{NSDG}* の染色体挿入を行った *R. eutropha* 株を宿主とし、メチロトロフ *Methylobacterium extorquens* 由来 *ccr*, *R. eutropha* 由来広基質特異性 (R)- エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子 *phaJ4a*, マウス由来エチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼの合成遺伝子を高発現させた組換え株により、0.5% フルクトースを炭素源とした培養で乾燥菌体重量あたり 48wt% の P(3HB-co-22.2mol% 3HHx) の生合成を達成した。

Metabolic Engineering of *Ralstonia eutropha* for Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers containing C₆-unit from unrelated fructose

Chayatip Insomphun, Huan Xie, Jun Mifune, Izumi Orita, Satoshi Nakamura,
○Toshiaki Fukui
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, metabolic engineering, biodegradable plastic