

### 1P-236 通性独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* の従属栄養ポリヒドロキシアルカン酸合成条件における炭酸固定代謝のメタボローム解析

○清水 理恵<sup>1</sup>, 傳寶 雄大<sup>2</sup>, 中山 泰宗<sup>2</sup>, 折田 和泉<sup>1</sup>, 馬場 健史<sup>2</sup>, 中村 聡<sup>1</sup>, 福崎 英一郎<sup>2</sup>, 福居 俊昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大院・生命理工・生物プロセス, <sup>2</sup>阪大院・工・生命先端・生工)  
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】水素細菌 *Ralstonia eutropha* H16 株は独立栄養条件、従属栄養条件の双方において高いポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] 合成能を示す。本株の炭酸固定経路であるカルビンサイクル酵素遺伝子群は糖質を炭素源とした P(3HB) 合成条件下で強く転写されることを見出し、本研究では従属栄養 P(3HB) 合成条件下でのカルビンサイクルの機能解析を行った。

【方法および結果】*R. eutropha* グルコース資化改変株 H16G 株、およびそのカルビンサイクル遺伝子オペロン転写活性化因子 *cbbR* を破壊した H16G Δ*cbbR* 株を 1-<sup>13</sup>C-グルコースを炭素源として培養し、蓄積 P(3HB) を分析したところ、H16G Δ*cbbR* 株では <sup>13</sup>C 存在比が 2.2% であったのに対し、H16G 株では 5.5% を示した。メタボローム解析により各種代謝物への 1-<sup>13</sup>C-グルコース由来 <sup>13</sup>C の取り込みを測定したところ、H16G Δ*cbbR* 株ではリブrosis 1,5-ビスリン酸 (RuBP) が検出されなかったのに対し H16G 株では RuBP が検出され、かつ 3-ホスホグリセリン酸を含む多くの代謝物で H16G Δ*cbbR* 株より高い <sup>13</sup>C 取り込み率を示した。すなわち、*R. eutropha* H16G 株ではグルコースに由来するピルビン酸の酸化脱炭酸で生じた CO<sub>2</sub> を固定し再利用していることを見出した。

### Metabolomic analysis of CO<sub>2</sub> fixation during heterotrophic polyhydroxyalkanoate biosynthesis by facultative autotrophic bacterium *Ralstonia eutropha*

○Rie Shimizu<sup>1</sup>, Yudai Dempo<sup>2</sup>, Yasumune Nakayama<sup>2</sup>, Izumi Orita<sup>1</sup>, Takeshi Bamba<sup>2</sup>, Satoshi Nakamura<sup>1</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>2</sup>, Toshiaki Fukui<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, <sup>2</sup>Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *Ralstonia eutropha*, polyhydroxyalkanoate, CO<sub>2</sub> fixation, Calvin cycle

### 1P-238 ナノファイバー蛋白質 AtaA による微生物接着の制御

○吉本 将悟, 中谷 肇, 堀 克敏  
(名大院・工・生物機能)  
khorin@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景】生体触媒を効率的に利用するには、生体触媒を反応容器内で長時間保持したり、生産物との分離を容易にしたりするために担体に固定化する必要がある。アシネトバクテラ属細菌 Tol 5 株は細胞表面に存在するナノファイバー蛋白質 AtaA を介し、バイオフィルムの形成に依存せず様々な材質表面に対して迅速かつ高い接着性を示す。また、有用な微生物に AtaA を生やすことで接着性を付与し、担体に微生物を直接固定化することができる。本研究では AtaA の接着特性に基づいて、AtaA を生やした微生物の接着と固定化の制御について検討した。

【方法】精製した AtaA を異なる濃度の塩化カリウム溶液に懸濁し、ポリスチレンおよびガラス製プレートに加え 2 時間静置後、接着した AtaA を ELISA より定量した。微生物の接着性に関しては、AtaA を発現させたアシネトバクテラ属細菌 ADP1 株を、異なる濃度の塩化カリウム溶液に懸濁後プレート上で 2 時間静置し、接着した微生物をクリスタルバイオレット染色により定量した。

【結果】AtaA 分子、AtaA を生やした微生物どちらも塩溶液中では高い接着性を示したが、低塩濃度条件下では接着性が著しく低下し、純水中ではほとんど接着しなかった。また AtaA を介してプレート上に接着した微生物は純水で洗浄することにより剥離でき、剥離した菌体を再度塩化カリウム溶液に懸濁すると接着性を取り戻した。

### Control of bacterial adhesion using a nanofiber protein AtaA

○Shogo Yoshimoto, Hajime Nakatani, Katsutoshi Hori  
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** immobilization, adhesion, immobilized bacteria, *Acinetobacter*

### 1P-237 PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* における 3-ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素の同定と機能解析

○瀬川 睦, 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】*Ralstonia eutropha* H16 は 3-ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素 (3HBCoADH) 活性を有し、アセトアセチル-CoA から P(3HB) のモノマーである (R)-3HB-CoA の生成と競合して (S)-3HB-CoA も生成することが推測されるが、本菌の糖質での生育時における (S)-3HB-CoA 代謝の意義は明らかにされていない。本研究では *R. eutropha* 3HB-CoADH の同定と P(3HB) 合成における機能の解析を行った。

【方法および結果】*R. eutropha* における推定 3HB-CoADH 遺伝子 *paah1* および *paah2* を破壊したところ、*paah1* 破壊株において 3HB-CoADH 活性は約 1/3 に低下した。*paah1* 破壊株から活性を指標に酵素精製を行い、H16\_A0602 を同定した。*paah1* および *h16\_A0602* の二重破壊で 3HB-CoADH 活性は野生株の約 1/7 に低下したことから、*R. eutropha* において両遺伝子の産物が主要な 3HB-CoADH として機能していることが示された。3HB-CoADH 遺伝子破壊株がフルクトースから生合成した P(3HB) の分子量測定を行ったところ、*h16\_A0602* 破壊株において数平均分子量が 2.2 倍に増加していた。この結果から、遺伝子破壊により (S)-3HB-CoA の細胞内濃度が低下することで P(3HB) ポリマー鎖が伸長しやすくなることが示唆された。

### Identification and functional analysis of 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenases from PHA-producing *Ralstonia eutropha*

○Mutsumi Segawa, Rie Shimizu, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui  
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

**Key words** biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase

### 1P-239 キシロースによる *Pseudozyma antarctica* のキシラナーゼ生産の誘導

○渡部 貴志<sup>1</sup>, 佐藤 育男<sup>1</sup>, 篠崎 由紀子<sup>1</sup>, 森田 友岳<sup>2</sup>, 小池 英明<sup>2</sup>, 北本 宏子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農環研, <sup>2</sup>産総研)  
kitamoto@affrc.go.jp

【背景と目的】これまで我々は、葉面酵母 *Pseudozyma antarctica* が産出する生分解性プラスチック分解酵素 PaE (分子量 22 kDa) の生産が、キシロースによって促進されることを見出した。この培養液を SDS-PAGE に供したところ、PaE とは別に、33 kDa の機能未知のタンパク質が大量に生産されていた。文献調査の結果、近縁種である *Pseudozyma hubeiensis* はキシランによって 33 kDa のキシラナーゼが生産誘導されること、またキシロースによってキシラナーゼを生産する微生物の報告例があった。また、*P. antarctica* の培養液にもキシラナーゼ活性があることを確認し、この機能未知のタンパク質はキシラナーゼと推測した。本研究では、PaXyn の遺伝子配列の取得、基礎的な性質調査、および Jar 培養による大量生産を行った。

【方法と結果】まず、キシロースを用いたフラスコ培養で、経時的にキシラナーゼ活性の増加と、33 kDa 付近のバンドの濃度上昇を確認した。次に、このバンドの N 末端アミノ酸配列解析結果を基に、*P. antarctica* T34 株の全ゲノム配列から、キシラナーゼホモログ遺伝子を取得した。培養液から 33 kDa のタンパク質をゲル濾過にて部分精製し、キシラナーゼ活性の基礎的な性質を調べたところ、至適 pH 5.2、至適温度 60°C であり、キシランをモノマーのキシロースまで分解した。さらに、稲刈由来の *P. antarctica* GB-4(0) 株を用いた Jar 培養では、72 時間で 4.5g/l の PaXyn が生産された。本研究の一部は、農林水産産業・食品産業科学研究推進事業で実施した。

### Xylose strongly induces *Pseudozyma antarctica* to produce a xylanase

○Takashi Watanabe<sup>1</sup>, Ikuo Sato<sup>1</sup>, Yukiko Shinozaki<sup>1</sup>, Tomotake Morita<sup>2</sup>, Hideaki Koike<sup>2</sup>, Hiroko K. Kitamoto<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>NIAES, <sup>2</sup>AIST)

**Key words** *Pseudozyma antarctica*, xylanase, xylose, jar fermentor