

2P-081 桂皮酸と桂皮酸類縁体の微生物生産

○小林 祐太, 榊尾 俊介, 高谷 直樹
(筑波大院・生命環境)
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】微生物が生産する多様なフェニルプロパノイドの中でも桂皮酸 (CA) や CA 類縁体は、化成品、香料、医薬品などの原料として幅広く用いられており産業上重要である。そこで、本研究では、*Escherichia coli* を宿主としてグルコースを CA や CA 類縁体へと変換するシステムを開発することを目指した。一般に、CA はフェニルアラニンアンモニリアーゼ (PAL) によりフェニルアラニンを經由して生産される。一方、*Clostridium sporogenes* の *fldABCI* オペロンはフェニル乳酸 (PhLA) を CA に変換することが知られている。そこで、本研究では、*fldABCI* を用いて、CA とその類縁体の発酵生産システムを開発することを目指した。

【結果および考察】フェニルアラニン高生産能をもつ *E. coli* NST37 (DE3) に *fldABCI* を導入して得られた形質転換体を用い、PhLA を基質として休止菌体反応を行った。反応の通気条件を検討したところ、好気条件下で *fldABCI* の発現誘導と休止菌体反応を行った場合には CA の生産は見られなかった。いずれも嫌気条件下で行った場合は、反応液中に最大で 76 mg/L の CA の蓄積がみられた。これは、Fld の活性が酸素に感受性であることと一致する。また、L-PhLA を基質とした場合の CA 生産量は D-PhLA を基質とした場合の CA 生産量の 10 分の 1 以下であり、L 体よりも D 体の PhLA が反応の良い基質となることが示された。さらに、この形質転換体は、D/L-4- ヒドロキシフェニル乳酸や 3- インドール乳酸を対応する CA 類縁体に変換することも可能であった。PAL を利用した従来型の CA 生産系では、数 g/L の効率で CA が生産可能となっているが、本研究で得られた新たな CA 生産系は、これよりも効率の低いものであった。

Production of cinnamic acid and its analogs by engineered *Escherichia coli*

○Yuta Kobayashi, Syunsuke Masuo, Naoki Takaya
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words phenylpropanoid, cinnamic acid, bioconversion

2P-082 遺伝子組換え分裂酵母を用いた D-乳酸の生産

○原 太志¹, 木村 修一郎¹, 東田 英毅²
(¹旭硝子・中研,²旭硝子)
futoshi-hara@agc.com

【背景・目的】D-乳酸は農業、例えば L-2-クロロプロピオン酸など、及び医薬の原体や耐熱性生分解性樹脂の原料としての利用が期待されている。D-乳酸をこれらに用いる際には D 体の骨格が重要なので高い光学純度 (99.5%e.e. 以上) が求められる。高光学純度の D-乳酸の生産には、発酵等のバイオプロセスが知られている。しかしながら回分発酵において、既知の D-乳酸の生産速度は 1.0 ~ 4.0 g/L・h であり、これらは L-乳酸の発酵生産速度 (12.8 g/L・h) の 4 分の 1 以下である。そこで本研究では D-乳酸を、より高い生産速度で発酵生産する事を目的とした。

【方法・結果】高光学純度の D-乳酸を生産する菌株を得るには、(1) D-乳酸のみを生産する微生物を天然から探索する手法、(2) 本来は乳酸を生産しない微生物に D-乳酸の生産能力を付与する手法、等が実施されている。本研究では (2) を選択し、宿主に分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いた。そして遺伝子組換えにより、D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) 遺伝子を導入した *S.pombe* 組換え体を作製した。これらの組換え体を用いて D-乳酸の発酵生産を行った。その結果、*S.pombe* 組換え体は非常に高い発酵速度を示す事が解った。

Production of D-Lactic acid using genetically modified fission yeast

○Futoshi HARA¹, Shuichiro KIMURA¹, Hideki TOHDA²
(¹Res. Center, Asahi Glass Co., Ltd., ²Asahi Glass Co., Ltd.)

Key words D-lactic acid, yeast, fermentation

2P-083 A Novel Lactic Acid Bacterium Enables Thermophilic and Homo-fermentative L-Lactic Acid Production with High Yield from Xylose

Mohamed Ali Abdel-Rahman^{1,2}, ○Jiaming Tan¹, Yukihiro Tashiro¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sakai¹, Kenji Sonomoto^{1,3}
(¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Fac. Sci., Al-Azhar Univ. Egypt., ³Bio-Arch., Kyushu Univ.)
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

L-lactic acid (L-LA) produced from lignocellulose is hampered by several challenges including hetero-fermentation of pentose and the high energy consumption by mesophilic lactic acid bacteria (LAB). In our previous work, thermotolerant *Enterococcus mundtii* QU 25 produced L-LA homo-fermentatively from xylose at 43°C, but did not show homo-fermentation with max. L-LA yield of 0.67 g/g and productivity of 1.13 g/l/h at low xylose titer (≤ 25 g/l) (1). Here, we report a novel LAB showing more thermophilic and homo-fermentative L-LA production with high yield even from low xylose titer. Among 128 strains isolated from Egyptian soils, strain QU 50 produced optically pure L-LA (≥ 99.2%) with high yield from xylose, and was identified as *Enterococcus faecium* based on sugar fermentation pattern and 16S rDNA sequence. The strain produced L-LA from low xylose titer (22 g/l) over a wide range of temperature (30-52°C) and pH (6.0-9.0). The optimal L-LA production was established at 50°C and pH of 6.5 with L-LA yield of 1.04 g/g and productivity of 1.97 g/l/h. Therefore, strain QU 50 should favor non-sterilized fermentation (2) and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose.

(1) AEM, 77:1892-5, 2011
(2) RSC Adv., 3:8437-45, 2013

A Novel Lactic Acid Bacterium Enables Thermophilic and Homo-fermentative L-Lactic Acid Production with High Yield from Xylose

Mohamed Ali Abdel-Rahman^{1,2}, ○Jiaming Tan¹, Yukihiro Tashiro¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sakai¹, Kenji Sonomoto^{1,3}
(¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Fac. Sci., Al-Azhar Univ. Egypt., ³Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words *Enterococcus*, thermophilic, L-lactic acid homo-fermentation, xylose

2P-084 乳酸菌由来 Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase の持つリボシル基転移活性を利用した核酸医薬中間体の酵素合成

○日比 慎¹, 松谷 成裕², 堀之内 伸行², 高橋 里美¹, 小川 順²
(¹京大院・農・産業微生物, ²京大院・農・応用生命)
mhibi@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】核酸医薬は次世代の医薬品として期待されている。その合成原料であるピリミジンヌクレオシド誘導体については効率的合成法が開発されてきている一方で、プリンヌクレオシド誘導体に関しては化学合成が困難である。我々はバイオプロセスを活用するピリミジンヌクレオシド誘導体からのプリンヌクレオシド誘導体への変換法の開発を目的とし、これまでに 2'-O-methyl-uridine (2'-OMe-UR) と adenine から 2'-O-methyl-adenosine (2'-OMe-AR) を生産する酵素として *Lactobacillus buchneri* LBK78 由来の Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (LbNH) を見いだしている。本研究では LbNH の酵素学的諸性質の詳細解析、および 2'-OMe-AR の生産に向けた反応条件検討を実施した。

【方法・結果】大腸菌発現系により LbNH の組み換え酵素を調製し、詳細な特性解析を行った。LbNH は様々なヌクレオシドに対する加水分解活性とリボシル基転移活性を併せ持つユニークな酵素であった。Adenine が反応液中に存在することで LbNH の加水分解反応における触媒反応率が低下するとともに、リボシル基転移反応が顕在化した。すなわち Adenine 高濃度 (1 M) 存在下では、1.5 M の 2'-OMe-UR から最大 7.5 mM の 2'-OMe-AR 生産することが可能であった。

Enzymatic production of nucleic acid drug intermeditates by transribosylation using an Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase from lactic acid bacteria

○Makoto Hibi¹, Narihiro Matsutani², Nobuyuki Horinouchi², Takahashi Satomi¹, Ogawa Jun²
(¹Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words nucleic acid drug, nucleoside hydrolase, transribosylation