

3P-213 細菌由来シトクロム P450 ライブラリーを利用した物質生産への応用

○西岡 大樹, 藤井 匡
(日本マイクロバイオファーマ)
fujii-td@microbiopharm.com

シトクロム P450 は、2つの電子を使って還元的に酸素を活性化し、不活性な炭化水素鎖に水酸基を導入する反応を行うヘムタンパク質である。動植物から微生物まで数多くの生物が保有しているが、中でも、細菌由来シトクロム P450 は、その多くが可溶性タンパク質であることから、産業応用しやすいというメリットを持つ。日本マイクロバイオファーマ株式会社（以下「MBJ」と記す）では、158種類の細菌由来シトクロム P450 について、反応に必要な電子を伝達する *Pseudomonas putida* 由来電子伝達タンパク質（CamAB）を共発現させた大腸菌を作製することで、96穴プレート上で水酸化反応スクリーニングが可能な探索プラットフォームを構築してきた（第一世代 P450 ライブラリー）。加えて、発現ホストとして多剤排出ポンプ *tolC* 遺伝子を破壊した大腸菌を用いることにより、ライブラリー全体の活性を底上げすることに成功している（第二世代 P450 ライブラリー）。さらに現在では、シトクロム P450 の立体構造予測と進化工学的手法による独自の変異体スクリーニングシステムを立ち上げることによって、短期間のうちに高活性かつ高選択性を示す変異体酵素の作製をすることが可能となっている（第三世代 P450 ライブラリー）。上記水酸化反応プラットフォームを用いて創薬候補化合物に水酸基を導入することにより、水溶性や活性の向上、ADME の改善といった効果が期待され、実際に数多くの化合物でその有用性を示してきた。本ポスター発表では、水酸化スクリーニングシステムの概要及びこれまで MBJ で取り組んできた実例をいくつか紹介すると共に、今後の展開についても述べる。

Production of useful compounds using bacterial cytochrome P450 library

○Taiki Nishioka, Tadashi Fujii
(MicroBiopharm Japan Co., Ltd.)

Key words cytochrome P450, hydroxylation, actinomycetes, bioconversion

3P-215 特殊セルロースフィルムを用いた好酸性微生物の単離培養法の開発

○中久喜 真理¹, 石井 里歩¹, 斉藤 諒¹, 村山 晃一², 今泉 卓三², 後藤 直美², 青柳 秀紀¹
(¹筑波大院・生命環境, ²フタムラ化学)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】寒天平板培養法（AP 法）等の従来法で単離培養できる微生物は、自然界に存在する微生物の 1% 前後であり、新たな微生物資源の開拓が求められている。一つの方法として、極限環境からの微生物の分離や利用があるが、従来法が使用困難な場合がある。演者らは、従来法の問題点を排除した特殊セルロースフィルムを用いた新規微生物単離培養法（SCF 法）を開発し、土壌や海水サンプルを対象に検討を実施してきた¹⁾本研究では極限環境の中で酸性環境に着目し、SCF 法を用いた好酸性微生物の単離培養法の開発を試みた。【方法と結果】培地の硬度に基づき AP 法と Gellan gum 平板培養法（GP 法）を評価し、低 pH 条件下での使用範囲を把握した。モデル好酸菌として *Acidocella aminolytica* JCM8796 を用いた。種々の条件（pH1.6～2.5）の培地で *A. aminolytica* を液体培養後、AP 法、GP 法および SCF 法で培養を行った。その結果、AP 法では、pH が 2.0 以下ではコロニー形成が阻害され、pH1.6 以下ではゲルが液状化した。GP 法では、pH3.0 以下でコロニー形成が阻害され、培地硬度も低下した。一方、SCF 法は、両手法でコロニー形成が認められない条件でも、コロニーが形成した。種々の土壌サンプルを用いて、同様に検討した結果、pH 2.0 では、SCF 法でのみコロニー形成が認められ（現在、微生物種を解析中）、酸性環境の微生物の単離培養に有効な事が示された。¹⁾ H 25 生物工学会要旨 p.144.

Development of method for isolation and cultivation of acidophilic microorganisms using specialized cellulose film.

○Mari Nakakuki¹, Riho Ishii¹, Ryo Saitoh¹, Koichi Murayama², Takuzo Imaizumi², Naomi Goto², Hideki Aoyagi¹
(¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Futamura Chemical Co., Ltd.)

Key words acidic environment, *Acidocella aminolytica*, specialized cellulose film, uncultured microbes

3P-214 特殊セルロースフィルムを用いた新規微生物単離培養法の開発（第 4 報）

○斉藤 諒¹, 村山 晃一², 今泉 卓三², 後藤 直美², 青柳 秀紀¹
(¹筑波大院・生命環境, ²フタムラ化学)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】従来の寒天平板培養法（AP 法）により、単離培養できる微生物は自然界に存在する微生物の 1% 前後であることが示唆され、AP 法の問題点を排除した新規培養法が求められている。この現状を踏まえ、我々は特殊セルロースフィルムを用いた新規微生物単離培養法（SCF 法）を開発し、土壌や海水などの環境サンプルを対象に AP 法との比較を実施してきた¹⁾。本研究では、統計的手法などを用いて SCF 法と AP 法の環境サンプルにおける培養特性の比較を行い、SCF 法の有用性を評価すると共に、SCF 法の利用性の拡大を目指し種々検討を行った。【結果】海水サンプルは茨城県大洗海岸、千葉県稲毛海岸より採取した。Marine-broth2216 培地を用い、海水サンプルを SCF 法あるいは AP 法で 15℃、5 日間培養を行った。得られたコロニーの DNA を抽出し、DGGE 法で微生物叢を解析し、Dice 法によりバンドパターンの類似度を算出した。その結果、複数の海水サンプルにおいて類似度が 50% 未満となり、SCF 法と AP 法は大きく異なる培養特性を示した（現在、微生物種を解析中）。また、同様な結果が土壌サンプル等でも得られた。SCF 法の利用性の拡大を目指し、モデルとして *Saccharomyces cerevisiae* を用い SCF 法で培養した結果、AP 法と異なりサンプリングにより培養中の glucose や ethanol の濃度の経時変化が把握できた（AP 法では困難な培養経過に基づく培地交換や供給が可能）。現在、環境サンプルの系について検討中である。1) H25 生物工学会要旨 p. 144.

Development of novel method for culturing and isolating microorganisms using specialized cellulose film (part 4)

○Ryo Saitoh¹, Koichi Murayama², Takuzo Imaizumi², Naomi Goto², Hideki Aoyagi¹
(¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Futamura Chemical Co., Ltd.)

Key words agar plate, environmental bacteria, PCR-DGGE, specialized cellulose film

3P-216 自動通気制御型培養システムを活用した新規培養微生物の集積と単離

○高橋 将人, 青柳 秀紀
(筑波大院・生命環境)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】これまで単離培養された微生物は、自然界に存在する 1% にすぎない。我々は好気性微生物の探索を振盪フラスコ培養法で行う過程で新奇な現象（手作業のサンプリング操作に伴う短時間 [30 sec] の栓の開封が培養微生物群集に影響を与える）を見出した¹⁾。そこで、栓の開封に伴うフラスコ内気相環境の変化が重要な培養環境因子であると推察し、気相部の制御が可能なシステム（Automatic Aeration-controlled culture Flask System : AAFS）を開発し培養を行った結果、短時間の通気条件により従来法とは異なる培養微生物群集が形成した²⁾。本研究では、AAFS を活用し土壌由来の新規微生物の集積と単離を試みた。【方法および結果】筑波大学構内で採取した土壌サンプルを HV 培地を用い、AAFS で振盪フラスコ培養（200 rpm）を 60 h 行い、その期間中に Air を通気した。それぞれの通気条件で得られた培養液を DGGE 法で解析した結果、Control（無通気）とは異なる培養微生物群集が得られた（特に、培養の中期や後期に通気すると、多様性を維持しながら異なる培養微生物群集が得られた）。そこで、培養後期に様々な間歇的通気を行い、得られた培養液を平板培養した結果、Control とは異なる微生物を単離することができた。以上の結果、振盪培養に AAFS を使用することは、新たな微生物や微生物群集の獲得に有用である事が示唆された。現在、現象（短時間の強制通気が培養微生物群集に影響を与える）の機構を解明するためにフラスコ内の気相環境の CO₂等の挙動を解析中である。1) H24 生物工学会要旨 p. 156. 2) H25 生物工学会 p. 144

Application of an automatic aeration-controlled culture flask system for enrichment and isolation of novel microorganisms

○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words aerobic culture, DGGE, gas phase, screening