

## 2P-177 リグニンからバイオプロセスにより誘導されるプラットフォームケミカル 2 ピロン 4,6-ジカルボン酸 (PDC) の生産と利用技術開発

○中村 雅哉<sup>1</sup>, 大塚 祐一郎<sup>1</sup>, 政井 英司<sup>2</sup>, 敷中 一洋<sup>3</sup>, 片山 義博<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>国研・森林総研, <sup>2</sup>長岡技科大, <sup>3</sup>農工大院・工, <sup>4</sup>日大・生資料)  
nmasaya@fpri.affrc.go.jp

【背景と目的】木材を構成する成分の約30%を占めるリグニンは天然の芳香族高分子で、その成分は石油、石炭に含まれる成分に類似した化合物から構成されているが、極めて複雑な化学構造であることからほとんど利用されていない。我々はパルプ工場排水路から単離されたリグニン分解菌 *Shpingobium* sp. SYK-6 株が複雑な構造を有する低分子リグニンを 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) とする代謝中間体を経て、最終的に二酸化炭素と水に分解することを見出した。本研究ではリグニン代謝系遺伝子を操作することにより、低分子リグニンからプラットフォームケミカルとなる PDC を代謝工学を用いて大量生産し、高分子材料の開発を行った。

【実験及び結果】SYK-6 株のパニリン脱水素酵素遺伝子 (*lig V*)、プロトカテック酸 4,5-ジオキシゲナーゼ酵素遺伝子 (*lig AB*)、4-カルボキシ-2-ヒドロキシムコン酸-6-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ酵素遺伝子 (*lig C*)、脱メチル酵素遺伝子 *van AB* から組換え微生物を得て、パニリン、パニリン酸を出発物質とした PDC の発酵生産を行った。培養条件を検討し、グルコース添加、無機塩類、酵母エキスの添加を連続的に添加した結果、菌体密度は従来の 4 倍 (OD660=80) に上昇し PDC 生産量は 100g/L となった。得られた PDC からはポリアリレート系高分子を得ることが出来た。

### Efficient production of 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid (PDC) for platform chemical derived from lignin by metabolic engineering.

○Masaya Nakamura<sup>1</sup>, Yuichiro Otsuka<sup>1</sup>, Eiji Masai<sup>2</sup>, Kazuhiro Shikinaka<sup>3</sup>, Yoshihiro Katayama<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Micob. FFPRI, <sup>2</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

**Key words** lignin, platform chemical, metabolic engineering

## 2P-178 PHA 重合酵素が示すアルコーリシス能に関するアミノ酸残基の特定

○百武 真奈美<sup>1,2</sup>, 富澤 哲<sup>3</sup>, 水野 康平<sup>4</sup>, 久野 玉雄<sup>5</sup>, 阿部 英喜<sup>1,2</sup>, 柘植 丈治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>理研CSRS, <sup>3</sup>熊本高専, <sup>4</sup>北九州高専, <sup>5</sup>理研 Spring-8)  
manami.hyakutake@riken.jp

【背景と目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物細胞内に蓄積されるバイオポリエステルであり、重合酵素により重合される。先行研究において、*Bacillus cereus* YB-4 由来重合酵素 (PhaRC<sub>YB4</sub>) は PHA 重合能のみならずアルコーリシス能を有することが確認された。本反応は末端修飾 PHA の合成法として応用できる可能性があるが、詳細な反応機構は明らかになっていない。そこで本研究では、本反応に関与するアミノ酸残基の特定を目的とした。

【方法】PhaC<sub>YB4</sub> 上の Cys<sup>151</sup>, Asp<sup>306</sup>, His<sup>335</sup> それぞれを置換した変異型酵素を構築した。これと高分子量 PHA を重合可能な *Delftia acidovorans* 由来重合酵素 (PhaC<sub>Da</sub>) を共発現する組換え大腸菌を構築し、炭素源としてグルコースを含む LB 培地にて培養した。蓄積された PHA の含有率をガスクロマトグラフィー、分子量をゲル浸透クロマトグラフィーにより決定し、構造解析を NMR により行った。

【結果と考察】変異型 PhaRC<sub>YB4</sub> のみを発現する株では PHA 蓄積が確認されず、これらの残基が重合反応に関与することが示唆された。PhaC<sub>Da</sub> と野生型 PhaRC<sub>YB4</sub> を共発現させた場合には培養時間の経過に伴う PHA 分子量の低下が確認されたが、変異型酵素では確認されず、アルコーリシス能を欠失したと考えられる。これらの結果より、重合反応とアルコーリシス反応に同じアミノ酸残基が関与することが示唆された。

### Identification of amino acid residues involved in alcoholysis reaction catalyzed by PHA synthase from *Bacillus cereus* YB-4

○Manami Hyakutake<sup>1,2</sup>, Satoshi Tomizawa<sup>3</sup>, Kouhei Mizuno<sup>4</sup>, Tamao Hisano<sup>5</sup>, Hideki Abe<sup>1,2</sup>, Takeharu Tsuge<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, <sup>2</sup>RIKEN CSRS, <sup>3</sup>Kumamoto Natl. Coll. Technol., <sup>4</sup>Kitakyushu Natl. Coll. Technol., <sup>5</sup>RIKEN Spring-8)

**Key words** *Bacillus*, polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, catalytic residue

## 2P-179 アルキルフェノール及び多環芳香族炭化水素を原料とした *Bacillus* sp. CYR1 株によるポリヒドロキシ酪酸 (PHB) の産生

モカトラ カテスワー レディ<sup>1</sup>, 矢島 由佳<sup>2</sup>, 張 ヨンチョル<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>室工大・応理化, <sup>2</sup>京大院・医研, <sup>3</sup>室工大・応理化)  
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

生分解性プラスチックの実用化に向けて、安価な量産技術が求められている。中でも、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は、硬度等の点でポリ乳酸などの他の生分解性プラスチックよりも優れており、その安価な製造方法に対するニーズは高い。一方、産業廃水に広く含有されているフェノール類のような芳香族化合物を原料として生分解性プラスチックのような有用物質を製造することができれば、有害な芳香族化合物を分解除去できると同時に、生分解性プラスチックの原料コストを大幅に抑制することができる。

5 種類のアルキルフェノールと多環芳香族炭化水素をターゲット物質とし、*Bacillus* sp. CYR1 株による分解能及び PHB への変換能力について検討を行なった結果、Tween 80 非添加系、即ちそれぞれの毒性の芳香族化合物を唯一な炭素源とした反応液では 6 日目に分解が確認された。一方、細胞から抽出した PHB の官能基、構造、熱的、及び物理的特性を、フーリエ変換赤外分光法、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR、熱重量分析、示差走査熱量測定、X 線回折及びゲル浸透クロマトグラフィー、透過電子顕微鏡法など、様々な分析方法を用いて解析した結果、高純度の PHB が菌体内に蓄積していることが確認できた。PHB 産生能はフェノール (51±5%)、ナフタレン (42±4%)、4-クロロフェノール (32±3%)、4-ニルフェノール (29±3%) の順に高かった。

### Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from alkylphenols and poly-aromatic hydrocarbons using *Bacillus* sp. CYR1

Venkateswer Reddy Motakarla<sup>1</sup>, Yuka Yajima<sup>2</sup>, 〇Young Cheol Chang<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Sci. Muroran Inst. Technol., <sup>2</sup>Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Dept. Appl. Sci. Muroran Inst. Technol.)

**Key words** Poly-3-hydroxybutyrate (PHB), *Bacillus* sp. CYR1, Alkylphenols, Aromatic compounds

## 2P-180 シロアリ原生生物由来セルラーゼ活性増幅因子の発現

○小田切 正人<sup>1</sup>, 岸川 昭太郎<sup>1,2</sup>, 雪 真弘<sup>1,3</sup>, 大熊 盛也<sup>1,3</sup>, 守屋 繁春<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>理研・バイオマス, <sup>2</sup>理研・BRC, <sup>3</sup>理研・BRC-JCM)  
masatoo@riken.jp

シロアリは腸内共生原生生物群の働きによって、効率よく木質バイオマスを分解利用していることが知られている。しかし、共生原生生物群は難培養性であるため、シロアリの木質バイオマス分解メカニズムの解明は非常に困難であった。そのため、我々はこれまでに培養を介さないメタ EST 解析やシングルセルトランスクリプトーム解析等の手法によりシロアリ原生生物由来の木質分解に関連する因子を網羅的に収集してきた。本研究では、これらのシロアリ共生原生生物群より抽出した因子群を、セルラーゼ高生産菌である *Trichoderma reesei* 中で発現させることにより、木質バイオマス分解を向上させることを目指した。セルラーゼ活性増幅因子候補遺伝子をアグロバクテリウム法を用いて *T. reesei* に導入した。形質転換菌を 28℃、1 週間培養した培養上清を実バイオマス(1-10w/v%)に対して 30℃、24-72h 反応させ、実バイオマスにおける糖化効率を還元糖生産量を指標として評価を行った。その結果、シロアリ原生生物由来のセルラーゼ活性増幅候補遺伝子を導入し発現させた分泌酵素は市販のセルラーゼ製剤 (Cellic CTec2) と比較して高い分解活性が見られたことから、これらの因子群が実バイオマス分解に関与する遺伝子であることが示唆された。

### Cloning and expression of cellulase enhancing factors from symbiotic protists of termites

○Masato Otogiri<sup>1</sup>, Shotaro Kishikawa<sup>1,2</sup>, Masahiro Yuki<sup>1,3</sup>, Moriya Ohkuma<sup>1,3</sup>, Shigeharu Moriya<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>BMEP, RIKEN, <sup>2</sup>BRC, RIKEN, <sup>3</sup>BRC-JCM, RIKEN)

**Key words** cellulase, cellulose degrading enzyme, cellulosic biomass, termite