

2S-Cp04 嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 細菌の代謝多様性と廃水処理への応用

○押木 守, 佐藤 久, 岡部 聡
(北大院・工・環境創成)
oshiki@eng.hokudai.ac.jp

アンモニア酸化反応は窒素循環の1プロセスとして重要な寄与を及ぼしており、アンモニア酸化細菌はその担い手である。アンモニア酸化細菌については、1980年代まで好気性アンモニア酸化細菌しか知られていなかったが、1990年代にオランダの廃水処理リアクター内においてアンモニアが嫌氣的に酸化される現象が見いだされた。その後の¹⁵N標識化合物を用いたトレーサー試験によって、亜硝酸を電子受容体としながらアンモニアが嫌氣的に酸化されていることが実証され、anaerobic ammonium oxidation (anammox) 反応と名付けられた。現在までの生理学、生化学的な解析により、anammox 反応は1) 亜硝酸がNOへ還元され、2) アンモニアとNOから窒素2重結合を持つヒドラジンが最終的にN₂ガスへ酸化される一連の代謝反応から構成されることが明らかとなっている。

Anammox 反応を行う細菌は *Planctomycetes* 門に帰属される単系統群の細菌であり、未だ純粋培養が成功していない難培養性細菌である。この anammox 細菌が持つ代謝能には興味深いものが多い。例えば、anammox 反応におけるヒドラジン合成ではアンモニアとNOから窒素2重結合を持つヒドラジンが合成されるが、窒素の2重結合を生成する反応を触媒する酵素は、NO reductase (EC 番号 1.7.2.5 および 1.7.1.14) 以外にはほとんど知られていない。また、anammox 細菌は細胞構成成分としてラグララン脂質と呼ばれる階段状の構造を持つ脂質を合成するが、これは anammox 細菌以外からは未だ見いだされていない特殊な脂質である。ラグララン脂質の生合成経路は未だ完全には解明されていないものの、そのユニークな分子構造を形成するために新規な酵素が関与していると推測されている。さらに、anammox 細菌は多量のヘムタンパク質を含有しており、様々な分子を電子供与体あるいは電子受容体とした呼吸反応を行えることが生理学的試験によって明らかとなっている。例えば、anammox 細菌は、硝酸を電子受容体としながら、鉄およびマンガンを酸化することができ、逆に鉄およびマンガン電子受容体としながら有機物を異化的に酸化することもできる。

上述の生理学、生化学的特徴のみならず、工学的な観点からも anammox 反応は興味深い。従来、廃水処理における窒素除去は、好気性の硝化プロセスと、脱窒プロセスを組み合わせられてきた。一方、anammox 反応を窒素除去法として導入した場合には複数の利点が考えられる：1) 酸素供給のための曝気装置の動力カット、2) 余剰汚泥発生量の削減、3) 温室効果ガスである N₂O ガス発生量の削減、4) 脱窒反応における有機物の外部添加が不要。こうした利点から、anammox 反応は次世代型窒素除去プロセスとして注目を集めており、実規模での性能検証が欧州を中心に進められている。

我々の研究グループでは、anammox 細菌の培養から研究をスタートし、これまでに従来の硝化脱窒プロセスの窒素除去速度を遙かに上回る高速 anammox リアクターの構築に成功している。本リアクターでは anammox 細菌 "*Candidatus Brocadia sinica*" が高度に集積されており、この集積バイオマスを用いて "*Ca. Brocadia sinica*" の生理学的特性を調査してきた。その結果、"*Ca. Brocadia sinica*" が他の anammox 細菌と比較して、比増殖速度などの点で異なる特性を有することを明らかにしている。現在我々は "*Ca. Brocadia sinica*" の全ゲノム解析に取り組んでおり、ゲノム情報に基づく網羅的な生理学、生化学的特性の解明を進めている。本発表では、"*Ca. Brocadia sinica*" の生理学的特性およびゲノム解析から明らかとなった成果について紹介を行う。

Physiological and genomic insights into an anammox bacterium "*Candidatus Brocadia sinica*"

○Mamoru Oshiki, Hisashi Satoh, Satoshi Okabe
(Div. Environ. Eng., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words anaerobic ammonium oxidation, physiology, genome

2S-Cp05 耐熱性酵素モジュールを用いた *in vitro* バイオリファインリーへの挑戦

○本田 孝祐^{1,2}
(¹阪大院・工・生命先端・生工、²JST・さきがけ)
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

微生物機能を活用したバイオマスからの化学品生産、いわゆるバイオリファインリーは、持続可能型社会実現のための重要課題のひとつとして、専門家のみならず広く一般にもその名を知られるところとなっている。エネルギー問題への関心の高まりとも相まり、とりわけバイオ燃料生産には大きな期待と注目が寄せられているが、化石燃料への依存度の軽減のみにとどまない将来的な脱石油化社会の構築までを視野に入れるならば、バイオリファインリーは燃料性物質のみならず、幅広い種類の化学品生産への適用を目指して展開されてゆくべきものであろう。バイオ燃料生産の分野でこそ、欧米に比べやや遅れをとっているとの指摘も聞かれるわが国の微生物利用産業であるが、そのプロダクトや技術要素の多様性において、現時点で他国の追随を許していないことは、同分野に携わる産学官の研究者の総意であろう。この「多様性」を維持しつつ、個々の生産プロセスの高度化をはかることが、和製バイオリファインリーの優位性を担保するキーチャレンジになるのではないだろうか。

このような背景のもと、演者らは様々な化学品生産に特化した人工代謝経路をオンデマンドで創出する新たな生体触媒利用技術の開発に取り組んできた。本技術では、まず(超)好熱菌に由来する耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温性宿主微生物内で過剰発現させる。得られた組換え菌を熱処理に供した後、触媒としてそのまま利用することで、宿主由来酵素の大部分が熱変性により失活し、精製酵素と同レベルの高い選択性を有した生体触媒が容易に得られる。本アプローチは、異種宿主内での機能的発現さえ可能であれば、あらゆる耐熱性酵素に対して適用可能である。従って代謝経路を構築する一連の耐熱性酵素をモジュール化し、これらを任意に組み合わせることによって化学品生産に特化した *in vitro* 代謝経路を簡便かつ自在に構築することが可能となる。

すでに演者らは本法を用いることによって、グルコースを原料にL-乳酸¹、L-リンゴ酸²、*n*-ブタノールを作りわたることに成功している。本シンポジウムでは、これらの成果について紹介するとともに、本法を通じて実用化に資する生産効率を達成するために、今後取り組むべき課題についても議論したい。

1. Ye, X. et al. *Microb. Cell Fact.* 11, 120 (2012).

2. Ye, X. et al. *J. Biotechnol.* 164, 34-40 (2013).

Challenge to *in vitro* bio-refinery with thermostable biocatalyst

○Kohsuke Honda^{1,2}
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.,
²PRESTO, JST)

Key words thermostable enzyme, *in vitro* metabolic engineering, bio-refinery, butanol