

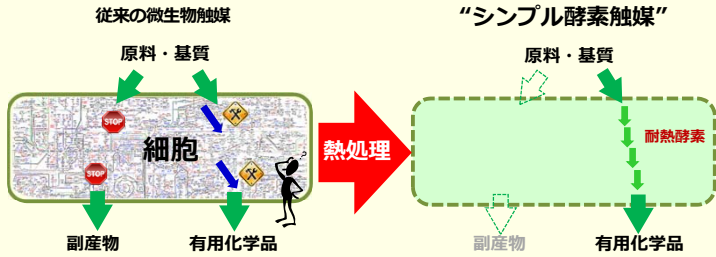


田島 誉久 (広島大学大学院 先端物質科学研究科)
Tel: 082-424-7871, E-mail: ttajima@hiroshima-u.ac.jp



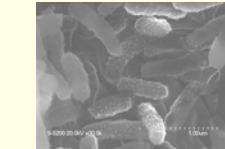
低温菌シンプル酵素触媒とは、物質変換系酵素を宿主(低温菌)代謝系とは異なる温度域で機能させるようにした細胞を構築し、中温の熱処理により異種発現させた中温性酵素のみで効率的な物質変換を行う触媒である。本触媒は酵素を精製することなく、宿主代謝酵素による副産物のカットと基質の膜透過性を向上させることが可能である。そこで本研究ではグリセロールを基質として1,3-プロパンジオールを生成するシンプル酵素触媒の構築を目的とした。*Klebsiella pneumoniae*由来の1,3-プロパンジオール変換酵素DhaBおよびDhaT、さらに補酵素NADH再生酵素としてギ酸デヒドロゲナーゼを発現し、45°Cで熱処理してシンプル酵素触媒を調製した。20 mMグリセロールおよびギ酸を基質として変換を行ったところ、NADHを添加することなく高収率での変換が可能であった。また、宿主である低温菌については、高増殖する培養条件を検討し、菌体収量を8倍に、さらに海底泥からの低温菌探索により、*Shewanella*属細菌よりも比増殖速度が2倍の新規低温菌を単離した。

1 シンプル酵素触媒とは

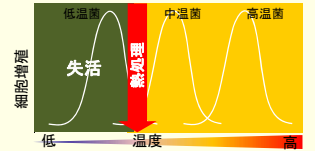


- 宿主の代謝酵素を保持するため、
 宿主の代謝酵素を失活させれば、
- 副産物が生成する、低収率。
 - 代謝工学による宿主代謝経路の改変では、開発期間が長く、困難なこともある。
 - 培養制御や操作が煩雑、複雑である。
 - 副産物フリー、高収率。
 - 酵素の精製を必要としない。
 - 化学触媒並みにシンプルに取り扱える。
 - 簡単に触媒を調製できる。

2 低温菌を宿主とする

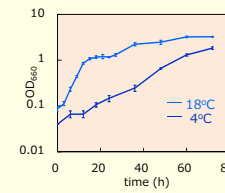


Shewanella livingstonensis Ac10
 ・至適生育温度: 18°C
 ・30°C以上では増殖できない。



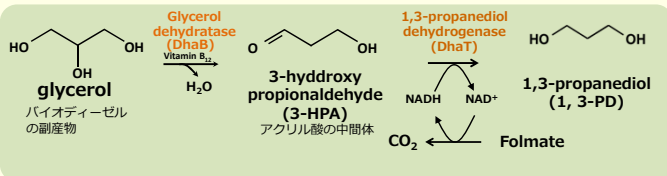
	低温菌	中温菌	高温菌
菌株数	44	1,799	232
ORF数	148,253	4,451,614	457,902

Genomes Online Database (GOLD) 2013.9.



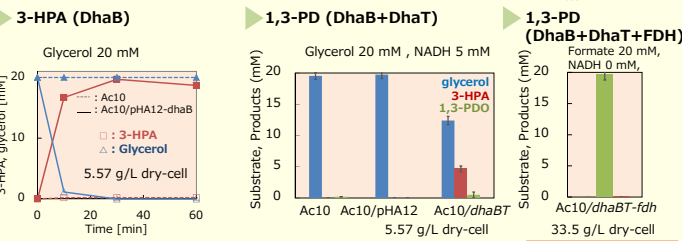
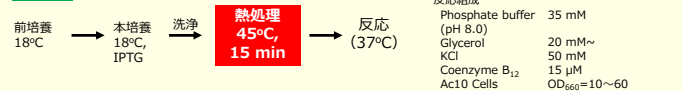
多くの酵素は中温菌に由来する中温性酵素である。低温菌シンプル酵素触媒ならば、中温での熱処理であるために中温菌、動物、植物由来の様々な酵素を組み合わせて物質変換系を設計することが可能である。

3 1,3-PD 生成反応



*Klebsiella pneumoniae*由来のdhaBおよびdhaTを低温菌に導入、発現させた。

実験方法

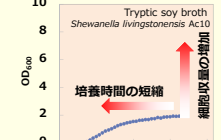


シンプル酵素触媒により、グリセロールから化学量論的に3-HPAを生成することが可能であった。
 また、1,3-PDについては補酵素再生酵素(FDH)と共役させることにより高収率で純グリセロールおよび廃グリセロールから変換させることに成功した。

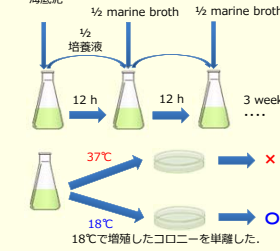
1,3-PD (廃グリセロール) (DhaB+DhaT+FDH)
 Glycerol 20 mM, Formate 20 mM, NADH 0 mM, 33.5 g/L dry-cell
 19.7 mM 1,3-PD, 収率: 98.5 %
 バイオフィーゼル製造過程副産物の廃グリセロールを用いた変換反応 (glycerol 20 mM, 57.9% (w/w) glycerol, 30.2% methanol, 12.5% fatty acids, 2.7% ash)
 収率: 95%

4 低温菌の探索

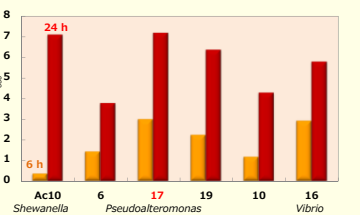
宿主である低温菌の増殖を向上すべく検討を行った。



反復回分培養

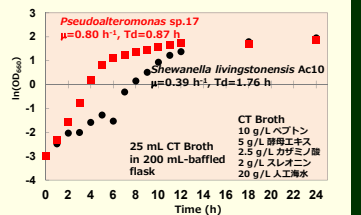
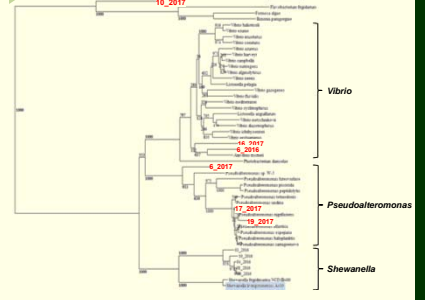


単離菌の培養



培養開始後6時間で単離菌株のOD₆₆₀はAc10より高く、24時間で17が最も高かった。

16S rRNA解析



対数増殖期を短縮した新規低温菌株の選抜に成功した。

まとめと今後の方針

- 低温菌シンプル酵素触媒を用い、グリセロールを1,3-PDに変換する反応をモデルに生成実験を行った。その結果、補酵素NADH再生と共役させた反応系を構築することにより、補酵素を添加することなく高収率な変換を行うことができた。
- 低温菌の増殖を向上すべく、培養条件と低温菌の探索を行った。通気の向上とアミノ酸の添加により大幅な収量の向上が可能であり、海底泥を反復回分培養した培養液より低温菌を単離することにより、速く増殖する菌を獲得することができた。
- 新たに取得した低温菌を宿主として利用すべく酵素発現系を構築するとともに、本触媒を各種化学品の効率的な変換プラットフォームとして活用したいと考えている。