

## バイオプロダクション

研究代表者 桐村 光太郎  
(先進理工学部 応用化学科 教授)

### 1. 研究課題

バイオテクノロジーは 21 世紀の基盤技術であり、とくに環境負荷低減型のプロセスにより選択的に有用物質生産を行うために必要不可欠な要素技術として認識されている。本プロジェクトは、資源循環型社会の構築に資する新規なバイオテクノロジーによるものづくりを基礎と応用の両面からの研究展開により構築することを目的としている。より具体的には、有用物質生産を支える技術として、圧倒的に高い生産効率を示す「スーパー生体触媒」さらにはマイクロ生産工場といえる「細胞型反応装置 (セルファクトリ)」の開発を軸に、再生可能資源である植物系バイオマスからの有用物質生産技術体系の構築を図る。

### 2. 主な研究成果

#### (1) ネオアガロビオース加水分解酵素の諸性質の検討とその利用

近年、寒天オリゴ糖の様々な生理活性機能が明らかになり、医薬品や機能性食品などへの利用が盛んになっている。寒天の主成分であるアガロースは、D-ガラクトースと 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが  $\beta$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,3 結合で交互に結合した直鎖構造を有する。アガロース中の  $\alpha$ -1,3 結合を切断して得られるオリゴ糖はアガロオリゴ糖、 $\beta$ -1,4 結合を切断して得られるオリゴ糖はネオアガロオリゴ糖と呼ばれる (図 1 参照)。これらの寒天オリゴ糖のうち、ネオアガロオリゴ糖はデンプン老化防止作用が強く、加熱処理により静菌作用を生じることや、低カロリー性等の面から食品分野で高機能性食品の原料として有用である。また、高い保湿性と美白作用を兼ね備え、化粧品素材としても有用である。ネオアガロオリゴ糖を酵素的に加水分解して得られる 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースは、キシリトールに替わる抗う食性糖質 (虫歯になりにくい食品素材) として有用である。ネオアガロオリゴ糖の生産法としては、 $\beta$ -アガラーゼを用いた酵素的加水分解でネオアガロオリゴ糖を選択的に生成することが可能であるが、酵素の基質特異性の問題から 1 種類の酵素でアガロースから低分子量のアガロオリゴ糖を生成することは困難であり、その生産量も未だ工業生産レベルには至っていない。

本研究では、寒天あるいは未利用の寒天成分を含む海藻残渣から寒天オリゴ糖の生産技術の開発を目的として、とくに  $\beta$ -アガラーゼおよびネオアガロオリゴ糖加水分解酵素、あるいはその生産微生物を利用して、ネオアガロオリゴ糖、ネオアガロビオースおよび 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースの生産技術の開発を目的とする。本年度は、寒天オリゴ糖の生産技術の要素技術開発について、ネオアガロオリゴ糖加水分解酵素の 1 つであるネオアガロビオース加水分解酵素 (NAH) の諸性質について検討し、当該組換え大腸菌を使用したネオアガロビオースからの 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースの生産について検討した。

筆者らは、寒天を唯一の炭素源として利用可能な微生物の探索により、 $\beta$ -アガラーゼおよび NAH

活性を有する *Cellvibrio* sp. WU-0601 を単離した。さらに、*Cellvibrio* sp. WU-0601 から NAH を精製し、その諸性質を決定するとともに、当該酵素遺伝子を取得した。精製した NAH は、SDS-PAGE およびゲルろ過による分子量決定から、分子量約 42 kDa のサブユニット 2 個から成る分子量約 83 kDa のホモダイマー酵素であった。至適 pH は 6.0、至適温度は 25 °C であった。また、当該酵素遺伝子は、364 残基のアミノ酸をコードする 1,092 bp の ORF から成る配列を有していた。当該酵素のアミノ酸配列は、*Saccharophagus degradans* 2-40 の  $\alpha$ -neoagarobiose hydrolase および *Zobellia galactanivorans* の 1,3- $\alpha$ -3,6-anhydro-L-galactosidase とそれぞれ 74% と 56% の相同性を示した。さらに、当該 NAH 遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製し、当該酵素を発現させた組換え大腸菌からの NAH の比活性は、*Cellvibrio* Sp. WU-0601 の NAH 活性の 27 倍であった (Molec. Catal., in press)。

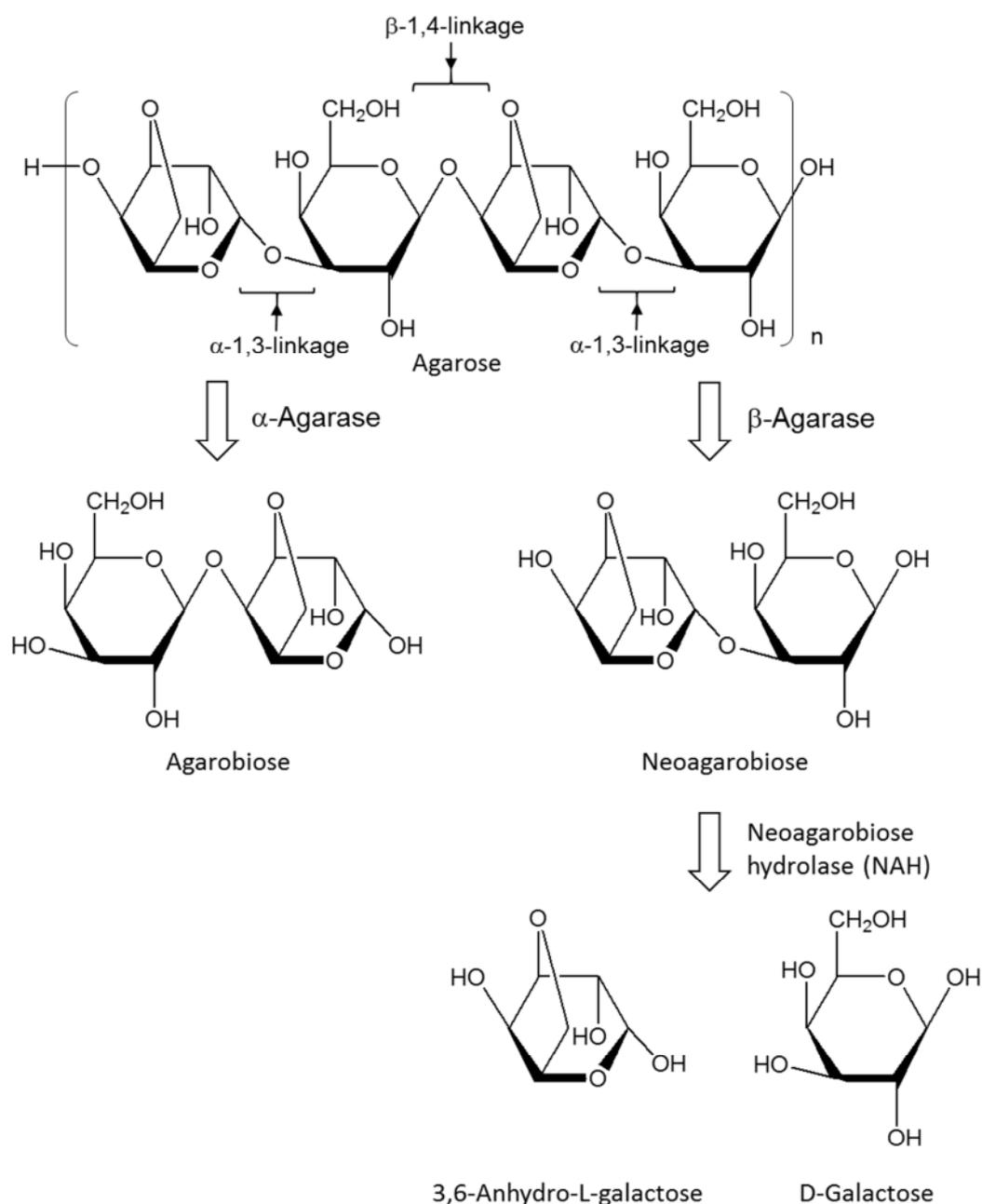


図1 寒天からの寒天オリゴ糖および関連有用物質生産

### 3. 共同研究者

- 木野 邦器 (先進理工学部・応用化学科・教授)  
古屋 俊樹 (先進理工学部・応用化学科・助教)  
小林 慶一 (先進理工学部・応用化学科・助手)

### 4. 研究業績

#### 4.1 学術論文

- (1) Electrodialytic separation of levulinic acid catalytically synthesized from woody biomass for use in microbial conversion, H. Habe, S. Kondo, Y. Sato, T. Hori, M. Kanno, N. Kimura, H. Koike, K. Kirimura, *Biotechnol Prog.* **33**(2), 448-453 (2016).
- (2) Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314, O. Yamada, M. Machida, A. Hosoyama, M. Goto, T. Takahashi, T. Futagami, Y. Yamagata, M. Takeuchi, T. Kobayashi, H. Koike, K. Abe, K. Asai, M. Arita, N. Fujita, K. Fukuda, K.I. Higa, H. Horikawa, T. Ishikawa, K. Jinno, Y. Kato, K. Kirimura, O. Mizutani, K. Nakasone, M. Sano, Y. Shiraishi, M. Tsukahara, K. Gomi, *DNA Res.*, **23**(6), 507-515 (2016).
- (3) Draft Genome Sequence of *Burkholderia stabilis* LA20W, a Trehalose Producer That Uses Levulinic Acid as a Substrate, Y. Sato, H. Koike, S. Kondo, T. Hori, M. Kanno, N. Kimura, T. Morita, K. Kirimura, H. Habe, *Genome Announc.*, **4**(4) (2016).
- (4) Phenotypes of gene disruptants in relation to a putative mitochondrial malate-citrate shuttle protein in citric acid-producing *Aspergillus niger*, K. Kirimura, K. Kobayashi, Y. Ueda, T. Hattori, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **80**(9), 1737-1746 (2016).
- (5) Heterologous gene expression and functional analysis of a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger* NRRL 328, K. Kirimura, S. Watanabe, K. Kobayashi, *Biochem Biophys Res Commun.*, **473**(4), 1106-1110 (2016).
- (6) Bioproduction of *trans*-aconitic acid from citric acid by whole-cell reaction of *Escherichia coli* heterologously expressing the aconitate isomerase gene from *Pseudomonas* sp. WU-0701, K. Kobayashi, J. Maruebi, K. Kirimura, *Chemistry Select*, **1**(7), 1467-1471 (2016).

#### 4.2 総説・著書

#### 4.3 招待講演

#### 4.4 受賞・表彰

#### 4.5 学会および社会的活動

- (1) 糸状菌 *Aspergillus niger* 有機酸輸送体遺伝子破壊株によるシュウ酸生産, 有岡 育哲, 上田 由佳, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第68回日本生物工学会大会(富山)講演要旨集 3P-1a075, 2016年09月

- (2) 好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース加水分解酵素の酵素的特徴, 渡辺 輝彦, 榎村 佳奈, 桐村 光太郎, 第 68 回日本生物工学会大会(富山)講演要旨集 3P-1p056, 2016 年 09 月
- (3) *Aspergillus niger* NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析, 丸海老 純也, 渡邊 昭太郎, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 68 回日本生物工学会大会 (富山) 講演要旨集 3P-1p057, 2016 年 09 月
- (4) *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼの諸性質検討と遺伝子の同定, 丸海老 純也, 油原 かほり, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 67 回日本生物工学会大会 (鹿児島) 講演要旨集 1P-034, 2015 年 09 月
- (5) 可逆的サリチル酸脱炭酸酵素の改変と酵素的 Kolbe-Schmitt 反応によるメチルサリチル酸生産, 熊倉 匠, 桐村 光太郎, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015 (東京) 講演要旨集 P8-061, 2015 年 09 月
- (6) アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を異種発現させた組換え大腸菌の細胞反応によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産, 丸海老 純也, 油原 かほり, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌) 講演要旨集 4F182, 2016 年 03 月
- (7) クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子破壊株の作成, 小林 慶一, 上田 由佳, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌) 講演要旨集 4F120, 2016 年 03 月
- (8) 非海洋性細菌由来ネオアガロビオース加水分解酵素の諸性質検討と遺伝子解析, 榎村 佳奈, 渡辺 輝彦, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2016 年度大会(札幌)講演要旨集 4D007, 2016 年 03 月

## 5. 研究活動の課題と展望

今回取得した *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来のネオアガロビオース加水分解酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて、ネオアガロビオースからの 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース生産について継続して検討する。さらに、*Cellvibrio* sp. WU-0601 由来の  $\beta$ -アガララーゼの諸性質を明らかにして、寒天あるいは未利用寒天を含む海藻残渣からのネオアガロオリゴ糖生産を検討する。