

第 55 回化学関連支部合同九州大会
外国人研究者交流国際シンポジウム

55th Kyushu Area Joint Meeting of the Chemistry-Related Societies

講演予稿集

2018 年 6 月 30 日

共催

有機合成化学協会九州山口支部
電気化学会九州支部
日本分析化学会九州支部
高分子学会九州支部
繊維学会西部支部
日本農芸化学会西日本支部
化学工学会九州支部
日本化学会九州支部

協賛

(公財) 北九州観光コンベンション協会

固定化ピルビン酸-フェレドキシ酸化還元酵素によるアセチル-CoA 生成
Acetyl-CoA production by immobilized pyruvate-ferredoxin oxidoreductase

竹中 慎^{1,2}、伊 基 石^{1,2,3}、松 本 崇 弘^{1,2,3}、小 江 誠 司^{1,2,3}
Makoto Takenaka^{1,2}, Ki-Seok Yoon^{1,2,3}, Takahiro Matsumoto^{1,2,3}, and Seiji Ogo^{1,2,3}

Abstract : Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) is one of the enzymes that catalyzes acetyl-CoA synthesis. We report the immobilization of PFOR_{S77} purified from Citrobacter sp. S-77 by using hydroxyapatite particle and alginate hydrogel as support materials. Turn over frequency (TOF) of immobilized PFOR_{S77} was 37 s⁻¹. The immobilized PFOR_{S77} maintained 70% of initial activity after 10 consecutive operation cycles.

1. 緒言

アセチル-CoA は代謝経路の中心となる化合物であり、生体のエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) や、医薬・農業として利用可能なポリケチド化合物を合成するための前駆体として知られている。近年、固定化アセチル CoA 合成酵素 (ACS) によるアセチル-CoA 生成が報告されている。ACS による反応では、基質である ATP 由来のアデノシン三リン酸 (AMP) と二リン酸が副生成物として生じ、反応後のアセチル-CoA の分離・精製が課題となる。一方、ピルビン酸-フェレドキシ酸化還元酵素 (PFOR) はピルビン酸と CoA を基質とし、副生成物として分離が容易な二酸化炭素、プロトンおよび電子を生ずることから、アセチル-CoA 生成への応用が期待される。しかし、これまでに PFOR を固定化した報告例はない。本発表では Citrobacter sp. S-77 から精製した PFOR_{S77} を用いた固定化 PFOR_{S77} の作製とその特性評価について報告する。

2. 実験

PFOR_{S77} は、発表者らが新規に単離した細菌 Citrobacter sp. S-77 から嫌気的条件下で精製した。固定化 PFOR_{S77} は、精製酵素をハイドロキシアパタイト粒子 (HA) に吸着させた後、アルギン酸ハイドロゲルに内包させて作製した (Fig. 1)。固定化 PFOR_{S77} の触媒活性は、メチルピオロゲン電子受容体として用い、生成したアセチル-CoA を HPLC 分析で定量することで求めた。

3. 結果および考察

固定化 PFOR_{S77} の触媒回転頻度 (TOF, 30°C, pH 7.0) は 37 s⁻¹ であり、遊離酵素の TOF (102 s⁻¹) と比較して触媒活性は低下した。一方、固定化 PFOR は 10回の繰り返し使用後も初期活性を約 70%保持していた。本研究は、固定化 PFOR の作製とアセチル-CoA 生成反応への利用に成功した初めての例である。

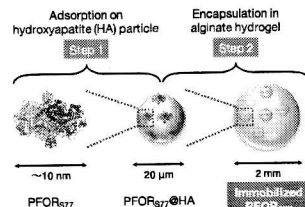


Fig. 1. Development of immobilized PFOR_{S77}.

- (1) L. Ionov et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 1500 (2015).
(2) M. Takenaka et al., Bioresour. Technol. 227, 279 (2017).

量産型 ABC 光半導体のカビに対する抗菌効果
Antifungal effect of mass-production type ABC photosemiconductor

辻塚誠一郎¹、宮本樹里¹、鈴木尚幸¹、伊東謙吾²、田中賢二¹
Seichiro Tsujitsuka¹, Juri Miyamoto¹, Naoyuki Suzuki¹, Kengo Ito² and Kenji Tanaka¹

ABC compound material which is composed of Ag nanoplate, boron resin and clay, is dispersive in organic solvent therefore is a novel paintable photosemiconductor. The ABC photosemiconductor shows antimicrobial effect in dark and it is enhanced by irradiation of visible light or near-infrared light. We report antifungal effect of mass-production type ABC photosemiconductor which was newly developed.

1. 緒言

(株)伊都研究所で開発された平板状銀ナノ粒子 AgNPL(A)、ボロン樹脂(B)およびクレイ(C)の複合粒子(ABC粒子)で作成された薄膜は、可視光や近赤外光照射による顕微鏡的な電変換反応を引き起こす。本物質は、有機溶媒中での分散性と安定性にも優れており、物体表面への塗布による薄膜化が容易である。すなわち、ABC粒子は、画期的な塗料型の光半導体として幅広い分野での利用が期待される。我々は、このABC光半導体が、可視光照射下で微生物に対する強力な抗菌作用を示すことを明らかにしている。いわゆる光触媒として利用されている酸化チタンなどの金属酸化物半導体が主に紫外光の照射によって抗菌性を発揮するのに対して、ABC光半導体は、暗所でも抗菌活性を示すこと、可視光だけでなく近赤外光照射によっても抗菌活性が増強される点が光触媒と大きく異なる。これまで、ABC光半導体の抗菌活性に関しても、材料であるA、B、Cの混合比や可視光の照射波長、近赤外光の光量が抗菌活性に及ぼす影響について報告してきたが¹⁾、今次大会では、大量生産に適した新たな製法で製造された量産型ABC光半導体のカビに対する抗菌能評価を行ったので報告する。

2. 実験

検定菌には、クロウジカビ Aspergillus niger NBRC 105649、アオカビ Penicillium pinophilum NBRC 6345 および Penicillium citrinum NBRC 6352 を用いた。試験サンプルには、A、B、Cの混合方法と溶媒が従来のタイプD IおよびタイプD IIを用い、抗菌能評価は、JIS R1705を参考にしたフィルム密着法により暗所、可視光(白色LED 1000 lx)および近赤外光(放射照度: 12.5 W/m²)照射下で放置後のカビ孢子生菌数を比較した。なお、JIS法と異なり、光半導体の試験用フィルムへの固定や孢子生菌のマウントを含む前置操作の全てを暗所 (0.02 lx) で行った。

3. 結果および考察

まず、ABC光半導体タイプD I・D IIともに、A. niger、P. pinophilum および P. citrinum に対して、完全暗所、LED白色光および近赤外光照射いずれの条件下でも顕著な殺菌効果が認められた。また、どの検定菌種に対してもタイプD IおよびタイプD IIともに、暗所条件に較べて近赤外光またはLED白色光を照射することで孢子への殺菌力が増強された。ABC光半導体間で殺菌力を比較すると、タイプD IよりタイプD IIの方が殺菌力は大きいことが分かった。以上の結果より、新たなABC光半導体タイプD IIは、大量生産可能でありかつ強い抗菌能を持つことが確かめられ、本品の実用化が大いに期待される。

参考文献 1) 辻塚ら、第69回日本生化学会大会講演要旨集P241、2017年9月13日

量産型 ABC 光半導体の細菌に対する抗菌効果
Antibacterial effect of mass-production type ABC photosemiconductor

宮本樹里¹、辻塚誠一郎¹、鈴木尚幸¹、伊東謙吾²、田中賢二¹
Juri Miyamoto¹, Seichiro Tsujitsuka¹, Naoyuki Suzuki¹, Kengo Ito² and Kenji Tanaka¹

ABC compound material which is composed of Ag nanoplate, boron resin and clay, is dispersive in organic solvent therefore is a novel paintable photosemiconductor. The ABC photosemiconductor shows antimicrobial effect in dark and it is enhanced by irradiation of visible light or near-infrared light. We report antibacterial effect of mass-production type ABC photosemiconductor which was newly developed.

1. 緒言

(株)伊都研究所で開発された平板状銀ナノ粒子 AgNPL(A)、ボロン樹脂(B)およびクレイ(C)の複合粒子は、薄膜にすることで可視光や近赤外光照射下で顕微鏡的な電変換反応を引き起こす。本物質は、有機溶媒中での分散性と安定性にも優れているため、塗布による薄膜化や工業製品表面への加工が容易な塗料タイプの光半導体 (以下ABC光半導体と称す) として期待される。ABC光半導体は、光触媒的に照射下で微生物に対して強い抗菌作用も有する。しかしながら、本光半導体は、紫外光よりも可視光照射での抗菌力が強く、また暗所でも抗菌活性が認められ、かつ近赤外光照射によっても抗菌力が増強される点が従来の光触媒と大きく異なる。これまで、ABC光半導体やその加工製品の細菌やカビ、ウイルスに対する抗菌特性について報告してきたが¹⁾、今次大会では、大量生産に適した新たな製法で製造された量産型ABC光半導体について、大腸菌や病原細菌に対する抗菌能評価を行ったので報告する。

2. 実験

検定菌には、大腸菌 Escherichia coli JCM1649^T を、病原細菌として黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus NBRC 12732 と緑膿菌 Pseudomonas aeruginosa NBRC 3080、セロウス菌 Bacillus cereus NBRC15305 を用いた。試験サンプルは、材料成分A、B、Cの混合方法と溶媒組成を大量生産向けに改善した新たな光半導体タイプD IとD IIを用いた。抗菌能評価は、JIS R1705を参考にしたフィルム密着法により、光半導体を固定させた試験フィルムに検定菌をマウントし、暗所、可視光(白色LED 1000 lx)照射下でそれぞれ放置した後の生菌数を比較した。なお、JIS法と異なり、試験フィルム作成や検定菌液のマウントを含む前置操作の全てを暗所 (0.02 lx) で行った。

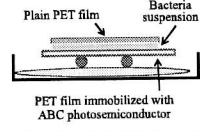


Fig. Test piece for antibacterial activity

3. 結果および考察

上記光半導体を 0.16 μg/cm² の密度で固定したフィルムを用いて試験した結果、全ての検定菌で暗所下でも顕著な抗菌効果が見られた。可視光照射下ではより強い効果が認められ、D I、D IIの両方において生菌率は大幅減少(ほぼ0%、黄色ブドウ球菌で1%前後、セロウス菌では3%程度)に減少した。しかし、緑膿菌では全ての条件下で他の菌よりも明らかに高い生菌率を示した。緑膿菌は、他の菌に比べて凝集しやすいためコントロール試験区での生菌数が少なかった。これが光半導体試験区での生菌率を見かけ上高める一因と考えている。

参考文献 1) 山本ら、第69回日本生化学会大会講演要旨集P241、2017年9月13日

遺伝子組換え水素酸化細菌による CO₂ からの生分解性プラスチック生成
Biosynthesis of biodegradable plastic from CO₂ by engineered hydrogen-bacterium

鈴木尚幸¹、宮本樹里¹、辻塚誠一郎¹、折田和泉²、福島俊昭²、田中賢二¹
Naoyuki Suzuki¹, Juri Miyamoto¹, Seichiro Tsujitsuka¹, Orita Izumi², Toshitaki Fukui², Kenji Tanaka¹

Biosynthesis of the copolyester of D-3-hydroxybutyric acid and D-3-hydroxyhexanoic acid, P(3HB-co-3HHx) from CO₂ by engineered strains of a hydrogen-oxidizing bacterium, R. eutropha was investigated. Cell yield, cellular content of P(3HB-co-3HHx) and the molar ratio of the monomer units in the polyester were compared between the four types different engineered strains. The effect of nitrogen source in the inorganic salts medium on those fermentation results were also investigated.

1. 緒言

3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と炭素数6-12の3-ヒドロキシルカン酸(3HA)を構成ユニットとする共重合ポリエステル(ポリヒドロキシルカン酸(PHA)は、3HBのホモポリエステル PHB に比べ柔軟性などの点で実用性に優れた生分解性プラスチック素材として期待されている。我々は、従来培養条件下でフルクトースから 3-ヒドロキシヘキサノ酸(3HHx)を高含有率で含む P(3HB-co-3HHx) を合成する水素酸化細菌 Ralstonia eutropha の遺伝子組換え株が、独立栄養条件下でも CO₂ から良好に P(3HB-co-3HHx) を合成する可能性を明らかにした¹⁾。今回、PHA 合成系遺伝子の組換えや培養条件が PHA 中の 3HHx モル分率にどのように影響するの検証したので報告する。

2. 実験

R. eutropha H16 株 (野生株) の PHB 合成系遺伝子の一部を欠損・置換させ、さらに 3HA-CoA の効率よい合成を可能にする複数の遺伝子を導入した。組換え遺伝子の一部が異なる 4 種類の組換え株を、無機塩合成培地を用い H₂O/CO₂=8:1 の組成の混合ガスを基質としてフラスコ培養し、菌体増殖量とメタノリス-GC 分析により組成当たりの PHA 蓄積率、構成モノマーのモル比を比較した。また、培地の無機窒素源の種類と濃度が PHA 合成にどう影響するの検証した。

3. 結果および考察

窒素源として 1.0g/L を用いた場合、4 種の組換え株 (MF01/J4a 株、MF01 ΔB1/J4a 株、MF01 ΔC 株、MF01 ΔB1/JAc 株) のうち、MF01 ΔB1 株は菌体濃度が野生株よりも低く、MF01 を宿主とする 2 株は野生株と同等もしくはそれ以上の値となった。特に、MF01/JAc 株は菌体濃度が最も高く (OD₆₀₀=67)、PHA 蓄積率が 74.2wt% と最も高かった。MF01 ΔB1/J4a 株は 3HHx モル分率が 40mol% と驚異的に高い値を示したが、物理的に最も優れるとされる 3HHx モル分率は約 10mol% である。一方、短鎖長(R)-3HA-CoA に高活性を示す(R)-エノイル-CoA ヒドラーゼ遺伝子 phaAc を導入した MF01 ΔB1/JAc 株では 3HHx モル分率は 8.5mol% に抑えられた。窒素源として塩安を用いた場合、菌体濃度は野生株では大きく上昇したが、組換え株では全体的に低くなる傾向が見られた。これは培養液中に残存する塩化物イオン (Cl⁻) による pH 低下に加え、組換え株特有の何らかの中間代謝産物(有機酸)の漏出しによる pH 低下が菌体増殖に影響を及ぼしたためと考えられる。実際に、組換え株における培養上清を HPLC により分析した結果、窒素源に塩安を用いた場合でより多くの有機酸が検出された。組換え株の乾燥固体から PHA を抽出・精製し NMR 解析にかけたところ、3HHx モル分率は GC 分析の値とほぼ等しいことが確かめられた。また、GPC により分子量はポリステレン換算で数十万程度と推定された。

参考文献 1) K.Tanaka et al. Biomaterials International 2017, Fukuoka Japan, pp.1-4, August 20-23, 2017