

2019年繊維学会年次大会 に参加して

横江 洋人

Hiroto YOKOE

物質化学専攻修士課程 1年

私は今回、2019年6月5日から7日にかけて東京のタワーホール船堀にて開催された繊維学会の「2019年繊維学会年次大会」に参加した。今回は「微生物 *R. eutropha* によるポリ(3-ヒドロキシブチレート)の生合成時のグリセリン炭素源の代謝効率」と題して、口頭発表を行った。

1. 緒言

微生物 *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) は細胞内にエネルギー貯蔵物質として poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) を効率よく蓄積できる代表的な微生物である。*R. eutropha* による P3HB 生合成で炭素源としてグリセリンを用いると P3HB 含有率が 30-40% であるのに対し、グルコースなどの炭素源を用いた時の 50-60% と比較して低い値になっている。本研究室ではグリセリンに少量の脂肪酸を加えた混合炭素源では、P3HB の収率が向上することを報告した。そこで、本研究では *R. eutropha* による P3HB の生合成時の炭素源であるグリセリンの代謝と蓄積される P3HB との関係について検討した。

2. 実験操作

R. eutropha (NCIMB 11599) を有機培地中で 32℃, 120 rpm, 24 h で振とう培養し、炭素源にグリセリンを用いて窒素、リン制限の条件下で 72 h 振とう培養した。菌体内に蓄積した P3HB はクロロホルムを用いて抽出した。P3HB の収率は乾燥菌体中に含まれている P3HB の重量分率とした。培地中のグリセリン濃度は ¹H NMR 測定により標準試料としてアセトアニドを用いてグリセリンのピーク強度から求めた。¹H NMR 測定は JEOL-ECA 400

を用いた。

3. 結果と考察

R. eutropha による P3HB 生合成時で得られた乾燥菌体重量 (DCW) とポリマー収量の関係を Fig. 1 に示した。DCW とポリマー収量は、ともにグリセリン濃度が 25 mmol/100 mL 以上で急激に減少することが確認された。特にポリマー収量はグリセリンが高濃度であるときに小さくなった。これは、菌体がエネルギー貯蔵物質であるグリセリンを代謝する必要がなかったためと考えられる。また Fig. 2 にはグリセリン濃度を変化させた時のポリマー収率の図を示す。ポリマー収率も収量と同様の変化の傾向が見られた。

次に、この時の培養液中の残留グリセリンの量を ¹H NMR 測定により求めた。菌体に代謝されたグリセリンの量は加えたグリセリンの量から、培養液中に残留しているグリセリンの量との差から求めた。Fig. 3 に菌体内で代謝されたグリセリンの量を

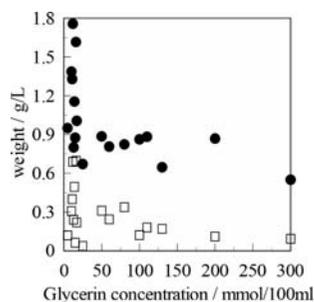


Fig. 1 P3HB biosynthesized from the carbon source of glycerin.

● : Dry cell weight □ : Polymer weight

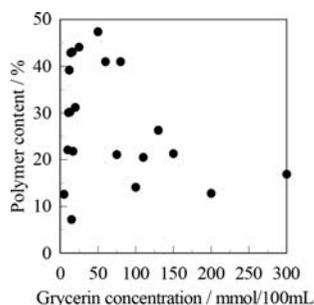


Fig. 2 Polymer content by P3HB biosynthesized

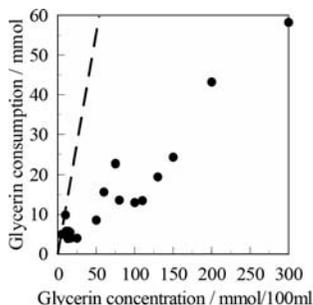


Fig. 3 Glycerin consumption during P3HB biosynthesized

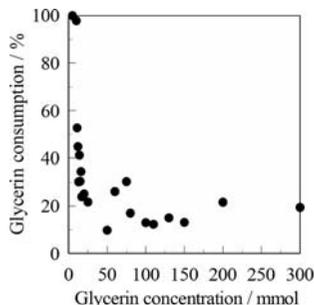


Fig. 4 Glycerin consumption during P3HB biosynthesized

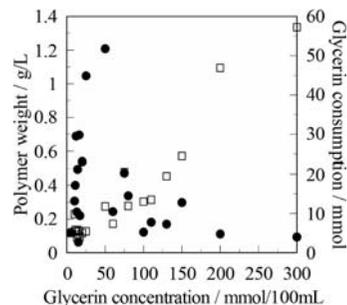


Fig. 5 P3HB biosynthesized from the carbon source of glycerin and glycerin consumption.

● : Polymer weight
□ : Glycerin consumption

グリセリン濃度に対してプロットした。また、参照のために加えたグリセリンの量は波線で示した。菌体内で代謝されるグリセリンの量は培養液中のグリセリンの濃度が上がるとともに単調に増加した。特にグリセリン濃度の低い5 mmol, 10 mmol/100 mL 以下では、加えたグリセリンを全て代謝したが、高濃度になると代謝されずに培養液の中に残留しているグリセリンの量が多くなった。

また Fig. 4 にはグリセリン消費率をプロットした図を示す。グリセリンモル濃度が5 mmol, 10 mmol/100 mL の時にグリセリンは約 100% 消費されていることが確認できた。しかし 10 mmol/100 mL よりグリセリン濃度を上げていくとグリセリン消費率が減少していき、25 mmol/100 mL 加えた時では 21.7% とグリセリンの消費率は大きく減少した。そこからさらにグリセリンの濃度を上げて消費率は約 15~20% でほぼ一定の値になることが確認できた。先ほどのグリセリン消費量の図と比較してグリセリン濃度が上がるにつれてグリセリンの消費される割合は一定になっているがグリセリン消費量は増えていくということが確認できた。

得られた P3HB の収量の変化からグリセリンの消費量がどれほど変化したかをまとめた図を Fig. 5 に示す。先ほどのグリセリン消費量の図でも示した通りグリセリン消費量はグリセリンの濃度が上がるにつれて P3HB 収量の増加と共に増えているが 50

mmol/100 mL からグリセリンの消費量が増えているのにも関わらず P3HB の収量が減少していることからグリセリンの消費量と P (3HB) 収量の 2 つは共に単調増加しないということが考えられる。これは加えるグリセリンの量を多くしても得られる P3HB の収量は増えないことを示しています。

代謝されたグリセリンの量は加えたグリセリンに対して 20-30% と低かったことから、菌体内に蓄積される P3HB の収率が高くならなかったと考えられる。また、Fig. 1 の P3HB の蓄積量が高濃度のグリセリン中では極めて低くなったが、Fig. 3 で示したように菌体内での代謝は高濃度のグリセリンでも行われていることから、代謝されたグリセリンはエネルギー貯蔵物質として P3HB に変換されるより、運動エネルギーとして消費されたと考えられる。また豊富な炭素源により菌体がポリマーを蓄積しなくていいと判断したためだと考えられる。

4. 評価

初めての学会での口頭発表でとても緊張しました。発表を聞きに来てくれている方が思っていたよりも多く、こういう機会は滅多にないことなのでとても良い経験になりました。参考になる質問やご指摘もいただきましたので今後の研究に活かしていきたいと考えています。