

2016年 IPC 2016 に参加して

山内 一平

Ippei YAMAUCHI

物質化学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は今回、2016年12月14日から12月16日にかけて福岡市の国際会議場にて開催された高分子学会の「The 11th SPSJ International Polymer Conference」に参加した。今回は「Increment of the Yield of Poly(3-hydroxybutyrate) Biosynthesised from Mixed Substrate of Glycerin and L-leucine by *Ralstonia eutropha*」と題して、ポスター発表を行った。

2. 緒言

微生物による Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) の生合成では、微生物の種類や炭素源の種類を変えることで得られる PHA の組成や収量が変化することが知られている。*Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) はエネルギー貯蔵物質として Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) を効率よく蓄積できる代表的な微生物である。これまでに炭素源としてグリセリンに少量の脂肪酸を添加した混合基質を用いて生合成を行うことで、得られる PHB 収量が增大したと報告した。また、炭素源として20種類のアミノ酸を用いた場合、ロイシンが最も高い PHA 収率を得られると報告した。

本研究では *R. eutropha* によるグリセリンとロイシンの混合基質を用いた生合成について検討した。

3. 実験操作

微生物 *R. eutropha* (NCIMB 11599) を有機培地中で 32°C, 120 rpm, 24 h で振とう培養して増殖させたのち、炭素源にグリセリンおよびロイシンを用いてリン制限の条件下で 72 h 振とう培養した。微生物内に蓄積した PHB はクロロホルムを用いて抽出した。また、培地中のグリセリンとロイシンの残

留量は液体¹H NMR 測定から求めた。内部標準試料としてアセトアニリドを用いた。

4. 結果と考察

Fig. 1 にはロイシンの濃度を 5 mmol 固定し、グリセリンの濃度を変えた混合炭素源から得られた PHB の収量を示した。グリセリンの濃度が上がるにつれて PHB 収量は増大していき、グリセリン濃度が 60 mmol のときに PHB 収量は最大となった。また、それ以降では収量は減少する傾向がみられた。これは培地濃度が上がることで、微生物に対する浸透圧が増加し、微生物の繁殖力や PHB 蓄積力へ影響を与えたためであると考えられる。また、混合炭素源から得られたものと比較するために、グリセリンとロイシンをそれぞれ単一の炭素源として用いて生合成を行った。Fig. 2 にはグリセリンとロイシンをそれぞれ単一の炭素源として用いた場合と混合炭素源とした場合の収量の比較を示した。グリセリンとロイシンの単一炭素源で得られた収量については、足し合わせて収量の合計値を示した。混合炭素源での収量が最大となったグリセリン濃度 60 mmol まで、得られた PHB 収量は混合炭素源を用

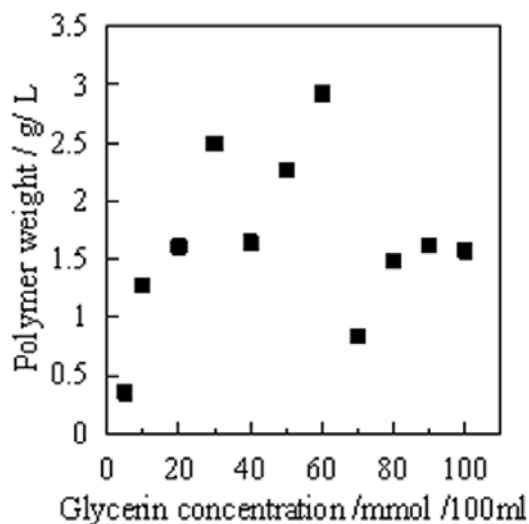


Fig. 1 Polymer weight of PHB biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin and leucine 5 mmol.

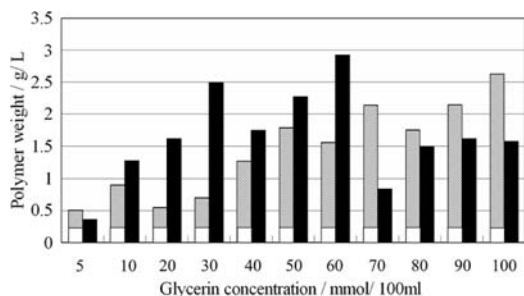


Fig. 2 Polymer weight of PHB biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin and L-Leucine 5 mmol.
 □ : L-leucine ★ : glycerin ■ : the mixed substrate of glycerin and L-leucine

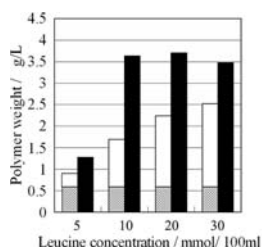


Fig. 3 Polymer weight of PHB biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin 10 mmol and L-Leucine.

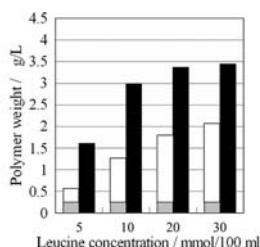


Fig. 4 Polymer weight of PHB biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin 20 mmol and L-Leucine.

いた場合の方が多くなった。

Fig. 3, 4には、グリセリンの濃度をそれぞれ 10 mmol, 20 mmol, 30 mmol に固定してロイシンの濃度を変えた混合炭素源を用いた場合の混合炭素源と単一炭素源の収量の比較を行った結果を示した。得られた PHB 収量は全ての濃度で混合炭素源を用いた場合の方が多くなる結果となった。

この収量の増大効果は、グリセリンとロイシンを混合することによって菌体内により多く取り込まれやすくなったことが原因であると考えられたため、培地中のグリセリンとロイシンの残留量を求めた。方法として、液体 1H NMR 測定により内部標準で

あるアセトアニリドのメチル基のピークを基準に、グリセリンのメチレン基とロイシンのメチル基のピーク強度比から残留量を求めた。

また、培地中のグリセリンの残留率も調べた。グリセリンの濃度が 5 mmol のとき残留率は 0% を示し、微生物内に 100% 取り込まれていた。グリセリン濃度が上がるにつれて、残留率も増加する傾向がみられた。また、混合するロイシンの濃度に関わらずグリセリンの濃度が同じであれば、グリセリンの残留率は同等の値となった。さらに、混合炭素源とグリセリン単一の炭素源でも、残留率は同等の値を示した。したがって、ロイシンを混合してもグリセリンの代謝は促進されなかったことが確認できた。さらに、培地中のロイシンの残留率も調べた。グリセリンの場合と同様に、ロイシンの濃度が 5 mmol のとき残留率は 0% を示しており、ロイシンの濃度が上がるにつれて、残留率も増加する傾向がみられた。また、混合するグリセリンの濃度に関わらずロイシンの濃度が同じであれば、ロイシンの残留率は同等の値を示した。さらに、混合炭素源とロイシン単一の炭素源でも残留率は同等の値を示した。したがって、グリセリンを混合してもロイシンの代謝は促進されなかったことが確認できた。

このことから、混合炭素源による PHB 収量の増大効果は微生物体内に取り込まれてからの代謝経路内に原因があると考えられる。

5. 評価

これまでに何度か学会でのポスター発表を経験しましたが、初めての国際学会ということで少し緊張しました。しかし、ほとんどが日本人であったため英語での発表はありませんでした。今後も英語を使う機会はあると思うので、研究だけでなく英語の勉強にもより一層力を注いでいきたいと思っています。