

H14-2 *Burkholderia cepacia*TM1 のバニリン酸代謝により生成するホルムアルデヒドの毒性回避システム

三井 亮司¹, ○草野 陽子¹, 由里本 博也², 阪井 康能², 加藤 暢夫², 田中 三男¹
(¹岡山理大理・生化, ²京大院農・応用生命)

【目的】リグニンモデル化合物と呼ばれるバニリンやバニリン酸などの芳香族化合物のメトキシル基は細菌による代謝過程で脱メチル化をうけ、強い毒性を持つホルムアルデヒド (HCHO) を生じる。私たちはこれまでにバニリンやバニリン酸を資化する *B. cepacia* TM1 が HCHO の毒性をリブ्रोースモノリン酸 (RuMP) 経路を用いて回避することを明らかにしてきた。今回、HCHO 代謝に関わる RuMP 経路の鍵酵素をコードする遺伝子を *B. cepacia* TM1 内で過剰発現させ、バニリン酸代謝に及ぼす影響を検討したので報告する。

【方法および結果】HCHO 代謝の鍵酵素、ヘキシロースリン酸シンターゼ (HPS) とホスホヘキシロイソメラーゼ (PHI) をコードするメチロトロフ細菌由来の遺伝子を *B. cepacia* TM1 内に形質転換した。その結果、野生株よりも2〜3倍の活性の上昇が見られた。そこで、培養液中に HCHO を直接添加し、野生株と生育および HCHO の減少速度を比較した結果、培養初期において改善が見られた。また、¹⁴C 標識 HCHO を用いて細胞抽出液中の ¹⁴C 活性を検討した結果においても同様であった。このことから、HCHO を代謝過程で生じるバニリン酸を炭素源として用いた結果、高濃度で過剰生産株の生育およびバニリン酸代謝速度に明らかな改善が見られた。

Formaldehyde fixation enzyme contribute to detoxification for growth on vanillic acid in a *Burkholderia cepacia*TM1

Ryoji Mitsui¹, ○Kusano Yoko¹, Hiroya Yurimoto², Yasuyoshi Sakai², Nobuo Kato², Mitsuo Tanaka¹

(¹Dept. Biochem., Fac. Sci., Okayama Univ. of Sci., ²Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words Formaldehyde, *Burkholderia*, Vanillic acid, Methylotroph, Ribulose monophosphate pathway

H14-4 *Lactobacillus paracasei* KW3110 株のプロバイオティクス菌としての評価

○藤井 敏雄¹, 中嶋 桂子¹, 藤原 大介¹, 飯野 久和²
(¹キリンビール基盤研, ²昭和女大院・生活機構)

【背景と目的】乳酸菌は免疫系の Th1/Th2 バランスを改善することにより、抗アレルギー作用を示すことが報告されている。先に我々は 80 株以上の乳酸菌から、Th1/Th2 バランスの改善作用がもっとも優れた乳酸菌として *Lactobacillus paracasei* KW3110 株を選抜したことを報告した¹⁾。今回は本株の酸耐性、胆汁酸耐性、腸管細胞 Caco-2 への接着性を検討することにより、プロバイオティクス菌としての評価を行った。

【方法】酸耐性は pH3 の MRS で 3 時間培養した後、生菌率を調べた。胆汁酸耐性は 1〜3% の bile salts (Oxoid 社) を含む MRS で培養し、その増殖速度より判断した。Caco-2 細胞への接着は細胞に付着した乳酸菌をグラム染色 (B & M) 法で染色することにより計測した。

【結果と考察】KW3110 株は酸処理後の生存率が 80% 以上と高く、また 2% bile salt 含有 MRS でも良好な生育を示すことから、胃酸および胆汁酸耐性が高いと考えられた。さらに Caco-2 接着性試験では、本株が *L. paracasei* としては例外的に高い接着能力を有しており、腸管への定着に有利な菌であることが示唆された。現在、ラットを用いて KW3110 投与による腸内菌叢への影響を検討するとともに、KW3110 株の Caco-2 接着因子についての、生化学的な解析を行っている。

【参考資料】

1) 井上ら、日本農芸化学会大会講演要旨集 p74 (2003)

Characterization of *Lactobacillus paracasei* KW3110 for use as probiotics

○Toshio Fujii¹, Keiko Nakashima¹, Daisuke Fujiwara¹, Hisakazu Iino²

(¹Kirin Brewery Co., Ltd. Central Laboratories for Key Technology, ²Showa Women's University)

Key words *Lactobacillus paracasei*, probiotics, allegy, Caco-2

H14-3 Comparative role of PCR cloned PHA synthase I and II genes from *Pseudomonas putida* KCTC1639 on mcl-PHA biosynthesis

Yong-Hyun Lee, ○Tae-Kwon Kim, Hyun-Dong Shin

(Dept. Genet. Eng., Coll. Nat. Sci., Kyungpook Natl. Univ., Korea)

A new PHA synthase cluster, composed of *phaC1* encoding PHA synthase I, *phaZ* encoding PHA depolymerase, and *phaC2* encoding PHA synthase II, was cloned from *Pseudomonas putida* KCTC1639 using the touchdown PCR, and the functional roles of PHA synthase I and II genes on the biosynthesis of mcl-PHA from various carbon sources were compared. The PCR cloned PHA synthase I and II genes were transformed separately into the PHA synthase negative mutant strain *R. eutropha* DSM541 to confirm the expression of PHA synthase I and II genes, and the activity of PHA synthase I was slightly higher than that of PHA synthase II. Two cloned *phaC1* and *phaC2* genes were transformed into the parent *P. putida* KCTC1639, and the PHA accumulation increased substantially after transformation of both PHA synthase I and II genes. To investigate the molecular characteristics and the function of PHA synthase I and II of *P. putida* KCTC1639, the monomer composition of PHA was analyzed after amplification of the PHA synthase I and II genes, respectively.

Comparative role of PCR cloned PHA synthase I and II genes from *Pseudomonas putida* KCTC1639 on mcl-PHA biosynthesis

Yong-Hyun Lee, ○Tae-Kwon Kim, Hyun-Dong Shin

(Dept. Genet. Eng., Coll. Nat. Sci., Kyungpook Natl. Univ., Korea)

Key words *phaC1* and *phaC2* genes, *Pseudomonas putida* KCTC1639, scl-PHA, mcl-PHA

H14-5 Metabolic pathway analysis of *pgi* knockout *Escherichia coli* for PHB production based on RT-PCR

○Mohiuddin Kabir, Kazuyuki Shimizu
(Kyushu Inst. Tech.)

The *pgi* knockout *E. coli* DF11/AeKG1 bearing plasmid for PHB synthesis, *pgi* knockout *E. coli* DF11 and control *E. coli* JM109 were grown under aerobic condition. Total cellular RNA was then isolated by Qiagen RNeasy Mini Kit (QIAGEN K. K.). The primers used in this study were synthesized at Hokkaido System Science Co. (Sapporo, Hokkaido) and RT-PCR reactions were carried out in TaKaRa Thermal Cycler (TaKaRa TP240) using Qiagen OneStep RT-PCR Kit. A total of 87 *E. coli* genes involved in central metabolic pathways and key regulatory mechanisms were investigated to understand transcriptional regulation. The results showed that PP pathway genes and part of EMP pathway genes were affected significantly by expression of *phb* genes in *E. coli* DF11/pAeKG1 as well as in *E. coli* DF11 compared with those in *E. coli* JM109. Most of the TCA cycle genes except *icdA* were downregulated in both *pgi* knockout *E. coli*. It was also found that *aceA* and *aceB* genes involved in glyoxylate shunt were upregulated in both *pgi* knockout *E. coli* while *ppc* gene was downregulated, indicating that *pgi* inactivation changes the anaplerotic pathway from *ppc* to glyoxylate shunt.

Metabolic pathway analysis of *pgi* knockout *Escherichia coli* for PHB production based on RT-PCR

○Mohiuddin Kabir, Kazuyuki Shimizu

(Kyushu Inst. Tech.)

Key words *pgi* knockout, *E. coli*, PHB, RT-PCR, gene expression, metabolism