

1pB15-5 *spo0A* 変異株の溶菌抑制に関する解析

○児玉 武子^{1,2}, 尾崎 克也¹, 関口 順一²
(¹花王・生物研, ²信州大・繊維・応生科)

グラム陽性桿菌である枯草菌*Bacillus subtilis*は、菌体外へのタンパク質分泌能力が高く、各種タンパク質生産用の宿主として広く用いられている。枯草菌MGF (Minimum Genome Factory) 研究開発プロジェクトは、枯草菌168株を題材とし、遺伝子組換え操作技術により、異種タンパク質の分泌生産に必要な遺伝子群を欠失させ、必要な遺伝子群を導入・強化する等、枯草菌ゲノムを大幅に改良し、酵素や異種タンパク質など有用タンパク質を効率的に生産できる宿主微生物細胞 (MGF) を創製することを目的としている。このプロジェクトから、胞子形成関連*spo0A*遺伝子の破壊変異株では、アルカリセルラーゼ (Egl-237) の生産性が野生株と比較して約1.6倍向上することが明らかとなった。しかし、培養50時間以降に著しい溶菌現象が観察された。培養25時間後の*spo0A*変異株について細胞壁溶解酵素のザイモグラムを行ったところ、*spo0A*変異株の細胞表層には主要な細胞壁溶解酵素CwlBを含め、いくつかの細胞壁溶解酵素が存在することが明らかとなった。そこで、*spo0A*変異株の*cwlB*および*sigD* (*cwlB*, *cwlE* および *cwlG* のシグマ因子)を破壊し、*spo0A*変異株の溶菌防止を試みた。本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託を受けて実施した。

Prevention of cell lysis in *spo0A* mutant

○ Takeko KODAMA^{1,2}, Katsuya OZAKI¹, Junichi SEKIGUCHI²
(¹Bio. Sci. Labs., Kao Corp., ²Dept. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, *spo0A*, cell wall lytic enzyme

1pB16-2 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニル及びサリチル酸代謝における制御因子 BphR1 及び BphR2 の機能解析

○藤原 秀彦¹, 松永 徹也¹, 古川 謙介²
(¹九大院・生資環, ²九大院・農)

【目的】*P. pseudoalcaligenes* KF707 株は染色体上にビフェニル代謝 (*bph*) 遺伝子群及び、サリチル酸代謝 (*sal*) 遺伝子群を有している。我々は先に KF707 株の *bph*, *sal* 遺伝子群の転写制御に関する *bphR1* と *bphR2* の 2 つの遺伝子を見出し、両遺伝子が *bph* 遺伝子群の転写を正に制御していること、*sal* 遺伝子群の転写については *BphR1* が負の、*BphR2* が正の制御を行っていることを明らかにした。そこで、今回は *BphR1* 及び *BphR2* について *bph*, *sal* 遺伝子群の転写制御について更なる知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】 精製 *BphR1* タンパク質及び *BphR2* タンパク質を用いて、*bphR1*, *bphA1* 及び *salA* のオペレーター領域に対して Gel shift 解析を行った。その結果、*BphR1* については *bphR1*, *salA* のオペレーター領域に対して、*BphR2* については *bphR1*, *bphA1* 及び *salA* のオペレーター領域に対してそれぞれ結合が認められた。この結果から、*bphA1A2(orf3)A3A4BC* の転写には *BphR2* のみが関与していることが明らかとなった。また、反応液に 0.5 mM の biphenyl, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate (HOPD), salicylate, hydroxymuconate semialdehyde, benzoate をそれぞれ加え、同様の反応を行ったところ、その結合に差異が認められたことからこれらの化合物がエフェクターとして機能していることが明らかとなつた。

Functional analysis of BphR1 and BphR2, transcriptional regulatory proteins of biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707

○ Hidehiko FUJIHARA, Tetsuya MATSUNAGA, Kensuke FURUKAWA
(Grad. Sch. Biore. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words biphenyl/PCB, bioremediation

1pB16-1 *Bacillus subtilis* のグルタミン酸ラセマーゼ変異株

の表現型解析：細胞生育及びポリ-gamma-グルタミン酸合成に及ぼす影響

○山本 真義, ○芦内 誠, 島内 和也, 松永賢一郎,
味園 春雄
(高知大・農・生資)

【目的】*Bacillus subtilis* の生理学上、D-グルタミン酸 (D-Glu) は特に重要である。今回、D-Glu 供給系変異株を作製しその特有の表現型について解析した。

【結果】*B. subtilis* は、2種のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子 *glr* と *ypc* を保持している。まず、*Δglr1* (*ypc* は維持)、*Δypc* (*glr* は維持) 及び *Δglr1 Δypc* (両遺伝子とも欠失) を作製し、富栄養培地 (LB) と最小培地 (SMM) で生育試験を行った。*Δglr1* と *Δglr1 Δypc* は LB 培地において 5 mg/ml という高濃度で D-Glu を要求した。SMM 培地では、*Δglr1* は D-Glu を要求しないが、*Δglr1 Δypc* の生育には D-Glu が必要であった。高濃度の L-Glu やカザミノ酸を添加した SMM 培地では、*Δglr1* の生育が著しく低下した。D-及び L-アラニンでの相補はなく、D-アミノ酸トランスアミナーゼ (YheM) の D-Glu 合成への関与は否定された。*B. subtilis* では、*Gl* が D-Glu 供給の主役であり、*Ypc* は L-アミノ酸制限のストレス環境下でその機能を発揮すると示唆された。一方、*Δglr2* は SMM 培地でも D-Glu 無添加では殆ど生育できない。*Δglr2* のポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) 合成酵素遺伝子 *pgsBCA* を破壊すると D-Glu 要求性が解除された。*glr* 変異株に *pgsBCA* 過剰発現ベクター pWPGS1 を導入したクローニング株を作製し、その生育及び PGA の合成量と立体化学性を調べ、*Gl* が PGA の主要基質 D-Glu の供給に関与しているとの結論を得た。

Phenotypic analysis of glutamate racemase-mutants of *Bacillus subtilis*: Effects on cell growth and poly-gamma-glutamate synthesis

○ Masayoshi YAMAMOTO, ○ Makoto ASHIUCHI, Kazuya SHIMANOUCHI, Ken'ichiro MATSUNAGA, Haruo MISONO
(Dept. Biore. Sci., Kochi Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, D-glutamate, glutamate racemase, poly-gamma-glutamate

1pB16-3 *Pseudomonas aeruginosa* の走化性遺伝子群の機能解析

○田中 宏英¹, 下城麻衣子¹, 黒田 章夫¹, 滝口 翼¹,
大竹 久夫², 加藤 純一¹
(¹広島大院・先端・生命機能, ²阪大院・工・応生工)

多くの細菌には走化性と呼ばれる行動的応答があり、化学物質の濃度勾配を感じてそれに集積したり、それから逃避したりする性質を持っている。自然水中や土壤などに広く生息し、環境微生物として重要な細菌である *Pseudomonas aeruginosa* PAO1株は26の走化性センサー (MCP) 様の遺伝子を有している。そこで本研究ではこの *Pseudomonas aeruginosa* PAO1株の MCP 遺伝子群の機能解析、特に走化性センサーとしての機能を網羅的に解明することを目的とした。*Pseudomonas aeruginosa* の26の MCP 遺伝子をすべて PCR で増幅し、大腸菌のプラスミドベクターにクローニングし、MCP ライブラリーを構築した。5つの MCP のうち主要な4つの MCP 遺伝子を欠損した大腸菌 KO607株に MCP ライブラリーを導入し、これら遺伝子が走化性トランスデューサーとして機能するか調べた。ミニスウォームアッセイにより走化性検定を行った結果、MCP 遺伝子 *tpl1* の導入によりペプトン走化性が相補されることを見い出した。そこで既にアミノ酸センサーとして、MCP の機能が明らかとなっている *pcaABC* の破壊株を用いて、*pcaABC* の四重破壊株を作成した。この破壊株を用いてスウォームアッセイを行ったところ、ペプトン走化性が弱まった。以上のことから、*tpl1* はペプトン中のアミノ酸以外の物質の感知に関与することが示唆された。

Functional analysis of methyl-accepting chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*

○ Hirohide TANAKA¹, Maiko SHITASHIRO¹, Akio KURODA¹, Noboru TAKIGUCHI¹, Hisao OOTAKE², Jyunichi KATO¹
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.,
²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words chemotaxis, transducer, signal transduction, *Pseudomonas aeruginosa*