

3D09-4 *Methylophilus methylotrophus* で L- リジン排出活性を発揮する LysE24 の機能解析と応用○郡司 義哉, 杉本 慎一, 伊藤 久生, 安枝 寿
(味の素発酵研)

【目的】偏性メチロトロフ *M. methylotrophus* を用いた L- リジンの生産においては、その細胞外への排出が重要であり、我々は既に本菌で L- リジン排出能を発揮する LysE24 を取得している。本研究では、この LysE24 の排出活性発現の機構について解析し、この因子を利用した *M. methylotrophus* による L- リジンの生産性改善を検討した。【方法・結果】 *lysE24* は本来の ORF 中にフレームシフト変異を持つため、その結果出現する停止コドンにより 123 アミノ酸からなる短絡型蛋白質(野生型 233 アミノ酸)をコードする遺伝子であると当初考えられた。この LysE24 の排出活性発現の機構を調べるため、まず *lysE24* を本来の宿主である *Corynebacterium glutamicum* に導入したところ野生型 *lysE* で見られるような L- リジン排出量の増加が観察されず、また *lysE24* 遺伝子上で塩基挿入により出現した停止コドン以降の領域を欠失させた遺伝子を *M. methylotrophus* に導入しても L- リジン排出活性を示さなかった。更に種々の部位特異的変異を *lysE24* に導入した解析からも、*lysE* 中に生じた停止コドン以降の領域も排出活性の発現に必須であることがわかった。このことより、*M. methylotrophus* 中で L- リジン排出活性を発揮する LysE24 は野生型 *LysE* とは構造が異なるユニークな蛋白質であると思われる。この *lysE24* 遺伝子と L- リジン生合成遺伝子との発現をトランスポゾンを用いた遺伝子増幅法にて強化すると L- リジンの蓄積量が向上した。

Analysis of LysE24 expressing L-lysine excretion in *Methylophilus methylotrophus* and its effect on the L-lysine production○Yoshiya GUNJI, Shin-ichi SUGIMOTO, Hisao ITO, Hisashi YASUEDA
(Ferment. Biotech. Lab., Ajinomoto Co.)**Key words** amino acid, methylotroph, lysine exporter, metabolic pathway modification**3D10-1** 偏性嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum* における酸素誘導性タンパク質の発見○川崎 信治, 石倉 淳, 綿村 祐介, 小野 順基,
武田 晃治, 新村 洋一
(東農大・応生科・バイオ)

【目的】我々は偏性嫌気性菌の好気生育阻害要因の解明を目的とし、代表的な偏性嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌を用いて研究を行っている。これまでの研究において *Clostridium* 属細菌が酸素代謝能力を有し、生育阻害要因に酸素代謝が深く関与することを推定している。本学会では、発酵工業の分野で広く研究されゲノム解読も完了している *C. acetobutylicum* DSM792(=ATCC824) 株を用いて微好気環境下での生理解析を行った結果、*Clostridium* 属細菌で初めて酸素誘導性タンパク質が発見されたので報告する¹⁾。

【方法と結果】*C. acetobutylicum* は酸素 1% の大気下でコロニーを形成できない偏性嫌気性菌であるが、微好気下での液体培養時には溶存酸素を消費しながら正常に生育する特徴を有していた。微好気環境下で生育中の菌からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動により解析した結果、酸素により顕著に発現が誘導されるタンパク質を数種類発見し、PMF解析により同定を行った。ノザン解析の結果、転写レベルで酸素により発現制御されることが明らかとなった。

1) Kawasaki et al. FEBS Letter, in press (2004)

Identification of oxygen-induced polypeptides in an obligatory anaerobe, *Clostridium acetobutylicum*○Shinji KAWASAKI, Jun ISHIKURA, Yusuke WATAMURA, Masaki ONO, Koji TAKEDA, Youichi NIIMURA
(Dept. Biosci., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)**Key words** anaerobe, Clostridium, oxygen stress, two dimensional electrophoresis**3D09-5** リジン発酵プロセスのプロテオーム解析○粕谷 聡, 多田 清志, 菅野 亨, 堀内 淳一
(北見工大)

【目的】バイオプロセスでは、培養経過中における微生物体内の代謝反応の変化を把握し、その菌体内挙動に応じた各制御策を実行することが有効である。そこで、本研究ではリジン発酵をモデルとして、二次元電気泳動を用いて種々の培養状態におけるタンパク質発現レベルの動態解析を行った。

【方法及び結果】菌株にはリジン生産菌である *Brevibacterium flavum* (ホモセリン要求株) を用い、初発グルコース濃度及びスレオニン濃度がそれぞれ 100g/L 及び 1.5g/L を含む培地を用いて回分培養を行った。このリジン発酵の培養状態を菌体内のタンパク質発現の観点から検討するために、種々の培養時期で得られた菌体サンプルを用いて二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動は菌体から抽出したタンパク質を二次元電気泳動装置 (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて分離し、銀染色によってタンパク質スポットを可視化し、二次元電気泳動マップを作成した。その結果、増殖期とリジン生産期においてタンパク質発現レベルが大きく変化することが明らかとなった。増殖期ではスレオニンの枯渇により菌体生合成に関連する代謝経路が働き、一方リジン生産期では協奏的フィードバック阻害が解除され、リジン生合成経路が主に働いたためと考えられる。今後、ペプチドマスフィンガープリンティングによって解析された *Corynebacterium glutamicum* のデータベースからタンパク質の同定を行い、菌体増殖期及びリジン生産期に働く代謝経路を決定する予定である。

Proteome analysis of lysine fermentation process based on two dimensional gel electrophoresis○Satoshi KASUYA, Kiyoshi TADA, Tohru KANNO, Jun-ichi HORIUCHI
(Kitami Inst. Technol.)**Key words** proteome, 2-D electrophoresis, lysine**3D10-2** Selection of genes having antioxidant function and effect of the gene expression on physiological property of *Escherichia coli* cultivated under oxidative stress○SunYoung KIM¹, Motomu NISHIOKA¹, Masahito TAYA¹, Shuhei HAYASHI², Hiroyuki HONDA², Takeshi KOBAYASHI³
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ³Dept. Biol. Chem., Chubu Univ.)

Objective ROS is normally generated in the cells with oxygen-associated metabolisms and is known to be a factor that raises cellular impairment. To clarify the protective function of several genes against oxidative stress, in this work, we investigated the effect of the gene products on the cultivation of *E. coli* under an oxidative condition.

Methods and Results Genes (*yfiD*, *yggB* and *yggE*) selected by DNA microarray analysis, which was achieved using mRNA sample prepared from SOD null *E. coli* cells with and without oxidative stress, was amplified by PCR and inserted into pUC 19 plasmid. The original pUC 19 (as control) and constructed plasmid DNAs were transformed into *E. coli* MM294 and the transformants were cultivated in M9 medium with paraquat. Maximum specific growth rates of the transformants were ca. 4 times higher than that of control cells. Besides, ROS contents in the cells expressing selected genes were lower compared with that of control cells (ca. 60 %), especially, the ROS content in *yggE* transformant cells was ca. 30 % of that in control cells. It is considered that *yggE* gene product has ROS-scavenging effect on cultivation of *E. coli* cells and thus reinforce cell growth.

Selection of genes having antioxidant function and effect of the gene expression on physiological property of *Escherichia coli* cultivated under oxidative stress○SunYoung KIM¹, Motomu NISHIOKA¹, Masahito TAYA¹, Shuhei HAYASHI², Hiroyuki HONDA², Takeshi KOBAYASHI³
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ³Dept. Biol. Chem., Chubu Univ.)**Key words** oxidative stress, *yggE* gene product, ROS content