

1Bp11 コリネ型細菌におけるヒドロ芳香族化合物質化遺伝子群の発現制御機構

○寺本 陽彦, 乾 将行, 湯川 英明
(RITE)

【背景・目的】ヒドロ芳香族化合物であるキナ酸／シキミ酸は、様々な微生物により炭素源・エネルギー源として利用される。その分解経路の初期段階は、芳香族化合物の生合成に関わるシキミ酸生合成経路と重なるため、細胞内外の環境に応じて厳密に制御される必要がある。我々は有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の代謝調節機構を解明するため、様々な物質代謝遺伝子の発現制御機構の解析を進めている。本研究では、この細菌におけるキナ酸／シキミ酸質化遺伝子群の発現解析を行った。

【実験方法・結果】キナ酸／シキミ酸デヒドロゲナーゼの遺伝子 (*qsuD*) の破壊株は、キナ酸またはシキミ酸を単一炭素源として生育できなくなることから、この酵素がキナ酸／シキミ酸分解経路の第一段階を触媒することが示唆された。*qsuD*はゲノム上で、プロトカテク酸までの分解に関与すると思われる他の3遺伝子とクラスター (*qsuABCD*) を形成している。*qsuABCD*遺伝子の発現がキナ酸／シキミ酸の存在下で誘導され、その発現制御に LysR タイプの転写因子 (QsuR) が関与することが示された。本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。

Regulation of expression of genes involved in hydroaromatic compounds utilization in *Corynebacterium glutamicum*

○Haruhiko TERAMOTO, Masayuki INUI, Hideaki YUKAWA
(RITE)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, quinate, shikimate, transcriptional regulation

1Bp12 コリネ型細菌の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現制御機構

○豊田 晃一, 寺本 陽彦, 乾 将行, 湯川 英明
(地球環境研)

【背景・目的】乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)はピルビン酸をNADH依存的に乳酸へ還元する酵素であり、生体内の酸化還元バランスの維持において重要である。我々是有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* における酸化還元バランスの調節機構の解明を目的として、LDHをコードする遺伝子*ldhA*の発現制御機構の解析を進めている。本研究では、*ldhA*の発現を制御する転写因子の同定及びその機能解析を行った。

【実験方法・結果】DNAアフィニティービーズを用いて*ldhA*プロモーター領域に結合するタンパク質を精製することにより、DeoR-typeの転写因子 SugRが単離された。*sugR*遺伝子の破壊株では野生株と比較して*ldhA*遺伝子の発現が上昇することが、定量 RT-PCR 及びプロモーター-レポーターアッセイにより示された。*in vitro*結合解析により、*ldhA*プロモーター上の SugR結合サイトを決定した。以上の結果から、SugRは*ldhA*の転写抑制因子として働くことが示された。本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。

Transcriptional regulation of the *ldhA* gene encoding L-lactate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*

○Koichi Toyoda, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa
(RITE)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, lactate dehydrogenase, transcriptional regulation

1Bp13 *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 のセレン酸還元関連遺伝子群の解析

○黒田 真史¹, 永野 公太¹, 三輪 恵美子¹, 清 和成¹, 惣田 訓¹, 山下 光雄², 池 道彦¹
(¹阪大院・工・環境・エネルギー, ²芝浦工大・工・応化)

【背景・目的】*Bacillus selenatarsenatis* SF-1は、セレン酸を不溶性の元素態セレンにまで還元する高い能力を持つ。これを利用したセレン含有排水のセレン除去・回収技術は、従来法に比較して低コスト、省エネルギーの画期的な技術となると期待される。SF-1株は嫌気呼吸によってセレン酸を亜セレン酸に還元する事が示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。SF-1株のセレン酸還元の仕組みを明らかにし、より高効率なセレン除去・回収技術の確立に役立てることを目的として、セレン酸還元に関する遺伝子の単離・解析を行った。

【実験方法・結果】SF-1株ゲノムへのトランスポゾンTn916のランダムな挿入により、セレン酸還元能欠損変異株を得た。この変異株のTn916挿入部位近傍のDNA配列を決定したところ、molybdopterin oxidoreductase、及びGGDEFドメインと相同性の高い配列を見出した。これらの配列から genome walking を行い、前者は3つのORF (*mpoABC*)、後者は2つのORF (*dcpA*, *mutT*) がそれぞれオペロンを形成していることが示唆された。これらをセレン酸還元能を持たない大腸菌変異株に導入したところ、*mpoABC*を導入した株はセレン酸還元能を示したが、*dcpA*, *mutT*を導入した株は変化がなかった。このことから*mpoABC*はセレン酸還元酵素遺伝子であると考えられる。また*dcpA*, *mutT*の機能に関しては現在検討中である。

Analysis of genes related to selenate reduction isolated from *Bacillus selenatarsenatis* SF-1

○Masashi KURODA¹, Kouta NAGANO¹, Emiko MIWA¹, Kazunari SEI¹, Satoshi SODA¹, Mitsuo YAMASHITA², Michihiko IKE¹
(¹Div. Sustain. Energy & Environ. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Appl. Chem., Shibaura Inst. Technol.)

Key words *Bacillus selenatarsenatis* SF-1, selenate reductase, molybdopterin oxidoreductase, transposon mutagenesis

1Bp14 シアノバクテリアのプロモーター強度の定量解析

○丸本 満彦, 長濱 一弘, 松岡 正佳
(崇城大・生物生命・応微工)

(目的) シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942は光独立栄養条件下での物質生産に有用な宿主である。しかし、環境条件に依存したPCC 7942 の全遺伝子のプロモーター強度の定量解析はほとんど行われていない。この研究ではプロモーター強度測定用のベクターを作成し、各種配列をクローニングして定量化を行うことを目的とした。

(方法) ホタルのルシフェラーゼ(luc)遺伝子はプロメガ社のpSP-luc+NFよりBglII-XhoI断片として取り出した。シャトルベクターとしてpUC303のSacI-XhoI部位間にリンカーを付加し、SD配列をもつ luc 遺伝子を連結して、プロモーター検索ベクターpLUC1を作成した。luc遺伝子上流側のSrfI部位に各種平滑化DNAを連結して大腸菌MOSblueを形質転換した。ルシフェラーゼ活性測定はFluoroskan Ascent FLを用いて行った。

(結果) ランダムDNAとして超音波処理したPCC 7942 GRPS1株の染色体DNA (~200 bp) をKlenow処理し、pLUC1をベクターとしてクローニングを作成した。対照として、シアノバクテリアのpsbAIプロモーター、大腸菌lacZプロモーターを正方向に連結したpLUC1-psbAI、pLUC1-lacZを作成した。これらを用いてGRPS1株を形質転換した結果、様々なルシフェラーゼ活性を示すクローニングが得られ、現在、高発現クローニングの解析を行っている。

Quantitative analysis of promoter strengths in cyanobacteria

○Mitsuhiko MARUMOTO, Kazuhiro NAGAHAMA, Masayoshi MATSUOKA
(Dept. Appl. Microbial Technol, Faculty of Biotechnol. and Life Sci., Sojo Univ.)

Key words luciferase, reporter, *Synechococcus elongatus*, promoter