

3P-1121 大腸菌の染色体 DNA への目的遺伝子の挿入と代謝工学への応用

○駒 大輔, 山中 勇人, 森芳 邦彦, 大本 貴士, 酒井 清文 (大阪市工研)

【背景および目的】大腸菌で目的遺伝子を発現させる場合には、プラスミドベクターがよく利用される。しかしながら、プラスミド（特に高コピー）は宿主株の代謝に異常な負荷をかけるために、代謝工学への利用には適さないと言われている。一方、目的遺伝子の染色体DNAへの挿入は、宿主株の代謝への負荷を低減する。加えて、プラスミド保持のための薬剤等も必要とせず、導入した遺伝子が安定して発現することが期待される。そこでステップワイズに目的遺伝子を大腸菌染色体DNAに導入するための手法を開発し、代謝工学への応用を試みた。

【方法および結果】FRT-Km-FRTフラグメントを導入したpET21またはpETDuetベクターを構築した。次に、作製したベクターに染色体DNAに挿入するための目的遺伝子を導入した。PCRでFRT-Km-FRTとその下流に配した目的遺伝子を増幅し、Red recombinaseとFlippaseを用いて、大腸菌染色体DNAの狙った位置にマーカースで目的遺伝子を挿入することに成功した（T7発現系）。染色体DNAに挿入した場合は目的遺伝子は1コピーしかないにもかかわらず、pETベクター（20-40コピー）を用いた場合の25-50%の発現量であった。次に、代謝工学への応用として、フェニルアラニン、チロシン、チラミンなどの芳香族化合物をターゲットとし、上記手法を用いて複数個の遺伝子を染色体DNAに挿入した。結果、pETベクターを用いた場合と比較して、各化合物の生産量は2-6倍に向上した。その要因のひとつとして、グルコースの代謝や菌株の生育が関与しているようであった。

A method for integration of genes into the chromosomal DNA of *Escherichia coli* and its application to metabolic engineering

○Daisuke KOMA, Hayato YAMANAKA, Kunihiko MORIYOSHI, Takashi OHMOTO, Kiyofumi SAKAI (Osaka Municipal Technical Res. Inst.)

Key words genome integration, *Escherichia coli*, plasmid, aromatic ring compound

3P-1123 アミノ酸生産菌における好氣的代謝経路の使い分けの GFP モニタリング

○杉山 貴彦, 青柳 真人, 坂本 順司 (九工大院・情報工・情報科学)

好氣的代謝経路の中心で働く呼吸鎖は、微生物では高等動物とは異なり、生物種や生育環境によって多様である。アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* の呼吸鎖も大きく異なる二つの電子伝達経路を持つ。メナキノン下流よりシトクロム *bcc* 複合体 (*qcr*) と *aa₃* 型シトクロム *c* 酸化酵素 (*cta*) の経路と *bd* 型キノーール酸化酵素 (*cyd*) の2つの経路に分岐している。これら2つの電子伝達経路は酸素分圧に応答し切り替わるが、その調節機構に関する知見は乏しい。そこで我々は各遺伝子の上流約400 bpとEGFPをプラスミド pVK6 上でつないだレポーターアッセイ株を構築し、分岐呼吸鎖酵素群のプロモーター活性を様々な増殖段階・培養条件でリアルタイムに解析してきた。

今回、培養条件として、酸素供給条件と共に、炭素源などの栄養条件も様々に変えて、呼吸鎖の発現調節をモニタリングした。グルコース、安息香酸を炭素源にした場合、*qcr*、*ctaD*、*cyd* のプロモーター活性が定常期後半にかけて低下した一方、酢酸では増加し、L-乳酸では各増殖段階で差は見られなかった。この結果より、分岐呼吸鎖の発現調節は炭素源の違いにより大きく影響を受けることが明らかとなった。次に *cta* の基質酸化部位および還元反応を触媒する複核中心に位置する銅を添加した条件でモニタリングした。硫酸銅を0.01 - 0.001 % (w/v) 添加すると、定常期前半で *cta* のプロモーター活性がコントロールと比較して1.49~1.99倍と顕著な増加が見られた。この結果から、銅添加により *cta* の発現が誘導されることが示唆された。

GFP - monitoring of switching between aerobic metabolic pathways in an amino - acid producing bacterium.

○Takahiko Sugiyama, Makoto Aoyagi, Junshi Sakamoto (Grad. Sch. of Comp. Sci., Kyushu Inst. Tech.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, Aerobic metabolism, Respiratory chain, GFP

3P-1122 枯草菌の抗酸化酵素多重遺伝子破壊株における細胞内代謝系の酸化損傷の解析寺村 憲一郎¹, 言上 智香², 西願 文哉¹, ○坂元 仁^{2,3}, 土戸 哲明^{1,2,3} (¹関西大・院・理工,²関西大・化生工・生命生物工,³関西大・先端機構)

【目的】多くの生物は活性酸素から自らの細胞を保護するため、染色体上には機能の重複する複数の遺伝子セットをもち、それらにコードされた抗酸化酵素群により厳重に防御されている。我々は枯草菌においてスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、有機ペルオキシド等の活性酸素種 (ROS) に対する防御因子をコードする遺伝子群の組合せの多重遺伝子破壊株を構築しており、これまでに熱や種々の薬剤に対する感受性化および耐性化現象を見出している。これらの株を酸化ストレス高感受性センサー細胞として用い、細胞内代謝系における酸化損傷箇所の特定を試みた。

【方法と結果】スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 群、カタラーゼ (CAT) 群、有機ペルオキシド耐性化因子 (ORG) 群のそれぞれの多重遺伝子破壊株とそれらの組み合わせた多重遺伝子破壊株を用いて最少培地にて培養したところ、SOD群よりもORG群の欠損で著しく増殖が阻害された。また、SOD CAT ORG群の多重遺伝子破壊は最少培地で増殖不可能となり、非必須遺伝子の必須遺伝子化現象が見出された。この現象はマンガンの添加では相補できなかったが、カザミノ酸の添加により増殖能が回復した。各アミノ酸の含有培地を用いて調査した結果、アミノ酸生合成系の中の酸化高感受性因子は、メチオニン生合成系およびグルタミン酸族の生合成系である可能性が示唆された。

Amino acid biosynthesis is inhibited by oxidative damage in *Bacillus subtilis* multiple antioxidant enzymes knockout mutantsKenichirou TERAMURA¹, Tomoka GONJYO², Fumiya SAIGAN¹, ○Jin SAKAMOTO^{2,3}, Tetsuaki TSUCHIDO^{1,2,3} (¹Grad. Sch., Sci. Eng., Kansai Univ.,²Dep. Life Sci. Biotech., Fac. Chem., Materials Bioeng., Kansai Univ.,³ORDIST, Kansai Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, oxidative stress, oxidative damage, multiple knockout

3P-1124 Effect of phosphate limitation and *phoB* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli*

○Kazuyuki SHIMIZU, Lolo Marzan (Kyushu Inst. Tech.)

[Objectives] *E. coli* controls phosphate (P) metabolism through Pho regulon, where PhoR-PhoB two-component system plays the central role. PhoR senses the environmental P concentration as a sensor kinase, and PhoB responds as a response regulator. The expressions of the genes under the control of the PhoR-PhoB in *E. coli* was found to be affected by the duration of P-limitation, which means that the role of the PhoR-PhoB system seem to be complex and highly interconnected with other regulatory circuits. In the present study, we investigated the effect of P-limitation on the metabolism in *E. coli*. The effect of *phoB* gene knockout on the metabolism was also investigated. [Methods and Results] *E. coli* BW25113 and its *phoB* gene knockout mutant (JW0389) were used. Batch and continuous cultivations were carried out using M9 synthetic medium, where P concentrations were changed. The gene expressions were measured by RT-PCR. The result indicates that the glucose up-take genes such as *ptsH*, *ptsG*, *pfkA* were up-regulated for the wild type under P-limitation as compared to P-rich condition. The *tktB* and *eda* genes were up-regulated for the *phoB* mutant in particular under P-limitation, thus those genes were repressed by *phoB* under P-limitation. Under P-rich condition, *arcA* gene expression of *phoB* mutant was down-regulated, and the TCA cycle genes were up-regulated, which caused the increased specific CER. Under P-limitation, *arcA* gene expression of *phoB* mutant increased and TCA cycle genes were down-regulated.

Effect of phosphate limitation and *phoB* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli*

○Kazuyuki SHIMIZU, Lolo Marzan (Kyushu Inst. Tech.)

Key words *Escherichia coli*, phosphate, metabolic regulation