

1P-005 大腸菌の新規 Cl 輸送体のイオン透過性

○豊田 隼斗¹, 浜本 晋¹, 小泉 卓也¹, 井原 邦夫², 斎藤 浩美³, 小林 弘³, 魚住 信之¹
 (¹東北大院・工, ²名大・遺伝研, ³千葉大院・薬研)
 uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

【背景・目的】陰イオン輸送体は、細胞内の浸透圧調節や膜輸送と情報変換に関わる重要な膜装置であるが、大腸菌において同定された陰イオン輸送体は現在でも限られており、未知な点が多い。そこで、大腸菌の新規陰イオン排出系の単離同定を目的に遺伝学的手法を用いて、新たな陰イオン輸送体遺伝子の単離を試みた。大腸菌野生株を遺伝子変異誘発剤によって処理した後、高濃度のNaClを含有した培地において生育することができないCl感受性変異株を単離した(WTD731)。

【方法・結果】WTD731の変異遺伝子はP1 transductionにより、Cl感受性変異を相補する遺伝子の同定を行い、野生型に部分的に回復を示す膜蛋白質をコードする遺伝子の単離に成功した。この輸送体の性質を詳細に調べるため、WTD731のCl以外の陰イオンへの感受性を検討した。pH8.6の0.5Mグルタミン酸含有培地を用いて37℃で培養したところ、WTD731は野生株と同様に増殖した。しかし、30℃で培養を行うとWTD731の生育が阻害された。これはWTD731がグルタミン酸の低温感受性であることを示しており、単離した輸送体はClの他にグルタミン酸を透過する輸送体であることを強く示唆している。また、他の部分に遺伝子変異が存在する可能性があったことから、野生株とWTD731の全遺伝子配列に関して次世代シーケンサーによる解析を行ったところ、上記以外の遺伝子に変異が生じていたがsilent mutationであった。このことは、初めの遺伝子の変異は、強いCl感受性を示す機能変異を誘発していることが推定された。

Identification of chloride transporter in *E. coli*

○Hayato Toyoda¹, Shin Hamamoto¹, Takuya Koizumi¹, Kunio Ihara², Hiromi Saito³, Hiroshi Kobayashi³, Nobuyuki Uozumi¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²Ctr. Gene. Res., Nagoya Univ., ³Grad. Sch. Pharm. Res., Chiba Univ.)

Key words transporter, membrane potential, *Escherichia coli*

1P-007 Inside-out membrane vesicle を用いた大腸菌のAla ニン排出輸送体 AlaE の活性評価

○金 世怜, 堀 初弘, 安藤 太助, 磯貝 恵美子, 米山 裕
 (東北大院・農・生物産業創成)
 yoneyama@bios.tohoku.ac.jp

これまでその重要性ならびに解析のし易さから多くの取り込み輸送体が同定され詳細な解析がなされてきた。しかしながら、研究の難しさから一次代謝産物の排出輸送体の研究は遅れていた。我々は最近、大腸菌のL-アラニン(Ala)排出能欠損変異株の分離に成功し、この変異を相補する新規遺伝子ygaWが大腸菌のAla排出輸送体(AlaE)をコードすることを初めて明らかとした。AlaEのAla排出活性を評価するために、野生株、AlaE欠損変異株($\Delta alaE$)、およびクローン化した $alaE$ 遺伝子を導入した形質転換体($\Delta alaE/pAlaE$)の各細胞内への放射性標識したAla($[^3H]Ala$)の取り込み能を評価した結果、 $\Delta alaE$ 株は野生株に比べ約2倍の $[^3H]Ala$ を取り込んだのに対し、形質転換体は野生株の約40%の取り込み量を示した。この細胞内への $[^3H]Ala$ の蓄積はAlaEがAla排出活性を有することを意味している。しかし、この結果はAlaの排出と取り込みの両活性を反映したものであることから、さらに詳細なAlaEの排出輸送活性を評価するために、 $\Delta alaE/pAlaE$ 株と $\Delta alaE$ 株のinside-out membrane vesicle (IO vesicle)を調整し $[^3H]Ala$ の取り込み活性を測定した。その結果、 $\Delta alaE/pAlaE$ 株より調整したIO vesicle内への $[^3H]Ala$ の蓄積はvesicle外Ala濃度依存的に上昇したが、 $\Delta alaE$ 株の場合Ala濃度に依存した蓄積はほとんど認められなかった。以上より、本研究で構築したIO vesicleを用いた評価系はAlaEの排出活性を検出できることが明らかとなった。

Evaluation of the activity of L-alanine exporter AlaE in *Escherichia coli* with inside-out membrane vesicle

○Seryoung Kim, Hatsuhiro Hori, Tasuke Ando, Emiko Isogai, Hiroshi Yoneyama
 (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words *Escherichia coli*, Inside-out membrane vesicle, Exporter, L-alanine

1P-006 *Eggerthella* sp. YY7918 株におけるダイゼイン-エクオール変換酵素系の解析

○川田 結花¹, 横山 慎一郎², 柳瀬 笑子³, 服部 正平⁴, 大島 健志朗⁴, 野村 泉¹, 鈴木 徹¹
 (¹岐阜大院・連農, ²岐阜産技セ・環化, ³岐阜大・応生科, ⁴東大院・新領域)
 s6103001@edu.gifu-u.ac.jp

エクオールは特定の腸内細菌により大豆イソフラボン的一种であるダイゼインを基質として生産される。その構造は女性ホルモンのエストロジオールに類似しているため、エストロゲンレセプターへの結合活性を示す。エクオールはダイゼインの約100倍の結合活性を示し、更年期の女性ホルモンの減少に起因する各種症状に効果を示すとして注目され、エクオールの研究が進んでいる。大豆食品より摂取されるダイゼインは、ダイゼインレダクターゼ、ジヒドロダイゼインレダクターゼ、テトラヒドロダイゼインレダクターゼの触媒する3段階の水素添加反応によってエクオールが生産される。我々はこれまでに、成人の糞便よりエクオール産生能を持つ*Eggerthella* sp. YY7918株を単離し全ゲノム配列の解析を行ってきた。*Eggerthella* sp. YY7918の全ゲノム配列の取得後3つのクラスター遺伝子E1、E2、E3をエクオール生産に関わる遺伝子群の候補とし組換え大腸菌を作製した。各遺伝子をクローニングし作成した組換え大腸菌において、関連する3つの酵素の発現を確認することができた。組換え大腸菌及び組換え酵素において、エクオール及び中間代謝物質が生産されていることを確認した。現在、組換え大腸菌の精製酵素を用いてその諸性質の解析を行っている。

Analysis of for Daidzein-to-equal Conversion system in *Eggerthella* sp. YY7918

○Yuika Kawada¹, Shin-ichiro Yokoyama², Emiko Yanase³, Masahira Hattori⁴, Kenshiro Oshima⁴, Izumi Nomura¹, Tohru Suzuki¹
 (¹United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., ²Ind. Technol. Center, Gifu Pref. Gov., ³Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., ⁴Grad. Sch., Frontier Sci., Tokyo Univ.)

Key words bacteria, soybean, NAD(P)H, equal

1P-008 *Zymomonas mobilis*におけるクエン酸回路欠損遺伝子がエタノール生産に及ぼす影響

○加藤 剛士, 林 毅
 (別府大院・食栄研)
 hayashi@nm.beppu-u.ac.jp

これまでエタノール発酵菌*Z. mobilis*において、呼吸欠損株の単離に初めて成功した。この呼吸欠損株は好気条件において増殖能とエタノール生産性が著しく上昇したことから、呼吸鎖は、好気条件では増殖の阻害因子として働くことが明らかとなった。この表現型から、*Z. mobilis*にとって呼吸鎖は一見不要なものと思われるが、進化の過程で淘汰されずに保存されていることから、呼吸鎖には呼吸以外の別の生理機能があるのではないかと予想される。従って我々は現在、呼吸鎖の生理機能の解析を進めている。*Z. mobilis*野生株は酵母菌とは異なり、好気条件下ではほとんど増殖できない。そのメカニズムは独特で、クエン酸回路において2つの遺伝子(*mdh*, *kdh*)が欠損し機能しておらず、細胞内のNADH量が乏しい。従って好気条件下では呼吸鎖とエタノール発酵の間でNADHの奪い合いが生じ、その結果、アセトアルデヒドが蓄積し、増殖能が著しく低下する。本研究では、NADH量を基に代謝の観点から呼吸鎖機能を解析するために、野生株にクエン酸回路で欠落している遺伝子を導入することでクエン酸回路を機能させ、これらがエタノール生産に及ぼす影響について評価を試みている。まず、*mdh*(大腸菌由来)を野生株の導入を行った。表現型を解析した結果、NADHの供給量が増えたにもかかわらず、好気条件下では増殖能とエタノール生産量が変化しないかむしろ減少する傾向があった。詳細は現在解析中である。また*kdh*に関しては現在クローニング中であり、本学会では*kdh*がエタノール生産に及ぼす影響についても加えて報告したい。

Effects of ethanol productivities with deficient genes of tricarboxylic acid cycle in *Zymomonas mobilis*

○Tsuyoshi Kato, Takeshi Hayashi
 (Grad. Sch. Food Sci. Nutri., Beppu Univ.)

Key words *Zymomonas mobilis*, ethanol fermentation, respiratory chain, tricarboxylic acid cycle