

1P-164 細菌由来メバロン酸経路遺伝子群を利用した大腸菌におけるテルペン基本代謝のパスウェイエンジニアリング

○千田 大樹¹, 播本 孝史², 岡本 賢治¹, 築瀬 英司¹, 原田 尚志¹
 (¹鳥取大・工・生応工,²神戸天然物化学)
 harada@bio.tottori-u.ac.jp

<研究背景>

テルペン化合物は、これまでに植物や微生物等から約4万種類が単離されており、自然界で最も複雑かつ多様な化合物群である。その多くは化学合成が困難かつ天然賦存量が稀少なことから、植物や微生物を利用した、バイオテクノロジーによるテルペン化合物の効率的生産技術の開発が期待されている。これまでの研究により、本来非メバロン酸(MEP)経路のみを有する大腸菌に対して放線菌や酵母由来のメバロン酸(MVA)経路遺伝子群を導入する試みにより、テルペン生産能が十倍以上向上することを報告している。本研究では細菌由来のMVA経路遺伝子群に注目し、その機能比較と最適化を行うことにより、既存生産系よりも高効率な生産システムの開発を目指した。

<方法・結果>

MVA経路を有する7種の細菌について、ゲノム配列情報を基にMVA経路遺伝子群のPCRクローニングを行った。これらの遺伝子群を用いて、*in vitro*相同組換え法により各種MVA経路遺伝子群発現プラスミドを構築し、モデルテルペン化合物であるリコペン量を指標として機能評価を行った。その結果、3種の細菌由来のMVA経路遺伝子を導入した場合において、既存の生産系と比較して最大で3倍程度生産量の増加が確認された。本研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施された。

Pathway engineering of the basic terpene biosynthesis in *Escherichia coli* using gene clusters for the mevalonate pathway from several bacterial species

○Daiki Senda¹, Takashi Harimoto², Kenji Okamoto¹, Hideshi Yanase¹, Hisashi Harada¹
 (¹Dept. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Tottori Univ., ²KNC Laboratories)

Key words pathway engineering, mevalonate pathway, terpenoid, carotenoid

1P-166 アデニン添加によるブタノール発酵性 *Clostridium* 属細菌の至適発酵温度の向上

○清 啓自, 川嶋 草平, 門倉 利守, 中里 厚実, 中山 俊一
 (東農大院・農・醸造)
 s3nakaya@nodai.ac.jp

【背景】

我々はこれまでに高温性セルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* および中温性ブタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4(以下N1-4)の混合培養によるセルロースからのブタノール生産系の構築に成功している。しかし、セルラーゼの活性温度は高温なのにに対し、本培養系は大半を30℃で行うためセルロース分解能の低さがブタノール生産の律速となっている。一方で、N1-4のブタノール発酵は熱耐性が低く、37℃では30℃の30%以下となる。そのため、混合培養系のブタノール生産性向上にはより高温でもN1-4が高ブタノール生産を行う必要がある。そこで、本研究ではN1-4の温度上昇によるブタノール生産性低下の要因を解明し、混合培養系の培養温度上昇によるブタノール生産性向上を目的とした。

【方法・結果】

30℃および37℃にて培養したN1-4をメタボローム解析に供した。その結果、30℃と比較して37℃では解糖系上流が停滞し、その下流の代謝物量も総じて減少する傾向にあった。また、代謝核酸、アミノ酸、NADなど菌体の生育や増殖の必須物質も減少していた。そこで、不足していた代謝物の中でも特にアデニンを250 mg/L添加して37℃で培養した結果、菌体量は2倍以上に上昇し、ブタノール生産量も添加無しでは3.5 g/Lなのに対して8.5 g/Lに上昇した。また、アデニン添加により39℃までブタノール生産量は有意に向上した。以上より、生育に必須の代謝物を増強することで高温でも高ブタノール生産が可能であることが明らかとなった。

Addition of adenine improves optimum fermentation temperature in butanol producing clostridia

○Keiji Kiyoshi, Sohei Kawashima, Toshimori Kadokura, Atsumi Nakazato, Shunichi Nakayama
 (Dept. Ferment. Sci., Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words butanol, *Clostridium*, thermotolerance, metabolic analysis

1P-165 ジペプチドによる大腸菌の生育阻害機構の解析

○田中 佑樹, 板谷 佳織, 岩井 伯隆, 和地 正明
 (東工大院・生命理工・生物プロセス)
 mwachi@bio.titech.ac.jp

近年、枯草菌から無保護のアミノ酸2つを結合させるL-アミノ酸リガーゼが発見され、これを利用したジペプチドの発酵による生産法が開発された。この酵素を大腸菌で発現させ、ジペプチドの分解を担うペプチダーゼの遺伝子群を欠損させることにより、Ala-Gln生産菌が作出された。しかし、ペプチダーゼを欠損させた株(Apeps株)はAla-Glnを含むグルコース最少培地(Ala-Gln培地)で生育が著しく抑制された。本研究ではAla-GlnによりApeps株の生育阻害が引き起こされるメカニズムを明らかにすることを目的とした。Ala-Glnによる生育阻害は、カザミノ酸の添加またはジペプチド取り込み系Dppの欠失によって回復された。これらよりApeps株はDppにより培地中のAla-Glnを取りこむが、ペプチダーゼの欠損によりAla-Glnを分解できず、菌体内に蓄積したAla-Glnがアミノ酸生成系に影響を及ぼし、生育阻害を引き起こされると考えられた。そこでサルモネラ属細菌において、複数のアミノ酸生成系遺伝子を制御することが報告されているGcvB small RNAに注目した。GcvB sRNAまたはRNAシャペロンHfqタンパク質の欠損によりApeps株のAla-Gln培地での生育が回復した。さらにGcvB sRNAの転写制御因子GcvAタンパク質をApeps株で欠損させることでもAla-Gln培地での生育が回復した。これらの結果より、菌体内に蓄積したAla-GlnはGcvAおよびGcvB sRNAを介してアミノ酸生成を抑制し、生育阻害を引き起こすことが示唆された。

Analysis of the mechanism of bacterial growth inhibition by dipeptide

○Yuki Tanaka, Kaori Itaya, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi
 (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words dipeptide, growth inhibition, GcvB

1P-167 焼酎粕のアルコール除去での酢酸菌の培養における振とうおよび消泡剤の影響

○多賀 直彦¹, 岩下 小太郎², 小林 直幹¹, 三好 清胤¹, 桃田 聖孝³, 村田 達郎⁴, 芝田 猛³, 荒木 朋洋¹, 安田 伸¹, 松田 靖⁴, 本田 憲昭⁵
 (¹東海大・農・バイオ, ²東海大院・農, ³東海大・農・応動, ⁴東海大・農・応植, ⁵東海大・農・農教実)
 ntaga@agri.u-tokai.ac.jp

紫芋を原料とする焼酎の焼酎粕は、食品機能性成分であるアントシアニン色素を豊富に含んでおり、飲料やサプリメントとしての応用が期待される。まず、紫芋焼酎粕を原料とする飲料を開発したが、固形分が残存するとともに焼酎粕使用率は低かった。次に、清澄かつ焼酎粕使用率の高い新たな飲料の開発を目的として、蕨田式濾過圧搾機による固液分離、および、焼酎粕液分中の1%弱のエタノールを酢酸発酵で完全除去する方法を確立した。本研究は、酢酸菌の培養における振とうおよび消泡剤の影響について検討した。紫芋焼酎粕は、本格焼酎“阿蘇之魂”の焼酎粕を使用し、酢酸菌は*Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283株を用いた。バッフルフラスコ培養で、振とうの制御により、消泡剤を用いずに良好に酢酸菌が増殖した。

Effects of shaking and antifoam of acetic acid bacteria culture for alcohol removal of shochu distillery wastewater

○Naohiko Taga¹, Kotarou Iwashita², Naoki Kobayashi¹, Kiyotsugu Miyoshi¹, Kiyotaka Kabata³, Tatsuro Murata⁴, Takeshi Shibata³, Tomohiro Araki¹, Shin Yasuda¹, Yasushi Matsuda⁴, Kenshou Honda⁵
 (¹Dept. Biosci., Sch. Agric., Tokai Univ., ²Grad. Sch. Agri., Tokai Univ., ³Dept. Anim. Sci., Sch. Agric., Tokai Univ., ⁴Dept. Plant Sci., Sch. Agric., Tokai Univ., ⁵Cent. Agri. Edu., Tokai Univ.)

Key words shochu distillery wastewater, acetic acid, ethanol, fermentation