

3P-209 ビルビン酸と酢酸を効率的に利用するために改良した代謝トグルスイッチによる IPA 生産性の向上

○山路 大樹, 相馬 悠希, 花井 泰三
(九大院・農)
taizo@bbs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】これまで我々は、誘導剤の添加により目的遺伝子の発現の ON/OFF を切り替えることができる代謝トグルスイッチを構築し、組換え大腸菌におけるイソプロパノール (IPA) 生産性の向上に成功した¹⁾。これは、IPA 生産と TCA 回路が同じアセチル CoA を利用する競合関係にあることに着目し、代謝トグルスイッチで培養途中に TCA 回路を ON から OFF、IPA 生産を OFF から ON に制御することで競合関係を効率的に解消している。しかし、ビルビン酸と酢酸が余剰に蓄積するという問題点が存在した。そこで本研究では、これらの蓄積物をアセチル CoA に変換するために、大腸菌由来の *poxB* 遺伝子で構成される *p.a.* 経路を新たに構築した。そして *p.a.* 経路を代謝トグルスイッチによる TCA 回路の制御と同時に OFF から ON に制御することで、ビルビン酸と酢酸をアセチル CoA に変換し、IPA 生産性を向上させることを目的とした。

【方法・結果】IPA 生産のための代謝トグルスイッチでは、アセチル CoA から TCA 回路への流入経路を触媒する酵素遺伝子 *gluA* の発現を ON から OFF に制御することで、TCA 回路を制御している (*gluA* 制御株)。本研究では、ビルビン酸を酢酸に変換する酵素遺伝子 *poxB* と酢酸をアセチル CoA に変換する酵素遺伝子 *acs* の発現を OFF から ON に制御する *gluA-p.a.* 制御株を構築した。この菌株を、炭素源としてグルコース、窒素源としてカザミノ酸を添加した M9 培地にて回分培養を行った結果、*gluA-p.a.* 制御株は、*gluA* 制御株と比較し IPA の生産量と生産速度が向上し、ビルビン酸と酢酸濃度の減少が確認された。¹⁾ Soma et al., *Metab. Eng.*, 23:175-184, 2014

Improvement of IPA Production by a Modified Metabolic Toggle Switch for Utilization of Pyruvate and Acetate

○Taiki Yamaji, Yuki Soma, Taizo Hanai
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words metabolic toggle switch, isopropanol, synthetic pathway, *Escherichia coli*

3P-211 遺伝子高発現による表現型変化をスクリーニングするための形質転換微生物アレイの開発

○林 修平, 中島 澁貴, 中嶋 駿, 塩入 祐太郎, 山本 進二郎, 塩谷 裕明, 宮坂 均
(崇城大・生物生命)
shayashi@life.sojyo-u.ac.jp

【背景と目的】DNA マイクロアレイの開発を契機に、様々な生体分子 (タンパク質や抗体など) をアレイ状に配列し、相互作用などの解析を網羅的に行う手法が開発されてきた。その中で、アレイ状に配列された外来遺伝子をその場で動物細胞に導入するリバーストランスフェクション法に代表される、細胞をアレイ状に配列して網羅的解析を行う技術が開発された。本研究では、その技術を微生物に適応させた形質転換微生物アレイの開発と、それを用いて有機溶媒耐性を向上させる表現型をもたらす遺伝子のスクリーニングを試みた。

【方法】ニトロセルロースメンブレン上にプラスミドをアレイ状に配置し、コンピテント化した大腸菌をその上から配置し、その場で形質転換を行った。形質転換後、有機溶媒を重層し、コロニー形成が見られるかどうかで有機溶媒耐性を向上しているかどうか評価した。

【結果と考察】メンブレン上での形質転換の条件 (プラスミドの濃度やヒートショックの温度や時間) に関して検討を行い、条件を決定した。また、その方法により、有機溶媒との接触で遺伝子発現量が増加する遺伝子群や酸化ストレス、浸透圧ストレスに関与する遺伝子など 16 種類の遺伝子に対して、有機溶媒耐性を向上させる表現型をもたらすかどうか評価した。既に有機溶媒耐性を向上させると報告されている遺伝子以外に、いくつかの遺伝子で有機溶媒耐性を向上させる可能性があることが示唆された。

Development of transformation bacteria array for screening phenotype changed by a high-expressed gene

○Shuhei Hayashi, Koki Nakashima, Shun Nakashima, Yutaro Shioiri, Shinjiro Yamamoto, Suteaki Shioya, Hitoshi Miyasaka
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words transformation, bacteria array, phenotype, organic solvent

3P-210 スイゼンジノリの効率的培養操作条件の検討

○栗山 裕美子, 山本 進二郎, 林 修平, 宮坂 均
(崇城大院・工・応生命)
miyasaka@life.sojyo-u.ac.jp

【目的】スイゼンジノリは湧泉などのきれいな水の中でのみ生育するラン藻であり、レアメタルを吸着するサクランも合成する。スイゼンジノリの増殖速度は小さい上に、常に大量の湧水を使うため、高い養殖コストとなっている。本研究では、サクラン生産とともにスイゼンジノリを効率的に培養する条件操作の確立を目指して、様々な培養条件の影響を検討した。

【方法】スイゼンジノリ (丹誠堂恵贈) を用いて次の培養条件で培養し、スイゼンジノリの増殖とサクラン合成に及ぼす培養条件の影響を検討した。0 ~ 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ の光合成有効量子束密度、リンや窒素の培地成分濃度、培地交換頻度などの条件を変えて、増殖量とサクラン合成量を測定した。スイゼンジノリの重量は湿重量を、サクランはアルカリ抽出法によって合成量を測定した。

【結果】0 ~ 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ の光合成有効量子束密度で所定の頻度で培地交換をする培養を行なったところ、どの条件においてもスイゼンジノリの増殖は見られず、湿重量とサクラン量は経時的に減少することが観察された。しかし、高い照度ほど、これらの減少速度を抑制することが認められた。また、培地交換頻度を大きくすることも、スイゼンジノリの湿重量やサクラン量の維持に有効なことが示唆された。

Culture conditions for efficient growth of *Aphanothece sacrum*

○Yumiko Kuriyama, Shinjiro Yamamoto, Shuhei Hayashi, Hitoshi Miyasaka
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

Key words cyanobacteria

3P-212 量子ドットナノプローブを用いたアミロイド β 凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニングシステム

○徳楽 清孝, 上井 幸司
(室蘭工大院・工・環境創生工)
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景と目的】アルツハイマー病の発症には脳内におけるアミロイド β ($\text{A}\beta$) の凝集が関与しているため、 $\text{A}\beta$ 凝集阻害物質が病気の治療や予防に有用である。最近我々は量子ドットナノプローブを用い、蛍光顕微鏡下で $\text{A}\beta$ 凝集過程の可視化に成功した。本研究では、この可視化法を凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング用に最適化し、52 種類の香辛料および 11 種の海藻の EtOH 抽出物に対し網羅的スクリーニングを行った。

【方法】量子ドット (QD) と $\text{A}\beta$ を化学的に架橋し量子ドットナノプローブ (QDA β) を作成した。5 μl のサンプル溶液 (段階的に希釈した抽出物、30 μM $\text{A}\beta$, 30 nM QDA β , 5% EtOH, 3% DMSO, 1xPBS) を 1536 ウェルプレートに注入し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間インキュベート後、形成した $\text{A}\beta$ 凝集体を蛍光顕微鏡で撮影した。凝集体量を蛍光画像中心部の 100 x 100 pixels の明るさの標準偏差 (SD) 値から推定し、得られた凝集阻害曲線から 50% 効果濃度 (EC_{50}) を算出した。

【結果と考察】1536 ウェルプレートを用いることで、5 μl の微量で $\text{A}\beta$ 凝集体量を定量化し、凝集阻害活性を EC_{50} 値として数値化することに成功した。52 種類の香辛料 EtOH 抽出物の $\text{A}\beta$ 凝集阻害活性を評価したところ、シソ科香辛料が高い凝集阻害活性を示すこと、またその活性本体はロスマリン酸であることが明らかとなった。さらに 11 種の海藻について凝集阻害活性を評価したところ、EtOH 抽出物の EC_{50} 値はシソ科植物の 100 倍程度と活性は低かったが、熱水抽出物はシソ科植物に匹敵する阻害活性を示した。

A microliter-scale high-throughput screening system for amyloid- β aggregation inhibitors using quantum-dot nanoprobe

○Kiyotaka Tokuraku, Koji Uwai
(Div. Sustain. Environ. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words amyloid, amyloid fibril, aggregation, screening