

1P-105 新規経路による桂皮酸の微生物生産

○小林 祐太¹, 榊尾 俊介², 高谷 直樹²
 (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系)
 takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】桂皮酸 (CA) は、化成品や香料等の原料として幅広く用いられており、産業上重要な化合物である。現在、CA はベンズアルデヒドと無水酢酸を原料として工業生産されている (パーキン反応) が、これらを再生可能な資源であるバイオマス由来の生産に置換していくことは重要である。一般的な CA の発酵生産では、CA はフェニルアラニンアンモニリアーゼによってフェニルアラニンから変換され生成される。一方、*Clostridium sporogenes* の *fldABCI* オペロンはフェニル乳酸 (PhLA) から CA を生成する反応に関わる。そこで、本研究では、*Escherichia coli* を宿主として用い、*fldABCI* を用いて、グルコースを原料とした CA の発酵生産システムを開発することを目指した。

【方法・結果】フェニルアラニン高生産菌である *E. coli* NST37 (DE3) に *fldABCI* を導入して得られた形質転換体を用い、PhLA を基質として休止菌体反応を行った。その結果、供給した PhLA から CA が生産されたが、その生産効率は従来の経路よりも低いものであった。そこで、発現ベクターの組み合わせや反応の通気条件を検討することにより、最適な条件下で対 PhLA 収率を 90% にまで改善できた。さらに、PhLA 発酵生産系と組み合わせ、グルコースから PhLA を中間体として CA を生産する方法を検討した。PhLA 発酵生産菌を培養し培地中に PhLA を生産させた後、得られた培地を用いて *fldABCI* 組換え菌を培養した場合の CA 生産効率は低かった。また、この培地から PhLA を粗製精し、これを基質に用いて培養または休止菌体反応を行った場合の CA の対 PhLA 収率は 40% であった。

1. 第 66 回日本生物工学会大会 講演要旨集 p. 127

Novel biosynthetic pathway of cinnamic acid fermentation

○Yuta Kobayashi¹, Shunsuke Masuo², Naoki Takaya²
 (¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Faculty Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words cinnamic acid, bioconversion, fermentation, *Escherichia coli*

1P-106 大腸菌の陰イオン感受性変異株の単離と陰イオン耐性遺伝子の同定

○菅原 慶太¹, 早坂 俊亮¹, 浜本 晋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・遺伝子実験施設, ³千葉大院・薬)
 uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

【背景・目的】微生物の環境変化への初期反応で細胞内イオン濃度は調節される。私達は、大腸菌の陰イオン耐性遺伝子の単離と同定を試み、複数の Cl 感受性変異株を単離し、その一つは機械的刺激感受性チャンネル遺伝子であることを報告した (2013 年本大会)。今回、同様の手法によって得た未解析の Cl 感受性変異株の解析と原因遺伝子の同定を行った。

【方法・結果】大腸菌の野生株 Ymel を変異原で処理した後、弱アルカリ性の高濃度の Cl 環境で生育しない Cl 感受性変異株を単離し、変異株 E10 と命名した。pH8.6 の 0.5M Cl 培地で培養したところ、野生株は生育したが、E10 は 0.5M Cl 培地でその生育は阻害された。次に E10 の変異遺伝子を同定するために、野生株と E10 の全ゲノム配列の解読と比較を行ったところ、61 個の遺伝子にアミノ酸置換が生じる変異が見つかった。これらの遺伝子の単一遺伝子欠損株と野生株の増殖を 0.5M Cl 培地で比較して増殖速度が低下する欠損株の探索を行った。その結果、 $\Delta cpxA$, $\Delta mrcB$, Δrmp , $\Delta cyaA$, $\Delta tatC$ の 5 つの株で増殖の低下が見られた。次に、それぞれの単一遺伝子欠損株に各遺伝子を再導入して増殖速度を指標に確認を行ったところ、 $cpxA$, $mrcB$, $cyaA$ 再導入株において生育が相補した。また、0.8M マンニトール培地で増殖試験を行った結果、 $\Delta cpxA$ と $\Delta cyaA$ は生育したが、 $\Delta mrcB$ は生育しなかった。以上より、 $cpxA$ と $cyaA$ は高濃度の陰イオンへの耐性、 $mrcB$ は浸透圧耐性に関わっていることが推察された。

Identification of anion tolerance gene in *E. coli*

○Keita Sugawara¹, Shunsuke Hayasaka¹, Shin Hamamoto¹, Kunio Ihara², Hiromi Saito³, Hiroshi Kobayashi³, Nobuyuki Uozumi¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²Gene. Nagoya Univ., ³Grad. Sch. Pharm., Chiba Univ.)

Key words stress resistance, cell wall protein, ion homeostasis, chloride ion

1P-107 大腸菌 GAD 欠損変異株の高圧二酸化炭素ストレス応答

田上 峻, 松藤 寛, 古川 壮一, ○森永 康
 (日大・生資料)
 morinaga@brs.nihon-u.ac.jp

【目的】大腸菌の Glutamate decarboxylase system (GAD) の欠損変異株では、野生型株 (WT) に比べ、L-Glu 存在下での高圧二酸化炭素 (HPC) 耐性が低下するのに対し、L-Lys 存在下での HPC 耐性が高まることをこれまでに報告してきた。本研究では、GAD 欠損変異株の L-Lys による HPC 耐性向上の機序を解析した。

【方法】*E. coli* K12 BW25113 (WT) とその GAD 欠損変異株 ($\Delta gadAB$) を HPC 処理装置 (AKICO 社製) で 3 MPa・37℃・30 min 処理した。1mM の L-Glu・Na または L-Lys・HCl 存在下で HPC 処理後、生成した GABA および Cadaverin (CAD) を UPLC-MS/MS で定量し、生成活性を解析した。また、HPC 処理菌体より mRNA を抽出、Real time PCR で Lys 脱炭酸系遺伝子 (*cadA* および *ldcC*) の発現量を解析した。

【結果】GAD 欠損変異株の HPC 処理条件下における GABA 生成活性は WT の 1/20 に低下していたが、CAD 生成活性は WT の 1.2 倍に上昇していた。また、HPC 処理前の *cadA* および *ldcC* の発現量は GAD 欠損変異株と WT で差が認められなかったが、処理後の GAD 欠損変異株の *cadA* 発現量は WT の約 10 倍と高い値を示した。以上の結果より、GAD 欠損変異株 ($\Delta gadAB$) は、HPC ストレスに応答して *cadA* を高発現させ、GAD 機能を補完することが示唆された。

Response of *E. coli* GAD deletion mutant on high pressure carbon dioxide stress

Syun Tagami, Hiroshi Matufuji, Soichi Furukawa, ○Yasushi Morinaga
 (Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

Key words *Escherichia coli*, carbon dioxide

1P-108 大腸菌のビルビン酸脱水素酵素複合体制御因子 PdhR 欠損変異株での 1,3-ブタンジオール生産

○片岡 尚也¹, Vangnai Alisa S.², 薬師 寿治¹, 加藤 純一³, 和田 大⁴, 横田 篤⁴, 松下一信¹
 (¹山口大・農, ²チュラロンコン大, ³広島大院・先端物質, ⁴北大院・農)
 nkataoka@yamguchi-u.ac.jp

【背景・目的】PdhR は、ビルビン酸脱水素酵素複合体をコードする *pdh* オペロンの負の転写制御因子である。そのため *pdhR* 欠損変異株では、ビルビン酸の酸化的脱炭酸の活性化によるアセチル CoA 及び NADH 供給の増大が期待される。本研究では、アセチル CoA を重要中間体として還元的に生成される有用物質生産に *pdhR* 欠損変異株を利用することを目的として、アセチル CoA 以降 3 段階の還元反応により生成される 1,3-ブタンジオール生産の検討を行った。

【方法・結果】アセチル CoA から 1,3-ブタンジオールを生産するために必要な 3 つの遺伝子 *Ralstonia eutropha* 由来 *phaAB* 及び *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 由来 *bld* を大腸菌 BW25113 *lacI^q* 株 (親株) 及び BW25113 $\Delta pdhR$ *lacI^q* 株 ($\Delta pdhR$ 株) に導入した。*pdhR* 欠損変異が 1,3-ブタンジオール生産に及ぼす影響を評価するべく、様々な酸素供給条件におけるグルコースを含む生産培地での発酵試験を行った。その結果 $\Delta pdhR$ 株は、酸素供給量が高い条件においては親株と同等の収量・生産速度を示す一方で、酸素供給量の低い条件においては親株に比べ顕著に高い収量・生産速度を示した。現在、1,3-ブタンジオール合成代謝経路を構築された $\Delta pdhR$ 株で起こる特異な代謝制御機構が存在するか解析を進めている。

1,3-Butanediol production in a pyruvate dehydrogenase complex regulator-defective mutant of *Escherichia coli* constructing 1,3-butanediol synthetic pathway

○Naoya Kataoka¹, Alisa S. Vangnai², Toshiharu Yakushi¹, Junichi Kato³, Masaru Wada⁴, Atsushi Yokota⁴, Kazunobu Matsushita¹
 (¹Fac. Agric., Yamaguchi Univ., ²Chulalongkorn Univ., ³Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ⁴Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Escherichia coli*, 1, 3-butanediol, pyruvate dehydrogenase complex regulator