

1P-109 バタノール生産菌におけるアデニン添加高温培養時の解糖系遺伝子群の転写解析

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

＜背景・目的＞ 至適発酵温度が30℃の高バタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (以下N1-4) は温度感受性が高く、37℃では菌体増殖量とバタノール生産量は共に30℃に対して30%以下に低下する。これまでに培養液中へアデニンを添加することで増殖、バタノール生産量が37℃でも30℃と同等に回復し、初発増殖速度とグルコース消費速度が30℃より上昇することが明らかになっている。そこで、本研究ではN1-4の37℃での増殖、発酵低下およびアデニン添加時の増殖、発酵向上に寄与する遺伝子を転写解析により検討した。

＜方法・結果＞ メタボローム解析により37℃では培養初期から解糖系の代謝物が減少することが明らかになっており、ビルビン酸100 mg/Lを添加することでも37℃での増殖が回復する事が明らかになっている。このため37℃では解糖系の代謝が30℃よりも低下している可能性が示唆された。そこで培養12時間後の解糖系の遺伝子発現をqRT-PCR法にて比較した結果、37℃で培養した菌体では多くの解糖系遺伝子の転写量は30℃で培養したものと比較して50%以下に低下した。一方、アデニンを添加した37℃培養菌体では30℃と同等かそれ以上であった。このため、アデニン非添加37℃ではバタノール生産期の解糖系の発現低下により増殖・発酵が低下する一方、アデニン添加ではその発現が維持されるためバタノール生産が可能となることが示唆された。

Transcriptional analysis of glycolysis genes in butanol producing bacteria at high temperature cultivation with addition of adenine

○Keiji Kiyoshi, Kosuke Nobuki, Sohei Kawashima, Toshimori Kadokura, Shunichi Nakayama
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words butanol production, *Clostridium*, glycolysis, transcriptional analysis

1P-110 セルラーゼ高発現バタノール生産菌への育種

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

【目的】

これまでにセルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* とバタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4(以下N1-4) の混合培養によりセルロース基質からバタノール生産可能であり、セルラーゼ活性を補うことでさらにバタノール生産性が向上することを明らかとした。N1-4はエンド型セルラーゼをコードする遺伝子を有しているが、その活性は極めて低い。そのためN1-4固有のエンド型セルラーゼ発現強化により、本混合培養系での強化が期待される。本研究では、変異導入により高セルラーゼ発現変異株への育種を目的とした。

【方法・結果】
先の研究でリファンピシン耐性株として取得され耐熱性が向上した変異株 RIFR91 を親株として、紫外線照射により変異処理し唯一の炭素源としてカルボキシメチルセルロース(CMC)を含む寒天培地で生育する変異株42株(RC株)を取得した。取得した変異株42株からコンゴレッド染色を用いたハロ形成を指標とし、親株と比較してCMC分解能が高かった4株を選別し、セルロース分解菌との混合培養に供し脱リグニンした稲わらを基質としたバタノール生産量を測定した。その結果、親株であるN1-4とRIFRはそれぞれ8日目においてそれぞれ4.2、4.6 g/Lであったのに対し、変異株RC33のバタノール生産量は6.4 g/Lと1.4倍高い生産量を示し、より高効率に稲わらからバタノール生産可能な変異株の取得に成功した。

Breeding of high cellulase expression strain in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4

○Kosuke Nobuki, Keiji Kiyosi, Souhei Kawasima, Tosimori Kadokura, Shunichi Nakayama
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Clostridium*, butanol production, cellulase, mutation

1P-111 *Corynebacterium glutamicum* ビルビン酸キナーゼ欠失株における代謝変化とそのメカニズム

○横田 篤, 澤田 和典, 萩原 拓也, 今井 恵太, 禪院 進, 和田 大
(北大院・農)
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

【目的・背景】ビルビン酸キナーゼ(PYK)は、ホスホエノールビルビン酸(PEP)からビルビン酸への反応を触媒し、ATP生産も行うため、解糖系における鍵酵素とされている。本研究ではPYK欠失株における代謝変化およびそのメカニズムを多面的なアプローチで解明した。

【方法・結果】*C. glutamicum* ATCC13032 (野生株)、PYK欠失株、PYK活性相補株をバイオシテン十分グルタミン酸非生産条件の発酵培地で培養した。PYK欠失株において、最大生育量の増加、比糖消費速度の上昇、呼吸活性の低下が観測された。また最少培地で培養しても、同様な傾向が得られた。PYK活性相補株は野生株と同様な傾向を示したので、上記の特性はPYK欠失によると考えられた。そのメカニズムを解明するために、メタボローム解析、酵素活性測定、転写量解析を行った。その結果、PYK欠失株は解糖系の上流部分とペントースリン酸経路中の代謝産物が蓄積していた。その中には、PEPなどのバイオマス生産に必要な前駆体物質も含まれていた。また、アナブレロティック経路の酵素活性および転写量が変化しており、これはPEPの蓄積を回避するための戦略と考えられた。さらに呼吸活性の低下に伴い、リンゴ酸：キノン酸化還元酵素の活性および転写量が低下していた。これは、オキサロ酢酸の蓄積を回避するためと考えられた。これらの知見は本菌のより高度な産業利用に貢献するものと考えられる。

Effect of pyruvate kinase gene deletion on the metabolism of *Corynebacterium glutamicum*

○Atsushi Yokota, Kazunori Sawada, Takuya Hagiwara, Keita Imai, Susumu Zen-in, Masaru Wada
(Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, Pyruvate kinase, Biomass production, Metabolome analysis

1P-112 *Methylobacterium* 属細菌によるエルゴチオネインの生産

Md Alamgir Kabir¹, 増田 幸子^{1,2}, ○谷 明生¹
(¹岡山大学・資源植物科, ²JST ALCA)
atani@okayama-u.ac.jp

Methylobacterium 属細菌は植物が放出するメタノールを利用できるため植物葉上で優占化する。また植物に接種するとその生育を促進することから農業への利用が期待されている。本属細菌の菌体内代謝物質をCE-TOF MSで網羅的に解析したところ、通常のアミノ酸に加えて著量のユニークなアミノ酸、エルゴチオネイン(EGT)を高蓄積していることを見いだした。本研究では本属細菌におけるEGT生産性と生理的役割を調べた。本属細菌の基準株はほとんどEGTの生産をすることを見いだした。その中でも発表者らが分離した *M. aquaticum* 22A株の生産性が高くゲノム情報をすでに得ていることからさらなる解析に用いた。EGTは菌体内に蓄積する他のどのアミノ酸よりも高蓄積していた。培養液には分泌されず、菌体内にのみ見いだされた。菌体を遠心分離で集め、熱処理をすることでEGTを上清に回収可能であった。炭素源及び窒素源の種類・量、EGT合成の前駆体となるアミノ酸の添加、希土類の添加等の検討を経て、最適化した培養条件で2%のメタノールを用いて10 mg/L培養液(6.3 mg/g乾燥菌体)の生産性を得た。また、*Mycobacterium* 属細菌で同定されているEGT合成遺伝子のホモログを22A株ゲノムに見いだし、*egtBD* 遺伝子破壊株を構築した。破壊株はEGTの生産がなくなり、熱ショック、UV暴露に感受性を示すことを見いだした。しかしメタノールに対する生育、植物上での生育は野生株よりも向上した。以上のことから、EGTは本属細菌が普遍的に持つ物質で、植物上で太陽光に曝されながら生育するために重要な物質であり、メタノールの代謝には関与していないことが分かった。

Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species

Kabir Md Alamgir¹, Sachiko Masuda^{1,2}, ○Akio Tani¹
(¹IPSR, Okayama Univ., ²JST ALCA)

Key words *Methylobacterium*, Ergothioneine, methanol, amino acid