

1P-129 全自動実験室進化による様々な化合物ストレスに対する耐性大腸菌の創成と耐性化機構の解析

○堀之内 貴明¹, 鈴木 真吾¹, 清水 浩², 古澤 力^{1,2}
 (¹理研・生命システム, ²阪大院・情報)
 chikara.furusawa@riken.jp

微生物を用いた物質生産のプロセスにおいて、細胞は様々なストレスを受けて生産効率の低下を引き起こすことから、ストレス耐性株の育種は工業的に重要な課題である。ストレス存在下で長い世代を経させることによってストレス耐性株を取得する実験室進化は、次世代シーケンサーなどの解析技術と組み合わせることで、有用細胞の育種や耐性メカニズムの理解を可能とする強力なツールとして近年注目を浴びている。我々は有用微生物の効率的育種を目的とし、多数系列の実験室進化を全自動で行うことができるシステムを開発しており¹⁾、本研究ではこのシステムを用いて様々なストレスに対する実験室進化を行った。酸・アルカリ・塩類・アルコール等の合計11種類のストレス化合物に対する大腸菌の約1000時間の実験室進化の結果、親株よりも有意に高い比増殖速度を示す耐性株をそれぞれ複数株取得した。これら合計数十株に対して全ゲノムリシーケンス解析により変異の同定を行い、さらに複数の株間で共通に見いだされた変異を親株に導入することにより、親株に各ストレスに対する耐性を賦与することに成功した。また、耐性株のトランスクリプトーム解析も執り行い、それぞれのストレスに対する耐性化に伴ってどのような遺伝子発現状態の変化が起こったかを解析した。これらの結果に基づき、様々なストレスに対する大腸菌の適応戦略と有用株育種への応用について議論したい。

[1] Horinouchi et al., *J. Lab. Autom.*, **19**(5), pp. 478-482, 2014.

Automated experimental evolution and analysis of tolerance mechanisms for various chemical stress conditions in *Escherichia coli*

○Takaaki Horinouchi¹, Shingo Suzuki¹, Hiroshi Shimizu², Chikara Furusawa^{1,2}
 (¹QBiC, RIKEN, ²Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, evolutionary engineering, stress resistance, omics analysis

1P-130 Studies on the carbon and energy metabolism of the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1

○Masaharu Ishii¹, Huu Tri Nguyen^{1,3}, Shinichi Hirano², Hiroyuki Arai¹
 (¹Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, ²Central Res. Inst. Electric Power Industry, CRIEPI, ³Fac. Sci., HCM Univ. Agri. Forest., Vietnam)
 amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

The thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 belongs to the beta-proteobacteria. TH-1 not only showed the ability to fix CO₂ via the Calvin cycle with highest growth rate among autotrophs, but also can grow heterotrophically as well as mixotrophically. The existence of two key genes of glyoxylate cycle, isocitrate lyase and malate synthase, in genome of TH-1 indicates that the glyoxylate cycle might be operative under certain metabolic condition. The expressions of whole genes of strain TH-1 under autotrophic, heterotrophic, or mixotrophic condition with butyrate as substrate was analyzed through microarray. Under autotrophic condition, TH-1 gives a specific growth rate of 0.60 h⁻¹ at 50°C. TH-1 could not grow mixotrophically with high concentration of acetate 30 mM or butyrate 15 mM. At 5 mM acetate or butyrate, mixotrophic growth could be observed, and at 10 mM acetate or butyrate a long lag phase was seen. The high activity of isocitrate lyase and malate synthase was detected when TH-1 was grown heterotrophically on acetate or butyrate. This fact suggests the operation of glyoxylate cycle in TH-1. The growth inhibition under mixotrophic condition was derived by the toxic compounds from photorespiration. Enzymatic activity and microarray data indicate that the combination of glycolate oxidase and malate synthase probably works as a detoxification system in strain TH-1.

Studies on the carbon and energy metabolism of the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1

○Masaharu Ishii¹, Huu Tri Nguyen^{1,3}, Shinichi Hirano², Hiroyuki Arai¹
 (¹Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, ²Central Res. Inst. Electric Power Industry, CRIEPI, ³Fac. Sci., HCM Univ. Agri. Forest., Vietnam)

Key words *Hydrogenophilus thermoluteolus*, hydrogen-oxidizing bacteria, detoxication

1P-131 *Acetobacter* 属二種における基幹代謝経路の動作機序の比較解析

○今井 健太郎¹, 石川 森夫¹, 吉田 将也¹, 山本 有紀¹, 松原 拓哉¹, 兼崎 友², 吉川 博文^{2,3}, 小泉 幸道¹, 貝沼 (岡本) 章子¹
 (¹東農大・応生科・醸造, ²東農大・ゲノムセ, ³東農大・応生科・バイオ)
 okamoto@nodai.ac.jp

【目的】食酢醸造用酢酸菌 *Acetobacter aceti* および *Acetobacter pasteurianus* は、いずれもエタノールの酸化発酵能（酢酸発酵能）および生じた酢酸を菌体内で完全酸化する酢酸過酸化能を示す。しかし、両種の基幹代謝経路の構成は大きく異なり、その動態の共通性や差異についての知見は少ない。本研究では両種の酢酸発酵生理を特徴づける基幹代謝系構成因子の役割の解明を試みた。【方法および結果】*A. aceti* および *A. pasteurianus* について、エタノール培養時における基幹代謝系構成因子の転写挙動解析を RNA-seq 法により行った。その結果、両種共に TCA 回路をバイパスする AarC が酢酸過酸化期において高発現し、解糖系末端の pyruvate phosphate dikinase (Ppdk) および enolase (Eno) が生育時期を通じて高発現した。上記3因子の各破壊株についてエタノール存在下での生育挙動を比較したところ、両種に共通して *aarC* の破壊は酢酸過酸化能の欠失をもたらし、*ppdk*, *eno* の破壊は酢酸発酵期での生育抑制をもたらした。以上より、これら因子の酢酸発酵生理における役割は両種の基幹代謝経路の違いに依らず共通しており、AarC・Ppdk・Eno の酢酸発酵時の生育能への重大な関与が示唆された。

Comparative analysis on probable flow manner of the central metabolic pathway between 2 kinds of *Acetobacter* species

○Kentaro Imai¹, Morio Ishikawa¹, Masaya Yoshida¹, Yuki Yamamoto¹, Takuya Matsubara¹, Yu Kanesaki², Hirohumi Yoshikawa^{2,3}, Yukimichi Koizumi¹, Akiko Okamoto-Kainuma¹
 (¹Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., ²Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., ³Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Acetobacter*, acetic acid fermentation, central metabolic pathway

1P-132 RNA-seq 法による *Acetobacter* 属酢酸菌二種のグルコース存在下における代謝戦略の比較解析

○阿部 達明¹, 石川 森夫¹, 松原 拓哉¹, 兼崎 友², Andrés-Barrao Cristina¹, 吉川 博文^{2,3}, 小泉 幸道¹, 貝沼 (岡本) 章子¹
 (¹東農大・応生科・醸造, ²東農大・ゲノムセ, ³東農大・応生科・バイオ)
 okamoto@nodai.ac.jp

【目的】酢酸菌は細胞膜上での酸化発酵により ATP を獲得するが、細胞内の基幹代謝経路を介したエネルギー代謝能も有しており、両者の関係性については不明な点が多い。先に演者らは *Acetobacter* 属酢酸菌二種について、エタノールを炭素源とした場合の RNA-seq 解析を行い、酢酸発酵時には基幹代謝系が殆ど駆動せず、エネルギー代謝と物質代謝が独立して活動するという知見を得た。¹⁾ 今回、グルコースを炭素源とした場合の知見を得たので報告する。【方法及び結果】*Acetobacter pasteurianus* および *Acetobacter aceti* について、グルコース培養時の菌体について、RNA-seq 解析に供した。発現データから各生育時期に特徴的に発現する遺伝子群を抽出し、代謝経路へのマッピングを行った。その結果、グルコース存在下において、両種のエネルギー代謝は酢酸発酵時と同様、細胞膜上の酸化発酵を主体とするが、一部のグルコースが細胞内資化され基幹代謝経路が駆動するという、酢酸発酵時とは異なる代謝戦略をとる可能性が示唆された。

1) 松原ら：日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 2A21p07 (2015).

Comparative study using RNA-seq analysis on the metabolic strategies of *Acetobacter* species in the presence of glucose

○Tatsuaki Abe¹, Morio Ishikawa¹, Takuya Matsubara¹, Yu Kanesaki², Andrés-Barrao Cristina¹, Hirohumi Yoshikawa^{2,3}, Yukimichi Koizumi¹, Akiko Okamoto-Kainuma¹
 (¹Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., ²Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., ³Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Acetobacter*, oxidative fermentation, central metabolic pathway, RNA-seq