

2P-001 ポリリジン生産放線菌 *Streptomyces albulus* を宿主とした有用物質異種生産システムの開発

吉村 友宏¹, 柴田 展行¹, 濱野 吉十², 〇山中 一也³
 (¹JNC・横浜研, ²福井県大・生物資源, ³関西大・化生工)
 kazuyay@kansai-u.ac.jp

【目的】産業的、生理的に重要な化合物の中には ATP 依存性酵素が関与して生成されるものも多い。しかし ATP は高価であるため、これらの *in vitro* 合成反応に ATP を基質として使用することは現実的ではない。一方、組換え微生物を利用した生産においても ATP 供給が律速となり、十分な収量で化合物生産を達成することは困難である。我々は、放線菌 *Streptomyces albulus* の主二次代謝産物である epsilon-Poly-L-lysine (e-PL) 合成研究の過程で、e-PL 合成酵素 (Pls) が誘導的に発現し、e-PL 生産が認められる対数増殖期後期に細胞内 ATP 濃度が著しく高まることを見出した。そこで、本研究では、*S. albulus* を ATP 依存的に生成される各種化合物群の異種生産宿主として応用することを目的に、本菌における遺伝子発現系の構築を行った。

【方法及び結果】*pls* プロモーターにより遺伝子発現を誘導するベクターに、ATP 依存的に L-グルタミン 2 分子の縮合により青色素 indigoidine を生成する酵素遺伝子をクローン化し、e-PL 生産培地で *S. albulus* *Apls* 株形質転換体が生産する青色素量を指標として本遺伝子発現系の有用物質異種生産への応用の可能性を検証した。その結果、リボソーム結合サイトを改変した改良型ベクターでは原型を大幅に上回る色素生産が確認されたことから、有用物質異種生産における *S. albulus* *Apls* 株宿主及び改良型ベクターの有効性が示された。

Development of a gene expression system for heterologous production of desired molecules in an e-PL producer, *S. albulus*.

Tomohiro Yoshimura¹, Nobuyuki Shibata¹, Yoshimitsu Hamano²,
 〇Kazuya Yamanaka³
 (¹JNC Corp, Yokohama Res. Center, ²Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ., ³Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words gene expression, heterologous production, biosynthesis, ATP

2P-002 ポリリジン生産放線菌 *Streptomyces albulus* を宿主とした高分子量ヒアルロン酸及び 5-アミノレブリン酸の異種生産

吉村 友宏¹, 〇柴田 展行¹, 濱野 吉十², 山中 一也³
 (¹JNC・横浜研, ²福井県大・生物資源, ³関西大・化生工)
 kazuyay@kansai-u.ac.jp

【目的】我々は、高い ATP 生産能を有する放線菌 *Streptomyces albulus* を ATP 依存的に生成される各種化合物群の異種生産用宿主として応用することを目指し、本菌における遺伝子発現ベクターの改良を進めてきた。本研究では、改良型ベクターの組換え生産における有効性を確認することを目的として、医療用材料として利用される高分子量ヒアルロン酸(HA)及び近年抗がん剤や植物成長剤としても注目を集める 5-アミノレブリン酸(ALA)の異種生産を試みた。

【方法及び結果】*Streptococcus* 属乳酸菌において、HA 生産性及び分子量は細胞内 ATP 濃度依存的に増大することが報告されている。しかしながら、*S. albulus* *Apls* 株へ *Streptococcus* 由来の HA 合成酵素遺伝子(*hasA*)を導入しても HA は生産されなかった。そこで、コドン最適化した *hasA* 遺伝子を複数の前駆体糖合成遺伝子と共発現させたところ、期待した通り 2-MDa を超える高分子量 HA が著量 (>6 g/L) 生産された。一方、ALA の異種生産には、光合成細菌由来の ALA 合成酵素遺伝子(*hemA*)を用い、*S. albulus* *Apls* の *hemA* 遺伝子導入株を ALA 合成前駆体であるグリシンの添加培地で培養することで、細胞外への顕著な ALA 生産蓄積(60 mM)が確認された。以上の結果から *S. albulus* を宿主とした遺伝子発現系が ATP 依存的に生成される各種化合物群の異種生産に極めて有効であることが確認された。

Heterologous production of hyaluronic acid and 5-aminolevulinic acid in an e-PL producer, *S. albulus*.

Tomohiro Yoshimura¹, 〇Nobuyuki Shibata¹, Yoshimitsu Hamano²,
 Kazuya Yamanaka³
 (¹JNC Corp, Yokohama Res. Center, ²Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ., ³Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words heterologous production, ATP, Hyaluronic acid, 5-aminolevulinic acid

2P-003 *Bacillus* 属細菌における新規ケイ酸トランスポーターの探索

〇田中 達也, 本村 圭, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫
 (広島大院・先端物質)
 ikedakeshi@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】ケイ素は生物にとって重要な元素であり、高等植物や珪藻は環境中からケイ酸 (H₂SiO₄) を細胞内に取り込み、シリカ (SiO₂) を形成して組織や細胞の強度を高めている。当研究室では、*Bacillus cereus* とその近縁種がケイ酸を多量に取り込み、胞子コート近傍にシリカとして蓄積することで胞子の酸耐性能を向上させていることを発見した。このケイ酸蓄積は胞子形成期にのみ認められることから、ケイ酸を母細胞内に取り込む輸送体の存在が強く示唆されている。そこで本研究では、*B. cereus* をモデルとして、原核生物での報告例が無いケイ酸輸送体の探索を行った。

【方法及び結果】相同性検索により、高等植物や珪藻における既知のケイ酸輸送体のアミノ酸配列と相同性を有する *B. cereus* のタンパク質を探索した。その結果、イネのケイ酸輸送体と相同性を有する 4 種類の輸送体様タンパク質を見出した。各輸送体様タンパク質をコードする遺伝子を相同組換えによりクロラムフェニコール耐性遺伝子で置換した破壊株を作製し、ケイ酸の取り込み能を評価した。その結果、ヒ素の輸送体としてアノテーションされている 2 種類の遺伝子の破壊株において、ケイ酸取り込み能の顕著な低下が確認された。また、これらの破壊株に輸送体様タンパク質をコードする遺伝子を相補することでケイ酸の取り込み能の回復が見られた。このことより、2 種類の遺伝子はケイ酸取り込みに関与しており、原核生物でこれまで報告例の無いケイ酸輸送体であることが強く示唆された。現在、これらの破壊株について詳細な解析を進めている。

Identification of novel silicate transporters in the genus *Bacillus*

〇Tatsuya Tanaka, Kei Motomura, Takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
 (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Bacillus cereus*, silicate transporter, silica, biomineralization

2P-004 *Rhodococcus erythropolis* の株レベルの個性の検出と宿主最適株の構築

〇北川 航^{1,2}, 波田 美弥子¹
 (産総研・生物プロセス, ²北大院・農)
 w-kitagawa@aist.go.jp

背景: *Rhodococcus* 属細菌は環境汚染物質の分解や二次代謝産物の生産、また高い有機溶媒耐性や広い生育範囲など、実に様々な能力・性質を持ち合わせる微生物である。これら異なる特性は *Rhodococcus* 属の種間で見られるだけでなく、同種内の株間でもそれぞれ異なる性質を示し、“株レベルの個性”がある事が分かる。*Rhodococcus erythropolis* で見られる株レベルの個性としては、コロニー形状、生育速度、芳香族化合物分解能、16S rRNA 遺伝子配列、保有する線状・環状 plasmid、形質転換効率、遺伝子発現の安定性、生産する抗生物質の種類、などであった。本研究では *R. erythropolis* の数十株を用いてこれら個性を分析し、それぞれ個性が対照的な数株を対象にゲノム解析を行い、個性の遺伝的背景について情報を得る事を試みた。さらにこれらの情報を元に、ゲノムレベルで改変した“最適化宿主”を創成することを目指した。

結果: 外来 plasmid の保持安定性や形質転換効率など個性が異なる 6 株を選択し、ゲノム解析に供した。その結果、染色体にはわずか 1-2% に、plasmid には線状・環状ともそれぞれ大きな違いが認められた。しかし染色体と plasmid のサイズはかなり異なるため、それぞれの個性への関与(固有 DNA 領域)は同程度と考えられた。これら違いを精査し、ゲノム領域の取捨選択(追加と削除)をした宿主株を現在構築中である。2014 年 7 月から *R. erythropolis* と特定のベクターが文部科学省の指定する「認定宿主ベクター系」となったことから、宿主として最適化した改変株が今後有効に利用されると期待している。

Identification of strain level individuality of *Rhodococcus erythropolis* toward the development of microbial host strain

〇Wataru Kitagawa^{1,2}, Miyako Hata¹
 (¹BRI, AIST, ²Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Rhodococcus*, genome engineering, host-vector system, plasmid