

2P-013 *Bradyrhizobium japonicum* の PHB 蓄積に関わるファジン遺伝子の解析

○西畑 省吾¹, 田中 耕生², 竹中 慎治¹, 吉田 健一¹
 (¹神戸大院・農・生命機能, ²神戸大・自科・研究環)
 ken-yoshi@kobe-u.ac.jp

[背景と目的]ポリヒドロキシ酪酸(PHB: poly-3-hydroxybutyrate) は生分解性プラスチックとして有用であり、多様な微生物が細胞内に蓄積する。我々は *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 が PHB を菌体内に顕著に蓄積することに着目した。USDA110 の PHB 蓄積には、その合成や分解に関わる酵素よりも、PHB 顆粒を安定化するファジンが重要な役割を果たすことを見出した。PHB 蓄積時にはファジンをコードすると推定された 4 種の *phaP* 遺伝子のうち、*phaP1*, *phaP2*, *phaP4* の転写量が増加し、*phaP4* の発現が最も顕著であった。本研究では、*phaP4* 遺伝子とその転写制御を行うと推定された *phaR* 遺伝子の破壊を行い、その影響を調べることを目的とした。

[方法と結果]*phaR* 破壊株を YEM 培地 (PHB 蓄積培地) と TY 培地 (非 PHB 蓄積培地) で培養、対数増殖期の初期に全 RNA を抽出、定量 RT-PCR で *phaP* 遺伝子等の転写量を比較した。TY 培地で培養時、*phaR* 破壊株で *phaP1*, *phaP4* の転写量が著しく増加した。従って、*PhaR* は *phaP* と *phaP4* の転写を抑制していることが示唆された。PHB の合成、分解を担う遺伝子は *phbZ1* のみで転写量が増加した。*phaP4* 破壊株では、PHB の蓄積量が 12 日目に親株の半分以下となり、*PhaP4* が PHB 顆粒の安定化に寄与することを確認した。一方、*phaR* 破壊株では PHB 蓄積量が大幅に減少した。この原因として、*phbZ1* の過剰発現による PHB 分解、あるいは *phaP4* の過剰発現による PHB 顆粒の小型化が考えられた。興味深いことに、*phaR* 破壊株は PHB 蓄積条件で増殖が減退した。原因として、PHB 蓄積の不全が代謝のバランスを損なう等の可能性が疑われた。

Phasin genes involved in PHB accumulation in *Bradyrhizobium japonicum*

○Shogo Nishihata¹, Kosei Tanaka², Shinji Takenaka¹, Ken-ichi Yoshida¹
 (¹Grad. Sch. Agric., Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words *Bradyrhizobium japonicum*, PHB, phasin

2P-014 *Corynebacterium glutamicum* を用いたバイオマスからのカダベリン生産

○今尾 健太, 瀬川 将太, 田中 勉, 近藤 昭彦
 (神戸大院・工)
 akondo@kobe-u.ac.jp

[緒言] カダベリンはナイロンや医薬など様々な化成品の原料となるジアミンであり、従来、化石燃料から作られてきた。しかし環境への配慮からバイオマスを用いた、バイオプロセスによる生産法が求められている。そこで本研究ではカダベリン生産の原料にヘミセルロースを、宿主に *Corynebacterium glutamicum* を選択した。*C. glutamicum* はカダベリンの前駆体であるリジン生産に優れている一方で、バイオマス分解能、キシロース資化能、リジン脱炭酸能を有さないため、キシロース異性化酵素遺伝子(*xylA*)、リジン脱炭酸酵素遺伝子(*cadA*)を菌体内で共発現させ、キシロースからのカダベリン生産を試みた。

[実験方法] 大腸菌由来の *xylA*, *cadA* を用いて共発現ベクターを作製し、そのプラスミドを用いてエレクトロポレーション法により *C. glutamicum* を形質転換した。得られた形質転換体を、試験管中 BHI 液体培地で 16 h 前々培養、4 h 前培養した後、2% キシロースを含む MMYE 培地 20 mL に 5% (v/v) 植菌し、200 rpm、30℃、72 h フラスコ培養した。そして培養液の OD₆₀₀、培養上清のキシロースおよびリジン、カダベリン濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

[結果と展望] *xylA*, *cadA* 共発現株は培養 72 h において、OD₆₀₀ が 15.6 を示し、キシロースを 12.4 g/L 消費した。また、リジンは途中蓄積が見られたが 72 h では完全に消費され、カダベリンを 4.7 mM 生産した。このことから *xylA*, *cadA* の共発現により、キシロース炭素源でのカダベリン生産に成功した。今後はヘミセルロースからのカダベリン生産に向け、細胞表面提示技術による多糖分解能の賦与を行う。

Cadaverine production from biomass using *Corynebacterium glutamicum*

○Kenta Imao, Shota Segawa, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondou
 (Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, xylose, decarboxylase

2P-015 *Stenotrophomonas maltophilia* のフェノール類走性センサーの同定とその解析

○渡邊 祐子¹, 荷方 稔之¹, 内田 智美², 柿井 一男¹
 (¹宇都宮大院・工, ²宇都宮大・工)
 nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp

[目的] *Stenotrophomonas maltophilia* は *p*-クロロフェノールや内分泌攪乱物質の疑いのあるビスフェノール A をはじめとする幅広いフェノール類に正の走性を示す。本細菌は 12 の走化性センサー様遺伝子を有することが推定され、フェノール類のセンシングに関与する走化性センサー遺伝子を同定することで効率的なバイオレメディエーションへの応用が期待できる。そこで本研究ではフェノールと *p*-クロロフェノールに着目し、その走化性センサーの同定を試みた。

[方法] キャピラリーにフェノール類を含むアガロース溶液を充填・固化して洗浄した菌体懸濁液に挿入し、細菌が集積する様子を倒立位相差顕微鏡で観察・録画した。それを元にコンピュータでキャピラリー開口部付近の菌体を計数して菌体濁度当たりの集積初速度 (比集積初速度) (cells/sec・OD₆₀₀) で走化性を評価した。

[結果] 野生株は 2.0 mM フェノールに対し弱い集積応答 (3.3 cells/sec・OD₆₀₀) を示したが、走性センサー遺伝子 *mcp5* を破壊した Δ*mcp5* では応答が観察されなかった。このことから *S. maltophilia* JCM1975 における 12 の推定走化性センサー様遺伝子のうち、*mcp5* はフェノールを感知する唯一の走性センサー遺伝子であることが示唆された。また、*p*-クロロフェノールに対する破壊株 Δ*mcp5* および Δ*mcp6* の応答は、野生株のそれに比べてそれぞれ 82%、22% 減少していた。このことから *p*-クロロフェノールの感知には MCP5 と MCP6 が関与していることが考えられた。

Identification and characterization of chemoreceptors towards phenols in *Stenotrophomonas maltophilia*

○Yuko Watanabe¹, Toshiyuki Nikata¹, Tomomi Uchida², Kazuo Kakii¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., ²Fac. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words *Stenotrophomonas maltophilia*, chemotaxis, phenol

2P-016 大腸菌抗酸化システム多重欠損株を用いた熱ストレス条件下での酸化ストレス損傷の解析

○坂元 仁¹, 古田 雅一^{1,2}, 土戸 哲明¹
 (阪府大・放研セ, ²阪府大院・工)
 sakamoto.jj@gmail.com

[目的] 大腸菌の一部のストレス誘導性因子における熱ショック応答と酸化ストレス応答の交叉誘導から、加熱損傷時に細胞が酸化ストレスに曝されている可能性が示唆される。しかしながら、この時に発生する活性酸素種 (ROS) の種類や、その生存性への影響については明らかにされていない。我々は大腸菌の抗酸化システムの多重遺伝子破壊株を構築し、これらを用いて熱ストレス時の酸化損傷の関与について調査した。

[方法と結果] 大腸菌 K12 W3110 の派生株 NBRC 106482 を親株とした。スーパーオキシド消去系 *sodA*, *sodB*, *sodC* を SOD-セット、過酸化水素消去系 *katE*, *katG*, *ahpCF* を HPX-セット、細胞質内の酸化還元状態を支配する主要因子 *trxA*, *trxB*, *trxC*, *gor* を RDX-セットとし、単独、二重、三重セット欠損株を構築した。これらの株を L 培地 (30~48℃) で培養し、連続光学密度測定装置で増殖能を調査した。42℃では SOD-セットの欠損を含む株で顕著に増殖が阻害されたが、HPX-セット、RDX-セットのみでは影響しなかった。しかし、セットの多重化により増殖阻害が促進された。その影響は SOD > HPX > RDX であった。48℃では HPX 株、RDX 株でも増殖阻害が観察され、多重セット欠損株はほぼ増殖不能であった。熱ストレス下で細胞を攻撃する主要な ROS はスーパーオキシドであり、次が過酸化水素であることが示唆された。45~48℃の高温域での耐性や増殖能には過酸化水素消去能や還元状態の維持も影響していた。

Analysis of oxidative damage in *Escherichia coli* multiple mutants defective in antioxidative systems under heat shock treatment

○Jin Sakamoto¹, Masakazu Furuta^{1,2}, Tetsuaki Tsuchido¹
 (¹Rad. CRes.Osaka Pref. Univ., ²Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

Key words heat shock, oxidative stress, *Escherichia coli*, reactive oxygen species