

2P-109 細胞外電子伝達による生細胞のエネルギー代謝制御○石川 聖人¹, 金子 真大², 加藤 創一郎^{1,3}, 橋本 和仁^{1,2}, 中西 周次⁴¹東大・先端研, ²東大院・工, ³産総研・生物プロセス, ⁴阪大・太陽エネ研

ishikawa@light.t.u-tokyo.ac.jp

背景・目的

生物がエネルギーを獲得する異化代謝は物質の酸化還元反応に基づく電子移動反応である。それゆえ、電子伝達体である NAD⁺の細胞内レドックス状態(NADH/NAD⁺比)は生細胞のエネルギー代謝様式と大きく関連する。また、細胞内 NADH/NAD⁺比は遺伝子発現や、様々な生物機能に影響を与えることが知られている。当研究グループは生細胞内の NADH/NAD⁺比を遺伝子組換えのような細胞内部からの改変ではなく、外部との電子移動で制御することによって、代謝や遺伝子発現を制御できるのではないかと考えている。本研究では、細胞親和性の電子伝達ポリマーを介した細胞外電子伝達 (EET) により、大腸菌や酵母のエネルギー代謝様式を変化させることができるかを調べた。

実験方法・結果

電子伝達ポリマーは当研究グループが以前開発した PMF を用いた。酸化型の PMF が唯一の電子受容体になるように最小培地に添加し、大腸菌および酵母を嫌氣的に培養した。培養後の細胞収率や代謝物および遺伝子発現を調べたところ、PMF が存在する培地で培養された細胞は解糖系が抑制され、酸化的リン酸化が活性化されたことを示唆する結果が得られた。これらの結果は電子伝達ポリマーを介した EET は遺伝子組換えを用いないエネルギー代謝制御の方法となり得ることを示唆している。

Controlling energy metabolism of living cells by extracellular electron transfer○Masahito Ishikawa¹, Masahiro Kaneko², Souichiro Kato^{1,3}, Kazuhito Hashimoto^{1,2}, Shuji Nakanishi⁴¹RCAST, Univ. Tokyo, ²Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, ³BRI AIST, ⁴RCSEC, Univ. Osaka)**Key words** Extracellular electron transfer, Intracellular redox state**2P-110 カンツバキから新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の単離と機能解析**○八反 順一郎¹, 新藤 一敏², 大野 史菜¹, 樋口 雄貴¹, 石井 純³, 近藤 昭彦⁴, 三沢 典彦¹¹石川県大・生物資源研, ²日本女子大・家政, ³神戸大・自科・研究環, ⁴神戸大院・工・応化)

n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp

【目的】セスキテルペンは植物の芳香成分であるだけでなく、種々の健康に有用な生理機能を有している。本研究では、そのようなセスキテルペンを合成する新規酵素遺伝子 *Tps* の取得を試みた。

【方法】メバロン酸経路遺伝子群等を導入した大腸菌に基質として lithium acetoacetate を加えることで、セスキテルペンの前駆体 farnesyl diphosphate を多量合成できる。カンツバキ (寒椿) *Camellia hiemalis* の花から既知 TPS とホモロジーのある遺伝子配列を単離し、上記大腸菌に導入することでセスキテルペンの合成を試み、産物の同定を通して TPS の機能解析を行う。

【結果】全 RNA を抽出し、縮重 RT-PCR と RACE 法により 1 つの *Tps* 全長配列を得た。次に全長配列増幅用プライマーを合成し、PCR で全長を再増幅し、アミノ酸配列がわずかに異なる 22 クロウンを得た。GC-MS 分析により、17 クロウンにおいてセスキテルペンの生成が確認された。産物を溶媒分画及び逆相 HPLC 分取により精製し、GC-MS 及び各種 NMR 分析により構造解析した結果、16 クロウンでは valerianol、1 クロウンは hedyeryol が主産物と同定された。なお、valerianol synthase 遺伝子は世界で初めて取得された。

本研究は経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。

Isolation and functional analysis of a novel sesquiterpene synthase gene from "Kantsubaki" *Camellia hiemalis*○Jun-ichiro Hattan¹, Kazutoshi Shindo², Fumina Ohno¹, Yuhki Higuchi¹, Jun Ishii³, Akihiko Kondo⁴, Norihiko Misawa¹¹Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., ²Dept. Food Nutritions, Japan Women's Univ., ³Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ⁴Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)**Key words** *Camellia*, fragrance, sesquiterpene, valerianol**2P-111 フリージア・エアリーパールから新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の単離と機能解析**○樋口 雄貴¹, 八反 順一郎¹, 大野 史菜¹, 伊藤 智子², 澁谷 ゆりか², 渡邊 ありさ², 石井 純³, 近藤 昭彦⁴, 新藤 一敏², 三沢 典彦¹¹石川県大・生物資源研, ²日本女子大・家政, ³神戸大・自科・研究環, ⁴神戸大院・工・応化)

n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp

【目的】セスキテルペンは植物の芳香成分であるだけでなく、種々の健康に有用な生理機能を有している。本研究では、そのようなセスキテルペンを合成する新規酵素遺伝子 *Tps* の取得を試みた。

【方法】メバロン酸経路遺伝子群等を導入した大腸菌に基質として lithium acetoacetate を加えることで、セスキテルペンの前駆体 farnesyl diphosphate を多量合成できる。フリージア (*Freesia × hybrida*) エアリーパールの花から既知 TPS とホモロジーのある遺伝子配列を単離し、上記大腸菌に導入することでセスキテルペンの合成を試み、産物の同定を通して TPS の機能解析を行う。

【結果】全 RNA を抽出し、縮重 RT-PCR と RACE 法により 1 つの *Tps* 全長配列を得た。次に全長配列増幅用プライマーを合成し、改めて PCR で全長を増幅し、アミノ酸配列がわずかに異なる 3 クロウンを得た。GC-MS 分析により、これらにセスキテルペンの生成が確認された。産物を溶媒分画及び逆相 HPLC 分取により精製し、各種 NMR 分析により構造解析した結果、3 クロウンとも α-selinene が主産物と同定された。

本研究は経産省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。

Isolation and functional analysis of a novel sesquiterpene synthase gene from *Freesia × hybrida* 'Ishikawa Fl'○Higuchi Yuki¹, Jun-ichiro Hattan¹, Fumina Ohno¹, Tomoko Ito², Yurika Shibuya², Arisa Watanabe², Jun Ishii³, Akihiko Kondo⁴, Kazutoshi Shindo², Norihiko Misawa¹¹Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., ²Dept. Food Nutritions, Japan Women's Univ., ³Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ⁴Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)**Key words** *Freesia*, fragrance, sesquiterpene, alpha-selinene**2P-112 *Citrobacter freundii* IFO13545 遺伝子破壊株によるグルコースからのバイオ凝集剤生産の改善**○柏 雅美¹, 宮本 弘毅¹, 木村 和幸², 多田 昇平¹, 根来 誠司¹, 武尾 正弘¹¹兵庫県大院・工・応用, ²兵庫分析センター)

takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

Citrobacter freundii IFO13545 株は、酢酸からキトサン様構造を有するバイオ凝集剤を生産するが、より安価な蔗糖蜜などの有機廃液を基質として使用するために、代謝工学的的手法によりグルコースからの凝集剤生産を計画している。本凝集剤はアミノ糖が構成糖であるため、解糖系からアミノ糖合成に炭素フローが向かうように、解糖系の中間体フルクトース 6-リン酸やグルコース 6-リン酸の代謝に関わる 4 つの酵素遺伝子の破壊を検討したので報告する。

大腸菌の相同組換えによる遺伝子破壊法を用いて、*C. freundii* IFO13545 株の 4 つの候補遺伝子を単独あるいは複数組み合わせで破壊し、それらをサザンハイブリダイゼーションにより確認した。最終的に 9 株の異なる変異を有する遺伝子破壊株を得た。グルコースを単一炭素源とする無機塩培地で各遺伝子破壊株を培養し (30℃, 150 rpm)、その培養上清を用いてカオリン懸濁法により凝集力価を評価した。グルコースを炭素源にした時には野生株は凝集活性を示さないが、4 株において酢酸を基質にした場合の野生株の凝集力価の 1/3 程度の力価が確認でき、グルコースからの生産に効果のある 2 種類の遺伝子破壊のパターンを見いだせた。

Improved production of bio-flocculant from glucose by gene-disrupted mutants of *Citrobacter freundii* strain IFO13545○Masami Kashiwa¹, Koki Miyamoto¹, Kazuyuki Kimura², Shohei Tada¹, Seiji Negoro¹, Masahiro Takeo¹¹Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. of Hyogo, ²Hyogo Analysis Center Co. Ltd.)**Key words** chitosan-like biopolymer, bioflocculant, fructose-6-phosphate, *Citrobacter freundii*