

3P-085 Signal transduction engineering meets metabolic engineering: for hyper-production of bioactive metabolites

○Jian-Jiang Zhong

(State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.)
jjzhong@sjtu.edu.cn

This presentation demonstrates that signal transduction engineering and metabolic engineering work together to improve the production of anti-tumor triterpenoid - ganoderic acids (GAs) by *Ganoderma lucidum* and anti-fungal antibiotic - validamycin by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. Calcineurin signaling transduction was found to be significant to GA biosynthesis, and extracellular addition of Ca^{2+} , Na^+ and Mn^{2+} could trigger the calcineurin signals. Manipulation of signaling system was demonstrated to be an efficient strategy for hyperproduction of GAs, and metabolic engineering also contributed greatly to the GA overproduction. For the validamycin biosynthesis, our previous study indicated the involvement of A-factor-like cascade, and this work aimed to decipher the regulatory role of the multiple *afsA-arpA* homologs in the signaling cascade and to improve the validamycin production. By double deletion of *shbR1/R3*, the transcriptions of *adpA-H* and the validamycin biosynthetic gene expressions were up-regulated, and the validamycin production and productivity were enhanced significantly. The transcriptomic analysis revealed that the engineering of A-factor-like signaling cascade caused a shift from primary to secondary metabolism. Engineering of *S. hygroscopicus* 5008 by tandem amplification of multiple *val* gene clusters also led to hyper-production of validamycin.

Signal transduction engineering meets metabolic engineering: for hyper-production of bioactive metabolites

○Jian-Jiang Zhong

(State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.)

Key words metabolic engineering, signal transduction, *Streptomyces*, *Ganoderma lucidum***3P-086 バイオ凝集剤生産菌 *Citrobacter freundii* IFO13545 株の定量 RT-PCR による遺伝子発現解析**○池本 啓史¹, 柏 雅美¹, 木村 和幸², 根来 誠司¹, 武尾 正弘¹(¹兵庫県大院・工,²(株)兵庫分析センター)

takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

[目的] *C. freundii* IFO13545 株は、酢酸からキトサン様バイオ凝集剤を生産する。この凝集剤は、アセチル CoA、クエン酸回路、グリオキシル酸回路、糖新生、ヘキソサミン経路を経由して生産されると推定しており、既に本菌株のドラフトゲノム解析が終了していることから、この情報に基づき、これら経路の重要遺伝子を選定し、それらの遺伝子発現解析を実施したので報告する。

[方法] 酢酸あるいはグルコースを主炭素源とする 500 ml の無機塩培地 (AM 培地及び GM 培地) を用い、ミニジャーファーマンターで IFO13545 株を回分培養した。増殖の立ち上がりから静止期に至る 4 点の菌体をサンプリングし、全 RNA を抽出した。これを鋳型にして、上記予想経路に関係する 13 遺伝子の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

[結果] AM 培地では、酢酸の膜輸送タンパク、アセチル CoA シンセターゼ、イソクエン酸リアーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子が強力に発現し、酢酸の取り込みとグリオキシル酸回路による代謝、糖新生が盛んに動いていることがわかった。これらは、立ち上がり期から対数増殖期の中期までに強い発現が見られた。一方、GM 培地では、グルコースの膜輸送タンパク、酢酸キナーゼ、クエン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子等、予想通りグルコースの代謝に関わる遺伝子が高発現していた。また、ヘキソサミン経路や多糖の膜分泌に関わる遺伝子の発現も比較検討した。

Gene expression analysis of chitosan-like bioflocculant-producing *C. freundii* IFO 13545 by quantitative RT-PCR○Keishi Ikemoto¹, Masami Kashiwa¹, Kazuyuki Kimura², Seiji Negoro¹, Masahiro Takeo¹(¹Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, ²Hyogo Analysis Center Co. Ltd.)**Key words** RT-PCR, gene expression, bioflocculant production, *Citrobacter***3P-087 合成ガス資化性好熱性細菌 *Moorella thermoacetica* 代謝変異株によるエタノール生産**○吉田 嵩一郎¹, 岩崎 祐樹¹, 三好 佑季¹, 河合 優人¹, 喜多 晃久¹, 酒井 伸介², 庄 智裕², 斉藤 政宏², 村上 克治³, 星野 保³, 田島 誉久¹, 中島田 豊¹, 加藤 純一¹(¹広島大院・先端物質,²三井造船・技術開発セ,³産総研・機能化学研究部門)
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【目的】当研究室では *Moorella* 属細菌を用いた合成ガス ($\text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{CO}$) からの有用物質生産を目指している。これまでに、Moth_0864 及び Moth_1181 の両遺伝子が、エタノール生産と競合する酢酸生産に大きく関係していることを明らかにした。本研究では、*M. thermoacetica* に acetaldehyde dehydrogenase(aldh)遺伝子を導入するとともに、Moth_0864 及び Moth_1181 の両破壊株の作成を行い、エタノール生産能の強化を目指した。

【方法及び結果】*M. thermoacetica* ATCC39073 株のウラシル要求性変異株(dpyrF株)を宿主として、エタノール生産遺伝子の導入及び Moth_0864 及び Moth_1181 の両遺伝子の破壊による代謝変異株を作成した。この代謝変異株を、フルクトースにて回分培養したところ、ATCC39073 株ではエタノール生産が見られなかったのに対して、遺伝子導入株では顕著なエタノール生産が見られた。さらに、フルクトースと $\text{H}_2\text{-CO}_2$ の両方を基質として回分培養を行った結果、エタノール収率の向上が見られた。

The Production of Ethanol with Metabolism Mutant of Thermophillic Bacteria *Moorella thermoacetica* ATCC39073○Koichiro Yoshida¹, Yuki Iwasaki¹, Yuki Miyoshi¹, Yuto Kawai¹, Akihisa Kita¹, Shinsuke Sakai², Tomohiro Sho², Masahiro Saito², katsuji Murakami³, Tamotsu Hoshino³, Takahisa Tajima¹, Yutaka Nakashimada¹, Junichi Kato¹
(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²Res. & Development Headquarters, Mitsui Engineering & Shipbuilding Co., Ltd., ³Res. Inst. for Sustainable Chem., AIST)**Key words** syngas, *Moorella*, thermophilic, ethanol**3P-088 合成代謝経路導入シアノバクテリアによる光合成条件下での iso-propanol 生産**○広川 安孝^{1,2}, 花井 泰三^{1,2}(¹九大院・農,²JST・CREST)

taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】光合成による光独立栄養的な生育が可能であるシアノバクテリアに、異種生物由来の酵素遺伝子群からなる合成代謝経路を導入することで、二酸化炭素からの直接的な物質生産が可能となる。昨年度の本会にて、acetyl-CoA を出発物質とした合成代謝経路を導入した *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における iso-propanol 生産について報告した。既報の方法では光合成条件下で増殖させた細胞を嫌気かつ暗条件下に曝す、もしくは光合成条件下において酢酸を添加することでしか生産させることが出来なかった。酢酸は、iso-propanol 生産経路では CoA 受容体となっている。そこで、本研究では遺伝子導入による代謝変化により酢酸を生産させることで、光合成条件下における iso-propanol 生産を行った。

【方法・結果】*S. elongatus* PCC 7942 野生株と iso-propanol 生産株に対して、大腸菌由来 phosphate acetyltransferase (*pta*) を導入した。これらの株は 1% CO_2 通気的光合成条件下において定常期以降に酢酸を生産し、酢酸濃度は最大 3 mM に到達した。そこで、定常期に達した iso-propanol 生産 *pta* 導入株を、揮発を防ぐために密栓フラスコに移し iso-propanol 生産を行った。生産時には炭酸源として炭酸水素ナトリウムを適宜添加し、pH を中性付近に調整した。密栓フラスコにおいても酢酸の生産が確認され、iso-propanol の最大生産量は約 0.5 mM となった。*pta* 導入に伴う酢酸生産を行わせることで、光合成条件下での iso-propanol 生産を達成した。

Cyanobacterial iso-propanol production under photosynthetic condition○Yasutaka Hirokawa^{1,2}, Taizo Hanai^{1,2}(¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²CREST, JST)**Key words** cyanobacteria, iso-propanol, metabolic engineering, synthetic pathway