

J PB-005 大腸菌内cAMPレベルの光操作と突然変異率の解析

○鳥崎 真吾¹, 伊関 峰夫², 渋谷 麻実³, 小平 憲一⁴, 舟田 久⁵, 渡辺 正勝³, 安川 洋生⁴

¹富山大・院・理工学教育部, ²東邦大・薬学部, ³総研大・先端科学研究科, ⁴富山大・院・理工学研究部, ⁵富山大・院・医学薬学研究部

Key Word : cAMP, Mutagenesis, Photoactivated adenyllyl cyclase, RecA

【目的】長期培養した大腸菌のコロニーではcAMP濃度が増加すること、また突然変異しやすくなる事が知られている。本研究では*Beggiatoa sp.* PSが有する光活性化cAMP合成酵素 (BsPAC) を発現する大腸菌を用い終夜培養における突然変異率を解析した。また同時に、突然変異率におけるRecAの関与を検討した。

【方法】大腸菌はBW25113, JW3778 (BW25113 *cyaA::Km^r*) 及び JW2669 (BW25113 *recA::Km^r*) を使用した (大腸菌株はナショナルバイオリソースプロジェクト大腸菌 (NIG) より分譲)。BsPACを導入した各種大腸菌をそれぞれ暗条件と青色光照射の条件で培養した後、Rifampicin (50mg/L) を含むLB寒天培地で培養し、突然変異率を算出した。

【結果】BsPACを発現させた野生株では光照射によりRifampicin耐性株の出現率が有意に上昇した。一方、BsPACを発現させた*recA*破壊株は突然変異率が低く、光照射の有無による大きな差異は見られなかった。

【考察】終夜培養の大腸菌においてcAMPが突然変異を誘導していると示された。また、*recA*破壊株ではcAMPによる突然変異の誘導が検出されなかったため、cAMPが誘導する突然変異がRecAに依存している事が示された。大腸菌は飢餓に陥ると細胞内cAMPレベルを上昇させ突然変異を誘導し、その中のいくつかが環境に適応して生き残るという戦略を有しているのではないかと考えられる。

J PB-006 *Vibrio tritonius*のアルコール脱水素酵素遺伝子の多様性

○李 羨¹, 中川 聡¹, 丸山 史人², 小椋 義俊³, 林 哲也³, 黒川 顕⁴, 澤辺 智雄¹

¹北大院水, ²東京医歯大医歯総合, ³宮大フロンティア科学, ⁴東工大生命理工

Key Word : alcohol dehydrogenase, vibrio, metabolism, expression, biofuel

【目的】アルコールとアルデヒドの相互変換は微生物に必須の反応であり、アルコール脱水素酵素 (ADH) により触媒される。中でもNAD (P) 依存性のADHは驚くほど幅広い代謝に関与し、直鎖および分岐鎖や芳香族アルコールを基質としうるが、微生物の持つADHの生理生態学的役割は不明であることが多い。本研究でアメフラシ消化管より分離した*Vibrio tritonius* AM2^Tは海藻糖質から最大で15 g/Lのエタノールを生産できる。しかし、本菌が持つADH遺伝子についての知見は少ない。そこで本研究では、AM2^Tの*adh*の一次構造解析と発現によりそれらの特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】AM2^Tの全ゲノム塩基配列から*adh*に相同な遺伝子を探索し、活性部位のアミノ酸配列の保存性に基づいてグループ分けを行った。また、機能解明のため各*adh*をpET160/GW/D-TOPOベクター (Invitrogen) にクローニングし、*E. coli* BL21 StarTM (DE3) 株に形質転換させることで発現させた。

【結果と考察】AM2^Tの全ゲノム配列から19種のADHホモログ遺伝子が得られた。モチーフ配列に基づきグループ分けを行った結果、亜鉛イオン依存性の長鎖ADHと金属イオン依存性のポリオール特異的ADHがそれぞれ4種および15種コードされていると推定された。また、エタノール発酵 (AdhE) だけではなく高級アルコール (yqhD) やプロパンジオールの産生に関与する酵素も見いだされ、これらを*E. coli*で発現させることに成功した。今後、これら組換えADHの酵素化学的特徴を捉え、生理生態学的役割の解明を進める。

J PB-007 スイートソルガム搾汁液からブタノールを高生産する細菌株の選抜

○金本 美穂¹, Habibur M. Rahman², 佐藤 嘉則³, 長南 茂², 新田 洋司², 久留主 泰朗², 太田 寛行²

¹茨城大・院農, ²茨城大・農, ³東京文化財研究所

Key Word : bio-fuel, butanol, sweet sorghum, fermentation

食糧生産やエネルギーの使用などの人間活動は地球の生物化学的サイクルに強い影響を与えてきた。特に化石燃料の使用による大気中二酸化炭素濃度の増加は顕著であり、これを抑制するために、バイオ燃料の開発が注目されている。スイートソルガムはトウモロコシやサトウキビと異なって、食糧生産と競合しない点や成長が早く、熱帯～温帯の広い地域で栽培できる点で利点がある。本研究は、エタノールに比べて、高燃焼性、低腐食性などで優れているブタノールをスイートソルガム搾汁液から生産するシステムを構築することを目的とする。今回は、先に土壌から分離した、スイートソルガム搾汁液中で増殖できるブタノール生成細菌*Clostridium beijerinckii* SBP2株から、ブタノール高生産株を選抜した結果を報告する。SBP2株のブタノール耐性を高めるために、段階的にブタノール添加量を増やしたPYG寒天培地にSBP2株を継代培養して、ブタノール耐性株を段階的に選抜した。最終的に2.4% (v/v) ブタノール耐性株 (SBP2-HB株) を得た。スイートソルガム搾汁液中の糖からブタノールへの転換率 (単糖換算の糖消費量当たりのブタノール生成量のモル比) は、SBP2株の0.3～0.5からSBP2-HB株の0.7～0.8に上昇した。スイートソルガム品種FS902の場合、SBP2-HB株の転換率は、搾汁液 (0.44 mol単糖/L) 1 Lから0.34 mol (25 g) のブタノールが生産される収率となる。現在、ケモスタット連続培養系でブタノール生産の培養条件の最適化を検討している。

J PB-008 土壌環境内における*Pseudomonas putida* F1株の細胞内タンパク質のプロテオミクス

○森本 一, 桑野 晶喜, 門屋 亨介, 笠原 康裕

北大・低温研

Key Word : Proteome analysis, soil, *Pseudomonas putida* F1

細菌は自然環境下でどのような遺伝子を発現し、どのような生理状態で生息しているのだろうか? この解答を知ることは微生物生態の理解を深めるために重要なことである。本研究は土壌細菌*Pseudomonas putida* F1株のモデル土壌環境を構築し、*P. putida* F1株の発現タンパク質について液体培養系と比較プロテオーム解析を行った。

ゲノム解析株である*P. putida* F1株を、0.5%グルコースを添加した環境土壌 (大豆畑、野菜畑、森林) に接種し、3日間 (30℃) 培養した。培養土壌より密度勾配遠心分離法を用い、細胞を分離し、*P. putida* F1株の全タンパク質を抽出した。タンパク質はSDS-PAGE後、in gel法を用いてタンパク質をペプチド化し、質量分析計 (LC-MS/MS) とMascot検索により同定した。

プロテオーム解析により、大豆土壌、野菜土壌および森林土壌において、それぞれ約1000、約700、約600タンパク質を同定した。液体培養系との比較解析の結果、土壌培養系においてのみ特異的に22タンパク質 (一酸化窒素ジオキシゲナーゼ、ヘムオキシダーゼなど) が発現した。また、各土壌で固有に発現したタンパク質は、大豆土壌から33タンパク質 (重金属排出系タンパク質)、野菜土壌から33タンパク質 (尿素分解系タンパク質など)、森林土壌培養系から59タンパク質 (亜硝酸還元酵素など) であった。

現在、検出した土壌特異的および各土壌で固有のタンパク質と環境要因の関連性や土壌中での細菌細胞内の生理状態について解析を進めている。