

3P-1137 大腸菌のカタボライト抑制と複数炭素源の同時消費に関する研究

○廣瀬 勇気¹, 松尾 沙代子¹, 清水 和幸^{1,2}
(¹九工大・情工,²慶應大)

【目的】大腸菌のカタボライト抑制に中心的役割を果たすのはcAMP-Crp複合体であり、グルコース存在下では細胞内のEIIAGlc-Pの濃度が低下し、その結果Cyaの活性が低下し、cAMPの生成が低く抑えられ、グルコース以外の炭素源の取り込みが抑制される。一般にバイオマス由来の炭素源を利用して発酵生産を行う場合、グルコース以外の糖、例えばキシロースやフルクトースなどは、このカタボライト抑制のためにグルコースが消費された後にしか消費されず、生産性が低下してしまう。本研究では、このカタボライト抑制機構について調べ、複数の糖の同時消費について検討した。

【方法と結果】野生株(BW25113)大腸菌、そのptsG欠損株、pgi欠損株、crp欠損株およびcrp強化株(crp*)、mgsA欠損株について、グルコースとキシロースやフルクトースを炭素源としたM9合成培地を用い、好気条件下で回分および連続培養実験を行った。その結果、ptsG欠損株やpgi欠損株では複数炭素源の同時消費が可能であることがわかったが、グルコース消費速度が著しく低下することがわかった。また、crp*株では複数の糖がほぼ同時に消費されるが、野生株に比べ糖の消費速度が低下して、細胞増殖速度が低下することがわかった。また、希釈率を変えた連続培養実験を行い、希釈率を増加させるにつれて、野生株ではキシロースが蓄積するのに対して、crp*株では共に消費されることがわかった。この現象を遺伝子発現、および酵素活性の点から考察すると同時に、ptsG、pgiAおよびptsG、pgiA、frdA欠損株について、複数炭素源を利用した乳酸発酵についても検討した。

Catabolite repression of *E. coli* and the investigation on the simultaneous consumption of multiple carbon sources

○Yuki HIROSE¹, Sayoko MATSUO¹, Kazuyuki SHIMIZU^{1,2}
(¹Grad. Sch. of Comp. and Sys. Eng., Kyusyu Inst. Tech.,²Keio Univ.)

Key words *Escherichia coli*, catabolite repression, crp

3P-1139 海洋性微細藻のシステムバイオロジー解析に向けての網羅的代謝プロファイリング技術の開発

○和泉 自泰¹, 藍川 晋平¹, 松田 史生², 蓮沼 誠久², 近藤 昭彦¹
(¹神戸大・工・応化,²神戸大院・自科)

海洋性微細藻は国土の12倍の面積に達する海洋で太陽光をエネルギー源として生育するだけでなく、個体の倍加速度が植物と比べて速いため、二酸化炭素の吸収とバイオエネルギー生産のための重要な生体システムとして注目されている。しかしながら、海洋性微細藻をエネルギー源として利用するためには高い増殖能、耐塩性、光合成能を有する微細藻の取得が必要である。本研究では微細藻の中でも増殖能、耐塩性、グリコーゲン合成能が比較的高い*Spirulina (Arthrospira) platensis*に着目し、その代謝能力を評価するための基盤技術として、網羅的代謝プロファイリング技術の確立を目指した。SOT培地(*Spirulina*-Ogawa-Terui, 塩濃度2.2% w/v)にて30°C, 50 μmol photons m⁻² S⁻¹, 18時間明期で10日間培養した*Spirulina*菌体を回収し、水/メタノール/クロロホルム混合溶媒を用いて細胞内代謝物を抽出した。二相分画後、親水相をGC/TOF-MS, CE/TOF-MSに供し、糖・有機酸・アミノ酸・糖リン酸などの測定を行った。疎水相からはクロロフィル、カロテノイド類の測定をUPLC/QTOF-MSにて実施した。以上の構築した分析系をもとに、グリコーゲン代謝に重要なペントースリン酸経路を含む親水性代謝中間体50種と光合成色素7種の定量に成功した。当該技術と*in vivo*安定同位体標識法を組み合わせた動的代謝プロファイリングを実施することによりグリコーゲンを高蓄積させるための代謝戦略を立案できると考えられる。

Development of a comprehensive metabolic profiling technique for system biology analysis of microalgae

○Yoshihiro IZUMI¹, Shimpei AIKAWA¹, Fumio MATSUDA², Tomohisa HASUNUMA², Akihiko KONDO¹
(¹Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.,²Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ.)

Key words metabolomics, microalgae, glycogen, bio-ethanol

3P-1138 大腸菌のカタボライト抑制と複数炭素源の同時消費に関するモデリングとシミュレーション

○平敷 善太郎¹, 松尾 沙代子², 広瀬 勇気², 清水 和幸^{1,2,3}
(¹九工大,²九工大・生体工,³慶應大)

【目的】次世代のバイオエネルギー生産のための細胞の設計が大きなテーマとなってきているが、これを戦略的に行うには、細胞の代謝調節制御機構をモデル化し、*in silico*のシミュレーションを行うことが効率的である。そこで、本研究では、大腸菌の中心代謝経路のモデル化を行い、pgi/pgk遺伝子欠損株によるカタボライト抑制の解除と、複数炭素源の同時消費についてシミュレーションを行い、実験的な検討も行った。

【方法および結果】Kotteらによって提案されたモデル¹⁾をベースに、G6P・F6Pの蓄積によるEII BC^{Glc}-Pの濃度上昇をモデル化し、pgkAB/pgi欠損株のシミュレーションを行った。その結果、グルコースとフラクトースが同時消費される現象が確認でき、実験結果と比較した。さらに、PTS以外のグルコース取込みや、比増殖速度とATPやNADPHの生成速度の関係をモデル化し、より実際の培養を再現できるモデルの開発を行っている。

1)Molecular Systems Biology 6, 355, 2010

Modeling and simulation for catabolite repression in *E. coli* and simultaneous consumption of multiple carbon sources

○Yoshitaro Heshiki¹, Sayoko Matsuo², Yuki Hirose², Kazuyuki Shimizu^{1,2,3}
(¹Kyushu Inst. Tech.,²Grad. Sch. Life Sci. System Eng., Kyushu Inst. Tech.,³Keio Univ.)

Key words modeling, simulation, *Escherichia coli*, catabolite repression

3P-1140 基質消費スクリーニングを用いたプレニル転移酵素のサイズ特異性進化

○生悦住 茉友, 古林 真衣子, 方波見 彰仁, 斎藤 恭一, 梅野 太輔
(千葉大院・工・共生応化)

自然界には5万を超えるテルペノイドが知られており、この中には、医薬品、香料、化粧品など産業的価値のあるものが数多く含まれている。しかし、その多くは無色であり、その多様な生成物それぞれを分析するには、スループット上の問題がある。このため、テルペノイド酵素の活性進化は、構造に依存するものが主であった。我々は、テルペノイド合成活性をその基質消費能によって可視化する汎用的な手法を開発した。その消費活性は、細胞(大腸菌)に共存させたカロテノイド合成経路から基質を奪う現象を、蓄積するカロテノイド色素の減少(コロニ色の白化)として観察する。

本講演では、本手法を用いた*Bacillus stearothermophilus*由来ファルネシル二リン酸合成酵素(FDS)のサイズ特異性の改変について報告する。FDSのY81A変異体は、ゲラニルゲラニル二リン酸(C20PP)およびゲラニルファルネシル二リン酸(C25PP)を合成する(S. Ohnuma, et al., *J. Biol. Chem.*, 271 (1996))。この変異体を鋳型としたError-Prone PCRによって第2世代の変異体ライブラリを作製した。同一細胞内に共存するリコペン合成を最も妨げる(最も白いコロニを与える)クローンを単離したところ、C20PP → C25PP合成活性が有意に改良された変異体が得られた。本報告では、この変異体を用いた非天然カロテノイドの生合成経路の構築についても報告する。

Evolving geranylgeranyl diphosphate synthase using the visual screening of substrate consumption.

○Mayu Ikezumi, Maiko Furubayashi, Akinori Katabami, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

Key words terpene, carotenoid, color screening, geranylgeranyl diphosphate