

## D122

*rpoS* 遺伝子欠損による大腸菌の代謝変化とその機構解明

( 阪大院基工・化工 ) ( 正)尾島由紘, (学)福田悠人, 土田和樹, ( 正)田谷正仁\*

## 【緒言】

微生物細胞を用いた有用物質生産では、酸素不足などの環境条件の悪化により酢酸等の副生成物の生成が問題であり、目的物を高収率で生産するためには、副生成物を減少させることが重要である。本研究グループでは、これまで L-Phenylalanine 生産菌において、ストレス応答遺伝子 *yggG* を導入した場合、酢酸生成量が減少し、L-Phenylalanine 生成量が増加することを見出している<sup>1)</sup>。*yggG* 導入株の遺伝子発現を調べたところ、酢酸生成を誘導し、かつストレス応答性レギュレーターである *rpoS* 遺伝子の発現量が低下していることが確認された。そこで本研究では、大腸菌の *rpoS* 遺伝子発現量が酢酸生成に及ぼす点に着目し、*rpoS* 遺伝子の欠損が大腸菌の培養および代謝特性に及ぼす影響を検討した。

## 【実験】

大腸菌 K-12 株由来の BW25113 株とその *rpoS* 遺伝子欠損株(以下 BW25113/ $\Delta rpoS$  株)を LB 培地(グルコース 40 g/L)において 37℃, 100, 200 rpm の振盪条件下で培養した。培養は 200 mL パツフル付き三角フラスコに 40 mL の培地を入れて行い、pH 調整剤として 2% 炭酸カルシウムを添加した。細胞密度は希塩酸にて炭酸カルシウムを溶解させた後、OD<sub>600</sub>により測定し乾重量に変換した。また、培地中のグルコース濃度は、BioProfile™300 (ノバ・バイオメディカル(株))を用いて、その他の代謝生成物は高速液体クロマトグラフを用いて測定した。遺伝子発現量は、リアルタイム PCR 解析により求めた。

## 【結果および考察】

大腸菌 BW25113 株の振盪速度 100 rpm と 200 rpm での培養 12 時間後の *rpoS* 遺伝子の発現量を Fig. 1 に示す。100 rpm の場合と比較し、200 rpm では約 2 倍に発現量が増加していることから、*rpoS* は比較的酸素供給が多い条件において発現が誘導されることがわかった。

そこで、*rpoS* 遺伝子が誘導される 200 rpm の培養条件において、BW25113 株と BW25113/ $\Delta rpoS$  株を培養した。培養開始 72 時間後における培地中の菌体濃度と酢酸濃度およびそれらの対糖収率を Table 1 に示す。結果として BW25113 株における *rpoS* の欠損は、この培養条件におい

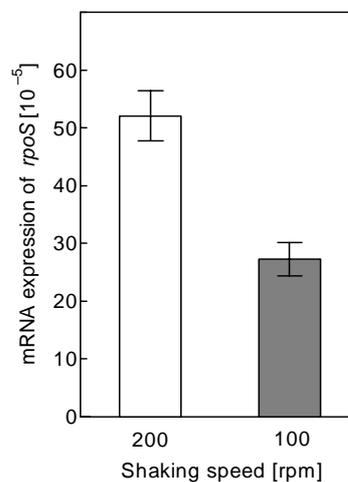
て主要な代謝生成物である酢酸の生成濃度と対糖収率を大きく低下させることが判明した。BW25113/ $\Delta rpoS$  株では、BW25113 株と比較すると 25 g/L 程度の酢酸生成量の減少が確認され、酢酸対糖収率を比較すると、BW25113 株の約 1/40 と非常に小さな値となり、中枢代謝に大きな変化が生じることが確認された。酢酸以外では、TCA 回路の代謝物であるクエン酸が、BW25113 株においては約 0.1 g/L であるのに対して、BW25113/ $\Delta rpoS$  株では約 2 g/L 蓄積しており、減少した酢酸の一部がクエン酸へと代謝されたことがわかった。以上の結果より、大腸菌の *rpoS* 遺伝子は比較的酸素供給が多い条件において誘導され、そこでの *rpoS* 遺伝子欠損は TCA 回路を初めとした中枢代謝のバランスとその結果生成する代謝物を大きく変化させることが確認された。現在、TCA 回路を含んだ中枢代謝の遺伝子発現を比較することにより、代謝改変機構の解明を行っている。

## 【参考文献】

1) Y. Ojima et al., *Biotechnol. Lett.*, **31**(4), 525-530 (2009)

\*TEL: 06-6850-6251, FAX: 06-6850-6254

e-mail: taya@cheng.es.osaka-u.ac.jp

Fig. 1 BW25113 株における *rpoS* 遺伝子発現量 (培養時間: 12 時間)Table 1 大腸菌 BW25113 株および BW25113/ $\Delta rpoS$  株の菌体濃度と酢酸濃度およびそれらの対糖収率

	振盪速度 [rpm]	菌体濃度 [g/L]	細胞収率 [g <sub>Dcw</sub> /g <sub>Glu</sub> ]	酢酸濃度 [g/L]	酢酸収率 [g <sub>Ace</sub> /g <sub>Glu</sub> ]
BW25113	200	3.0±0.3	0.097±0.020	26.7±2.3	0.76±0.11
BW25113/ $\Delta rpoS$	200	3.5±0.1	0.093±0.020	1.3±0.1	0.02±0.01

培養時間: 72 時間