

3A10-5 ゲノムデザイン学・網羅的ライブラリーによる遺伝子間配列の集積に与える効果の検討

○柘植 謙爾, 松井 邦子, 佐々木 理絵, 板谷 光泰
(三菱化学生命研)

【目的】バイオプロセスを構成する遺伝子群を集積する際には、連結順序の変化に伴い遺伝子コード領域間の介在配列が変化するため、これが全体の発現効率に影響を与える可能性が考えられる。我々は、枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した集積法の OGAB 法 (1) を考案し、本方法により枯草菌ゲノム中に分散して存在している抗生物質プリバスタチンの生産に関与する3つの遺伝子断片 (*degQ*, *sfp*, *pps*) の順序と向きを指定した全48種類の集積体を枯草菌ゲノム中に構築することに成功しており、集積向き・順序が生産量に影響を与えることを見出している (2)。今回は、この発現に与える影響の詳細な解析の一環として、遺伝子コード領域外に存在するプロモーターやターミネーターに違いのある断片を含めた144通りの網羅的集積ライブラリーを作成し、その発現の活性を評価したので報告する。【方法と結果】3のうち*degQ*遺伝子のアクティベーター領域を欠く遺伝子断片と、*sfp*遺伝子上流のターミネーターを欠く断片を新たな材料として使用した全31種類の断片を用意し、これらの断片を組み合わせて使用してOGAB法により枯草菌プラスミド中に集積後、枯草菌ゲノムに組み込むことで、目的のゲノムライブラリー全てを作成した。これらのプリバスタチンの生産量を指標に集積遺伝子群の発現効率の評価をした結果、*degQ*のアクティベーター配列の集積順序依存性が観察された。(1) Tsuge, Matsui, Itaya. NAR 31, e133 (2003) (2) 柘植, 松井, 板谷 2005年度農化要旨p.250

Genome designing biology: A study of effect of inter-gene sequence on the assembled unit by exhaustive library

○Kenji TSUGE, Kuniko MATSUI, Rie SASAKI, Mitsuhiro ITAYA
(Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sci.)

Key words genome designing, gene assembly, *Bacillus subtilis*, NRPS

3A11-2 大腸菌の網羅的リソース；微生物の潜在能力理解に向けたポストゲノム研究

ポスター
発表あり

○馬場 知哉¹, 北川 正成², 山本 奈津子¹, 富田 勝³, 森 浩禎^{1,3}
(¹奈良先端大・バイオ, ²ドラゴンジェノミクス, ³慶應大・先端生命研)

大腸菌は遺伝学・生化学・分子生物学のそれぞれの研究分野で最も研究された生物の1つであると同時に、遺伝子クローニングやタンパク質発現といった分子生物学ツールとして、またアミノ酸発酵などの代謝物質の生産菌としても重要な位置にある。大腸菌K-12株では、タンパク質をコードする遺伝子が約4300予測されているが、そのうち今日までに何らかの機能が解明された遺伝子は2500程度であり全体の60%に過ぎない。ポストゲノム研究では生命機能の細胞全体での統合的な理解、すなわちゲノム上の全ての遺伝子とその発現産物による相互関係を定量的・時間的・空間的に解明していくことがこれからの課題である。その為に我々は網羅的な研究リソースとして全遺伝子クローン (ASKA library) と全遺伝子の一遺伝子欠失株 (KEIO collection) を作製した。これらを用いて多角的なポストゲノム研究 (トランスクリプトーム解析、フィジオーム解析、インターラクトーム解析など) を遂行中である。また必須遺伝子に関しては新規の低コピープラスミドを用いた解析も開始している。これらの解析結果から微生物が有する潜在能力の理解とその開発に向けた今後の戦略について考察したい。

Comprehensive resources of *Escherichia coli*; Post-genome study for understanding of potentials in microorganisms

○Tomoya BABA¹, Masanari KITAGAWA², Natsuko YAMAMOTO¹, Masaru TOMITA³, Hirotsada MORI^{1,3}
(¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIIST, ²Dragon-Genomics, ³IAB, Keio Univ.)

Key words *Escherichia coli*, gene cloning, gene disruption, genome engineering

3A11-1 宿主細胞創製技術の開発 ミニマムゲノムファクトリー 染色体縮小化 MGF-01 株の作製とその性質

○溝口 寛¹, 澤野 由枝¹, 曾我 朋義², 富田 勝², 森 英郎¹
(¹協和発酵工業(株) バイオフロンティア研究所, ²慶應義塾大学先端生命科学研究所)

ミニマムゲノムファクトリー (MGF) プロジェクトでは染色体の大規模加工により細胞機能を向上させることを目標としている。我々はM9最少培地で旺盛に生育することを指標に53領域、合計1Mbの領域を削除したMGF-01株を作製した。この株はM9培地 (試験管) で培養すると、野生株と同等の生育速度で生育をはじめ、最終的な糖消費量は野生株より若干少ないにも関わらず、野生株が定常期に入った後も生育を続けるという性質を持っていた。MGF-01株を連続培養し菌体内代謝産物を測定したところ、野生株と比較して測定した45化合物のうち22化合物で変動があり、染色体縮小の過程で代謝が変化していることが示唆された。次に物質生産系をMGF-01株に導入し、生産物を指標に評価を行なった。脱感作型*thrA*を染色体に導入し、スレオニンの生産量を指標に野生株からMGF-01株にいたるまでの段階的な染色体縮小化株群を評価した。その結果、段階的に生産量の向上が認められ、MGF-01株は野生株と比較して2倍程度のスレオニンを蓄積することが確認された。MGF-01株で削除されている領域は生育という指標では不要であったが、これらの欠失のうちいずれか、もしくはそれらの組合せにより代謝面での変化がもたらされたと考えられた。遺伝子削除の複合的な効果を検証し、それらを利用した代謝の活性化について考察する。

Construction and analysis of MGF-01 with minimized genome by 1Mb

○Hiroshi MIZOGUCHI¹, Yoshie SAWANO¹, Tomoyosi SOGA², Masaru TOMITA², Hideo MORI¹
(¹Kyowa Hakko Kogyo CO., LTD. BioFrontier Lab., ²Institute for Advanced Biosciences, Keio University)

Key words genome, minichromosome, MGF, minimum genome

3A11-3 細菌「超チャネル」の分子移植による環境浄化型「スーパー細菌」の創成

○宮本 裕希子, 麻生 祐司, 橋本 渉, 村田 幸作
(京大院・農)

[背景・目的] *Sphingomonas* sp. A1は細胞表面に形成する体腔とABCトランスポーターからなる「超チャネル」を介して高分子物質であるアルギン酸を細胞内に取り込む。体腔はアルギン酸濃縮機能を持ち、その形成はアルギン酸の輸送・分解に関する遺伝子群の発現と関係している。本研究では、本遺伝子群をダイオキシン分解菌*Sphingomonas wittichii* RW1 (RW1株) に導入することで超チャネルをRW1株へ分子移植し、ダイオキシン分解能の向上を試みた。[方法・結果] 上記遺伝子群をベクター pKSI3にクローニングし、pBE11を構築した。これをRW1株へ導入後、アルギン酸およびdibenzofuranを添加した無機培地で4日間培養し、経時的に各添加物質を定量した。その結果、野生株は10 mM dibenzofuranを完全分解するのに3日以上要したのに対し、RW1 (pBE11) は僅か2日で分解した。また、RW1 (pBE11) は明瞭なアルギン酸酸化能を示さなかったが、ウェスタン解析および電子顕微鏡による細胞表面観察により、本菌はアルギン酸非添加時においてもアルギン酸輸送・分解に関する遺伝子群を構成的に発現し、超チャネルを形成していることが示唆された。以上の結果より、RW1 (pBE11) はアルギン酸非依存的に超チャネルを形成し、野生株よりも高効率にdibenzofuranの取り込み・分解を行うことが示唆された。本研究結果は、超チャネルの分子移植が環境有害物質分解菌の分解能向上をはじめとした新たな微生物の分子育種法に大きく寄与することを示すものである。尚、生研センタープロジェクトの一環として行われた。

Creation of a bioremediative super-bug by transplantation of the super-channel

○Yukiko MIYAMOTO, Yuji ASO, Wataru HASHIMOTO, Kousaku MURATA
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words *Sphingomonas*, dioxin, bioremediation, molecular breeding