

1P-025 代謝改変による赤色酵母を用いたアスタキサンチン生産性の向上

○山元 啓輔¹, 原 清敬², 荻野 千秋¹, 近藤 昭彦¹
 (¹神戸大院・工, ²静県大・食栄)
 akondo@kobe-u.ac.jp

【目的】

本研究は、赤色酵母を用いた発酵法によりアスタキサンチン(AXN)を高生産することを目的として、(1)AXN 生合成を妨げる生成物の合成に関与する遺伝子 *cyp61* の破壊、及び(2)AXN 生合成関連遺伝子の高発現を試みた。

【方法】**(1)*cyp61* の破壊**

第一に *cyp61* の 5' 及び 3' 末端側の相同領域とマーカーである G418 耐性遺伝子 (G418^R) カセットを連結し、赤色酵母ゲノム内に導入した。これにより、ゲノム中の目的遺伝子と G418^R カセットを相同組換えによって置き換え、*cyp61* のヘテロ破壊株 ($\Delta cyp61 (+/-)$) を得た。次に、G418 濃度を変えた濃度勾配培養によって、*cyp61* のホモ破壊株 ($\Delta cyp61 (-/-)$) を得た。

(2)AXN 生合成関連遺伝子の高発現

5つの遺伝子 (*AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *crtE*, *crtS*) を導入したプラスミドを構築し、赤色酵母ゲノム内へ組込み、得られた形質転換体 (MVA+*crtE/S* 株) を用いて AXN 生産を行った。

【結果】**(1)*cyp61* の破壊**

cyp61 の破壊株の発酵試験を行い、AXN 含有量の時間変化を調べた。その結果、野生(WT)株と比べ $\Delta cyp61 (+/-)$ 株では変化がなかったのに対し、 $\Delta cyp61 (-/-)$ 株では 140% 向上した。この結果から、*cyp61* のホモ破壊に成功したことが示唆された。また、赤色酵母の遺伝子破壊において本手法の有効性も示された。

(2)AXN 生合成関連遺伝子の高発現

培養 72 時間後において、MVA+*crtE/S* 株では、WT 株と比べて AXN 含有量が 210% 向上した。この結果から、AXN 生合成関連遺伝子の高発現によって AXN 含有量の向上に成功した。

Improvement of astaxanthin production using metabolically engineered***Xanthophyllomyces dendrorhous***

○Keisuke Yamamoto¹, Kiyotaka Hara², Chiaki Ogino¹, Akihiko Kondo¹
 (¹Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., ²Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words *Xanthophyllomyces dendrorhous*, Carotenoid, Astaxanthin, metabolic engineering

1P-026 タンパク質精製のためのポリヒスチジンタグの改良

○喜納 一貴, 鎌水 透, 中村 美紀子, 星田 尚司, 赤田 倫治
 (山口大院・医学系応用分子生命)
 rinji@yamaguchi-u.ac.jp

有用タンパク質の精製には様々な方法があるが、アフィニティークロマトグラフィーに着目した。6つ程度のヒスチジン (6His) が連続的に並んだ配列を目的のタンパク質にタグとしてつけ、6His がニッケルピーズに結合する性質を用いて精製する方法がある。タグが短いので、配列付加操作が容易となり、また、タンパク構造への影響が少ないと考えられる。しかし、この精製法では、6His とニッケルピーズとの吸着が弱く、不純物が多い抽出液からの精製工程において高度に精製するのが難しい。そこで、より長いポリヒスチジンがニッケルピーズとの親和性を向上させるのではないかと考え、ヒスチジンの数を増やした。モデルタンパク質として、可視光下でも赤色を呈する yEmRFP の赤色蛍光タンパク質を利用し、精製工程の観察した。酵母で yEmRFP に 6His または 12His のポリヒスチジンを N 末と C 末につけ、精製過程を比較した。イミダゾールによるニッケルピーズからの His-RFP の溶出を調べたところ 12His-RFP は 6His-RFP よりも高いイミダゾール濃度で溶出された。この結果は、6His よりも 12His の方がニッケルピーズとより強く結合するというを示している。さらにニッケルピーズとの吸着を強くするため、18His を yEmRFP につけて酵母に発現させたところ、酵母が赤色に呈色せず、白色になった。この結果は、ヒスチジンの数を増やすことで、目的のタンパク質の構造に影響を与えたのではないかと考えられる。そこで、18His に変異を加え、yEmRFP につけて酵母に発現させたところ、yEmRFP の構造に影響を与えず、ニッケルピーズに強く吸着する His タグができた。

Improvement of polyhistidine-tag for protein purification

○Kazuki Kina, Toru Yurimizu, Mikiko Nakamura, Hisashi Hoshida, Rinji Akada
 (Grad.Sch.Med.Bio.Sci, Yamaguchi Univ)

Key words His-tag, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, affinity purification

1P-027 がん細胞におけるクロモドメインタンパク質 CBX2 のアポトーシス制御機構の解析

○横山 翔^{1,2}, 伊藤 昭博¹, 波多野 稔子¹, 浜本 牧子², 吉田 稔¹
 (¹理研・化学遺伝,²明治大院・農)
 yoshidam@riken.jp

【背景と目的】 ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) は転写抑制のためのエピジェネティックマークとして機能するが、同時に細胞のがん化に密接に関与していることが明らかになってきた。H3K27me3 による転写抑制は、H3K27me3 と直接結合するクロモドメインタンパク質 CBX2 により仲介されるが、細胞のがん化における CBX2 の役割はほとんど不明である。そこで本研究では、CBX2 が制御する遺伝子特定することで、細胞のがん化における CBX2 の重要性を明らかにすることを旨とした。

【方法】 正常線維芽細胞 TIG3 および、乳がん細胞である MCF7 と MDA-MB-231 について、細胞内 ATP 量を指標として CBX2 をノックダウンによる細胞増殖への影響を検討した。また、CBX2 ノックダウン条件下における遺伝子発現レベルの変化を、DNA マイクロアレイによって網羅的に調べた。

【結果と考察】 CBX2 をノックダウンすることで、MDA-MB-231 細胞の増殖のみ顕著に抑制されることが明らかとなった。そこで MDA-MB-231 細胞において、DNA マイクロアレイによって CBX2 ノックダウンにより発現が変動する遺伝子を網羅的に探索したところ、アポトーシスの促進因子である BIK、PUMA の発現が上昇していることを見出した。定量的 PCR 解析の結果、MDA-MB-231 細胞でのみ、CBX2 のノックダウンで有意に両遺伝子の発現が上昇することが確認された。以上の結果から、CBX2 は MDA-MB-231 細胞において、BIK、PUMA の遺伝子発現を下方制御することによりアポトーシスを回避し、がん形質の維持に寄与する可能性が示された。

Functional analysis of chromodomain protein CBX2 in the regulation of apoptosis in cancer cells

○Yokoyama Sho^{1,2}, Ito Akihiro¹, Hatano Naruko¹, Hamamoto Makiko²,
 Yoshida Minoru¹
 (¹Chem. Genet., RIKEN, ²Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words epigenetic, CBX2, histone methylation, apoptosis

1P-028 遺伝子組換えタンパク質を生産可能とする「スーパーミズ」の開発

赤澤 真一, ○町田 悠, 加島 徳人, 若月 夕佳, 村山 隼人
 (長岡高専・物質工)
 s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

【目的】 バイオ医薬品であるヒトインスリンは大腸菌を宿主として生産されているが、貧血治療薬であるエリスロポエチンのような翻訳後修飾を必要とする糖タンパク質は大腸菌で生産する事が出来ず、動物細胞が利用されている。しかしながら製造コストが高価であるといった課題がある。そこで我々は、これらの問題を解決するための新規宿主生物としてシマミズ *Eisenia fetida* に注目した。既に我々は本ミズを用いた健康食品を開発しており、安全性も確かめられているため、本ミズを用いれば組換えタンパク質をミズごと食して摂取する事も可能である。しかしながら、本ミズの遺伝子工学的手法は全く報告されておらず、本研究では前段階として遺伝子導入法の構築を試みた。本手法の構築により、ミズを新規モデル生物としても提案可能となり、新たな研究分野を生み出すことも可能となる。

【方法】 *E. fetida* への遺伝子導入は、体内の土を排出させ切断し、切断した尻尾側の部位の切断面に、ルシフェラーゼ遺伝子をマイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用することによって行った。遺伝子導入の確認は、ミズを破碎・溶解し、ルシフェラーゼの発光強度を計測する事により行った。

【結果・考察】 世界で初めて *E. fetida* の遺伝子導入に成功した。現在はサザンブロットリングを用いて導入したルシフェラーゼ遺伝子の構築を行っており、今後は完全体に再生する頭部側の形質転換を試み、形質が子孫に継代するのかを検証する。本研究の一部は JSPS 科研費挑戦的萌芽研究の一環として行われた。

Development of "super earthworms" that enable production of recombinant protein

Shin-ichi Akazawa, ○Yu Machida, Norito Kashima, Yuka Wakatsuki,
 Hayato Murayama
 (Dept. Mat. Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll.)

Key words earthworm, transformation, host, model animal