

**2F15-1 96 ウェル形質転換法を利用した *BNII* と相互作用する遺伝子のゲノムワイド解析**○上野 耕司, 藤原 裕文, 星田 尚司, 赤田 倫治  
(山口大工・応化工)

酵母の *BNII* は形態形成を制御する Rho-GTPase エフェクターであり、ヒトのホモログはガン細胞の転移や浸潤に関与することがわかっている。*BNII* を *GAL10* プロモーターで発現制御しガラクトース培地で過剰に発現することで形態異常と増殖停止が引き起こされる。過剰発現による増殖停止を抑制する変異遺伝子のことをサブレッサーと呼び *BNII* の発現に関与しなければ、それらは *BNII* と相互作用する遺伝子であることがわかる。酵母では全遺伝子の破壊株が利用できるため、これらの遺伝子破壊株に *BNII* を過剰に発現するプラスミドを形質転換し、増殖停止を抑制する遺伝子の網羅的な探索を行うことにした。必須遺伝子を除いた 4,800 株に対して新しく開発した 96 ウェル形質転換法により *BNII* を導入した。形質転換体をガラクトース培地にスポットし、増殖を観察することで網羅的に *BNII* のサブレッサー遺伝子を探索した。既に相互作用のわかっている遺伝子に加え、様々な新しいサブレッサー遺伝子が取得できた。

**Genome-wide analysis of *BNII* interaction genes using a 96-well transformation method**○Koji Ueno, Hirotake Fujiwara, Hisashi Hoshida, Rinji Akada  
(Dept. Appl. Chem. and Chem. Eng., Fac. Eng., Yamaguchi Univ.)**Key words** *BNII*, yeast deletion strains, suppressor, genome**2F15-2 96 ウェル形質転換法を用いた酵母における異種ラッカーゼ生産に関するゲノムワイド解析**○星田 尚司, 菅野 幸, 山村 宏, 赤田 倫治  
(山口大工・応化工)

【目的】異種タンパク質を発現させる多くの宿主ベクター系が存在するが、どの系もあらゆるタンパク質を高発現できるとは限らない。実際、我々が白色腐朽菌 *Pycnoporus coccineus* からクローニングしたラッカーゼ遺伝子 (*lcc1*) を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で分泌生産させたときの活性は弱い。異種タンパク質においては構造形成の困難さや構造異常の品質管理機構の働きによりタンパク質生産が抑制されている可能性があるが、この機構はほとんどわかっていない。タンパク質品質管理機構を明らかにできれば、あらゆるタンパク質の高生産が期待できる。そこで異種タンパク質生産に関与する遺伝子を網羅的に探索した。

【方法および結果】出芽酵母では約 6,000 の遺伝子を 1 つずつ破壊した遺伝子破壊株セットが作成されており、我々はこの破壊株セットを迅速に形質転換できる方法を開発した。そこで、この破壊株セットのうち必須遺伝子破壊株を除く 4,800 株にラッカーゼ遺伝子を導入し、ラッカーゼ活性を強く発現できる遺伝子破壊株を探索した。*lcc1* cDNA を銅誘導型 *CUP1* プロモーターの下流に挿入した *CEN/ARS* 型プラスミドを用いて形質転換を行い、銅と活性指示薬のグアイアコールを含む培地上でラッカーゼ活性を調べた。検索された遺伝子は異種ラッカーゼ生産に重要な役割を持ち、いままで発現困難であった異種タンパク質の高生産がこれらの株で期待できるとともに、これらの遺伝子の機能解析により品質管理機構も解明できる。

**Genome-wide analysis of heterologous production of laccase in yeast using 96-well transformation method**○Hisashi Hoshida, Miyuki Sugano, Hiroshi Yamamura, Rinji Akada  
(Dept. Appl. Chem. Chem. Eng., Yamaguchi Univ.)**Key words** 96-well transformation, heterologous production, laccase, yeast**2F15-3 酵母を細胞工場とした植物染色体任意領域の高効率人工染色体化**○金 連姫<sup>1</sup>, 杉山 峰崇<sup>2</sup>, 池田 真知子<sup>1</sup>, 金子 嘉信<sup>1</sup>,  
福井 希一<sup>1</sup>, 小林 昭雄<sup>1,3</sup>, 原島 俊<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪大院工・応生工, <sup>2</sup> NEDO, <sup>3</sup> 生研機構小林プロジェクト)

【目的】動植物染色体の自在な操作技術は遺伝子治療や新しい動植物バイオテクノロジー発展のための基盤技術になると考えられる。演者らは、酵母の天然染色体を効率よく分断し、ミニ染色体化する技術を開発してきた。この技術を基に、YAC にクローニングされた植物染色体の任意領域を、直接植物細胞に導入可能な人工染色体に加工できる植物用 YAC 分断ベクターを構築した。その有効性を検討するため、シロイヌナズナ第 5 番染色体由来の 590kb 断片を持つ YAC クロノンを対象とし、それに含まれる 50kb 領域の人工染色体化を試みた。

【方法及び結果】YAC の右端から 100kb の部位で 1 回目の分断を行った。形質転換体の中で期待通り 590kb 断片が 100kb と 490kb に分断された 1 株を選び、490kb 分断染色体の右端から 50kb の部位で 2 回目の分断を行った。その結果、26 株の形質転換体中 3 株において、50kb の分断染色体が見られた。次に、この技術をさらに簡便化するため、PCR プライマーに、直接テロメア配列と分断の標的配列を付加して分断用断片を調製する PCS 法 (PCR-mediated Chromosome Splitting) を適用したところ、同様に任意領域の人工染色体化が可能であった。これらの結果より、植物染色体の任意領域を簡便に人工染色体化できることが示された。

**Efficient conversion of desired region of plant chromosome into artificial chromosome in yeast**○YeonHee Kim<sup>1</sup>, Minetaka Sugiyama<sup>2</sup>, Machiko Ikeda<sup>1</sup>, Yoshinobu Kneke<sup>1</sup>,  
Kiichi Fukui<sup>1</sup>, Akio Kobayashi<sup>1,3</sup>, Satoshi Harashima<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup> NEDO, <sup>3</sup> BRAIN)**Key words** YAC, chromosome splitting, plant chromosome manipulation**2F15-4 Translational coupling による翻訳読み枠に依存した新規マーカー遺伝子系の構築**○國廣 澄子<sup>1,2</sup>, 正木 春彦<sup>1</sup>, 萩原 央子<sup>1</sup>, 養王田 正文<sup>2</sup>,  
町田 雅之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 産総研・糖鎖セ, <sup>2</sup> 東農工大工・生命工, <sup>3</sup> 東大院農生科・応生工)

【目的】我々はファージディスプレイ法を用いた転写調節遺伝子の網羅的取得を行っており、出芽酵母染色体 DNA ライブラリーから認識配列特異的な濃縮に成功した (Hagiwara et al. J. Biochem. 132, 975, 2002)。しかし、ライブラリー構築時に生じる挿入 DNA 断片の翻訳読み枠のずれや逆向きの翻訳は、生体内には存在しないペプチドの提示を引き起こし、affinity selection の信頼性を著しく低下させる。そこで、これらを排除するための positive selection 系の構築を試みた。

【方法及び結果】大腸菌プラスミドの作る colicin E3 はリボソームを失活させて他の大腸菌を殺すが、生産菌は阻害剤である immunity タンパク質を作って安定化する。*imm* 遺伝子は直上流の *col* 遺伝子と近接しており、共発的に誘発合成 (translational coupling) される可能性がある。そこで外来 DNA と *col* 遺伝子の終止コドンから *imm* 遺伝子までを含む断片を pUC19 ベクターの *lacZ* 転写翻訳系下流に in-frame で配置すると、これで形質転換した大腸菌はコリシン耐性を示し、translational coupling による *imm* 遺伝子の発現が確認された。更に *imm* 遺伝子の上流域に翻訳読み枠が異なる複数の終止コドンを導入することにより、ライブラリー構築時に挿入 DNA 断片が正しい読み枠で貫かれなかったクローンを除去できるマーカー遺伝子系の構築に成功した。

**A novel expression vector for positive selection based on the translational coupling**○Sumiko Kunihiro<sup>1,2</sup>, Haruhiko Masaki<sup>3</sup>, Hiroko Hagiwara<sup>1</sup>, Masafumi Yoshida<sup>2</sup>, Masayuki Machida<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> AIST, <sup>2</sup> Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup> Dept. Biotech., Univ. Tokyo)**Key words** positive selection, expression vector, colicin E3, immunity E3, translational coupling