

3C10-2 微細藻類の増殖制御関連MAPキナーゼ情報伝達系の解析

○山口 明子, 西谷 哲哉, 藤江 誠, 山田 隆,
宇佐美昭二
(広島大院・先端・生命機能)

Hematococcus sp. などの微細藻類は、アスタキサンチンをはじめとする様々な有用カロテノイドを合成することから、生産性の向上が検討されてきた。一般的に二次代謝産物の合成は細胞増殖と負の相関にあることから、細胞増殖制御はカロテノイド生産性向上のための有効な手段の一つと考えられる。そこで微細藻類のモデル生物であるクラミドモナスを用い、細胞増殖の制御に関与する MAP キナーゼシグナル伝達系の分離と解析を進めてきた。H14年度大会において、クラミドモナスに5種類程度存在すると予想されたMAPキナーゼ相同遺伝子のうち、*CrMPK1,2*遺伝子の全塩基配列の決定、及びそれらタンパク質がリン酸化活性を有し、両遺伝子が機能的に MAP キナーゼ相同遺伝子であることを報告した。今回我々は *CrMPK1,2* タンパク質の機能を特定するため、抗 *CrMPK1,2* 特異抗体を作製し、リン酸化と細胞機能との関連をウエスタン法により解析した。その結果、*CrMPK2* タンパク質は細胞増殖、ストレスなどの様々な刺激のいずれによってもリン酸化に変化が見られないのに対し、*CrMPK1* タンパク質は細胞分裂直前の細胞において一過的にリン酸化されることが明らかとなり、*CrMPK1* タンパク質は細胞分裂の制御に関与している可能性が示された。現在 *CrMPK1* 遺伝子の過剰・抑制・破壊株を作製し、細胞増殖に対する効果を検証するとともに、二次代謝産物の生産への効果も検証していく予定である。

Analysis of MAPK signaling pathways involved in regulation of microalgal cell growth

○Akiko YAMAGUCHI, Tetsuya NISHITANI, Makoto FUJIE, Takashi YAMADA, Shoji USAMI
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words MAP kinase, *Chlamydomonas reinhardtii*, cell growth

3C10-4 シロイヌナズナの日長による茎の太さの制御の解析

○森田 一太¹, 藤江 誠¹, 塚谷 裕^{2,3,4},
宇佐美昭二¹, 山田 隆¹
(¹広島大院・先端・生命機能, ²自然科学研究機構・岡崎統合バイオ, ³総研大・先端科学及び生命科学, ⁴京都大・院・理)

【目的】植物の生長は分裂組織によって制御されている。茎頂分裂組織・根端分裂組織ではシロイヌナズナの突然変異体を用いた分子遺伝学的な研究が急速に進んでいるが、形成層については、実験室では扱いにくい木本性の植物において発達するため、未解明な点が多い。本研究は、モデル植物として有用なシロイヌナズナの茎の太さに関する変異体を取得し、形成層の活動を制御する遺伝子を同定・解析することを目的としている。【方法・結果】シロイヌナズナを短日条件下 (8h light, 16h dark) で栽培した場合、形成層が発達して茎が太くなることを見出した。そこで、シロイヌナズナを長日条件下 (16h light, 8h dark) と短日条件下で栽培し、胚軸の断面の茎の太さと細胞数について計測したところ、短日条件と長日条件では細胞数に差が生じていた。この結果をもとにアクチベーションタギングしたシロイヌナズナの種子を用いて長日条件下、短日条件下における変異体のスクリーニングを行った。現在までに、長日条件下において茎が太くなる変異体と考えられる *cs35858* と *cs36065* の2株を取得した。また、茎が太くなる株以外にも、短日条件下においてロゼット葉が異常に多くなる株、種子数が多くなる株なども取得した。これらの変異体候補とその解析結果について報告する。

Analysis of cell division activity in a cambium of *Arabidopsis thaliana*

○Ichita MORITA¹, Makoto FUJIE¹, Hirokazu TSUKAYA², Shoji USAMI¹, Takashi YAMADA¹
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²National Institute for Basic Biology/Center for Integrative Bioscience)

Key words cambium, meristem, *Arabidopsis thaliana*, mutant

3C10-3 大腸菌 *aceA* 遺伝子のラン藻 *Synechococcus elongatus* への導入と発現

○高橋 哲哉, 橋本 英幸, 松岡 正佳, 小川 隆平
(崇城大・工・応微工)

【目的】グリオキシル酸分路は C_2 化合物から TCA 回路中間体を補充し、イソクエン酸リアーゼ (ICL) とリンゴ酸合成酵素により構成される。ラン藻にはこれらの酵素の遺伝子が存在せず、グリオキシル酸分路を欠いている。ラン藻にグリオキシル酸分路を導入したときの代謝に及ぼす影響を調べるため、大腸菌イソクエン酸リアーゼのラン藻における発現を試みた。【方法及び結果】*lac* promoter 下流で発現する大腸菌 ICL 遺伝子 (*aceA* 遺伝子) をシャトルベクター pUC303 の *EcoRI* 部位に組み込んだプラスミドを構築し、エレクトロポレーションによりラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 R2-SPc に導入した。しかし、形質転換体では ICL 活性及びタンパク質の発現は確認されなかった。そこで、ラン藻で高発現する *psbAI* promoter の下流に *aceA* 遺伝子をつなぎ、pUC303 に連結して $\Delta psbAI$ ラン藻株 GRPS 301 に導入した。得られた形質転換体からは ICL 活性はほとんど検出されなかったが、Western blotting により ICL タンパク質の発現が確認された。よってラン藻における ICL 活性発現には他の要因 (リン酸化等) が必要である可能性 (1) が示唆された。

(1) Robertson, E.F. and Reeves, H.C. (1989) *Biochimie* 71, 1065-1070

Transformation and expression of *aceA* gen from *E. coli* in the *Cyanobacterium Synechococcus elongatus*

○Tetsuya TAKAHASHI, Hideyuki HASHIMOTO, Masayoshi MATSUOKA, Takahira OGAWA
(Dept. Appl. Microb. Technol., Fac. Eng., Sojo Univ.)

Key words isocitrate lyase, *Synechococcus*, *psbAI* promoter

3C10-5 高活性型人工進化酵素を用いた遺伝子組換えシロイヌナズナによるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 合成の効率化

○松本謙一郎¹, 新井 祐子², 長尾 里奈³, 村田 孝明³,
高瀬 和真¹, 田口 精一⁴, 島田 浩章³, 土肥 義治^{1,5},
吉瀬 智康⁶, 仲下 英雄⁶
(¹理研・高分子, ²基礎生物研, ³東理大・基礎工, ⁴北大・院工, ⁵東工大・院工, ⁶理研)

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物が貯蔵物質として合成するポリエステルであり、生分解性プラスチックとして利用できる。しかし、醗酵により PHA を生産すると炭素源のコストが全体のコストを押し上げるという問題があり、遺伝子組換え植物を用いた PHA の直接生産が検討されている。微生物から単離した PHA 合成系遺伝子を植物に導入すると PHA を合成する遺伝子組換え植物を得ることができるが、蓄積量が極めて少なく、実用化のためには蓄積量の増加が課題であった。最近我々の研究室では、進化工学の手法を用いて、天然型よりも高活性を持つ PHA 重合酵素の変異酵素を取得することに成功した。本研究では、高活性型変異酵素遺伝子をシロイヌナズナに導入し、PHA 蓄積量を増加させることを検討した。その結果、変異酵素の導入により、天然型酵素と比較して最大で約10倍の PHA を蓄積することができ、モノマー組成も制御できることが分かった。

Enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production in transgenic *Arabidopsis thaliana* by the highly active mutated PHA synthase generated by *in vitro* evolution

○Ken'ichiro MATSUMOTO¹, Yuko ARAI², Rina NAGAO³, Takaaki MURATA³, Kazuma TAKASE¹, Seiichi TAGUCHI¹, Hiroaki SHIMADA³, Yoshiharu DOI^{1,5}, Tomoyasu KICHISE⁶, Hideo NAKASHITA⁶
(¹Polymer Chem. Lab., RIKEN, ²National Institute for Basic Biology, ³Dept. Biol. Sci. & Tech, Tokyo Univ. Sci., ⁴Dept. Eng. Hokkaido Univ., ⁵Tokyo Ins. Tech., ⁶RIKEN Institute)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Arabidopsis thaliana*, evolutionary engineering