

2115-3 FLO1 由来アンカーを用いた *Pichia pastoris* を宿主細胞とした酵母細胞表面提示技術の開発

○谷野 孝徳¹, 福田 秀樹¹, 近藤 昭彦²
(¹神戸大院・自科,²神戸大・工・応化)

【目的】酵素剤は穏和な条件下で反応を触媒することができるという点のみではなく、グリーンケミストリーといった面でも注目されている。しかしながら酵素剤は一般的に高価であり、耐久性の面で問題を有する。こういった問題点を克服するための手法の一つとして、近年酵母細胞表面提示技術が注目されている。本研究では酵母細胞表面提示技術のよりいっそうの多様性および機能性の向上を目的とし、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を宿主細胞とした酵母細胞表面提示系の創製を試みた。*P. pastoris* は多くの利点を有した優れた宿主細胞であり、酵母細胞表面提示技術の機能性および応用範囲を拡大できると期待できる。

【方法・結果】アンカータンパク質として *Saccharomyces cerevisiae* ATCC60715由来FLO1タンパク質の凝集機能ドメインを含むN末端側から1099アミノ酸からなるFSアンカーを用い、AOX1プロモーター制御下で *Rhizopus oryzae* IFO4697由来リパーゼのpro領域を含むproROLの *P. pastoris* 細胞表面提示を試みた。蛍光抗体染色ならびにウエスタンブロット解析によりROLが *P. pastoris* 細胞表面に提示されていることが確認された。またウエスタンブロット解析の結果よりキメラタンパク質FSproROLが高度に糖鎖修飾を受けていることも確認された。また乾燥菌体当たりのリパーゼ活性は誘導96時間で59.4 IU / g-dry cellに達した。

Construction of yeast cell-surface system based on FLO1 anchor using *Pichia pastoris* as the host strain

○Takanori TANINO¹, Hideki FUKUDA¹, Akihiko KONDO²
(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

Key words cell surface display, *Pichia pastoris*, lipase

2115-5 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1における全ゲノム解析及び磁性細菌粒子合成関連遺伝子の探索

○福田 頼謙, 岡村 好子, 竹山 春子, 松永 是
(東京農工大院・工)

【目的】*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株は菌体内にナノサイズの磁石、磁性細菌粒子を合成する原核微生物である。AMB-1はバイオミネラリゼーションのモデル微生物というだけでなく、その合成する磁性細菌粒子はリン脂質膜、単磁区構造を有することにより高い分散性と磁気特性をもっており、磁石単体として優れている。この合成機構の解明は学術・応用の両側面において有意義な影響が期待され、今回、全ゲノム配列の決定及び解析を行い、磁性細菌粒子合成関連遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】AMB-1ゲノムは、4967148塩基対からなり、4559のORFが予測された。閾値1e-5としたアノテーション付けにより、43%のORFが機能を推定された。磁性細菌粒子合成機構の解析としては、(1)ゲノム配列が公開されている69のProteobacteria種に対するオーソログレベルでの比較解析、及び(2)全遺伝子セットから磁性細菌粒子を合成しうるシステムの再構成により行った。

比較解析の結果、517のAMB-1特異的遺伝子が見出された。これらの中には、プロテオーム解析により同定された磁性細菌粒子膜局在タンパク質をコードする遺伝子や、これまでに磁性細菌粒子合成に機能すると同定された遺伝子が含まれたが、そのほとんどが機能未知か他に類似性の見られない遺伝子だった。これらの遺伝子はゲノム上に散在していたが幾つかの局在領域も存在し、それらはIS因子やファージ遺伝子の近傍に位置していた。

Whole genome analysis of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 and gene finding for the magnetosome synthesis

○Yorikane FUKUDA, Yoshiko OKAMURA, Haruko TAKEYAMA, Tadashi MATSUNAGA
(Dept. of Biotechnol., Tokyo Univ. Agri. Tech.)

Key words Whole genome analysis, magnetosome, *Magnetospirillum magneticum* AMB-1

2115-4 酵母シグナル伝達によるリガンド検出システム

○石井 純¹, 松村 静香¹, 立松 健司², 黒田 俊一², 福田 秀樹¹, 近藤 昭彦¹
(¹神戸大院・自科,²阪大・産研)

【目的】Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞内にシグナルを伝達し生理作用を引き起こす。そのため医薬品開発の主要なターゲットとなっており、既知GPCRに対するアゴニスト・アンタゴニストの探索、オーファンGPCRに対するリガンドの探索が行われている。本研究では、酵母細胞を用いたアゴニストハイスループットスクリーニング系を開発するための足がかりとして、酵母内在性GPCRであるSte2をモデル系とした酵母シグナル伝達を利用したリガンド検出システムの開発を試みた。酵母a型細胞膜上に存在する受容体Ste2は接合因子であるalpha-factorとの結合によりシグナル伝達を引き起こす。シグナル伝達が起こった際に緑色蛍光タンパク質(EGFP)が生産されるよう酵母細胞を改変し、Ste2に対するリガンド結合を検出できるシステムを創製した。

【方法と結果】Ste2-alpha-factorの結合を検出するために、シグナル伝達により発現が引き起こされるFUS1pが緑色蛍光タンパク質(EGFP)との融合タンパク質として生産されるように酵母ゲノムを組換えた。この組換え細胞をalpha-factor添加培地で培養し、フローサイトメーター(FCM)を用いて蛍光強度を測定した。さらにこの酵母細胞を用いて、シグナル伝達に影響を及ぼす各種タンパク質をコードする遺伝子を破壊した。これらの破壊株は経時的な蛍光強度の変化に顕著な差が見られた。

今後、ヒトGPCRを酵母細胞膜上に発現させることにより実際のリガンドスクリーニングへの応用を試みる。

Ligand screening system with signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*

○Jun ISHII¹, Shizuka MATSUMURA¹, Kenji TATEMATSU², Syunichi KURODA², Hideki FUKUDA¹, Akihiko KONDO¹
(¹Kobe Univ., ²Osaka Univ.)

Key words GPCR, signal transduction, screening, *Saccharomyces cerevisiae*

2116-1 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 における鉄応答性遺伝子の発現解析

○鈴木 健之, 岡村 好子, 竹山 春子, 松永 是
(東京農工大院・工)

【目的】当研究室において *Magnetospirillum magneticum* AMB-1株の全ゲノム配列が解読され、ゲノムワイドでの解析が可能となった。現在我々はDNAマイクロアレイを用い、磁性細菌粒子形成機構の解明に向け網羅的遺伝子発現解析に取り組んでいる。AMB-1株は磁性細菌粒子を合成するために大量の鉄を必要とする。本研究では、鉄応答性遺伝子群の網羅的発現解析を目的とし、特にAMB-1株における鉄取り込みに着目し、解析を行った。

【方法及び結果】初期鉄濃度を0.1 μM-300 μMとしたMSGM培地中で、対数増殖期まで前培養を行ったAMB-1野生株を再度同一濃度のMSGM培地中に1×10⁹ cells/mlとなるよう植菌し、4時間インキュベートした。細胞を遠心回収後、全RNAを抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。低鉄濃度0.1 μMの培地中で培養した細胞(対照群)に対する、初期鉄濃度20, 40, 80, 100, 300 μMの培地中で培養した細胞(実験群)中のmRNAの発現比を求めた結果、すべての条件において鉄応答性転写抑制因子 *fur* の発現が見られたが、*fur*制御鉄トランスポーターは、300 μMのときのみ初めて抑制された。一般的なバクテリアでは、Fur制御下にある鉄トランスポーターはFurタンパク質により直ちに転写抑制を受ける。一方、AMB-1においては20 μM~100 μMでは *fur* が発現するにもかかわらず転写抑制を受けないが、300 μMという鉄濃度において初めて制御を受けることが本研究で明らかとなり、大量に鉄を取り込むための適応が示唆された。

Transcriptome analysis of iron responsive genes in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1

○Takeyuki SUZUKI, Yoshiko OKAMURA, Haruko TAKEYAMA, Tadashi MATSUNAGA
(Dept. of Biotech., Tokyo Univ. Agri. Tech.)

Key words transcriptome, microarray, magnetic bacteria