

1E11-5 Sequence-based approach による環境試料からの新規遺伝子の探索

○寺原 猛¹, 山田 一隆², 蔵田 信也², 横幕 豊一², 原山 重明³, 常田 聡¹
(¹早大・理工・応化,²日鉄環境エンジニアリング(株),³製品評価技術基盤機構)

【目的】生態系中の微生物群は複雑に相互作用していることもあって、分離培養が困難な場合が多い。そこで、環境試料から直接抽出したDNAを用いて解析するメタゲノム解析が注目されている。本研究では遺伝子全長取得技術として inverse PCR(I-PCR) に着目し、LNA オリゴヌクレオチドとPhi29 DNA Polymeraseを用いた選択的遺伝子増幅手法とI-PCRを組み合わせた Pre-amplified inverse PCR(PAI-PCR) にて環境試料からの新規リパーゼ遺伝子の探索を試みた。【結果】活性汚泥、土壌、堆肥などの環境試料を用い、ISOILにてDNAを抽出した。既知リパーゼ遺伝子の保存性の高い領域(Oxyanion hole, Active site)を基に作成したプライマーにてPCRを行った。まずPCR産物からT-RFLPを行い、多次元尺度法にて環境試料のリパーゼ遺伝子の多様性を解析したところ、その多様性は3つのグループに分けられていた。そこで、各グループからサンプルを選び、PAI-PCRにて既知遺伝子との相同性が低いものから新規リパーゼ遺伝子の全長取得を試みた。その結果、通常のI-PCRでは増幅困難であった新規リパーゼ遺伝子を6個取得した。既知遺伝子との相同性は33-76%であり、遺伝子発現後にSDS-PAGEにて泳動したところ、約30kDaであった。

Sequence-based approach to isolate novel genes from environmental samples

○Takeshi TERAHARA¹, Kazutaka YAMADA², Shinya KURATA², Toyokazu YOKOMAKU², Shigeaki HARAYAMA³, Satoshi TSUNEDA¹
(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Nippon Steel Kankyo engineering Co.Ltd., ³NITE)

Key words metagenome, sequence-based approach, locked nucleic acid (LNA), phi29 DNA polymerase

1E12-2 出芽酵母の形質転換における細胞壁の重要性

○河井 重幸, 村田 幸作
(京大院・農)

【目的】出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の形質転換過程において、プラスミドDNAがいつ、どのようにして細胞内に入り、核へと輸送されるのかという問題は解明されていない。演者らは、標識 DNA を用いた研究などにより、「ポリエチレングリコール(PEG)依存型の形質転換(自然形質転換)において、PEG/細胞/ DNA混合溶液中で、DNAが細胞壁周辺部に結合する(蛍光標識 DNA が細胞壁周辺を染色する)。細胞が選択培地に塗布された後、DNAが核へと輸送される。高形質転換能を示す特定の欠損株(*spf1* など)の細胞壁には、野生株の細胞壁に結合するDNAよりも多くのDNAが結合する。」ことを示す結果を得ている。これらの結果は、PEG 依存型の形質転換において、細胞壁に結合したDNAが細胞内に取り込まれること、すなわち同形質転換における細胞壁の重要性を示唆した。本研究では、野生株と*spf1*の細胞およびスフェロプラストの形質転換能と蛍光標識DNAによる染色パターンを比較することにより、PEG依存型の形質転換における細胞壁の役割を検討した。

【方法・結果】スフェロプラスト化により、*spf1*は高形質転換能を示さなくなった。更に、細胞で観察された蛍光標識DNAによる染色パターンは観察されなくなった。本結果は、PEG依存型の形質転換における細胞壁の重要性を支持した。一方、PEG 依存型の形質転換で顕著な温度依存性が、スフェロプラストでは見られなくなった。すなわち、温度依存性と細胞壁との関連性が示唆された。

The significance of cell wall in transformation of budding yeast

○Shigeyuki KAWAI, Kousaku MURATA
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, transformation, yeast, spheroplast

1E12-1 中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018 株における金属応答遺伝子の発現解析

○古賀 愛弓¹, 鈴木 耕大¹, 大島 拓², 石川 周², 黒川 顕², 小笠原 直毅², 新名 彦彦¹, 吉田 和哉¹, 仲山 英樹¹
(¹奈良先端大・バイオ,²奈良先端大・情報)

【目的】塩類集積環境では、水分に溶存する塩分や重金属などが水分の蒸発に伴って濃縮される。したがって、高塩環境下で生育できる生物は重金属耐性を進化の過程で獲得したと考えられる。これまでの研究から、中度好塩性細菌 *H. elongata* は優れた環境応答能力をもち、重金属に対する耐性は環境中のpHおよび塩濃度によって影響を受けることを明らかにした。さらに、その影響は重金属種によって異なっており、重金属種特異的な応答機構の存在が示唆された。本研究では、*H. elongata* の重金属種特異的な応答機構の鍵遺伝子を同定し、その機能解明を目指している。

【方法と結果】細胞外の pH や塩濃度を変化させた条件下で培養した *H. elongata* において、3種の重金属 (Cu、ZnまたはCd) 添加時に発現量が変動する遺伝子群を同定するためにゲノムアレイ解析を行った。その結果、pH や塩濃度に影響されずに金属種特異的に応答する遺伝子 (Cu : 19 種、Zn : 109種、Cd : 30種) が明らかとなった。これらの遺伝子のうち、金属応答性オペロンを形成していると予想される遺伝子群に着目し、細胞外金属濃度を変動させた条件下での各遺伝子の発現様式を詳細に解析した。現在、Cuに対する応答性に優れた遺伝子群に的を絞り、各遺伝子の機能を解明するために遺伝子欠損株の作製を進めている。

Expression analysis of metal responsive genes in the moderately halophilic bacterium, *Halomonas elongata* OUT30018

○Ayumi KOGA¹, Koudai SUSUKI¹, Taku OSHIMA², Shu ISHIKAWA², Ken KUROKAWA², Naotake OGASAWARA², Atsuhiko SHINMYO¹, Kazuya YOSHIDA¹, Hideki NAKAYAMA¹
(¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ²Grad. Sch. Info. Sci., NAIST)

Key words moderate halophile, tiling array, metal response

1E12-3 ロドコッカス属の生産するサクシニルトレハロースリピッドの物性測定と生合成経路の解析

○徳元 勇太¹, 松村 英夫², 野村 暢彦¹, 中島 敏明¹, 内山 裕夫¹
(¹筑波大院・生命環境,²産総研)

当研究室保有の *Rhodococcus* sp. SD-74 株はサクシノイルトレハロースリピッド (STL) と呼ばれるバイオサーファクタントを生産する。STLはトレハロースに脂肪酸とコハク酸が結合した構造を有する糖脂質タイプの界面活性剤である。特徴なのはその疎水基となる脂肪酸の構造をある程度制御できるという点である。よって、その生合成経路の解明は興味深い。まず、本研究では、このSTLの側鎖を制御できるという点が、実用化に向けてメリットとなりうるのか検討するため、側鎖の長さの異なるSTLの表面張力測定を行った。その結果、側鎖によってSTLの物性が変化することが観察された。

さらに、これまでの研究でSTL生合成に、アルカン代謝、糖代謝、アシル基転移、そして排出にはたらく遺伝子群が関与することが明らかとなっている。そこで、本研究においてはSTL生合成に関与するアルカン代謝、糖代謝、アシル基転移、STL排出の遺伝子群の遺伝子発現を中心に調べることとした。その結果、それらの遺伝子発現レベルが異なることが明らかとなった。

Property of Succinoyl Trehalose lipid and the Production pathway in *Rhodococcus* sp.

○YUTA TOKUMOTO¹, HIDEO MATSUMURA², NOBUHIKO NOMURA¹, TOSIAKI NAKAJIMA¹, HIROO UCHIYAMA¹
(¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ²AIIST)

Key words Biosurfactant, *Rhodococcus*, Trehalose