

1Dp17 Pre-amplified inverse PCRを用いた環境試料からの新規リパーゼ遺伝子の取得

○寺原 猛^{1,3}, 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・先進理工・生命医科, ²日鉄環境エンジニアリング(株), ³独製品評価技術基盤機構)

【目的】既存技術で培養可能な微生物は約1%といわれており、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。そこで、遺伝子全長取得技術であるinverse 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inverse PCRを組み合わせたPre-amplified inverse PCR(PAI-PCR)を開発し¹⁾、環境試料からの新規リパーゼ遺伝子の取得を試みた。【結果】環境試料から抽出した DNA に対し、既知リパーゼ遺伝子の保存性の高い領域(Oxanyan hole, Active site)を基に作成されたプライマーを用いてPCRを行った。BLAST検索の結果、既知遺伝子との相同性が低かったものに着目し、PAI-PCRを用いて遺伝子の全長取得を試みた。その結果、通常のinverse PCR では増幅困難であった新規リパーゼ遺伝子を取得することができた。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。新規リパーゼ遺伝子と既知遺伝子をそれぞれ機能解析した結果、反応温度やpHを変えた場合に違いが見られた。1) K, Yamada et al., Environ. Microbiol., 10 (4), 978-987, 2008

Isolation of novel lipase genes from environmental samples using pre-amplified inverse PCR

○Takeshi TERAHARA^{1,3}, Kazutaka YAMADA², Shinya KURATA², Toyokazu YOKOMAKU², Shigeaki HARAYAMA³, Satoshi TSUNEDA¹
(¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Advanced Sci. Eng., Waseda Univ., ²Nippon Steel Kankyo engineering Co. Ltd., ³NITE)

Key words Metagenome, Sequence-based approach, locked nucleic acid (LNA), phi29 DNA polymerase

1Dp19 耐冷性イヌリン分解微生物 Y-1 株のオリゴ糖合成酵素のクローニング

○藤村 朱喜¹, 古本 美恵¹, 宮地 竜郎¹, 富塚 登¹, 中川 智行², 中川 純一¹
(¹東農大・生物産業・食科, ²岐阜大・応用生物)

【目的】イヌリンは、高等植物の根に含まれる天然多糖類であり、健康食品素材としての需要が大きい。このイヌリンを低分子化するイヌリナーゼにより生成するジフルクトース・ジアンヒドリド (DFA III) は、ミネラルの吸収促進など有用オリゴ糖としての機能が知られている。本研究では有用オリゴ糖生産を目指し、当研究室にて単離した耐冷性イヌリン質化菌株 Y-1株の有するイヌリン分解酵素のクローニングを行った。

【方法および結果】昨年、イヌリンを唯一の炭素源として生育する耐冷性微生物 Y-1株を単離し、*Arthrobacter nicotinovorans* と分類同定、本菌株の DFA III生成能について報告した。1) このDFA生成に関わる酵素遺伝子のクローニングを目指し、他に報告されているイヌリフルクトトランスフェラーゼ遺伝子からプライマーを設計、PCR法により増幅しサブクローニングを行った。得られた遺伝子は、*Arthrobacter*属にて報告されるDFA IおよびDFA III生成型酵素と高い相同性を示したことから本菌株の有するDFA III生成型酵素である可能性が高いと考えられる。また、サザン解析の結果から、本遺伝子は1コピーのみ存在すると考えられる。

1) 藤村ら 2007年度 日本生物工学会大会 要旨集

Cloning of inulinase gene from *Arthrobacter nicotinovorans* Y-1 strain.

○Shuki FUJIMURA¹, MIE FURUMOTO¹, Tatsuro MIYAJI¹, Noboru TOMIZUKA¹, Tomoyuki NAKAGAWA², Junichi NAKAGAWA¹
(¹Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric., ²Dept. Appl. Biol., Gifu Univ.)

Key words Inulin, *Arthrobacter nicotinovorans*, DFA III

1Dp18 組換え大腸菌による大豆由来生理活性ペプチドの大量生産系構築

○加藤 里佳, 白鳥 優子, 曾根 輝雄, 比良 徹, 原 博, 浅野 行蔵 (北大院・農・応生科)

【目的】大豆タンパク質βコングリシニンβサブユニット51から63番目のペプチド(β51-63ペプチド)は、食欲抑制ホルモンの一種コレシストキニンの放出を促進する事が知られている。本研究は組換え大腸菌によるβ51-63ペプチドの大量生産系構築を目的とした。

【方法・結果】β51-63ペプチド(VRIRLLQRFNKRKRS)をコードする相補的なオリゴヌクレオチドを用い、PCR様反応によって目的ペプチドをタンデムに7回繰り返しコードしたDNAを作製した。プラスミドベクターを介しGST融合タンパク質として*E. coli* BL21-AIに発現させた。目的ペプチドは塩基性であるため、発現したタンパク質は精製・分析が困難であった。そこで酸性のペプチド配列を目的ペプチド配列に繋ぎ電荷を解消することにより、発現量や精製・分析が改善されると予測した。βコングリシニンの内部配列を参考に酸性ペプチド配列を決定し、酸性ペプチド-目的ペプチドDNA(DLSEDDVFVIEPMVRIRLLQRFNKRSM)をPCRにより作製した(1copy)。また、制限酵素 BbsI を用いて2回繰り返ししたDNA(2copy)も得た。同様にGST融合タンパク質として大腸菌に発現させたところ、1copy、2copyともに過剰発現がSDS-PAGEにより確認された。

Production of soybean bioactive peptides by recombinant *E. coli*.

○Rika KATO, Yuko SHIRATORI, Teruo SONE, Tohru HIRA, Hiroshi HARA, Kozo ASANO
(Divi. Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words soybean bioactive peptides, beta-conglycinin, cholecystokinin

1Dp20 レトロウイルスのゲノムインテグレーションメカニズムの解析

沖野 雄気¹, 稲吉 勇仁¹, 木下 佑哉¹, 水谷 昭文¹, 伊藤 俊成¹, 西島 謙一¹, ○三宅 克英¹, 飯島 信司¹, 朴 龍洙²
(¹名大院・工・生物機能, ²静大院・創科院・バイオ)

レトロウイルスを用いたトランスジェニック鳥類作成では、発生初期にウイルスを感染させると導入遺伝子のサイレンシングがおこる。我々は抑制性転写因子であるYY1に着目して研究を進めている。これまでにウイルスゲノムのLTRにYY1結合配列が存在し、この部分に結合するYY1がサイレンシングに関わっている可能性が示唆されてきているが、今回我々はウイルスインテグラーゼとYY1が相互作用することを見いだした。モロニーマウス白血球ウイルス(MoMLV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来のインテグラーゼを用いてGST-pull downアッセイを行い、いずれのウイルスインテグラーゼも細胞由来のYY1と直接結合することを示した。また、免疫沈降法の結果、この相互作用にはYY1側では転写抑制領域が重要であり、一方インテグラーゼ側ではC末が中心的な役割を担っていることがわかった。また大腸菌およびカイコで生産したインテグラーゼを用いてin vitroでのインテグラーゼアッセイ法を確立し、インテグラーゼ反応に対するYY1の効果も検証した。YY1はインテグラーゼとの結合を介してインテグレーションを制御していると考えられるが、現在、そのメカニズムとサイレンシングへの効果を検討している。なお本研究は生研センター基礎研究推進事業による助成を受けて行ったものである。

Transcription factor YY1 plays important roles in replication and transcription of retrovirus

Yu-ki OKINO¹, Yujin INAYOSHI¹, Yu-ya KINOSHITA¹, Akifumi MIZUTANI¹, Toshinari ITOH¹, Ken-ichi NISHIJIMA¹, ○Katsuhide MIYAKE¹, Shinji IJIMA¹, Yonsu PARK²
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

Key words Integrase, Retrovirus, Silencing, Transgenic chicken