2Bp07 清酒酵母協会7号孢子非形成におけるCln3タンパク質の役割

○小森 敬介, 岩野 君夫, 中澤 伸重
(秋田県大院・生資科)

目的 一般に醸造酵母の孢子形成が弱いことは知られているが、その原因は未だ明らかにされていない。我々は清酒酵母協会7号(K7)の孢子非形成メカニズムの解明を試み、現在までにCLN3遺伝子を破壊することによってIME1遺伝子の転写が誘導され、若干ではあるが孢子形成が回復することを既に報告している¹⁾。本研究では孢子非形成性におけるCln3タンパク質の役割を解析した。

方法および結果 K7において孢子形成条件下ではdown-regulationされずCln3タンパク質が存在することがウエスタンブロットにより観察された。cln3Δ株でIME1遺伝子を高発現させたところ、孢子形成率はcln3Δ株のそれに比べ約2倍に上昇した。早期減数分裂遺伝子の誘導に必要なIme1-Ume6タンパク質の相互作用をTwo-hybrid法により解析した結果、cln3Δ株のβ-ガラクトシターゼの活性値が約20倍に上昇した。これらのことはIme1-Ume6タンパク質の相互作用をCln3タンパク質が妨げていることを示している。Ime1タンパク質とUme6タンパク質との相互作用を促進するRim11およびRim15タンパク質とCln3タンパク質との関係を、cln3Δ株においてRIM11およびRIM15遺伝子の破壊や高発現株を使って調べたところ、Cln3タンパク質はこれらの因子と拮抗的に働いていることが分かった。以上のことから、Cln3タンパク質はIME1遺伝子の発現を転写レベルだけでなく、転写後レベルでも制御していることが明らかとなった。

1) 阿部ら 日本生物工学会2005年度大会講演要旨p59

The role of Cln3 in sporulation incompetence of Kyokai No.7

○KEISUKE KOMORI, KIMIO IWANO, NOBUSHIGE NAKAZAWA
(Dept. Grad. Sch. Biore., Akita Pref. Univ.)

Key words Kyokai No.7, sporulation incompetence, Cln3

2Bp10 ルシフェラーゼ遺伝子のPCRによる全合成とコドン最適化

○鎗水 透¹, 渡邊 佐知子¹, 星田 尚司², 赤田 倫治¹
(¹山口大院・医系・応用分子生命, ²山口大・イノベーション推進機構)

本研究では遺伝子全合成の最適な条件と、コドン最適化による遺伝子発現量の変化を調べた。そのためにPCRと複数の相補的なオリゴヌクレオチド(プライマー)を用いて遺伝子全合成を行った。今回は*Gaussia princeps*由来ルシフェラーゼ(GLuc)遺伝子を対象とした。これは558bpの比較的短い遺伝子であり、プライマー設計と遺伝子の活性評価が容易にできるため、モデルに最適と考えた。遺伝子は出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の高発現遺伝子に類出するコドンに置き換えて設計した(yGLuc)。合成ではプライマーをPCRでつなぎ、再度のPCRで目的遺伝子全長に相当する遺伝子を増幅した。合成した遺伝子を*S. cerevisiae*に導入し、形質転換体のルシフェラーゼ活性を評価することで合成の成否を判断した。プライマーとしては、40merのプライマーと相補プライマーを用いる方法(40/c40)、80merと40merを用いる方法(80/c40)、80merと80merの方法(80/c80)を行った。その結果、高いアニーリング温度で合成することで機能する遺伝子の割合が高くなった。これらの活性株の内2株にクローニングされた遺伝子配列を調べた所、設計通りの配列であることを確認した。しかし、80/c80ではどのようなPCR条件でも活性株を取得できなかった。遺伝子全合成で取得したyGLuc遺伝子と、ヒト培養細胞内で高発現するように設計されたhGLuc遺伝子の*S. cerevisiae*細胞内での発現量を比較した所、yGLuc導入株はhGLuc導入株の約2倍のルシフェラーゼ活性を示した。

Total gene synthesis of yeast codon optimized luciferase gene by PCR

○Tohru YARIMIZU¹, Sachiko WATANABE¹, Hisashi HOSHIDA², Rinji AKADA¹
(¹Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med. Yamaguchi Univ., ²Innov. Center, Yamaguchi Univ.)

Key words total gene synthesis, luciferase, PCR, codon

2Bp08 酵母での分泌発現に適したシロアリ原生動物セルラーゼ遺伝子のスクリーニング

○戸高 眠¹, 石田 亘広¹, 守屋 繁春^{2,3}, 大熊 盛也⁴, 工藤 俊章⁵, 高橋 浩雄¹
(¹豊田中研, ²理研・ASI, ³横浜市大・総理, ⁴理研・JCM, ⁵長崎大・水産・海洋物質科学)

【背景・目的】 下等シロアリの後腸内には原生動物が共生し、高効率なバイオマス分解を行っている。しかし腸内原生動物は難培養性であることから、バイオマス分解能力を人工的に再構築するためには原生動物由来の酵素を異種発現させることが重要である。本研究では、酵母での分泌発現に適したシロアリ原生動物セルラーゼ遺伝子をスクリーニングすることにより、セルロースを糖化・発酵できる酵母を構築することを目指した。

【実験方法・結果】 4種類のシロアリ、およびキゴキブリ腸内に共生する原生動物由来の完全長cDNAライブラリーでの解析¹⁾をもとに、140種類のセルラーゼ遺伝子を取得した。これらを酵母*Saccharomyces cerevisiae*で分泌発現させることを目的に、セルラーゼ発現ライブラリーを構築した。本発現ライブラリーを、β-glucosidase活性を付与した組換え酵母に導入し、炭素源をcarboxymethyl cellulose (CMC)とする培地でスクリーニングを行った。その結果、数種類のセルラーゼ遺伝子が選抜され、既存のセルラーゼと比較したところ、高いセルロース分解活性を示すことが確認された。

1) Todaka et al., *FEMS Microbiol. Ecology*, 2007, Vol. 59, p592-599.

Screening of cellulase genes from symbiotic protists of lower termites for the secretory expression in *Saccharomyces cerevisiae*

○Nemuri TODAKA¹, Nobuhiro ISHIDA¹, Sigeharu Moriya^{2,3}, Moriya OHKUMA⁴, Toshiaki KUDO⁵, Haruo TAKAHASHI¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²RIKEN ASI, ³Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ., ⁴RIKEN JCM, ⁵Dept. Mar. Mat. Sci., Fac. Fish., Nagasaki Univ.)

Key words termite, protist, cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*

2Bp11 ゲノムの再編による高温・酸性条件下でのエタノール高生産酵母の育種

○横田 大樹¹, 長谷川 大介¹, 赤瀬 晋平¹, 杉山 峰崇¹, 金子 嘉信¹, Chuenchit Boonchird², 原島 俊¹
(¹阪大院・工・生命先端, ²Dept. Biotech. Mahidol Univ.)

近年の環境問題により、再生可能なバイオマス燃料が注目されている。酵母によるエタノール発酵では、冷却コストの低減や雑菌汚染防止の面から高温・酸性条件における高いエタノール生産性が求められる。我々はこれまでの研究で、*Saccharomyces cerevisiae*ホモトリック雑種二倍体株TJ14を造成している。TJ14株は10%グルコース液体完全培地において41°Cの培養でも高いエタノール生産量(4.5%)及び発酵効率(89%)を示す。このTJ14株をさらに性格付けするため、高温条件下(45~55°C)における生存率をTJ14株の両親株と比較した。その結果、いずれの条件においてもTJ14株は両親株を上回る生存率を示し、優れた耐熱性を持つ事がわかった。同様にエタノール存在下(10~25%)におけるTJ14株の対数増殖期及び定常期細胞の生存率をそれぞれ両親株と比較したところ、10%エタノール存在下では3株とも細胞周期にかかわらず100%近い生存率を示したが、20%以上のエタノール濃度になると対数増殖期の細胞は3株とも著しい生存率の低下が見られた。これに対し定常期の細胞ではTJ14株が両親株を上回る生存率を示した。現在このTJ14株に、我々が別途の研究で同定した酸耐性付与遺伝子HAA1を導入し、高温・酸性条件下でエタノール高生産性を示す株の育種を行っている。

Breeding of *S.cerevisiae* high ethanol producer with high temperature and acid condition

○Daiki YOKOTA¹, Daisuke HASEGAWA¹, Shinpei AKASE¹, Minetaka SUGIYAMA¹, Yoshinobu KANEKO¹, Boonchird Chuenchit², Satoshi HARASHIMA¹
(¹Dept. Biotech. Osaka Univ., ²Dept. Biotech. Mahidol Univ.)

Key words ethanol fermentation, thermotolerance, acid tolerance