

2Bp21 シグナル物質を用いた細菌における細胞外ベシクル生産の制御

○田代 陽介, 市川 創作, 中島 敏明, 内山 裕夫, 野村 暢彦
(筑波大・院・生命環境)

【目的】多くのグラム陰性菌は細胞外に外膜で構成された直径20~200 nmの細胞外ベシクル(MV)を分泌することが知られている。多くの病原微生物においてMVは毒性因子を宿主へ運搬するキャリアーとしての機能を有するため、医学的面からその生産制御が求められている。本研究では細菌のMV生産を制御する物質の探索を行った。

【方法・結果】これまでに緑膿菌のシグナル物質の一つである *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)が自身及び異種細菌のMV生産を誘発させることが明らかとなっている。一方、大腸菌はシグナル物質としてインドールを細胞外に放出するが、インドールやその酸化物を含めた炭素二環式化合物がPQSを制御することによって緑膿菌のMV生産を抑制することが示された。また、多くの細菌によって各種脂肪酸が細胞外に分泌されているが、飽和脂肪酸が様々な細菌のMV生産を誘発させることが示唆された。

Control of bacterial membrane vesicle production by extracellular signals

○Yosuke TASHIRO, Sosaku ICHIKAWA, Toshiaki NAKAJIMA-KAMBE, Hiroo UCHIYAMA, Nobuhiko NOMURA
(Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words membrane vesicles, quorum-sensing, indole, fatty acid

2Bp23 油糧微生物ラビリンチュラ類における形質転換法の開発

○岩坂 宏明, 足達 浩文, 秋 庸裕, 河本 正次, 小埜 和久
(広島大院・先端・生命機能)

海洋微生物ラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸やアスタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイドといった有用物質を高濃度に蓄積することから、産業微生物としての利用が期待されている。我々は本微生物の分子育種による高度利用を目指し、*Aurantiochytrium* 属 CB15-5株を宿主として、ゼオシン耐性を与える放線菌由来プレオマイシン耐性遺伝子 (ble) とそれを構成的に発現するための actin あるいは elongation factor 1 α の各遺伝子の発現制御領域、及び、相同組換え領域としての rRNA 遺伝子を含むプラスミドを用いた形質転換系を整備してきた。本研究では、得られた形質転換体における導入遺伝子の状態を調べることを目的とした。

ゲノムPCRによってプラスミドの導入部位がrRNA遺伝子座であることを確認した上で、ble遺伝子のコピー数をリアルタイムPCRによって定量したところ、上記の遺伝子発現制御領域の種類及び長さによってコピー数が異なることがわかった。また、多コピー株では、導入遺伝子がタンデム構造を形成していた。rRNA 遺伝子の増幅機構を利用した任意遺伝子のコピー数制御に利用できると考え、ゼオシン濃度と遺伝子コピー数との相関関係を調べている。

Development of transformation system for oleaginous microorganism, Thraustochytrids

○Hiroaki IWASAKA, Hirofumi ADACHI, Tsunehiro AKI, Seiji KAWAMOTO, Kazuhisa ONO
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words Thraustochytrids, transformation

2Bp22 Cre/loxP システムによる枯草菌のピンポイント多重遺伝子破壊とその適用性

○坂元 仁^{1,2}, 土戸 哲明^{1,2}
(¹関西大・化生工・生命生物工,²関西大・先端機構)

【目的】Cre/loxP系のリサイクルマーカークラウド、カウンターマーカークラウド、染色体にloxP等を残存させない等の繰り返し可能な染色体操作法が細菌や真核生物で幾つも報告されている。当研究室では、これまでにCre発現プラスミドと野生型や変異型loxPを用いたリサイクル可能な薬剤耐性遺伝子マーカークラウドを構築して染色体上の複数の相同性遺伝子や同一の酵素活性を示すアイソザイム遺伝子のピンポイント多重破壊を行ってきた。今回、その中で明らかになったCre/loxP系の適用性について報告する。

【方法と結果】D-キシロース誘導性プロモーターとそのリプレッサーからなるxylR-P_{sd4}系でCreを発現制御した温度感受性oriを含む2種類の大腸菌-枯草菌間シャトルベクターとloxP、またはその変異型であるlox71とlox66で挟み込んだ薬剤耐性遺伝子マーカークラウドを構築し、*Bacillus subtilis* 168株を用いてDNA分解酵素群や、抗酸化酵素をコードする遺伝子群に対してリサイクルマーカークラウドによる遺伝子破壊と薬剤耐性の除去を行った。loxPリサイクルマーカークラウドは、近傍域の遺伝子破壊では大規模欠損や、loxPサイトを多重挿入した宿主ではCre発現プラスミドを含む形質転換体が出現せず、多重化の限界が観察された。一方、lox72と変異型loxPマーカークラウドが近傍域で同じ向きでは低い確率で大規模欠損が生じたが、逆向きか両方がlox72なら大規模欠損は回避できた。

Application of Cre/loxP recycle marker system in *Bacillus subtilis*

○Jin Sakamoto^{1,2}, Tetsuaki Tsuchido^{1,2}
(¹Dep. Life Sci. Biotech., Fac. Chem., Materials Bioeng., Kansai Univ.,
²ORDIST, Kansai Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, Cre/LoxP system, gene knockout, genome engineering

2Bp24 バイオナノ磁性粒子膜上への効率的な膜タンパク質ディスプレイに向けた発現誘導システムの構築

○吉野 知子, 下条 明子, 前田 義昌, 松永 晃
(東京農工大院・生命)

【目的】磁性細菌により合成される脂質二重膜で覆われたバイオナノ磁性粒子 (Bacterial magnetic particles : BacMPs) は、膜タンパク質の固相担体としての利用が注目されている。しかし、多くの膜タンパク質の発現は磁性細菌の生育阻害を引き起こし、BacMPs 上へのディスプレイが困難であった。本研究では、磁性細菌において膜タンパク質の発現時期や発現量の調整を行うための発現誘導システムを構築し、効率的なBacMPsへの膜タンパク質ディスプレイ技術の確立を目指した。

【方法及び結果】磁性細菌内で複製可能なベクターpUMGにテトラサイクリンリプレッサー (TetR) 遺伝子、及び標的遺伝子の5'にTetRが結合するオペレーター配列を組み込んだプロモーターを含む発現誘導ベクターを構築した。標的遺伝子としてBacMPs上のタンパク質であるMms13とGFPの融合遺伝子を用いて発現誘導を行ったところ、Anhydrotetracyclineの添加時においてBacMPs上に蛍光が確認された。そこで、膜貫通タンパク質であるCXCR4、CCR5及びCD81を標的遺伝子として、発現誘導ベクターを用いた磁性細菌の形質転換を行った。その結果、いずれの膜タンパク質においても、発現誘導システムを利用した時のみ形質転換体を得られた。また、CD81においてBacMPs上への機能発現が確認され、発現誘導システムを用いることで、細胞毒性の高い膜タンパク質のBacMPs上へのディスプレイが可能となった。

Development of inducible expression system for production of bacterial magnetic particles displaying transmembrane proteins

○Tomoko YOSHINO, Akiko SHIMOJO, Yoshiaki MAEDA, Tadashi MATSUNAGA
(Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words transmembrane protein, bacterial magnetic particles, inducible expression