

2P-1037 食虫植物ウツボカズラ消化液内共生細菌メタゲノムライブラリーからの新規リパーゼ遺伝子のスクリーニング

○及川 学, 佐藤 祥子, 諸星 知広, 池田 宰  
(宇都宮大院・工・物質環境)

【目的】食虫植物は捕虫器で捕らえた昆虫を自ら分泌した消化酵素により分解し、栄養源として吸収するが、古い捕虫器の場合、消化酵素の分泌は専ら消化液内に共生する微生物により行われていることが明らかになっている。そこで本研究では、食虫植物ウツボカズラの消化液内共生細菌メタゲノムを用い、共生細菌の構成を明らかにするとともに、メタゲノムライブラリーから消化に関わる新規遺伝子のクローニングを目的とした。【方法】ウツボカズラ消化液から遠心分離により回収した共生細菌からメタゲノムを抽出した。共生細菌の構成は、16S rRNA塩基配列を元にして解析を行った。微量メタゲノムはWhole genome amplification (WGA) 法により増幅し、pUC118ベクターに挿入してライブラリーを作製した。【結果・考察】ウツボカズラの2つの捕虫器から消化液を採取し、遠心分離にて回収した細菌ペレットからメタゲノムを抽出した。16S rRNA系統解析を行ったところ、2つの捕虫器に共通して*Burkholderia*属および*Variovorax*属が優占種であることが明らかになった。次に、WGA法により増幅したメタゲノムを用いて、クローン数約55,500、総インサートサイズ約0.28 Gbpのライブラリーを作製する事に成功した。このライブラリーから消化に関わる遺伝子としてリパーゼ遺伝子のスクリーニングを行ったところ、2つの明確なリパーゼ活性を示すクローンの取得に成功した。

Metagenomic analysis of the microbial community in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrida*: identification of the novel lipase genes

○Manabu OIKAWA, Shoko SATO, Tomohiro MOROHOSHI,  
Tsukasa IKEDA  
(Dept. Matter. Environ., Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words metagenome, lipase, *Nepenthes hybrida*, cloning

2P-1039 大腸菌 RNaseG の mRNA 切断点配列認識について

○伊藤 和敬, 浜崎 孝信, 柏森 綾, ぐん ぶんあてい,  
和地 正明  
(東工大院・生命理工・生物プロセス)

大腸菌RNaseGは、16S rRNAの成熟に関与する他、アルコールデヒドロゲナーゼ (AdhE) やエノラーゼをはじめとする主要な糖代謝酵素のmRNAを基質とする。RNaseG変異株ではこれらのmRNAの半減期が増大し、タンパク質が過剰発現する。

RNaseGは*adhE* mRNAの-145~-125領域を認識し、-17と-18の間(翻訳開始コドンのAを+1とする)を切断する。そのため*adhE* mRNAの5' UTRを*lacZ*に融合した*adhE-lacZ*融合遺伝子でもRNaseG変異株において過剰発現が見られる。

そこで今回、RNaseGの切断点前後に変異を導入した5' UTRを持つ*adhE-lacZ*融合遺伝子を構築し、RNaseGが切断点の配列を認識しているかを調べた。変異プラスミドを野生株とRNaseG欠損株に導入し、AdhE-LacZタンパク質の発現量を比較した。その結果、いずれの変異プラスミドにおいても野生型プラスミドと同様にRNaseG欠損株でのみAdhE-LacZタンパク質過剰発現が認められた。このことから、RNaseGは*adhE*の切断点配列を認識していないことが示された。

これよりタンパク質大量発現に用いる融合遺伝子には、*adhE* 5' UTRの全長は必要とせず、RNaseG認識領域さえあれば良いことが示唆された。

Does the *E. coli* RNaseG recognize nucleotides around the cleavage site?

○Kazutaka ITO, Koushin HAMASAKI, Aya KAYAMORI, Phuong Anh Thi NGUYEN, Masaaki WATI  
(Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol.)

Key words RNaseG

2P-1038 バイオナノ磁性粒子上への外来タンパク質ディスプレイ量増大に向けた宿主細胞の改変

○鐘築 由香, 吉野 知子, 松永 是  
(東京農工大院・生命)

【目的】原核生物において外来タンパク質を安定的かつ効率的に発現させるためには、ホストの改変が必要となる。本研究では磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1が合成するバイオナノ磁性粒子 (Bacterial magnetic particles: BacMPs) 上の膜二回貫通タンパク質Mms13の遺伝子を欠損させた宿主株を作製し、この宿主株に対し新たにMms13と外来タンパク質の融合遺伝子を導入することによりBacMPs上への外来タンパク質ディスプレイ量向上を目指した。

【方法及び結果】相同性組み換えによりゲンタマイシン耐性遺伝子を磁性細菌のMms13遺伝子に置き換えたことで、Mms13遺伝子欠損株を作製した。さらに、磁性細菌内で複製可能なプラスミドにMms13と外来タンパク質の融合遺伝子を組み込み、このプラスミドを用いてMms13欠損株の形質転換を行った。得られた菌体を大量培養後、BacMPsを回収し粒子上の外来タンパク質の発現量をWestern blotにより確認した。野生株とMms13欠損株を宿主とした形質転換体についてBacMPs上の発現量を比較したところ、欠損株では明らかな発現量の増大が認められた。特に、これまで野生株では発現量が微量であった甲状腺刺激ホルモン受容体のN末端領域においては5倍のディスプレイ量増大が示された。これより、Mms13欠損株がBacMPs上への外来タンパク質ディスプレイに有用であることが示された。

Construction of host cells for an efficient protein display onto bacterial magnetic particles

○Yuka KANETSUKI, Tomoko YOSHINO, Tadashi MATSUNAGA  
(Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words magnetotactic bacteria, magnetic particles, protein display, Mms13

2P-1040 イメージング技術を用いた植物オーロラキナーゼの機能解析

○浅田 拓也<sup>1</sup>, 栗原 大輔<sup>2</sup>, 内山 進<sup>1</sup>, 松永 幸大<sup>1</sup>,  
福井 希一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪大院・工・生命先端, <sup>2</sup> 名大院・理・生命理学)

細胞分裂は、1つの細胞から2つの娘細胞へと遺伝情報を均等に分配するという、生命の根幹をなす過程であり、この過程でゲノムDNAは中期染色体という高度に凝縮した高次構造をとる。これを制御する機構の一つとして、コアヒストンタンパク質の翻訳後修飾による制御が考えられており、中でも、Histone H3のリン酸化は動物や酵母まで広く保存された細胞分裂期特異的な修飾である。この修飾は動物、植物共にオーロラキナーゼ (Aurora kinase) によって行われており、シロイヌナズナにおいてオーロラキナーゼは、AtAUR1, AtAUR2, AtAUR3の3つが同定されている。動物細胞におけるオーロラキナーゼの研究は既に進められており、発現抑制により細胞分裂および染色体数の増加を伴わずにDNAの複製のみが進行し、種々の倍数性細胞が生じることが確認されている。この現象は核内倍加現象 (endoreduplication) と呼ばれ、植物細胞においては細胞体積の増加に必要不可欠な機構である。本研究では、蛍光顕微鏡を用いたイメージング解析を行うことで、AtAUR3の機能を解明することを研究目的とした。まず、RNAi法を用いてAtAUR3ノックダウン株を作製し、RT-PCRによって発現の抑制を確認した。そして、春化処理後5日目のAtAUR3ノックダウン株の根をDAPI染色およびPI染色することで、細胞の核DNA量および体積の計測を行った。その結果、AtAUR3ノックダウン株の細胞では、野生株の細胞に比べDNA総量および体積が共に増加していることが確認できた。

Function analysis of plant aurora kinase by imaging technique

○Takuya ASADA<sup>1</sup>, Daisuke KURIHARA<sup>2</sup>, Susumu UCHIYAMA<sup>1</sup>,  
Sachihiko MATSUNAGA<sup>1</sup>, Kiichi FUKUI<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup> Dept. Biol. Sci., Nagoya Univ.)

Key words Aurora kinase, Endoreduplication, Ploidy cell