

2Dp24 Prolonged Synthesis of Hyaluronan by *Chlorella* Cells Infected with Chloroviruses

○Numfon Rakkhumkaew, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)
tayamad@hiroshima-u.ac.jp

Hyaluronan (HA) synthesis by microalgal *Chlorella* cells in combination with chloroviruses represents a unique eco-friendly process converting solar energy and CO₂ into useful materials. However, at the final stage of viral infection, the infected host cells are completely lysed, so HA should be harvested before cell lysis. To improve the yield of HA synthesis, two ways were studied in this work: (i) adopting slow-growing chlorovirus isolates and (ii) modification of virus replication process with an inhibitor of DNA synthesis. Compared with PBCV-1, the prototype chlorovirus, slow-growing virus isolates CVO1 and CVTS1 gave 1.5 times higher concentration of HA in infected *Chlorella* cultures. Furthermore, addition of aphidicolin, an inhibitor of DNA synthesis, delayed the virus replication cycle and raised final concentration of HA to 1.5 times as much as that without aphidicolin in the culture. Therefore, 2-3 times increase in the yield of HA synthesis by *Chlorella*-virus system was attained by using slow-growing viral isolates and with aphidicolin.

Prolonged Synthesis of Hyaluronan by *Chlorella* Cells Infected with Chloroviruses

○Numfon Rakkhumkaew, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words hyaluronan, Chlorovirus, infection cycle, aphidicolin

2Dp26 クロレラウイルス遺伝子組換え技術の開発

○竹本 有希, 川崎 健, 藤江 誠, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)
tayamad@hiroshima-u.ac.jp

【目的】クロレラウイルスは直径約190nmの正二十面体粒子内に、330~390 kbpのdsDNAゲノムを持つ、非常に巨大なウイルスである。このウイルスは単細胞緑藻クロレラに感染し増殖することから、藻類のバイオテクノロジーツールとして注目されている。しかし、宿主であるクロレラ及びウイルス自体の遺伝子組換え技術は未だ確立されていない。そこで本研究では、クロレラウイルス遺伝子組み換え技術の開発を試み、藻類バイオテクノロジー研究の発展に大きく寄与することを目指した。

【方法・結果】本研究で重要となるのが、DNA導入法、組換え法、マーカー遺伝子と組換えウイルスの選択回収法である。まず、DNA導入法としてエレクトロポレーション法を用い、ウイルス感染中のクロレラ細胞に導入を試みる。次に、組換え法として相同組換え、あるいはトランスポゾンを使用した組換えを行う。クロレラウイルスは宿主細胞表面に蓄積させる多糖によりHAS型(ヒアルロン酸蓄積型)、CHS型(キチン蓄積型)に区別できる。HAS、CHS遺伝子はもともとウイルス内に存在する遺伝子であるため、組換えの際にマーカーとして利用可能と考えられる。そして、組換えウイルスの選択回収法として、ビオチン標識HA結合タンパク質とstreptavidin結合マグネティックビーズを用い、磁石による回収を試みている。現在まで、組換え対象となるウイルス(CVK2)と組換え体を想定したウイルス(CVIK1)を混合割合CVIK1:CVK2=1:10000の条件においてCVIK1の回収(13%)に成功している。より低濃度(約1:1億程度)のサンプルから組換え型を安定して選択・回収できる条件を検討し、遺伝子組換えウイルスの作製を試みる。

Development of recombinant DNA technology of *Chlorella* viruses

○Yuki Takemoto, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Chlorella* virus, has

2Dp25 クロレラ鞭毛関連遺伝子の発現解析

○熊谷 徳泰, 川崎 健, 藤江 誠, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)
tayamad@hiroshima-u.ac.jp

【目的】単細胞緑藻クロレラは、光合成におけるCalvin回路発見より50年以上にわたり植物生化学、生理学のモデル系として重要な研究対象となってきた。従来、クロレラは運動性を持たず、無性生殖性であると考えられてきた。しかし、*Chlorella variabilis* NC64A株(以下NC64A)の全ゲノム配列が解読された結果、減数分裂関連遺伝子群、さらにクラミドモナスで同定された鞭毛関連遺伝子群の一部が高度に保存されていることが明らかとなった。これに類似した事例として、配偶子形成の際に特殊な運動性鞭毛を形成し、有性生殖を行う淡水性珪藻タラシオンラ(*Thalassiosira pseudonana*等)が知られている。このことから、NC64Aが鞭毛を形成し、運動性、有性生殖性を持つ可能性が示唆された。そこで本研究では、NC64Aの鞭毛関連遺伝子群について発現解析及び発現の誘導条件検討を目的とした。

【方法・結果】DNAマイクロアレイ解析を用いて発現変動遺伝子群の探索を試みた。NC64Aより鞭毛関連遺伝子103個、減数分裂関連遺伝子4個、ハウスキーピング遺伝子22個をピックアップし、マイクロアレイを作製した(フィルジェン社)。窒素源飢餓条件で12hと48h、0.1mMアブシジン酸添加条件で6hと40h、低温条件で6h培養したNC64Aよりtotal RNAを取得し、アレイ解析を行った。コントロールは通常培養したNC64Aを用いた。その結果少なくとも2個の鞭毛関連遺伝子について、明確な発現量の変動が確認された。現在これら遺伝子をターゲットとしたqRT-PCR解析により、最適な誘導条件の検討を行っている。

Expression analysis of genes involved in flagella-formation and meiosis in *Chlorella*

○Noriyasu Kumagai, Takeru Kawasaki, Makoto Fujie, Takashi Yamada
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Chlorella*, flagella, motility, sexual reproduction

2Dp27 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の植物感染に関わる走化性機構の解析

○奥 正太, 米田 佳那子, 中里 憲司, 高西 寿洋, 緋田 安希子, 田島 蒼久, 中島田 豊, 加藤 純一
(広島大院・先端・生命機能)
jun@hiroshima-u.ac.jp

【目的】*Ralstonia solanacearum* は200種以上の植物に感染し、萎凋を引き起こす。R. solanacearumは根の傷口から内部に侵入し、通水障害により萎凋を引き起こす感染機構が知られる。近年、R. solanacearumの植物感染に走化性が重要となることが報告された。しかし、植物感染に関わる具体的な走化性機構は解明されていない。本研究では、R. solanacearum Ps29を用い、植物感染に関わる走化性機構の解明を試みた。

【結果】Ps29は植物根から分泌される滲出液の主要成分である有機酸やアミノ酸に対し強く誘引される。特に、リンゴ酸には極めて強く誘引された。また、Ps29は傷害ストレス応答性植物ホルモンであるジャスモン酸に誘引応答を示した。このことから、R. solanacearumは根滲出液の主要成分「有機酸」や「アミノ酸」を感知して根面へと集積し、傷口から分泌される「ジャスモン酸」を感知して根内部へと侵入するという走化性を介した感染モデルが考えられる。BLAST解析によりR. solanacearumは22の走化性センサータンパク(MCP)を有することが予想されたが、これらの機能は明らかでない。走化性機構解明においてMCP機能の解析は重要となる。走化性モデル株*Pseudomonas aeruginosa* PAO1を用いた異種株相補試験による機能解析から、植物関連物質走化性に関わるPs29-MCPを推定した。現在、当該Ps29-MCPを破壊した変異株を取得し、走化性と植物感染実験によりMCPの機能解析を行っている。

Chemotaxis toward plant-associated compounds in *Ralstonia solanacearum* and its involvement in bacterial wilt

○Shota Oku, Kanako Yoneda, Kenji Nakazato, Toshihiro Takanishi, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Ralstonia solanacearum*, chemotaxis, plant pathogen, jasmonic acid