

2P-029 低温菌を用いたシンプル酵素変換技術による 1,3-プロパンジオールの生産

○平井 慶輔, 婦木 耕嗣, 田島 啓久, 中島田 豊, 加藤 純一
(広島大院・先端物質)
jun@hiroshima-u.ac.jp

【目的】

微生物を活用した生産技術は、環境負荷が小さいという点から持続型社会構築のためのテクノロジーとして大きな注目を集めている。しかし、微生物を利用した有用物質生産は、その複雑な代謝系により様々な代謝産物が生成されてしまい、目的物質の収率向上のため副産物生成経路の除去など大きな労力が必要となる。そこで本研究では、低温菌に中温菌由来の遺伝子を発現させた組換え体を構築し、熱処理により宿主微生物の代謝活性をシャットアウトし、副産物フリーな物質生産が可能となると期待される。そこでグリセロールから 1,3-プロパンジオール (1,3-PD) の効率的な生産を行うシンプル酵素変換触媒の構築を目的としている。

【方法及び結果】

1,3-PD を生成するため *Klebsiella pneumoniae* 由来の *dhaB* 及び *dhaT* 遺伝子を低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 株に導入した株を用いた。1,3-PD 生産試験の結果、補酵素 NADH の添加量に応じて 1,3-PD を約 10mM まで生成する事ができた。これは 3-HPA から 1,3-PD への変換反応には NADH を補酵素として必要とするため、NADH の供給が問題と考えられる。そこで、NADH 再生反応を担う脂肪酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *fdh* に SD 配列を付加して導入した。この株を用いて、*fdh* の基質となるギ酸を加えて 1,3-PD 生産試験を行ったところ 1,3-PD の生成量が向上し、さらに 3-HPA の蓄積量が減少した。

Simple enzymatic conversion to 1,3-propanediol using psychrophilic bacterium

○Keisuke Hirai, Kousuke Huki, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words 1, 3-propanediol, coenzyme regeneration, psychrophilic bacterium

2P-031 コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* の RNase E/G による 5' 非翻訳領域依存的な mRNA の分解

○遠藤 諭, 前田 智也, 和地 正明
(東工大院・生命理工・生物プロセス)
mwachi@bio.titech.ac.jp

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸生産菌として分離され、多くのアミノ酸や有機酸などの工業的発酵生産に利用されている。真核生物と同様に、細菌の遺伝子発現制御も、転写段階だけではなく、mRNA の安定性などの転写後段階においても複雑に制御されていることが明らかになってきている。

RNase E/G はエンド型の RNA 分解酵素であり、大腸菌では生育に必須な RNase E と欠失可能な RNase G の二つのホモログが知られている。一方、*C. glutamicum* では NCgl2281 遺伝子に唯一のホモログがコードされており、欠失可能である。

これまでの研究により RNase E/G は、イソクエン酸リアーゼをコードする *aceA* mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' -UTR) を特異的に認識、切断することが明らかとなっている。RNase E/G 欠損株では *aceA* mRNA が安定化し、AceA タンパク質の過剰発現が引き起こされる。今回我々は、大腸菌由来の *trc* プロモーターとコリネ型細菌由来の *pyc* 遺伝子の SD 配列を利用して、大腸菌の *lacZ* 遺伝子をプラスミド上で発現させたところ、野生株に比べて RNase E/G 欠損株では LacZ タンパク質が過剰発現していることを見出した。他のプロモーターと SD 配列を用いた場合は、野生株と欠損株での発現の差が確認できなかったことから、*trc* プロモーターと *pyc* 遺伝子の SD 配列に由来する 5' -UTR が RNase E/G によって認識、切断されていることが示唆された。このように、外来の遺伝子から人工的に組み込んだ mRNA の配列が RNase E/G によって制御を受けることから、遺伝子改変技術により RNA レベルでの発現調節が可能であると考えられる。

5'-UTR dependent degradation of mRNAs by RNase E/G in *Corynebacterium glutamicum*

○Satoshi Endo, Tomoya Maeda, Masaaki Wachi
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words RNase E/G, *Corynebacterium glutamicum*, mRNA, 5'-UTR

2P-030 Simultaneous modulation of miR-122 and miR-151 suppressed hepatocellular carcinoma cell proliferation/migration in vitro and tumor growth in vivo

○Chiu-Ling Chen, Pei-Hsiang Yuan, Kuei-Chang Li, Guan-Yu Chen, Yu-Chen Hu
(Dept. Chem. Eng., Natl. Tsing Hua Univ., Hsinchu, Taiwan)
ychu@mx.nthu.edu.tw

MicroRNA miR-122 regulates cell proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC). Conversely, miR-151 promotes the tumor cell metastatic behaviors by the Rho family of GTPases pathway. Although the design of microRNA precursors and sponges have been reported, the anti-tumor effects by simultaneously modulating 2 microRNAs (miRs) during hepatocarcinogenesis have yet to be explored. Here, we employed a recombinant *Sleeping Beauty*-based baculovirus vector to deliver miR-122 precursors and miR-151 sponges into HCC cells. The baculovirus vector allowed for efficient transduction of Mahlavu cells, thereby persistently enhancing miR-122 expression and suppressing miR-151 expression. The simultaneous modulation of miR-122 and miR-151 led to enhanced apoptosis and inhibition of cell motility, cell cycle and proliferation. In addition, the baculovirus-mediated miRNA modulation suppressed the expression of proteins (ADAM10, ADAM17, Bcl-w, cyclin G1) downstream of miR-122, as well as regulated the expression of proteins (Rho GTPases family, RhoGDI) associated with the miR-151 pathway. Intratumoral injection of the baculovirus into the mice bearing HCC tumor effectively repressed the tumor growth and enhanced the survival rate. The simultaneous miRNA modulation also suppressed the cell cycle, metastasis and triggered apoptosis. Altogether, our results suggested that the baculovirus-mediated miR-122 overexpression and miR-151 suppression may serve as a means of therapy to block the proliferation and migration of Mahlavu cells.

Simultaneous modulation of miR-122 and miR-151 suppressed hepatocellular carcinoma cell proliferation/migration in vitro and tumor growth in vivo

○Chiu-Ling Chen, Pei-Hsiang Yuan, Kuei-Chang Li, Guan-Yu Chen, Yu-Chen Hu
(Dept. Chem. Eng., Natl. Tsing Hua Univ., Hsinchu, Taiwan)

Key words baculovirus, RNA interference, hepatocellular carcinoma

2P-032 カイメン共在バクテリアメタゲノムを用いた好中球調節ペプチドの高効率スクリーニング

○椎田 敦之¹, 高橋 宏和¹, 鈴木 克彦², 竹山 春子³, 岡村 好子¹
(¹広島大院・先端物質, ²早大・スポーツ科学, ³早大・先進理工・生医)
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】

我々はメタゲノムライブラリーから高効率に機能性遺伝子を取得する方法を開発している。昨年度の本会において、10 万クローンに及ぶライブラリーの中から *in sillico* スクリーニングによってペプチド合成に関与すると思われるクローンを選択し、従来の 400 倍の効率の陽性検出率を示すことを報告した (第 64 回生物工学会)。本研究では、同様のスクリーニングにより好中球活性化及び抗炎症性ペプチドの探索と解析をそれぞれ行った。

【方法及び結果】

好中球は外部刺激により炎症反応を誘起し、感染微生物に対する初期免疫を担う重要な細胞である。その活性は生じた次亜塩素酸による、ルミノール酸化に伴う発光反応により測定できる。陽性クローンの内、好中球を刺激し、炎症反応を誘発する活性を示したクローンは 1 クローン、反対にザイモザン刺激により過剰に刺激された好中球に対して何らかの抗炎症活性を示したクローンは 2 クローンであった。

このことより、本法は高効率スクリーニングに有効であると示唆された。さらに HPLC による逆相クロマトグラフィーによってそれぞれの生理活性ペプチドの粗精製を行った。現在、挿入メタゲノムを解析し、原遺伝子の同定を行っている。

High efficiency screening of peptides stimulate neutrophils among the metagenome library derived from sponge-associated bacteria

○Atsuyuki Shida¹, Hirokazu Takahashi¹, Katsuhiko Suzuki², Haruko Takeyama³, Yoshiko Okamura¹
(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²Grad. Sch., Sport Sci., Waseda Univ., ³Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words metagenomic libraries, neutrophil, bioactive peptide