

2P-198 顕微ラマン分光イメージングによる海洋珪藻 *Fistulifera* sp. の *in vivo* 脂質解析

○向井 将一¹, 安藤 正浩², 濱口 宏夫^{2,3}, 細川 正人¹,
長田 響子¹, 吉野 知子¹, 田中 剛^{1,4}
(¹農工大院・工・生命工, ²早大・ASMeW, ³台湾国立交通大,
⁴JST・CREST)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【目的】海洋珪藻 *Fistulifera* sp. は栄養枯渇条件下においてトリアシルグリセロール (TAG) を主成分とする油滴を高蓄積することから、TAG を原料としたバイオディーゼル燃料 (BDF) 生産の候補株として期待される。同株の TAG を構成する脂肪酸の細胞内での動的挙動の解明は BDF の高品質化や高生産を実現するために重要である。そこで、本研究では顕微ラマン分光イメージングを用いて細胞内に蓄積された油滴中の *in vivo* 脂質解析を目的とした。

【方法及び結果】顕微ラマン分光イメージングには、Nd:YAG レーザー (ex: 532 nm) を光源とし、モノクロメーターを分光器、EM-CCD を検出器として配したピエゾ電動ステージ付倒立顕微鏡を用いた。通常栄養条件から貧栄養条件へ切り替える 2 段階培養により *Fistulifera* 属 JPCC DA0580 株の TAG 蓄積を誘導し、24 時間毎にサンプリングを行った。単一細胞を 0.25 μm の間隔で走査し、各点のラマンスペクトルを取得した。油滴中に含まれる脂質中の脂肪酸組成をラマンスペクトルから分析した結果、細胞内でのミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、EPA の存在比を明らかにすることができた。本技術は、生細胞を低侵襲に解析可能であるため、細胞内における脂肪酸の輸送経路の解明に寄与できると考えられる。

***In vivo* lipid profiling of marine diatom *Fistulifera* sp. by Raman spectroscopic imaging**

○Shoichiroh Mukai¹, Masahiro Ando², Hiro-o Hamaguchi^{2,3}, masahito Hosokawa¹,
Kyoko Osada¹, Tomoko Yoshino¹, Tsuyoshi Tanaka^{1,4}
(¹Dept. Biotechnol. Life Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Waseda Univ.,
ASMeW, ³NCTU, ⁴CREST, JST)

Key words Raman spectroscopy, microalgae, Lipid profiling, *Fistulifera* sp.

2P-200 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での嗅覚受容体の機能的発現におけるアクセサリタンパク質の効果

○堀 綾佳¹, 福谷 洋介¹, 石井 純², 近藤 昭彦³, 松波 宏明⁴,
養王田 正文¹
(¹農工大院・工・生命工, ²神戸大・自科・研究環, ³神戸大・院・工・応化, ⁴デューク大学メディカルセンター)
ayaka.hori@yohda.net

哺乳類の嗅覚機構において匂い分子センサーとして機能する嗅覚受容体の存在が発見されて以来、嗅覚機構の全容解明や嗅覚を模した匂いセンサー開発に向けて様々な研究が行われている。当研究室では、嗅覚受容体を発現させた出芽酵母を用いて嗅覚を模した匂いセンサー開発を目的に研究を進めている。これまでは出芽酵母に発現させた嗅覚受容体のリガンド応答が低いために、センサーとしての実用化を目指すためには嗅覚受容体の機能的発現量やリガンド応答の向上が必要であった。

本研究では、出芽酵母におけるマウス嗅覚受容体の機能的発現の向上を目的に、嗅覚神経細胞内で嗅覚受容体の細胞膜輸送を特に補助する Receptor transport protein 1s (RTP1s) との共発現が、細胞膜局在量やリガンド応答の向上に与える影響について検討した。この結果、出芽酵母を宿主細胞とした場合においても、RTP1s の共発現によりマウス由来嗅覚受容体の膜局在量の増加とリガンド応答の向上がみられた。現在は、鼻腔粘液中でリガンドとなる匂い分子を捕捉し、嗅覚受容体に受け渡すとされる Odorant binding protein や Pheromone binding protein を添加することで、リガンド応答がさらに向上するかどうかを検討しており、本発表においてはその現状なども併せて報告する。

Effect of the accessory proteins on expressing functional odorant receptor with yeast

○Ayaka Hori¹, Yosuke Fukutani¹, Jun Ishii², Akihiko Kondo³, Hiroaki Matsunami⁴,
Masafumi Yohda¹
(¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ³Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.,
⁴Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke Univ. Medical Center)

Key words odorant response, biosensor

2P-199 顕微ラマン分光法による大腸菌シングルセルレベルでの呼吸活性の評価

○永島 佑樹¹, 安藤 正浩², モリ テツシ², 濱口 宏夫^{2,3},
竹山 春子^{1,2}
(¹早大・先進理工・生医, ²早大・ASMeW, ³台湾国立交通大)
haruko-takeyama@waseda.jp

細菌の呼吸のパターンは酸素濃度によって異なり、好気性、嫌気性、通性嫌気性の 3 種類が存在する。呼吸のパターンによって細菌内における代謝が異なるため、細菌の呼吸のパターンを突き止めることは重要である。現在、*in vivo* 条件下における細菌の呼吸活性をシングルセルレベルで測定できる方法は存在しない。本研究で用いた顕微ラマン分光法は、非染色で迅速にスペクトルを取得し、細胞全体に含まれる物質の情報を得ることができる手法であり、呼吸活性に関する知見が得られるものと期待される。そこで本研究では、顕微ラマン分光法による、増殖中の大腸菌における呼吸活性の検出を試みた。培地中の酸素濃度を変化させるため、200 rpm および 30 rpm の振とう条件下で培養を行い、一定時間ごとに大腸菌のラマンスペクトルを測定した。励起光の波長を 632.8 nm の時 740 cm⁻¹ に特徴的なラマンバンドが検出され、これはシクロロム d オキシダーゼを示していると考えられる。シクロロム d オキシダーゼは大腸菌の呼吸鎖に存在し、菌体内の酸素濃度が高いほど発現量が減少する傾向がある。高振とう条件下 (200 rpm) で培養した大腸菌では、低振とう条件下 (30 rpm) に比べて、シクロロム d オキシダーゼ由来のバンドの強度が減少した。この結果より、顕微ラマン分光法を用いることで増殖中の大腸菌の呼吸活性の検出が可能であることが示された。

Evaluation of respiratory activity of *Escherichia coli* at single cell level by using Raman microspectroscopy

○Yuki Eijima¹, masahiro Ando², Tetsushi Mori², Hiro-o hamaguchi^{2,3},
Haruko Takeyama^{1,2}
(¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²ASMeW, Waseda Univ., ³NCTU)

Key words *Escherichia coli*, single cell, cytochrome d oxidase, Raman microspectroscopy

2P-201 紫外線 DNA 損傷の修復機構における SUMO E3 結合酵素の機能解析

柘植 真亜沙¹, 増田 裕介¹, 金岡 英徳¹, 木溪 俊介¹, 三宅 克英²,
飯島 信司¹
(¹名大院・工・生物機能, ²石川県大・生物資源研)
kaneoka@nubio.nagoya-u.ac.jp

近年のアンチエイジングへの関心の高まりにより、機能性化粧品へ注目が期待が集まっている。機能性化粧品開発のためには、シミ・ソバカスなど肌トラブルの発生メカニズムの解明や新規機能性原料のスクリーニングが必要となる。しかし、化粧品の開発において世界的に動物実験を禁止する方向にあるため、培養細胞を用いたスクリーニング・評価系の構築が必要不可欠である。本研究では紫外線による DNA 損傷修復 (ヌクレオチド除去修復: NER) を活性化するための原料のスクリーニング系構築を目指し、NER 因子の翻訳後修飾の解析を行った。

SUMO 化は翻訳後修飾の一つであり、ユビキチン様の小型タンパク質 SUMO が基質タンパク質に結合することにより、その活性や局在、他のタンパク質との相互作用を制御する。これらの機能から、SUMO 化は DNA 複製や DNA 修復など様々な生命現象の制御因子であると考えられている。そこで我々は、SUMO の基質への結合を触媒する E3 ligase を RNAi によりノックダウンすることにより、NER への影響を測定した。代表的な紫外線 DNA 損傷であるシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) と 6-4 光産物 (6-4PP) の修復効率を ELISA 法により測定したところ、同じ SUMO E3 ligase に属する酵素であるにも関わらず、CPD の修復のみを活性化させる酵素と、CPD と 6-4PP 両方の修復を活性化させる酵素が観察された。これらの異なるパターンを示した二つの SUMO E3 ligase について、ターゲットタンパク質の同定をはじめとする詳細な検討を行った。

The roles of SUMO E3 ligase in nucleotide excision repair

Maasa Tsuge¹, Yusuke Masuda¹, 〇Hidenori Kaneoka¹, Syunsuke Kidani¹,
Katsuhide Miyake², Shinji Iijima¹
(¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

Key words UV damage, nucleotide excision repair, SUMOylation