

3S-Ba05 高輝度化学発光タンパク質によるリアルタイムバイオイメージング○永井 健治^{1,2}¹阪大・産研, ²JST・さきがけ
ng1@sanken.osaka-u.ac.jp

蛍光タンパク質は生物学研究に革命をもたらしたことは論を待たない。今や生物学研究のみならず、医学、薬学、さらには物理学分野でも用いられる日常的なツールになった。蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングにより様々な現象が発見され生命の理解に大いに貢献している。近年では100nm以下の空間分解能を達成する超解像にも不可欠になり、活躍の場に事欠かない。このように蛍光タンパク質は極めて有用で強力なツールではあるが、欠点が無い訳ではない。蛍光観察に必須の励起光照射が、時に細胞環境をかく乱し、或いは組織深部の観察を困難にしてしまうからである。一方、励起光照射を必要としない化学発光はこれら蛍光観察に付随する欠点は回避可能である。しかしながら、化学発光シグナルは非常に微弱なためシグナルの検出は数分から数時間という長時間の露光が必要であるという課題点を有していた。この課題を解決するために、我々は改変型ウミシイタケ luciferase と Venus 蛍光タンパク質を高効率にフェルスター共鳴エネルギー移動が生じるように融合し、大幅に発光強度を増加させることに成功した。Nano-lantern と名付けられたこの化学発光タンパク質により、生きた細胞を蛍光と同程度のクオリティーで観察することが可能になっただけでなく、自由に動き回る脱毛していないマウス体内の腫瘍組織を高感度に実時間観察することが可能になった。また、Nano-lantern を基に、Ca²⁺、ATP、cAMP を検出可能なセンサーを開発し、蛍光センサーが使用できない環境下において、これらの生理活性物質の動態をイメージングすることに成功した。これら励起光を必要としない化学発光性のセンサーによりオプトジェネティクスにより細胞機能を光操作しながらのバイオイメージングも可能になった。本シンポジウムでは化学発光タンパク質と蛍光タンパク質を比較しつつ、今後のバイオイメージングの展望を述べたい。

3S-Bp01 合成ガスプラットフォームによるバイオマスリファイナリー技術の開発

○中島田 豊

(広島大院・先端物質)
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

現在、我々の身の回りにあるエネルギー・物質の大部分は化石資源から製造されている。しかし、化石資源枯渇の懸念や地球温暖化への関心の高まりから、再生可能資源であるバイオマスの有効利用が求められている。これまでバイオマス中の糖質発酵が主に研究されてきたが(糖プラットフォーム)、合成ガス(H₂とCOの混合ガス)又はH₂-CO₂を経由する方法もある(合成ガスプラットフォーム)。合成ガスはバイオマスを水蒸気改質などによりガス化することで容易に得ることができ、糖質以外のリグニン、脂質、タンパク質も使うことができる。また、廃プラスチックなどの有機廃棄物も利用でき、さらに、再生可能資源である太陽光、風力、水力、地熱等により得られた電気エネルギーを用いて水を電気分解することで得られるH₂もエネルギーとして用いることができる。そのため合成ガスプラットフォームにより工業的に価値のある物質を生産できれば、地球温暖化の防止や新たな資源循環サイクルの構築につながることを期待される。そこで、我々は好熱性偏性嫌気性ホモ酢酸菌である *Moorella* 属細菌を用いた合成ガスプラットフォームでの物質生産法を以下の通り検討してきた。

まず、合成ガスのシフト反応(CO + H₂O → CO₂ + H₂)により得られるH₂-CO₂からの有用物質生産菌としてガンリン代替及び化成品原料となるエタノール生産菌を探索、合成ガスも資化できるホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* と多くの性状が一致する酢酸の他にエタノールを生産する好熱性細菌 *Moorella* sp. HUC221 株を世界で初めて見いだした(Sakai et al. Biotechnol. Lett., 26, 1607, 2004)。そこで、本菌の濃度培養法を開発し、H₂-CO₂からの酢酸・エタノール連続生産法を確立した(Sakai et al. J. Biosci. Bioeng., 99, 252, 2005)。しかし、本菌のエタノール生産量は酢酸生産量と比較してまだまだ低くエタノール取率の向上が求められた。そこで、分子育種によるエタノール生産能の増強を見据え、NAD(P)H 依存性アルコール脱水素酵素、及びアルデヒド脱水素酵素候補遺伝子を大腸菌内で発現、精製し、候補酵素活性からエタノール生成関連遺伝子と同定した(K. Inokuma et al. Arch. Microbiol., 188, 37-45, 2007)。

上記遺伝子などの過剰発現を図るために HUC22-1 株への遺伝子導入を試みたが、成功しなかった。そこで、HUC221 株と近縁でありゲノム情報が公開されている *M. thermoacetica* ATCC39073 株を宿主として、本菌の持つ制限修飾系を回避するために、本菌のメチル化酵素を発現させた大腸菌内で導入遺伝子をクローニングした。本方法により、ウラシル要求性変異株(以下 ΔpyrF 株)を相同組換えによる遺伝子破壊により作製でき、pyrF 遺伝子相補および外来遺伝子断片の導入試験に世界で初めて成功した。異種遺伝子導入による物質生産例として、*Thermoanaerobacter ethanolicus* 由来乳酸脱水素酵素 (*ldh*) をグルタルアルデヒド3リン酸脱水素酵素遺伝子(G3PDH)プロモーターの制御下、ΔpyrF 株で発現させ、フルクトースを炭素源として本来は生産できない乳酸生産にも成功した(Kita et al., J. Biosci. Bioeng., 115 (4), 347- 352, 2013)。

さらに、栄養要求性マーカーでは野生株への遺伝子導入が難しいことから、抗生物質耐性遺伝子マーカーによる遺伝子導入法を検討した。その結果、耐熱性カナマイシン耐性遺伝子を G3PDH プロモーターの制御下で発現させることで、形質転換マーカーとして利用可能であることを見いだした(FEMS Microbiology Letters, 343, 8-12, 2013)。

Real time bioimaging with bright luminescent proteins○Takeharu Nagai^{1,2}¹ISIR, Osaka Univ., ²PRESTO, JST)**Development of biomass refinery based on syngas platform**

○Yutaka Nakashimada

(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemiluminescent protein, fluorescent protein, FRET, bioimaging**Key words** syngas platform, Moorella, biomass, fermentation