The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

1P-011　耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus*の交配を利用したタンパク質共局在解析系の構築

○村上 允唯 , 星田 尚司 , 赤田 倫治
（山口大院・医系・応用分子生命）
mura-n@yamaguchi-u.ac.jp

タンパク質の局在を明らかにすることは、タンパク質機能やタンパク質間相互作用の予測に有用である。本研究では、耐熱性酵母 *K. marxianus*の全タンパク質の局在解析を進めている。各遺伝子と GFP 遺伝子との融合遺伝子の発現プラスミドを *K. marxianus*内で直接構築する方法を用いた。これまでに 672 タンパク質の局在を観察した結果、局在が明確なものだけでなく細胞内でドット状になる遺伝子が約 25% あった。これらのドット局在タンパク質を共局在解析により分類するために、RFP 融合タンパク質として発現させたが、GFP ではドット化するが、RFP ではドット化しないタンパク質があった。この問題を解決するため、RFP ではドット化できない *FAA2*遺伝子を用い RFP 遺伝子に変異を与え、ドット化するものを探索した。その結果、特定の変異を与えた RFP を用いると、GFP と融合させた場合と同様のドット局在を示した。共局在解析で GFP と RFP の局在箇所は一致していた。GFP 融合タンパク質及び RFP 融合タンパク質の共局在を調べるために、それぞれを発現する *K. marxianus*を交配させた。交配株の蛍光観察により、共局在解析が可能となる。

Development of a system for genome-wide protein colocalization analysis in *Kluyveromyces marxianus*

○Nobutada Murakami, Hisashi Hoshida, Rinji Akada
(Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

Key words　*Kluyveromyces marxianus*, colocalization, mutant RFP, mating

1P-012　分裂酵母のゲノム中に複数存在するトランスポゾン様遺伝子配列を利用した 異種タンパク質生産系の構築

○藤木 真優 [1], Idiris Alimjan[2], 竹川 薫 [1]
（[1]九大院・生資環・生命機能 , [2]旭硝子・ASPEX）
takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

モデル真核微生物である分裂酵母は、高等生物由来のタンパク質発現宿主として注目されている。従来のプラスミドを用いた異種タンパク質生産法では、栄養培地で継代培養を行うとプラスミドの脱落により発現量の低下が起こるという課題があった。分裂酵母のレトロトランスポゾン *Tf2*はゲノム上に 13 個のコピー配列が存在しており、これらの約 4 kb の塩基配列は互いに約 99.7 % の高い相同性を持つ。この *Tf2*を標的とした相同組換えでは 13 個の *Tf2*座への安定したマルチコピー遺伝子の組込みが期待される。本研究は目的遺伝子断片の形質転換効率、および異種タンパク質生産能を解析し、より高効率の異種タンパク生産系の構築を目的とした。*Tf2*の相同配列を両端に持ち , *ura4*マーカーとモデルタンパク質として EGFP を導入した遺伝子断片を作製し、分裂酵母野生株への形質転換を行った。獲得した形質転換体について、PCR により目的の断片が組込まれた *Tf2*座の位置と数を解析した。その結果、13 ヶ所の *Tf2*座中の 1-6 箇所に EGFP が組込まれたコロニーを獲得することができた。さらに、複数の *Tf2*座に組込まれた株は、栄養培地で継代培養を行なっても安定に EGFP が発現しており、本法が分裂酵母の異種タンパク生産に有効であることが示された。

Construction of an efficient fission yeast system for production of heterologous proteins by multilocus integration

○Mayu Fujiki[1], Alimjan Idiris[2], Kaoru Takegawa[1]
([1]Dept. Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., [2]ASPEX Div., Asahi Glass Co., Ltd.)

Key words　*Schizosaccharomyces pombe*, foreign gene expression, retrotransposon

1P-013　亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた酵母の選択的培養法の開発

○神田 圭輔 [1], 廣田 隆一 [1], 石田 丈典 [1], 北村 憲二 [2], 池田 丈 [1], 黒田 章夫 [1]
（[1]広島大院・先端物質 , [2]広島大・自然科学研究セ）
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

【目的】微生物を利用した物質生産ではコンタミネーションを防ぐために培地や装置の滅菌処理を行い、目的微生物のみを選択的に培養する必要がある。しかし、培養のスケールが大きくなるほど、その費用は莫大になり、抗生物質を用いる方法では耐性菌の出現といった安全性の問題がある。亜リン酸は還元型のリン酸であり、通常の生物はリン源として利用できないが、亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）を導入することで当該生物が生育可能となる。すなわち、安価な亜リン酸をリン源とし、PtxD を選択マーカーとすれば、厳重な滅菌処理を行わずとも、目的の微生物を安価で選択的に培養できることが期待される。昨年の本大会では、分裂酵において PtxD を導入することで、本手法での選択的培養が可能であることを報告した。今回我々は、微生物大量培養による物質生産のコスト削減と安全性向上を目的に、多倍体の実用酵母を含む出芽酵母において、その有効性を検討した。
【方法・結果】出芽酵母ではコドン偏位の影響によって異種蛋白質である PtxD の発現量が低いため、*Ralstonia sp.4506*株から取得した *ptxD*のコドン最適化を行った。その後、最適化した *ptxD*をプラスミドベクターにクローニングし、出芽酵母に異種発現させ、亜リン酸を唯一のリン源とした SD 培地で増殖を調べた。その結果、亜リン酸中での PtxD 導入株の増殖が大きく向上した。以上より、PtxD が菌体内で機能し、出芽酵母を含む酵母において広く利用可能であることが示唆された。

Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts

○Keisuke Kanda[1], Ryuichi Hirota[1], Takanori Ishida[1], Kenji Kitamura[2], Takeshi Ikeda[1], Akio Kuroda[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Ctr. Gene Sci, Hiroshima Univ)

Key words　yeast, transformation, phosphite, selection marker

1P-014　組換え酵母による難生産性分泌蛋白質発現系の性質決定

黒瀬 猛 [1], 齋藤 雄太 [2], 伊藤 圭祐 [1,2], ○河原崎 泰昌 [1,2]
（[1]静県大院・薬食生命 , [2]静県大・食栄）
kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景と目的】我々は、難生産性蛋白質であるシイタケ細胞内ラッカーゼ Lcc4 の組換え酵母による発現系構築の過程で、同酵素が宿主細胞内で分泌蛋白質として認識され、小胞体ストレスを介した細胞毒性を与えていることを見出した。低収量を回避する新たな発現誘導法（高密度菌体懸濁液を用いた発現誘導、以下高密度系）を開発し 1、これまでに Lcc4 をはじめとする難生産性分泌蛋白質の菌体外生産量を数千倍（培地 1 L あたり 1 mg 程度）に高めることに成功している 2。今回、さらなる生産性向上を目的とし、高密度系の分子機構について解析を行ったので報告する。
【結果と考察】Lcc4 発現酵母株を非誘導条件下で前培養（OD_{660}=3）し、増殖連動型生産、静止期型生産、高密度系生産を行った。この結果、3 種の菌体のトランスクリプトームは互いに類似しているが、高密度系でのみ窒素・アミノ酸代謝に関連する *Cha1*、*Vba5*などの発現量が変動していた。また *Ato2*など、広域転写因子 Adr1p の結合配列をもつ 15 遺伝子の発現量が増大していた。培地成分の検討を行ったところ、硫酸アンモニウムの過剰投与により Lcc4 生産量が 3 倍に増加した。adr1 欠損株は、高密度系における Lcc4 生産だけが顕著に低下した。高密度系とすることで一過的に誘導される *Adr1*下流因子群が難生産性分泌蛋白質の生産に関与していることが示された。
1 Kimata et al., JBB 113, 154-159 (2012); 2 Kurose et al., JBB 117, 659-663 (2014)

Characterization of high-cell density expression system

Gakeshi Kurose[1], Yuta Saito[2], Keisuke Ito[1,2], ○Yasuaki Kawarasaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words　*Saccharomyces cerevisiae*, recombinant protein, secretory production

NII-Electronic Library Service