

2P-017 Long-term P3HB expression in *E. coli* using CRISPR/Cas9 gene editing system and CICHE method

○Mu-en Chung, I-hsin Yeh, Yu-chen Hu
(Dept. of Chem. Eng., Natl. Tsing Hua Univ., Hsinchu, Taiwan)
ychu@mx.nthu.edu.tw

Stable and high-level heterologous expression is essential when applying microorganism to industrial production. Although plasmid-mediated heterologous expression in *E. coli* is commonly used, its instability and need of antibiotic selection increase the production cost. An alternative way that conquers the drawbacks of plasmids is chromosomal integration; however, single copy integration tends to lead to insufficient expression. Besides, the integration efficiency of foreign genes through homologous recombination is relatively low. In order to develop a stable and high-level *E. coli* expression system, we combined the “CRISPR/Cas9-based chromosomal integration method” and “chemically inducible chromosomal evolution (CICHE) system”. CRISPR/Cas9 genome editing system was applied to increase site-specific chromosomal integration efficiency while CICHE system was used to increase the copy number of integrated cassette. Here, the production of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB, a bio-degradable plastic), using the hybrid system was examined as an example. Since obtaining high quantities of P3HB with low cost remains a problem to be solved, the long-term P3HB expression *E. coli* strain constructed via the CRISPR/Cas9-CICHE hybrid methods will significantly decrease the production cost of P3HB.

Long-term P3HB expression in *E. coli* using CRISPR/Cas9 gene editing system and CICHE method

○Mu-en Chung, I-hsin Yeh, Yu-chen Hu
(Dept. of Chem. Eng., Natl. Tsing Hua Univ., Hsinchu, Taiwan)

Key words gene expression, CRISPR/Cas9 gene editing, Poly-3-hydroxybutyrate

2P-019 Toxin-Antitoxin system を利用した大腸菌カウンターセクション技術の開発

○佃 美雪^{1,2}, 中島 信孝^{1,3}, 宮崎 健太郎^{1,2}
(¹産総研・生物プロセス, ²東大院・新領域, ³東工大院・生命理工)
miyazaki-kentaro@aist.go.jp

【背景・目的】大腸菌は遺伝子組換え実験で最も頻用され、複製開始点、薬剤耐性マーカーが様々にくみ合わさったプラスミドベクターが完備し、遺伝子の導入技術はほぼ完成している。一方、一度導入されたベクターを脱落させるカウンターセクション技術は、選択マーカーも少なく充分ではない。そこで、我々は新たなカウンターセクションの方法論と効率的なマーカーの開発を行った。【実験】大腸菌ゲノムには、多くの毒素-抗毒素システムが存在する。多くの場合、抗毒素が過剰量発現することで毒素の機能をマスクしている。我々は、抗毒素の発現量をコンディショナルに調節することで、細胞死を自在に誘導できるのではないかと考え、この仕組みをカウンターセクションに応用することとした。抗毒素の発現抑制には、antisense RNA (asRNA) を利用した。asRNA は、標的遺伝子の mRNA にハイブリダイズし、mRNA の翻訳阻害、分解促進により標的遺伝子の機能発現を抑制する。そこで、(i) 脱落させたいベクターに抗毒素遺伝子に対する asRNA 発現カセットを組み込み、(ii) コンディショナル (IPTG 添加) に asRNA を発現誘導する。(iii) 抗毒素の発現が抑制された宿主細胞は死滅し、ベクターの脱落した細胞のみが濃縮されるという仕組みを考案した。本発表では、大腸菌ゲノムの抗毒素遺伝子の網羅的なサイレンシングと、とくに有効であった MqsAR および RnlAB を利用したカウンターセクションについて紹介する。

Antisense RNA-mediated counter selection system in *Escherichia coli*

○Miyuki Tsukuda^{1,2}, Nakashima Nobutaka^{1,3}, Miyazaki Kentaro^{1,2}
(¹BRI, AIST, ²Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo, ³Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words antisense RNA, counterselection, *Escherichia coli*, Toxin-antitoxin

2P-018 PheS 変異体を利用した新規大腸菌カウンターセクションマーカーの開発

○宮崎 健太郎^{1,2}
(¹産総研・生物プロセス, ²東大院・新領域)
miyazaki-kentaro@aist.go.jp

【背景・目的】合成生物学では、様々な遺伝子を様々な組み合わせで宿主微生物内で発現させ、新しい機能を付与することが行われる。特に近年では、単一遺伝子ばかりでなく、生合成系遺伝子など、多数の遺伝子から成る人工オペロンを導入するケースが多い。後者を目的とした場合、様々な人工オペロンを逐一合成するよりも、部分オペロンを含むベクターを宿主内に共導入し、組み合わせるのが効率的である。しかし、遺伝子の導入技術と比較し、脱落させる為の技術は立ち遅れており、大腸菌で有効に使えるカウンターセクションマーカーは極少数である。そこで、我々は操作性の高いカウンターセクションマーカーの開発を行なった。

【実験】本研究では、アミノ酸アナログの取り込みを利用したカウンターセクション方法を検討した。従来、フェニルアラニン合成酵素 PheS によりフェニルアラニンアナログ化合物の一種 p-Cl-Phe を取り込ませ、細胞内タンパク質を機能不全に至らしめ、細胞死を誘導する方法が開発されていた。しかし従来用いられてきた大腸菌 PheS 変異酵素 (PheS*) は、p-Cl-Phe の取り込み効率が低く、最少培地に準じた培地 (酵母エキス/グルコース/塩化ナトリウム: YEG 培地) を利用する必要があった。しかし、YEG 培地での増殖速度は低く、操作性に劣るという欠点があった。そこで本研究では、LB 培地でも有効に使えるよう、PheS* をさらに分子改変した。改変された PheS** 遺伝子を pUC18/19 ベクターなどに組み込み p-Cl-Phe 含有 LB 培地で致死効果を検討した結果、寒天培地、液体培地の双方で有効で、効率的なカウンターセクションが可能であることを確認した。

PheS-based counterselection system in *Escherichia coli*

○Kentaro Miyazaki^{1,2}
(¹BRI, AIST, ²Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo)

Key words PheS, counterselection, *Escherichia coli*, amino acid analog

2P-020 大腸菌発現系において培地および遺伝子配列が発現量および転写プロファイルに及ぼす影響

○安保 紘高¹, 三木 駿也¹, 原 啓文², 山副 敦司³, 細山 哲³,
土金 恵子³, 今村 維克¹, 今中 洋行¹
(¹岡山大院・自科, ²マレーシア工科大学, ³NITE・NBRC)
imanaka@okayama-u.ac.jp

【目的】大腸菌は増殖速度が速く、様々な遺伝子ツールの利用が可能のため、組換えタンパク質の発現用宿主として汎用されている。しかし、タンパク質の折りたたみ特性や遺伝子におけるコドン使用頻度の違いなどにより、細胞内での封入体の形成や、発現阻害といった問題がしばしば生じる。そこで本研究では、大腸菌を宿主とした難発現タンパク質大量発現系の確立を目的とした。

【方法・結果】野生型配列 (wt) の大腸菌内発現が困難である放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来 ϵ -リジンアシラーゼ遺伝子 (*Sm-ela*) をモデルとし、培地成分やコドン改変が発現量および活性体収量に及ぼす影響について調べた。また、各種菌体より total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行い、ゲノムワイドな転写プロファイルを比較評価した。各種 *Sm-ela* 発現実験の結果、培地成分のリッチ化、5' 末端近傍のレアカドン置換 (1mut), 全長領域にわたるコドン最適化 (opt) により、発現量及び活性体収量の向上が可能であることがわかった。RNA-seq の結果、培地成分によって転写プロファイルが大きく変動することがわかった。そして、*Sm-ela* の遺伝子配列の変異によって転写量が顕著に変動する遺伝子が複数見出された。さらに、RT-PCR により、*Sm-ela* (wt, 1mut) における mRNA の部分断片化が示唆された。

Influence of codon bias and media components on the *Escherichia coli* recombinant protein expression system and transcriptional profile of *E. coli*

○Hirotaka Abo¹, Syunya Miki¹, Hirofumi Hara², Atsushi Yamazoe³,
Akira Hosoyama³, Tsuchikane Keiko³, Koreyoshi Imamura¹, Hiroyuki Imanaka¹
(¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ., ²Uni. Tech. Malaysia, ³NBRC, NITE)

Key words recombinant protein production, transcriptome, *Escherichia coli*