

2P-029 2,4,6-トリクロロフェノール分解性 *Ralstonia pickettii* DTP0602 株のゲノム解析と後期分解遺伝子
○八田 貴¹, 岩崎 友裕¹, 畢 貞¹, 大坪 嘉行²
(¹岡山理大・工・生体医工, ²東北大院・生命)
thatta@bme.ous.ac.jp

【目的】*Ralstonia pickettii* DTP0602 は 2,4,6-トリクロロフェノール (2,4,6-TCP) を完全分解するが、その分解遺伝子は 3 つの遺伝子クラスターによって TCA サイクルに入ることが分かっている。今回は *R. pickettii* DTP0602 の全ゲノム解析を行い、その構造を明らかにするとともに分解遺伝子の位置関係を他の類縁菌株のものと比較することを目的とした。【方法・結果】*R. pickettii* DTP0602 の全ゲノム解析を次世代シーケンサー Roche FLX454 と illumina Miseq によって行った。完全な塩基配列を決定したところ、4,499,145-bp の染色体 1、2,889,590-bp の染色体 2、及び 737,115-bp のプラスミドから構成されていた。類縁の菌株とゲノム解析ソフト GenomeMatcher によるゲノムの相同性比較を行ったところ、*Ralstonia eutropha* H16 と *Cupriavidus necator* N-1 と最も類似性があることが明らかとなった。興味深いことに *C. necator* N-1 のプラスミドに *hadRXABC* 類似分解遺伝子が存在していた。一方 2,4,6-TCP 分解菌 *Cupriavidus necator* JMP134 のゲノムとは低い類似性であり、分解遺伝子 *tcpRXABCYD* は染色体 1 に存在していた。*R. pickettii* DTP0602 の 2,4,6-TCP 分解に関わる *hadRXABC* と *hadSYD* は染色体 2 に 146-kb 離れて存在していた。また、マレイル酢酸から TCA サイクルへの分解に関わる *hadEFG* は類似の遺伝子 3 コレが染色体 1、2、及びプラスミドにの存在が明らかとなった。さらに、これら 3 遺伝子がどのように分解に関わっているかを検討した。

Genome Sequence of 2,4,6-Trichlorophenol Degrading-Bacterium *Ralstonia pickettii* and the Gene Analysis
○Takashi Hatta¹, Tomohiro Iwasaki¹, Tei Hitsu¹, Yoshiyuki Ohotsubo²
(¹Dept. Biomed. Eng., Fac. Eng., Okayama Univ. Sci., ²Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

Key words chlorophenol, degradation, genome, *Ralstonia pickettii*

2P-031 出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
○松崎 浩明, 宮本 昭弘, 柳本 敏彰, 秦野 琢之
(福山大・生命工・生工)
matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐことを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導する方法が考えられる。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導することを検討している。セントロメア DNA の切り出しは、第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位 (RS) を同じ方向に挿入し、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第 IV 番染色体 1 本から切り出すことで、また二倍体では第 IV 番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができる。しかし、プレート上で僅かな数のコロニーが出現するので生存細胞が出現する原因を解析した。一倍体の生存細胞のセントロメア DNA 近傍の PCR 解析や RS 領域のシークエンス解析から、生存細胞が出現した原因は、主に染色体から 2 個の RS のうち 1 個が欠失し、切り出しが起らなかったためと示唆された。この結果に基づき、生存率をさらに低下させることを検討している。

Analysis for surviving cells appeared with induction of excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*
○Hiroaki Matsuzaki, Akihiro Miyamoto, Toshiaki Yanamoto, Takushi Hatano
(Dept. Biotechnol., Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words cell death, centromere, surviving cell, *Saccharomyces cerevisiae*

2P-030 独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* 由来炭酸脱水酵素の異種発現と活性測定
○宮原 佑宜¹, 太田 美乃¹, 小宮山 晶子², 柘植 丈治¹
(¹東工大院・総理工, ²九電)
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景・目的】工場などからは日々、大量の CO₂ が排出されており、CO₂ の分離・吸収、あるいは、新たな資源化技術の創出が課題となっている。炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase, CA) は炭酸を CO₂ と水に速やかに変換する生体触媒であり、排出された大量の CO₂ を低コストで分離回収する技術や再資源化技術に応用できる可能性が考えられる。本研究では、酵素や微生物の優れた機能を利用し CO₂ を低コストで分離回収、さらには付加価値の高い化学品への変換の可能性について検証することを目的として、化学合成独立栄養細菌である *Ralstonia eutropha* の CA に着目して、大腸菌を用いた発現系の構築および活性測定について検討を行った。【方法】*R. eutropha* H16 由来の CA 遺伝子 (*can*) を、ゲノム DNA から PCR により増幅し、pET-3a に挿入して発現ベクターを作成した。*Escherichia coli* BL21(DE3) を発現宿主として培養し、菌体を超音波で破碎し CA 酵素活性および SDS-PAGE 分析に供した。さらに、補因子として亜鉛やマグネシウムを測定系へ添加することで、CA 活性に変化が見られるかを検討した。【結果・考察】CA 酵素活性測定および SDS-PAGE によって、大腸菌内で CA が活性型の酵素として発現していることが確認された。また、活性測定系に亜鉛を添加した際に CA 活性が向上することが認められた。

Heterologous expression and activity assay of carbonic anhydrase from *Ralstonia eutropha*
○Yuki Miyahara¹, mino Ota¹, Akiko Komiyama², Takeharu Tsuge¹
(¹Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, ²Kyushu Electric Power Co., Inc.)

Key words carbonic anhydrase, carbon dioxide, *Ralstonia eutropha*

2P-032 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導機構
○西川 諒¹, 籠谷 さやか¹, Nobi Sahara Tatit¹, 秀瀬 涼太¹, 今中 忠行², 藤原 伸介¹
(¹関西学院大院・生環科学研セ, ²立命館大・生命科学・生工)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の生育温度は 60℃ から 100℃ と幅広い。また本菌において低温誘導性遺伝子が多数確認されており、これらが低温環境下での適応に重要な役割を果たすと考えられている。低温誘導性の遺伝子には温度センシング機構が存在すると考えられ、このスイッチング機構を応用することで低温誘導型の温度感受性の高発現系が実現すると期待される。既に低温誘導型 RNA ヘリカーゼでは SD 配列から開始コドンまでに存在するアデニンに富む領域が制御領域であると示唆されている。本研究では低温誘導機構の一般性を検証すると共に高発現系への応用を模索した。【結果】*T. kodakarensis* の 60℃ (低温) で高発現する低温誘導型遺伝子をマイクロアレイ解析で選抜し、候補遺伝子の低温誘導性を qRT-PCR で確認した。これら遺伝子群の制御領域を比較したところ、RNA ヘリカーゼと同様に、SD 配列から開始コドンまでの間にアデニンまたはチミンが連続した配列が存在するものが多くみられた。その中で低温誘導性のシャペロン遺伝子 *cpkA* に着目し、耐熱性カタラーゼをレポーターとする実験系を用いて解析した。*cpkA* の SD 配列から開始コドンまでに存在するアデニンの連続配列をグアニンの連続配列に置換したところ、低温誘導性が消失した。このことから、*cpkA* の低温誘導には SD 配列から開始コドンまでの間に存在する制御配列が重要であることが明らかとなった。

Induction mechanism of cold-stress inducible genes in *Thermococcus kodakarensis*
○Ryo Nishikawa¹, Sayaka Kagotani¹, Tatit Nobi Sahara¹, Ryota Hidese¹, Tadayuki Imanaka², Shinsuke Fujiwara¹
(¹Res. Center Environ. Biosci., Kwansei Gakuin Univ, ²Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words archaea, hyperthermophile, cold-inducible