

1P-077 多機能性カロテノイド合成酵素 CrtIBY の発現解析

○織田 愛海, 渡邊 研志, 長野 亜希子, 佐藤 亮太, 岡村 好子,
秋 庸裕
(広島大院・先端物質)
aki@hiroshima-u.ac.jp

[緒言] ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属は、高度不飽和脂肪酸、カロテノイド及び炭化水素といった機能性脂質を顕著量生産するため、工業生産株として有用である。当研究室ではカロテノイド生産性の *Aurantiochytrium* 属 KH105 株においてカロテノイド生合成に関わる新規酵素 CrtIBY に着目し、飢餓や低温のストレス条件下での遺伝子発現制御機構について解析を進めている。本研究では、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から β -カロテンを生成する多段階反応を単独で触媒する CrtIBY の酵素触媒機構について詳細な解析を行うために *in vitro* 反応系の構築を目指し、各種宿主微生物での同酵素の発現生産を試みた。

[方法・結果] KH105 株から crtIBY 遺伝子を単離し、その 5'又は3'末端に His タグ配列を付加して、カロテノイド低生産性の同属 CB15-5 株、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSc-1 株あるいは大腸菌 *E. coli* BL21 株に導入して発現させた。培養後の菌体から抽出した色素を分析したところ、CB15-5 株と酵母で β -カロテン生産が認められ、活性発現したことを確認した。また、大腸菌で His-GST 融合タンパク質として CrtIBY を発現させると、抗 His タグ抗体を用いたウェスタン解析で予想分子量 (167.3 kDa) 付近に陽性バンドが認められた。*E. coli* BL21 株は基質の GGPP 生産能を持たないため、現在、GGPP 合成酵素を共発現させることで CrtIBY の活性確認を行っている。

Expression analysis of a novel multifunctional carotenoid synthase, CrtIBY

○Ami Oda, Kenshi Watanabe, Akiko Nagano, Ryota Satou, Yoshiko Okamura,
Tsunehiro Aki
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Aurantiochytrium*, synthase, carotenoid, heterologous expression

1P-078 接着性ナノファイバータンパク質 AtaA と共発現するタンパク質との相互作用

○林 亜友美¹, 吉本 将悟¹, 石川 聖人², 堀 克敏¹
(¹名大院・工, ²東大院・工)
khorii@nubio.nagoya-u.ac.jp

[背景] *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株は様々な材料表面に対して迅速かつ高い付着性を示す。Tol 5 株の付着性は細胞表層に存在する三量体型オートトランスポートアダヘシン (TAA) ファミリータンパク質 AtaA によるものである。*ataA* 遺伝子のゲノム下流には 264 アミノ酸からなるタンパク質がコードされており、この遺伝子は *ataA* 遺伝子と同じオペロン上に存在し、共転写される。この遺伝子は、他のいくつかの TAA において類似の遺伝子が保存されていることから、TAA の機能に関与していることが示唆される。本研究では、*ataA* 下流の遺伝子がコードするタンパク質の相互作用について評価した。

[方法] *ataA* 遺伝子もしくは *ataA* 下流の遺伝子を欠損させた Tol 5 の変異株を作製し、ポリスチレンプレートに対する付着性を評価した。また、細胞分画によりタンパク質の細胞内での局在を、ブルダウンアッセイにより相互作用を解析した。更に、共焦点レーザー顕微鏡により AtaA の表層提示量を評価した。**[結果]** *ataA* 遺伝子欠損株は野生株と比べて付着性が著しく低下し、*ataA* 下流の遺伝子を欠損させた株は半分程度に低下した。また、細胞分画とブルダウンアッセイにより、*ataA* 下流の遺伝子のコードするタンパク質が AtaA と相互作用することが示唆された。これらの結果は、*ataA* 下流の遺伝子が AtaA の付着機能発現に重要であることを示している。

Interaction between the adhesive nanofiber protein AtaA and its co-expressed protein.

○Ayumi Hayashi¹, Shogo Yoshimoto¹, Masahito Ishikawa², Katsutoshi Hori¹
(¹Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words *Acinetobacter*, adhesion, autotransporter

1P-079 ゲノムを切らずに書き換える新たなゲノム編集技術の開発

○西田 敬二¹, 坂野 聡美², 近藤 昭彦²
(¹神戸大・自科・研究環, ²神戸大院・工)
akondo@kobe-u.ac.jp

様々な生物種のゲノム情報を直接操作することが出来るゲノム編集技術は近年著しい進歩を遂げており、生物工学はもちろんのこと生命科学全般においても革命的なツールとなりつつある。代表的な ZFN、TALEN、CRISPR などは人工スクレーパーと呼ばれるものであるが、これらの技術はいずれも標的とした DNA 配列を特異的に認識するようデザインすることが可能であり、標的部位において DNA 二重鎖切断を引き起こして、その後に宿主細胞が修復する過程で配列の変換を期待するものである。これまで相同組み換えおよびジーンターゲッティングが困難であった材料においても非常に有効であることから、動物など高等真核生物を中心に急速に導入が進んでいる。しかしながら染色体切断による細胞毒性が問題となり、特に多くの微生物等では多くの場合に致死的で適応が困難となっている。

本研究では新たなゲノム編集技術として、スクレーパー活性と代わる反応機構を採用することによって DNA を切らずに書き換える新たなゲノム編集技術の開発に成功し、出芽酵母および大腸菌において標的配列内に狙った点変異を高効率に導入して遺伝子機能を改変することを実現した。

Development of non-nuclease genome editing tool

○Keiji Nishida¹, Satomi Banno², Akihiko Kondo²
(¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words genome engineering, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, gene disruption

1P-080 ヒトニューロテンシン受容体におけるリガンド探索のための酵母バイオセンサー

○橋 弘樹¹, 中村 泰之², 石井 純³, 近藤 昭彦²
(¹神戸大・工, ²神戸大院・工, ³神戸大・自科・研究環)
akondo@kobe-u.ac.jp

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、細胞外の刺激を細胞内へ伝えることで生体内の多様な生理機能を司っていることから、医薬品の主要な標的となっている。新薬開発においては、GPCR の機能を調節できる分子を取得することが極めて重要であることから、GPCR に結合して細胞内シグナル伝達系を活性化もしくは阻害するリガンド候補を簡便に検出・選別できる酵母を宿主とした蛍光レポーターシステムが開発されている。この検出系は、リガンド候補を細胞表層に提示させることでフローサイトメーターを利用した 1 細胞スクリーニングが可能となり、大量のライブラリーを短時間でアッセイすることができる。しかし、従来の検出系では細胞ごとの蛍光強度のばらつきが大きいため、1 細胞スクリーニングに応用するためにはよりばらつきの小さい検出系を開発することが必要である。そこで本研究では細胞間における蛍光強度のばらつきが小さく、検出感度も高い GPCR アッセイ用酵母センサーの開発を目的とした。

標的 GPCR として中枢神経系の制御に関わるヒトのニューロテンシン受容体 (NTSR1) を用いた。NTSR1 発現系において、従来用いていた *PGK1* プロモーターから *TDH3* プロモーターへと変更した。また、コザック配列を付加し、さらにシグナル配列を付加した。これにより、細胞間の蛍光強度のばらつきが小さく、検出感度が高い GPCR アッセイ用の酵母バイオセンサーの開発に成功した。本系は、ヒト NTSR1 に対する新規リガンド探索のための強力な手段として期待される。

Yeast-based biosensor for ligand screening of human nerotensin receptor

○Hiroki Hashi¹, Yasuyuki Nakamura², Jun Ishii³, Akihiko Kondo²
(¹Fac. Eng., Kobe Univ., ²Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ³Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words G-protein-coupled-receptor, signal transduction, ligand screening, yeast