

1P-241 網羅的発現解析手法 (HiCEP) 法と次世代シーケンサーの組み合わせによる遺伝子発現データベースの構築

裏地 美杉¹, 湯野川 晴信², 万 ケン¹, 〇畑中 唯史¹
 (¹岡山生物研,²メッセンジャー・スケープ (株))
 hatanaka@bio-ribs.com

[背景と目的] 我々は、*Streptomyces cinnamonus* TH-2 株において、高濃度リン酸塩およびグルコース含有培地で大量分泌する金属プロテアーゼ (SCMP) を発見し、SCMP のプロモーターを用いた新奇放線菌遺伝子発現系を構築したが、SCMP プロモーターは、酵素発現に長期間の培養が必要である。そこで、SCMP 遺伝子発現系の改良を目指し、TH-2 株の遺伝子発現解析に取り組んでいる。本発表では、(独)放射線医学総合研究所で真核生物向けに開発された、網羅的発現解析手法 (High coverage expression profiling = HiCEP) 法を応用し、次世代シーケンサーによる放線菌遺伝子発現データベースの構築を試みる。

[結果と考察] *S. cinnamonus* TH-2 株を、2% グルコースあるいは 2% グリセロールを含む培地で、培養時間 24 時間、36 時間の時点で RNA を調整し、HiCEP 法に供した。また、RNA 転写物を PCR により増幅しライブラリーを作成し、次世代シーケンサーによる配列解析を行い、得られた結果を、HiCEP データベース作成パイプライン HiNGeS を用いて、遺伝子発現データベースの構築を行った。HiCEP 法により、グルコース炭素源、培養 24 時間で、他の条件より 5 倍以上上昇し、なおかつ、グリセロール炭素源で、変動しない (= 2 倍以内) ものが、全体の 0.2% に相当する 27 ピークであった。さらに、遺伝子配列データベースと照合し結果、グルコース炭素源、培養 24 時間でのみ強く発現する 8 種の遺伝子を同定した。現在、これらについて、リアルタイム PCR により、発現量を確認中である。

Construction of gene expression database by combination of next generation sequencing and HiCEP method

Misugi Uraji¹, Harunobu Yunokawa², Kun Wan¹, 〇Tadashi Hatanaka¹
 (¹RIBS, Okayama, ²Messenger Scape Co. Ltd.)

Key words *Streptomyces*, HiCEP

1P-242 抗体産生を向上させるための CHO 細胞代謝の数学モデリング

バッチャ モハメド, 杉本 友里恵, 〇倉田 博之
 (九工大)
 kurata@bio.kyutech.ac.jp

CHO 細胞の代謝ネットワークマップに基づいて、流束収支解析やエレメンタリーモード解析を実施し、代謝流束分布の予測モデルを構築して、細胞増殖や抗体合成に影響を与える因子を探索した。代謝流束モデルに代謝酵素の発現データを統合する数学的モデルを構築した。細胞増殖や抗体生産を予測する代謝流束モデル (dFBA モデル) を構築して抗体合成能力を予測し、それを実験データを用いて検証した。dFBA モデルでは、細胞内に取り込む基質の取り込み流束、生成物の分泌流束を動力学方程式で記述して、細胞内の代謝流束は、FBA モデルで記述した。細胞内外の基質と生成物の動力学方程式は、メタボロームデータや文献のデータから推定した。FBA モデルでは、細胞内の重要な代謝物の流束分布から、細胞の増殖速度とタンパク質生成の流束を推定することができる。生成後のタンパク質は、アセンブリ、糖鎖修飾を受け、オルガネラ間輸送を通して、培地に分泌される。それらのタンパク質プロセッシングの情報はまだ十分ではないので、現象論的モデルを作成して、実験データを柔軟に取り込めるモデルを構築する。

Mathematical modeling of CHO cell metabolism for enhanced antibody production

Md Badsha, Yurie Sugimoto, 〇Hiroyuki Kurata
 (Kyushu Inst. Technol.)

Key words metabolic engineering, flux analysis

1P-243 環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索

〇中村 祐哉, 森 宙史, 黒川 顕, 中島 信孝
 (東工大院・生命理工)
 nnakashima@bio.titech.ac.jp

現代の医薬品製造や化成品生産において、酵素タンパク質の利用は欠かせない。新規に有用酵素遺伝子を探査する際、メタゲノムと呼ばれる手法がよく用いられる。これは、環境などから取得してきた微生物群集を培養せずに、その DNA/RNA だけを抽出し、ライブラリ化して利用するものである。ライブラリ化後は、DNA/RNA 配列の相同性を指標にハイブリダイゼーションや、組換えタンパク質を発現させ酵素活性を指標にスクリーニングすることが多い。しかし、それらの方法では多大な時間を要することから、より簡易なスクリーニング方法が求められていた。そこで本研究では、新たなスクリーニング方法として、大量 RNA 配列経時解析法 (TILAMS) を提唱する。

TILAMS ではまず、環境から取得した微生物群集に、着目する基質を添加した物としない物を用意し、両試料から経時的に RNA を抽出する。そして、次世代シーケンサーを用いて得られた RNA を大量に配列解析し、基質添加によって量が増えた RNA 配列を探し出す。そこに、パイオインフォマティクスによる各種解析を与えることによって、擬陽性の RNA 配列を除去し、基質に作用する酵素遺伝子の RNA 候補を探し出す。TILAMS によれば、微生物細胞を使用せずに大量にスクリーニングを行うことができるため、メタゲノムからの有用酵素遺伝子探索のボトルネックを解消することができる。

本研究においては、化成品として利用価値の高いレブリン酸を基質として用い、その代謝を担うレブリン酸分解酵素遺伝子を取得することを目指し、講演では研究の過程と成果について発表する。

Discovery of valuable genes by massive sequencing and time-lapse analysis of environmental RNAs

〇Yuya Nakamura, Hiroshi Mori, Ken Kurokawa, Nobutaka Nakashima
 (Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words RNA-seq, metagenome, levulinic acid, environmental bacteria

1P-244 微小空間内に細胞を再構成する

〇田端 和仁^{1,2,3}, 森泉 芳樹¹, 芦川 裕樹¹, 渡邊 力也^{1,2}, 野地 博行^{1,3}
 (¹東大院・工,²JST・さきがけ,³JST・CREST)
 kazuhito@nojilab.t.u-tokyo.ac.jp

本発表では、細胞を一度破砕し、その破砕液を再度膜で包み込むという方法によって細胞の再構成を目指す。しかし、細胞の破砕液から細胞が再生したという報告はない。生きた細胞と比較して、破砕液からは 2 つの状態が失われていることが分かる。一つ目は、タンパク質濃度の状態である。二つ目は、細胞膜の状態である。この 2 つの状態を保つことができれば、一度細胞を破砕しても再生できるのではないかと考えた。そこで、私は細胞質濃度を維持するために、細胞 (大腸菌) と同程度の体積である、微小反応容器を利用することにした。大腸菌の体積と同程度の容器であるため、最大でも細胞質濃度は半分にしかならず、タンパク質濃度の維持ができる。また、細胞膜の状態を維持するため、この微小容器を脂質膜で覆う方法 (ALBiC: Arrayed Lipid Bilayer chamber) も開発した。大腸菌と ALBiC を融合させると、細胞質の全ては微小容器に導入され、膜タンパク質は全て ALBiC の脂質膜に導入される。実際の実験において、ALBiC と大腸菌プロトプラストの融合が確認され、融合細胞 (Hybrid cell) が作成できることが分かった。また、Hybrid cell のタンパク質合成能を GFP の発現によって調べたところ、GFP の合成が進むことが分かった。また、非常に希な例ではあるが、Hybrid cell の脂質二重膜部分が変形し再生するような現象も観察できている。今後は、Hybrid cell から再生する条件の最適化を行い、微小容器内にゲノムやタンパク質などを加えて、融合前の大腸菌とは異なる状態の大腸菌の作成を目指す。

Reconstitution of a cell in femto liter sized reactor array

〇Kazuhito Tabata^{1,2,3}, Yoshiki Moriizumi¹, Hiroki Ashikawa¹, Rikiya Watanabe^{1,2}, Hiroyuki Noji^{1,3}
 (¹Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, ²PRESTO, JST, ³CREST, JST)

Key words synthetic biology, micro device, *Escherichia coli*, reconstruction