

2P-017 二次構造予測に基づく small RNA の機能改良法の開発

○酒井 雄大^{1,2}, 早出 広司^{1,2}, 池袋 一典^{1,2}
 (¹農工大院・工, ²科学技術振興機構 CREST)
 ikebu@cc.tuat.ac.jp

非翻訳 RNA である small RNA は、標的 mRNA とハイブリダイゼーションして遺伝子発現を制御する。そのため、特定の mRNA との相補鎖を導入することで、その遺伝子の発現を調節できる small RNA を設計することができる。一方で、遺伝子発現をより強く制御できるように small RNA の機能を向上させることも重要である。これまでに当研究グループは、small RNA 構造中の標的 mRNA とハイブリダイゼーションするアンチセンス領域ではない配列領域への変異導入により、small RNA の機能を向上できることを報告している(Sakai *et al.* *ACS Synth. Biol.*, 2014, Sakai *et al.* *MicrobiologyOpen*, 2015)。本研究では、4 種の大腸菌由来 small RNA に対して変異導入を行い、標的遺伝子に対する発現制御能の向上を試みることで、small RNA の機能改良法の確立を目的とした。M-fold (Zuker *Nucleic Acids Res.*, 2003)による二次構造予測に基づき、4 種の大腸菌由来 small RNA の変異体を設計した。small RNA のアンチセンス領域ではない配列領域に対して、二次構造が安定化すると予測される変異を導入した結果、本研究で選択したすべての大腸菌由来 small RNA で、標的遺伝子融合 GFP の発現をより強く促進、もしくは抑制できる配列に改良できることが示された。

Improving small RNA function based on secondary structure prediction

○Yuta Sakai^{1,2}, Koji Sode^{1,2}, Kazunori Ikebukuro^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Japan Science and Technology Agency, CREST)

Key words gene expression, Hfq, Small RNA, Synthetic biology

2P-018 好熱性繊維状ファージ ΦOH3 の遺伝子機能解析

○中村 彩乃¹, 永吉 佑子¹, 藤野 泰寛², 土居 克実¹
 (¹九大院・生資環, ²九大・基幹教育)
 doi@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】ファージは地球上に1億種以上存在すると推測される膨大な未利用遺伝子資源である。これらファージの中には熱水等の高温環境に生息するものも知られるようになったが、その耐熱性については未解明のままである。また、このような好熱性ファージから耐熱性タンパク質を得られれば、新たな遺伝子工学ツールとしての利用が見込める。そこで本研究では、小浜温泉から単離され、当研究室でゲノム情報が解析された好熱性繊維状ファージΦOH3がコードすると推定される9個の遺伝子をクローニングしてそれら遺伝子産物の特性解析を行った。

【方法】ΦOH3 感染 *Thermus thermophilus* HB8 細胞からアルカリ溶菌法により複製型のΦOH3 ゲノムを単離した。これを鋳型として各 ORF に特異的なプライマーを用いた PCR を行った。PCR 増幅断片を pET21a にクローニングした。形質転換体を培養し、発現誘導後、破碎し SDS-PAGE によって発現の有無を確認した。発現が確認されたタンパク質については Ni-NTA カラムによって精製を行い、特性解析を行った。現在、サーマルシフトアッセイによって精製タンパク質の耐熱性を検討している。

【結果と考察】SDS-PAGE の結果から、有意に発現が確認されたのは3種の ORF のみだった。これらのうち ORF2 は ssDNA-binding protein をコードしていると推定され、アガロースゲルを用いたゲルシフトアッセイによって、ssDNA 及び dsDNA に結合することが明らかになった。本タンパク質はファージ生産と感染細胞の増殖とのバランスをとるために必要とされている。

Gene function analysis of thermophilic filamentous phage phiOH3

○Ayano Nakamura¹, Yuko Nagayoshi¹, Yasuhiro Fujino², Katsumi Doi¹
 (¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Arts. Sci., Kyushu Univ.)

Key words Filamentous phage, *Thermus thermophilus*, DNA-binding protein, thermal shift assay

2P-019 各種ガン細胞における好熱性ファージ φOH2 由来 Holin の効果とアポトーシス誘導

○黒木 未知瑠¹, 千羽 啓太¹, 原田 額郎², 片倉 喜範¹, 土居 克実¹
 (¹九大院・生資環, ²九大院・シス生科)
 doi@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】好熱性ファージφOH2由来Holin(Hol)の、ガン遺伝子治療への応用を試みている。Holは宿主細菌の細胞膜で重合後、穿孔して溶菌を誘導する。一方、動物細胞においてBax/Bakはミトコンドリア外膜で重合後、穿孔し、ミトコンドリア外膜透過性(MOMP)を亢進してアポトーシスを誘導する。我々は以上機構間に、膜穿孔による細胞致死という類似点を見出し、ガン細胞内でHolを発現させ、MOMP亢進によるアポトーシスを誘導できるか検討した。【方法】ドキシサイクリン(dox)で発現誘導可能なRetroX-TetOneベクターにφOH2ゲノムより増幅したholと、Holのミトコンドリア局在効果を検討するためにミトコンドリア移行シグナル(MTS)を付加したmts::holをクローニングした。次に、組換えプラスミドを各種ガン細胞(A549, HepG2, Caco-2)にインフェクションした。得られた形質導入細胞におけるholの転写は、qRT-PCRにより確認し、細胞生存率は血球計算盤を用いたセルカウントで求めた。Holの発現とアポトーシス誘導は抗FLAG,Caspase-3,7,PARP抗体を用いたWestern blottingにより検討した。

【結果と考察】形質導入細胞において、dox濃度依存的にhol転写量は増大し、発現も確認された。また、A549においてHol発現後の細胞生存率は65%、MTS::Hol発現後は80%程度減少した。さらに、MTS::Hol発現により、Caspase-3,7,PARPの切断が確認された。以上より、Holは細胞致死をもたらし、特に、ミトコンドリアに局在させることで、Bax/Bak同様にアポトーシスを誘導することが示唆された。

Apoptosis induction of cancer cell by holin from thermophilic phage φOH2

○Michiru Kuroki¹, Keita Chiba¹, Gakuro Harada², Yoshinori Katakura¹, Katsumi Doi¹
 (¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words Holin, apoptosis, cancer therapy, MOMP

2P-020 耐熱性 D1/D2 ヘテロダイマーを組み込んだシアノバクテリア光化学系 II 複合体の特性

川添 優, 住吉 光樹, 地原 稔貴, 原口 典久, 中山 泰宗, 長濱 一弘,
 ○松岡 正佳
 (崇城大・生物生命)
 matsuka@bio.sojyo-u.ac.jp

水の光分解によるプロトンと酸素の生成は、葉緑体やシアノバクテリアの膜にある光化学系 II(PSII)のマングーン・カルシウムクラスター(Mn₄CaO₅)で触媒される。この酸素発生複合体(OEC)は不安定で、PSIIのいくつかの表在性タンパク質で守られている。OECの最小単位を明らかにし、酸素発生機構をin vitroで解析するため、私達はシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942のPSII反応中心に位置するD1/D2ヘテロダイマーを耐熱性の相同タンパク質で置換した組換え株を遺伝育種した。まず内部アンテナCP47タンパク質のC末端にhistagを付加したGRPS810株に、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* 由来のD1-1およびD2タンパク質の遺伝子を組み込んだGRPS971株を作成した。遺伝子組換えはrps12媒介遺伝子置換法で行い、*S. elongatus* PCC 7942のD1タンパク質をコードする3つのpsbA遺伝子、およびD2タンパク質をコードする2つのpsbD遺伝子の中で、最も発現量の大きいpsbAとpsbD1遺伝子のORFを置換した。28および38℃において低光強度下BG11培地で培養したGRPS971株の比増殖速度はGRPS810株の約70%に低下していたが、両者のQO₂にはほとんど差が見られなかった。ウェスタン分析の結果、GRPS971株から精製したPSII複合体には*T. vulcanus*のD1/D2タンパク質が取り込まれていた。耐熱性D1/D2ヘテロダイマーがPSII複合体の中でどのように機能しているか解析を行っている。

Characterization of Cyanobacterial Photosystem II Complex Incorporating Thermostable D1/D2 Heterodimer

Yu Kawazoe, Mitsuki Sumiyoshi, Toshiki Chihara, Norihisa Haraguchi, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, Masayoshi Matsuka
 (Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words cyanobacteria, photosystem II, thermostability, oxygen