

3Ea10 マウス嗅覚受容体の出芽酵母での機能的発現における N 末端および C 末端配列置換の効果

○福谷 洋介¹, 中村 智子¹, 萬 麻衣子¹, 野口 恵一², 石井 純³, 近藤 昭彦⁴, 養玉田 正文¹
(¹農工大・院工・生命工,²農工大・学術研究支援総合センター・機器分析施設,³神戸大・研究環,⁴神戸大院・工・応用化学)
y_fuku@yoy.lab.tuat.ac.jp

嗅覚受容体は、嗅覚神経細胞に発現している 7 回膜貫通タンパク質であり、細胞外の匂い分子と結合することで細胞応答を引き起こしている。生物の嗅覚機能を模倣した匂い検出系の開発は、より生体感覚に近い高感度なセンサーを開発できるなどの利点を有しており工学的応用が期待されている。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主細胞とし、マウス嗅覚受容体 mOR-EG や mOR226、ならびにそれらの N 末端および C 末端領域をラット由来嗅覚受容体 I7 や出芽酵母内在フェロモン受容体 Ste2 の配列で置換した数種のキメラ受容体を構築し、機能的発現と配列置換効果の有無について調べた。機能確認として、内在フェロモン受容体のシグナル伝達経路を利用し、シグナル伝達下流で転写誘導される *FIG1* プロモーターにレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだアッセイシステムを用いた。受容体のタンパク質発現を確認後、各酵母株にリガンドを添加し、培養後のルシフェラーゼ由来の化学発光を検出したところ、リガンド添加による化学発光の増加がみられた。本発表においては、出芽酵母での嗅覚受容体の機能的発現に関して、キメラ手法やアッセイの最適化などを検討し、酵母匂いセンシングシステムの展望について報告する。

The effect of replacement of N- and C- terminus on the functional expression of mouse olfactory receptor in *Saccharomyces cerevisiae*

○Yosuke Fukutani¹, Tomoko Nakamura¹, Maiko Yorozu¹, Keiichi Noguchi², Jun Ishii³, Akihiko Kondo⁴, Masafumi Yohda¹
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Instr. Anal. Center, Tokyo Univ. Agric. Technol.,³Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.,⁴Grad. Sci. Eng., Kobe Univ)

Key words Olfactory receptor, *S. cerevisiae*

3Ea12 脂質蓄積性を高めた出芽酵母によるステアリン酸の生産 - 活性型ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼの導入 -

○木村 和義, 神坂 泰, 植村 浩, 山岡 正和
(産総研・生物プロセス)
kykimura@ni.aist.go.jp

一般的に出芽酵母は菌体内脂質を殆ど蓄積しない。これまでに、我々は、出芽酵母の *SNF2* 破壊株に、貯蔵脂質合成酵素ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) 遺伝子である *DGAT1* を過剰発現させ、ロイシンを高濃度供給することによって、30% 程度の脂質含量を有する出芽酵母を作成した。この株にラットの $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を過剰発現させ、 α -リノレン酸からステアリン酸の生産蓄積が出芽酵母で可能であること、及び、栄養要求アミノ酸であるヒスチジンの高濃度添加によりそのステアリン酸生産性が2倍に増大することも示した。更に DGAT の N 末端から 29 残基のアミノ酸を欠失させると DGAT 活性が顕著に増加することを見出した。今回、上記の *SNF2* 破壊株による高度不飽和脂肪酸生産系に、N 末端 29 残基を欠損させた活性型 *DGAT1* の導入を図った。活性型 *DGAT1* 導入株では、全長型 *DGAT1* 導入株に比べ、生育や脂肪酸蓄積量生育や脂肪酸蓄積量に大きな変化はなかったが、ステアリン酸生産量は僅かに増加した。全長型 *DGAT1* 導入株の場合と同様に、ヒスチジンを初期濃度 0.2g/L (通常の 10 倍) で添加すると、ステアリン酸生産量・変換効率が2倍に増加した。

Stearidonic acid production using genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced oleaginicacy by overexpression of activated diacylglycerol acyltransferase

○Kazuyoshi Kimura, Yasushi Kamisaka, Hiroshi Uemura, Masakazu Yamaoka
(Bioproduction Res. Inst., AIST)

Key words Stearidonic acid, diacylglycerol acyltransferase, *SNF2* disruption, *Saccharomyces cerevisiae*

3Ea11 T細胞活性化シグナルにおける脂質ラフトダイナミクス

○遠藤 智史, 上田 琴美, 山口 健太郎, 白 京玉, 濱田 勉, 高木 昌宏
(北陸先端大学院マテリアルサイエンス)
bioendo@gmail.com

【目的】近年、細胞膜には、飽和脂質やコレステロールを多く含む「脂質ラフト」領域が存在し、そこに多くの膜受容体が集積している事が明らかとなった。本研究では、免疫系 T 細胞を例に、脂質ラフトの膜上での移動や融合などの「2 次元的な動き」、膜内での小胞形成や輸送などの「3 次元的な動き」と、免疫細胞の成熟化シグナルの関係について解明することを目的とした。
【方法】ヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat は、10% FBS を含む RPMI1640 培地で 37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。活性化信号には、レクチンのコンカナバリン (ConA) を用いた。ラフトの標識には、コレラ毒素サブユニット B の Alexa Fluor 488 を、アクチンの標識には Rhodamine phalloidin を、細胞内 Ca²⁺ には Fluo-3AM を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。
【結果】ConA 刺激により、アクチンの集積、さらに脂質ラフトを中心とした小胞の形成が認められた。小胞は、アクチンと共に移動し、細胞内部に集積した。細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は、細胞内部での小胞集積の形成後であった。コレステロールを枯渇させた場合、アクチン集積、小胞形成は認められなかった。以上の結果化から、T 細胞成熟化信号に於いて、細胞内での小胞形成、小胞輸送が重要な役割を担っていると考えられ、新たなモデルを作成した。

Role of cell membrane raft domain dynamics in T-cell maturation signaling.

○Satoshi Endo, Kotomi Ueda, Kentaro Yamaguchi, Keangok Baek, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi
(Sch. Mat. Sci. JAIST)

Key words Lipid raft, concanavalin A, F-Actin, cholesterol

3Ea13 ジスルフィドイソメラーゼの酸化還元電位を持つ DsbA の活性測定

清遠 亜沙子, ○田村 隆, 吉田 隆真, 稲垣 賢二
(岡山大学院・自然科学・バイオ)
tktamura@cc.okayama-u.ac.jp

【目的】大腸菌 DsbA は活性中心に Cys-Pro-His-Cys の配列を持ち、ペリプラズム空間に分泌された蛋白質に分子内ジスルフィド結合を形成する。本酵素の酸化還元電位は Cys 残基間のアミノ酸配列によって支配されている。そこで Cys 残基間のジペプチド配列にランダム変異を導入して DsbA のコンビナトリアル変異ライブラリからジスルフィドイソメラーゼ相当の酸化還元電位をもつ DsbA [CDIC] を同定した。昨年の本大会において DsbA [CDIC] とこれと同程度の酸化還元電位を持つ DsbA [CRIC] の双方の最適発現条件を報告した。本研究では DsbA [CDIC] と同程度の酸化還元電位を持つ DsbA [CDIC] の機能解析を目的として還元反応速度など機能解析を報告する。【方法・結果】*E. coli dsbA* 遺伝子の変異ライブラリ *dsbA* [CXXC] は、活性中心領域の上流と下流に *Xho*I, *Spe*I サイトを導入し、塩基配列-TGC-NNN-NNN-TGC-を含む 47 mer 合成二本鎖 DNA を *Xho*I, *Spe*I 間で置換して作製した。さらに DsbA [CDIC] の発現プラスミドを鋳型として部位特異的変異導入により DsbA [CRIC] を調製した。DsbA [CDIC], DsbA [CRIC] 双方を 2L の培地で大量培養し、ペリプラズム画分を Ni アフィニティカラム精製した後、SDS-PAGE で確認した。得られた精製酵素を使用し、変性 RNase-S-S-G を基質とした *in vitro* リフォールディング速度解析やインスリンを基質とし濁度を測定する還元力活性を通して DsbA [CDIC] と DsbA [CRIC] の活性を比較した。還元力測定の結果、O.D.650 nm の値が 0.1 になるまで要した時間は、DsbA [CDIC] で 39 分、DsbA [CRIC] では 46 分と双方が同程度の還元力を持つ事が分かった。

Random Mutation of DsbA and redox potentials

Asako Kiyoto, ○Takashi Tamura, Takamasa Yoshida, Kenji Inagaki
(Grad. Sch. Nat. Sci. Tech.)

Key words DsbA, random mutation, refolding, disulfide