

**1P-039 オイル高生産微細藻類 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株の glycerol 資化能の向上**

○武藤 正記<sup>1,2</sup>, 田中 祐圭<sup>1</sup>, 吉野 知子<sup>1</sup>, 松本 光史<sup>2,3</sup>, 田中 剛<sup>1,2</sup>  
 (1)東京農工大院・工, 2)JST・CREST, 3)電源開発)  
 tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】微細藻類を利用したバイオディーゼル燃料の生産性向上の取り組みとして、混合培養法が試みられている。混合培養法は、光合成のみに依存した培養法と比較して生産量の向上が見込まれる。また、バイオディーゼル燃料精製時の副産物である glycerol が混合培養に利用可能である。本研究では、オイル高生産微細藻類 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株の glycerol 資化性を評価し、混合培養条件の検討を行った。さらに遺伝子組換えにより glycerol 資化能のさらなる向上によるオイル生産量の増加を目指した。

【方法】*F. solaris* を各 glycerol 濃度下で培養し、バイオマス量の評価を行った。また、*F. solaris* に内在性 *glycerol kinase* (*GK*) 遺伝子の強発現ベクターを導入し、*GK* 遺伝子強発現株の作出を行った。作製した形質転換体を glycerol 添加培地中で培養し、オイル生産性を評価した。

【結果】混合培養条件下における glycerol 濃度を検討した結果、50 mM において最も高いバイオマス量が得られ、オイル生産性は 13% 向上することが示された。さらに *GK* 遺伝子を導入した形質転換体を同条件で培養した結果、オイル生産性は 26% まで向上した。以上の結果から、*GK* 遺伝子を導入したオイル高生産微細藻類の混合培養により、オイル生産性の増加が可能であることが示された。本形質転換体の *GK* 遺伝子の発現量は野生株の 3.4 倍に止まっており、高発現株の作出による更なる glycerol 資化能の向上が期待される。

**Enhancement of glycerol metabolism in oleaginous diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 to improve triacylglycerol productivity**

○Masaki Muto<sup>1,2</sup>, Masayoshi Tanaka<sup>1</sup>, Tomoko Yoshino<sup>1</sup>, Matsumoto Mitsufumi<sup>2,3</sup>, Tsuyoshi Tanaka<sup>1,2</sup>  
 (1)Inst. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., 2)CREST JST, 3)J-POWER)

**Key words** *Fistulifera solaris*, mixotrophic cultivation, biodiesel fuel, metabolic engineering

**1P-041 CRISPR/Cas および TALEN による *Daphnia magna* のゲノム編集技術の開発**

○中西 貴士, 内藤 彰子, 加藤 泰彦, 松浦 友亮, 渡邊 肇  
 (阪大院・工・生命先端・生工)  
 watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】オオミジンコ (*Daphnia magna*) は淡水系に広く生息する生物で、毒性学・環境学などの研究に利用されている。近年ではゲノミクスの発展に伴い、オオミジンコでも RNA 干渉などの遺伝子操作技術が開発されたが、標的遺伝子を破壊する技術は未だ確立されていなかった。そこで本研究では、CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) および TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を用いたゲノム編集技術に着目した。これらの技術では、標的配列を特異的に切断するヌクレアーゼを利用することで、切断部位に挿入・欠失変異を導入できる。本研究では、CRISPR/Cas および TALEN を用いてオオミジンコの内在性遺伝子をノックアウトすることを目的とした。

【方法と結果】複眼の形成に必要な *eyeless* (*ey*) を標的として選択した。*ey* 遺伝子に結合する guide RNA と、Cas9 mRNA を合成し、卵に顕微注射したところ、顕微注射された個体 (G0) の 8.2% が複眼の一部を欠損した仔虫 (deformed eye G1) を産み、それらは両アレルに挿入・欠失変異を有していた。以上の結果は、CRISPR/Cas により *ey* 遺伝子をノックアウトできたことを示している。次に、*ey* 遺伝子を標的とする TALEN mRNA を合成し、卵に顕微注射したところ、G0 の 18% が deformed eye G1 を産み、それらは両アレルに挿入・欠失変異を有していた。以上の結果は、TALEN でも *ey* 遺伝子をノックアウトできたことを示している。本研究により、オオミジンコを含む甲殻類で初めて標的遺伝子破壊技術が確立された。

**Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas and TALEN in *Daphnia magna***

○Takashi Nakanishi, Akiko Naitou, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe  
 (Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *Daphnia magna*, genome engineering, CRISPR/Cas, TALEN

**1P-040 DNA ダメージ誘導型遺伝子発現システムを用いた細胞センサーの開発**

○小野 章彦<sup>1</sup>, 井藤 彰<sup>2</sup>, 鈴木 大雅<sup>2</sup>, 山口 雅紀<sup>2</sup>, 河邊 佳典<sup>2</sup>, 上平 正道<sup>1,2</sup>  
 (1)九大院・シス生科, 2)九大院・工・化工)  
 kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

細胞を用いたセンサーは細胞毒性等のダメージに対して、生理的な応答を示す生きたセンサーとなる可能性を持つ。特に動物細胞を用いる方法では、医薬品開発における一次スクリーニング等への応用が期待できる。本研究では、DNA ダメージを検出可能な遺伝子発現システムの開発及び細胞センサーの構築を目的とした。DNA ダメージに応答して誘導発現する p53 プロモーター領域と人工遺伝子大量発現システムである Tet-system を融合して作製した DNA ダメージ誘導型遺伝子発現システムを細胞に導入することで、DNA ダメージに対して高い応答性を持つ細胞センサーの構築を試みた。レポーター遺伝子に LacZ 遺伝子を用いた本遺伝子発現システムをマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に一過性導入し、DNA ダメージとしてマイトマイシン C (MMC) を添加した。その結果、MMC 添加により LacZ 遺伝子の発現が誘導されたことから、本遺伝子発現システムは DNA ダメージに応答した目的遺伝子の発現誘導が可能であることがわかった。またこの際、Tet-system による遺伝子発現の増幅も確認できた。さらに、MMC 以外の DNA ダメージ試薬に対する応答を調べたところ、本遺伝子発現システムは、DNA 2 本鎖切断に対して特に高い応答を示すことがわかった。次に Luciferase をレポーター遺伝子とした DNA ダメージ誘導型遺伝子発現システムを導入した遺伝子安定発現株 (3T3/Luc 細胞) を用いてダメージ応答性を調べた。その結果、LacZ 遺伝子を用いた一過性遺伝子導入細胞を用いた実験と比較して、誤差の小さい安定的な応答が得られた。

**DNA damage-induced gene expression system for biosensors**

○Akihiko Ono<sup>1</sup>, Akira Ito<sup>2</sup>, Taiga Suzuki<sup>2</sup>, Masaki Yamaguchi<sup>2</sup>, Yoshinori Kawabe<sup>2</sup>, Masamichi Kamihira<sup>1,2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., 2)Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

**Key words** biosensor, DNA damage, p53 promoter

**1P-042 アフリカツメガエル胚を用いた二分脊椎症病態モデルの作成と発症メカニズムの解析**

○狩野 絵史子<sup>1</sup>, 王 碧昭<sup>1</sup>, 伊藤 弓弦<sup>2</sup>  
 (1)筑波大院・生命環境, 2)産総研・幹細胞 RC)  
 s1412059@u.tsukuba.ac.jp

二分脊椎症は発生時疾患の一つであり、近年高齢出産の割合の増加に伴いその発生率も増加している。一方で疫学的に葉酸の摂取が有効であることが分かっていること以外、その詳しい発症メカニズムは不明である。その解明をする上で、胎生の生物を用いた場合、母体の影響が大きく、また初期の発生は観察しにくい。病態モデルとして使いにくいという難点がある。そこで、発生のすべてを体外で行うアフリカツメガエルを用いて、病態モデルの作成および発症メカニズムを解明することを考えた。本研究では、二分脊椎症の胎児のもつ妊婦中の羊水で増加が確認されているホモシステイン (Hcy) に注目し、その現象と病気の関係性を探ることを目的とした。

まず、二分脊椎症モデルの作成にあたり、アフリカツメガエル胚の 2 細胞期と 8 細胞期の細胞内と、胞胚期の胞胚にそれぞれ Hcy を投与し、その毒性を検証した。毒性は胞胚に顕微注射した場合のみ見られた。次に、葉酸代謝物である 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF)、Hcy と共通の受容体を有するグルタミン酸 (Glu) を用い表現型のレスキューを試みた。その結果、Glu のみに表現型の緩和がみられた。このことより作用点が細胞外の受容体があり、下流のシグナル経路が発生期の細胞動態に影響をあたえることが考えられた。また以上の結果より新たな予防法の可能性が示唆された。

**Generation of disease model for Spina Bifida in *X. laevis* embryo and elucidation of the mechanism thereof**

○Eriko Kano<sup>1</sup>, Pichao Wang<sup>1</sup>, Yuzuru Ito<sup>2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2)SCRC, AIST)

**Key words** *Xenopus*, Spina Bifida, homocysteine