

1P-047 大腸菌を宿主とした抗結核薬 D-サイクロセリン高生産システムの開発○熊谷 孝則¹, 小澤 智紀², 青田 達明¹, 的場 康幸¹, 野田 正文¹, 杉山 政則¹⁽¹⁾広大院・医歯薬保健学, ⁽²⁾広大・薬)

tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】私たちは、これまでに、抗結核薬 D-サイクロセリン (D-CS) 生産菌 *Streptomyces lavendulae* ATCC11924 から、D-CS 生合成遺伝子クラスター (*dcsA~dcsJ*: ただし *dcsI* および *dcsJ* は自己耐性遺伝子) をクローニング後、遺伝子破壊および組換えタンパク質を用いた実験により、D-CS 生合成経路を決定している。本研究では、D-CS 生合成遺伝子導入により、大腸菌を宿主とした D-CS 高生産システムの開発を目指した。

【方法および結果】まず、*dcsE*, *dcsD*, *dcsC* および *dcsG* の 4 遺伝子を T7 プロモーターの支配下に置き、かつ、タンデムに連結した D-CS 生産用ベクター pET-21a(+)/*dcsE/dcsD/dcsC/dcsG* を構築した。この組換えベクターの大腸菌 BL21(DE3) 株への導入により、大腸菌での D-CS 生産が認められたが、*S. lavendulae* ATCC11924 の 1/7 程度の生産量しかなかった。そこで、大腸菌における D-CS 生産量を向上させるべく、BL21(DE3) 株の L-セリン代謝関連遺伝子 (*cysK*, *cysM*) に加えて、硫化水素の生成に関わる遺伝子 (*cysJ*) の破壊株作製を行った。当該遺伝子破壊株は Red/ET リコンビネーション法を用いて作製し、その遺伝子破壊の成否は PCR 法により確認した。上記遺伝子を破壊した大腸菌に pET-21a(+)/*dcsE/dcsD/dcsC/dcsG* を導入した結果、*cysJ*, *cysK* および *cysM* のいずれの破壊株においても、BL21(DE3) 株に比べ、D-CS 生産量は明らかに数倍増加した。特に、*cysK* 破壊株の D-CS 生産量は ATCC11924 株とほぼ同じであった。

Development of a system producing highly an anti-tubercular antibiotic D-cycloserine in *E. coli*○Takanori Kumagai¹, Tomoki Ozawa², Tatsuaki Aota¹, Yasuyuki Matoba¹, Masafumi Noda¹, Masanori Sugiyama¹⁽¹⁾Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., ⁽²⁾Faculty of Pharm. Sci., Hiroshima Univ.)**Key words** D-cycloserine, heterologous production, gene disruption**1P-049 リニア DNA テクノロジーを用いた哺乳類培養細胞での迅速な遺伝子解析**○中村 美紀子¹, 鈴木 絢子¹, 矢野 晴也², 星田 尚司², 赤田 倫治²⁽¹⁾山口大・産学公セ, ⁽²⁾山口大院・医系・応用分子生命)

nakamura@crc.yamaguchi-u.ac.jp

組換え遺伝子の作製とその解析には大腸菌で作製するプラスミドが通常用いられているが、PCR 産物での遺伝子操作が可能になると、プラスミド作製の必要がないので、大幅な作業量の軽減と効率的な解析が可能となる。特に哺乳動物細胞への一過性の遺伝子導入発現においては、PCR 産物を扱うことで解析能力が格段に上がると予想される。しかし、これまで遺伝子導入効率や発現量の低さなどの問題がありほとんど利用されていない。そこで、PCR 産物の遺伝子導入効率を上昇させる方法と発現可能な DNA 構築法を開発し、PCR 産物を用いて遺伝子操作をする「リニア DNA テクノロジー」を用意してきた。今回はこの技術のさらなる応用を目指し、哺乳動物細胞での迅速な変異遺伝子の作製と解析を行った。

PCR を利用することで C 末側の変異作製は容易となるので、C 末端にあるペルオキシソーム局在配列 Ser-Lys-Leu (SKL) と G タンパク質の膜局在に必要な CAAX モチーフをそれぞれモデルに用いて、システマティックなアミノ酸置換による変異解析を行った。プライマーに変異を与え PCR で作製した変異遺伝子コンストラクト (80 種類の SKL 変異, 160 種類の CAAX 変異) をそれぞれ HEK293 細胞に導入し、蛍光顕微鏡下で局在に影響を及ぼす変異を調べた。その結果、ペルオキシソーム局在に影響を及ぼすアミノ酸を明らかにすることができた。また CAAX モチーフの膜局在のアミノ酸の組合せは複雑であることが分かり、簡便で迅速に解析ができる遺伝子変異解析法を確立することができた。

Simple and quick genetic analyses by linear DNA technology in mammalian cells○Mikiko Nakamura¹, Ayako Suzuki¹, Seiya Yano², Hisashi Hoshida², Rinji Akada²⁽¹⁾Innovation, Yamaguchi Univ., ⁽²⁾Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)**Key words** linear DNA, PCR mutagenesis, peroxisome, CAAX motif**1P-048 *Brevibacillus* を用いたドコサヘキサエン酸合成遺伝子の発現**○橋本 美佳子¹, 堀内 綾乃², 吉田 磨仁¹, 奥山 英登志¹, 花方 寛³, 水上 誠³, 宮内 明³, 折笠 善丈²⁽¹⁾北大院・地環科・生物圏科学, ⁽²⁾畜産大・食品科学, ⁽³⁾ヒゲタ醤油研)

yosori@obihiro.ac.jp

【背景と目的】海洋細菌 *Moritella marina* MP-1 から単離されたドコサヘキサエン酸 (DHA) 合成遺伝子群は、*pfaA*, *pfaB*, *pfaC*, *pfaD*, *pfaE* の 5 つの合成に必須な遺伝子から構成されており、これらを導入した大腸菌では DHA の生産が確認されている。以前の研究により各遺伝子産物のドメイン構造は推定されているが、それらの生合成における役割は明らかとなっていない。そこで、これらの機能を解明するため個々の遺伝子産物の発現を試みた。

【方法】*M. marina* MP-1 由来の DHA 合成遺伝子 (*pfaA*, *pfaB*, *pfaC*, *pfaD*, *pfaE*) を、*Brevibacillus* In vivo Cloning 法 (BIC) により *Brevibacillus* 発現用ベクター pBIC に組み込んだ。培養液上清および菌体はそれぞれ定法に従って処理し、SDS-PAGE により *pfa* 遺伝子産物を確認した。

【結果】BIC 法により、*pfaA-E* 遺伝子をそれぞれ pBIC に組み込んだ株が得られた。遺伝子の大きさが約 3 kb を超えるものは多段階の組み込みをおこなうことにより、組み込み効率を低下させることなく組み換え体を得た。得られた組み換え株のうち、*pfaE* 遺伝子発現株において約 33 kDa に遺伝子産物を確認できた。*PfaE* の N 末端に分泌シグナル配列を付加し菌体外分泌を試みたが、いずれの株においても *PfaE* の分泌は見られず菌体内に蓄積されることがわかった。

Expression of docosaheaxanoic acid synthesis gene using *Brevibacillus* expression system○Mikako Hashimoto¹, Ayano Horiuchi², Kimihito Yoshida¹, Hidetoshi Okuyama¹, Hiroshi Hanagata³, Makoto Mizukami³, Akira Miyauchi³, Yoshitake Orikasa²⁽¹⁾Div. Biosphere Sci., Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ., ⁽²⁾Dept. Food Sci., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med., ⁽³⁾R & D Dept., Higeta Shoyu)**Key words** Docosaheaxanoic acid, PUFA, *Brevibacillus*, plasmid**1P-050 希少糖生産酵素 *Geodermatophilus obscurus* NBRC13315 株由来 L-リボースイソメラーゼの諸性質の検討および X 線結晶構造解析**○寺見 優司^{1,2}, 上地 敬子¹, 高田 悟郎¹, 吉田 裕美², 神鳥 成弘²⁽¹⁾香川大・希少糖研セ, ⁽²⁾香川大・総合生命研セ)

goro@ag.kagawa-u.ac.jp

希少糖とは自然界にほとんど存在しない単糖と定義されている。近年では、商品化もされてきている。その希少糖生産酵素の一つである L-リボースイソメラーゼ (L-RI) は、L-リボースから L-リブローズへの可逆的異性化反応を触媒する。さらには、同様に L-アロース・L-ブシコース間等を触媒する、広い基質特異性を有する酵素である。本研究では、新たに得られた *Geodermatophilus obscurus* 由来 L-RI の大量発現と、X 線構造解析による三次元構造を明らかにし、希少糖生産に応用することを目的とした。*G. obscurus* 由来推定 L-RI 遺伝子をもとにプラスミドを合成し、大腸菌を形質転換させた。得られた組み換え酵素酵素をアフィニティークラムに供し、精製酵素を得た。精製酵素の諸性質を検討し、基質特異性は、L-リボースに対する活性を 100% としたとき、D-リキソース (66.2%)、D-タロース (97.7%)、L-アロース (8.69%)、L-グルース (3.16%)、D-マンノース (1.61%) に対して活性を示した。また、約 20 mg/ml まで濃縮した精製酵素液を、1.26 M ammonium sulfate, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.2 M lithium sulfate のリザーバー溶液と混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。得られた結晶から 2.26 Å 分解能回折データを得て、既知の L-RI の構造を用いた分子置換法により位相決定を行った。構造の精密化を行い、R 因子 0.285 (Rfree 0.364) を得ている。*G. obscurus* L-RI は結晶中で四量体を形成しており、活性部位には金属イオンが結合していた。

Characterization and Crystal structure of L-ribose isomerase from *Geodermatophilus obscurus* NBRC13315○Yuji Terami^{1,2}, Keiko Uechi¹, Goro Takata¹, Hiromi Yoshida², Shigehiro Kamitori²⁽¹⁾RSRC, Kagawa Univ., ⁽²⁾LSRC, Kagawa Univ.)**Key words** rare sugar, L-ribose isomerase, crystal structure