

講演番号：3A03-06

質疑応答日時、会場：3月16日 10:00～ ミーティングルーム A

シアノバクテリアにおける自律複製領域の探索とそれを利用した高発現ベクターの構築

Exploration of the autonomously replicating region and its utilization for expression vectors in cyanobacteria.

坂巻 裕¹、前田 海成²、荷村-松根 かおり¹、千葉櫻 拓¹、○渡辺 智¹ (¹東京農大バイオ、²東工大化生研)

Yutaka SAKAMAKI¹, Kaisei MAEDA², Kaori NIMURA-MATSUNE¹, Taku CHIBAZAKURA¹,
○Satoru WATANABE¹ (¹Tokyo Univ. Agric., ²Tokyo Inst. Technol.)

CO₂を固定しつつ炭素化合物を合成する藍藻はカーボンニュートラルな次世代の有用物質生産ホストとして期待できる。これまで産業微生物では遺伝子改変により目的に応じた形質を付与することで、人工代謝経路や所望の形質の導入が行われてきた。しかしながら、藍藻では利用可能な遺伝子工学ツールが限られているのが現状である。特に藍藻はベクターとして利用可能なプラスミドについての情報が乏しく、その複製機構についても未だに不明な点が多い。我々は藍藻における自律複製領域を網羅的かつ効率的にスクリーニングする手法として **AR-seq (Autonomous Replication sequencing)**を確立した。染色体に加え7つのプラスミドを有するモデル藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムライブラリーを構築し、異種藍藻である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 内において自律複製領域を探索した結果、S. 6803 のプラスミド pCC5.2 内に高い複製活性を持つ領域を同定した。ローリングサークル型複製に寄与することが示唆されている本領域は、幅広い藍藻種で維持されることが示され、藍藻工学を促進する新たなツールとして期待できる。

Owing to their photosynthetic capabilities, cyanobacteria are regarded as ecologically friendly hosts for production of biomaterials. However, compared to other bacteria, there is little information on autonomously replicating sequences and tools for genetic engineering, especially expression vector systems, are limited. In this study, we established an effective screening method, namely AR-seq (Autonomous Replication sequencing), for identifying autonomously replicating regions in cyanobacteria and utilized this region to construct an expression vector. AR-seq using a genomic library of *Synechocystis* sp. PCC 6803 revealed that a certain region encoding a Rep-related protein (here named Cyanobacterial Rep protein A2: CyRepA2) exhibits high autonomous replication activity in a heterologous host cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. A reporter assay using GFP showed that the expression vector pYS carrying CyRepA2 can be maintained in a wide range of multiple cyanobacterial species, not only S. 6803 and S. 7942, but also *Synechococcus* sp. PCC 7002 and *Anabaena* sp. PCC 7120. In S. 7942, GFP expression in the pYS-based system was tightly regulated by IPTG, achieving 10-fold higher levels than in the chromosome-based system. Furthermore, pYS could be used together with the conventional vector pEX, which was constructed from an endogenous plasmid in S. 7942. The combination of pYS with other vectors is useful for genetic engineering, such as modifying metabolic pathways, and is expected to improve the performance of cyanobacteria as bioproduction chassis.

cyanobacteria, expression vector, DNA replication

発表責任者：渡辺智 (s3watana@nodai.ac.jp)