

- 421** **好塩性細菌 *Halomonas elongata* におけるエクトインオペロンプロモーターの塩応答**
○林奈々絵, 小野比佐好, 室岡義勝 (阪大院・工・応生)

好塩性細菌 *Halomonas elongata* の浸透圧適合溶質エクトインは, 2,4-diaminobutyric acid aminotransferase (*ectB*)、2,4- diaminobutyric acetyltransferase (*ectA*)、ectoine synthase (*ectC*) の 3 種の酵素反応によって、aspartic- β -semialdehyde から生合成され、これら遺伝子群 (*ectABC*) はオペロンを成している。本研究ではエクトインオペロンのプロモーター領域の塩ストレスによる発現調節を調べることを目的とした。このエクトインオペロンの 5' 上流領域の種々の欠失断片と、リポーター遺伝子であるコレステロールオキシダーゼ遺伝子を連絡させ、広宿主域ベクター pBBR1MCS2 に挿入後、接合伝達法を用いて *H. elongata* OUT30018 (Rif^r) に導入し、5' 上流域の塩ストレスに対する発現特性を調べた。塩濃度を 1.5% から 10% にシフトした時の ChoA 活性を調べた結果、プロモーター領域が 2 箇所 (上流側から順に P1、P2) 存在した。P1 は構成的に発現するが、プロモーター活性は微弱であった。P2 は塩ストレス応答型のプロモーターであるが、P2 領域だけでは低塩ストレス下での活性が相対的に高くなった。さらに、P1 を含む 70bp 領域の欠失断片の解析より本領域には発現抑制機構があると考えられた。

Promoter analysis of ectoine operon in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*
○Nanae Hayashi, Hisayo Ono, Yoshikatu Murooka (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Halomonas elongata, エクトイン, 塩ストレス, プロモーター解析

- 423** ***Enterobacter cloacae* のリン酸認識機構の遺伝学的解析**
○楊 黎, 黒田章夫, 池田 宰, 滝口 昇, 大竹久夫, 加藤純一 (広大院・先端物質科学)

【目的】生物の生存に不可欠な元素であるリンは、自然環境中ではしばしば欠乏する。そのためか、微生物はリンを獲得するための手段を永い進化の過程で工夫してきた。*Enterobacter cloacae* はリン酸欠乏状態に曝されるとリン酸に対する正の走化性を誘導し、リン酸の探索・集積応答を示す。このリン酸走化性にはリン酸特異的膜輸送系 (Pst) の存在が必須であることが示されているが、リン酸走化性の誘導機構やリン酸の感知機構は未だ不明である。本研究では、リン酸走化性を支える分子機構の解明することを目的としている。本発表では、リン酸走化性を欠失したトランスポゾン変異株の取得と解析の結果について報告する。
【方法・結果】研究の対象として *E. cloacae* IFO3320 株を用いた。Tn1737KH を用いて作成したトランスポゾン変異株約 20000 株についてリン酸走化性を調べ、4 株のリン酸走化性欠失株を得た。これら変異株はペプトンには正常に走化性を示すことから、リン酸走化性に特異的な変異株であることが示された。Southern 解析を行った結果、4 株のうち 3 株は *pst* オペロンの変異株であった。残り 1 株の変異点を分析したところ、IFO3320 株が保持しているプラスミド pEC01 に Tn1737KH が挿入していた。親株 IFO3320 株の pEC01 キュアリング株はリン酸走化性を示さなかった。また、pEC01 にカナマイシン耐性遺伝子を挿入した一連のプラスミド pEC01.1 ~ 3 を作成してキュアリング株に導入したところ、pEC01.1 と pEC01.2 の導入によりリン酸走化性は復帰した。これらのことから、pEC01 の約 0.7kb の領域はリン酸走化性に必須であることが示された。現在この領域に存在する遺伝子について解析を進めている。

Genetic analysis of phosphate taxis in *Enterobacter cloacae*
○Li Yang, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, Junichi Kato (Grad. Sch. Adv. Sci. Matter, Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis, phosphate, *Enterobacter cloacae*, transposon, plasmid, signal transduction

- 422** **好塩性細菌 *Halomonas elongata* における Na⁺ 排出遺伝子の解析**
○黒田洋子, 小野比佐好, 室岡義勝 (阪大院・工・応生)

中等度好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018 は広範囲の塩濃度 (NaCl 0.3 ~ 24%) 環境で生育可能であるが、高塩濃度下においても細胞内塩濃度は低いと見なされ、この耐塩性獲得には Na⁺ 排出系が重要な役割を担っていると考えられる。そこで当研究室では *H. elongata* の Na⁺ 排出系を明らかにするため、*H. elongata* のゲノムライブラリーより Na⁺ 感受性を相補する遺伝子群のクローニングを行い pBR322 をベクターとするライブラリーから 1 株 (STF21) 取得し、今回この挿入断片の解析を行った。STF21 の挿入断片の全塩基配列を決定した結果、全長 7163bp 中に 6 つの ORF (上流側より ORF1 ~ 6 と命名) を見出し、それらはオペロンを形成していると考えられた。これらは *Pseudomonas aeruginosa* のゲノムプロジェクトにより推定される 6 つの連続した ORF と高い相同性を示し、同様な相同性を見出した他種生物の遺伝子情報より、ORF1 (2814bp)、ORF3 (1509bp) は NADH dehydrogenase を、ORF2 (345bp) は膜貫通タンパク質をコードしていると予想された。ORF4、ORF5、ORF6 は機能不明であるが、ORF5 を除く ORF は疎水性アミノ酸含有率が高く (60 ~ 70%)、STF21 はこれらを含む 6 種類の遺伝子産物の複合体として呼吸鎖と連動したタイプの Na⁺/H⁺ アンチポーターをコードしている可能性が高い。STF21 の細胞膜より調製した反転膜小胞を用いたキナクリン蛍光消光法によりアルカリ性 pH 域 (~ 9.0) での Na⁺/H⁺ アンチポート活性が確認された。

Analysis of Na⁺/H⁺ antiporter in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*
○Yoko Kuroda, Hisayo Ono, Yoshikatu Murooka (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Na⁺/H⁺ アンチポーター, Halomonas elongata, 塩ストレス

- 424** **枯草菌の多糖脱アセチル化酵素ホモログ YbaN の機能解析**
福島達也¹, ○田邊太一¹, 佐藤 勉², 吉川博文³, 関口順一¹ (¹信州大・繊維・応生, ²東京農工大・農・応生, ³東京農大・応生・バイオサイエンス)

【目的】枯草菌は栄養源の枯渇により孢子形成をする。多糖脱アセチル化酵素ホモログである YbaN は孢子形成に影響することが判明している (前年度報告)。今回、さらに詳細な YbaN の機能の解明を試みた。
【方法および結果】*ybaN* 破壊株を用いて孢子形成をさせたところ、形成した孢子は 9:1 の割合で phase-dark の孢子 (不成熟な孢子) と phase-bright の孢子 (成熟孢子) が存在した。これらの孢子を密度勾配遠心にかけたところ、phase-dark の孢子は phase-bright の孢子および野生株の孢子と比べ、比重が小さかった。このことから孢子内の成分に変化が生じていると予測し、孢子中に多量に蓄積するジピコリン酸の量を測定した。その結果、phase-dark の孢子では全くジピコリン酸が蓄積していないことが判明した。次に、この原因を探るためにより詳細な実験を試みた。孢子のコートタンパクについて SDS-PAGE を行った結果、コートタンパクは存在するものの野生株と異なるプロファイルを示した。また、この孢子を走査型プローブ顕微鏡で観察したところ、野生株とは異なり孢子が潰れたような状態であった。これらのことから YbaN は孢子の構造に多大な影響を与えていると言える。YbaN は多糖 (キチン) 脱アセチル化酵素ホモログであるので、実際は孢子コルテックスで機能している可能性が考えられる。現在、孢子の構成成分であるコルテックスの含有量を測定している。また、YbaN の局在、作用する基質について検討している。

Functional analysis of polysaccharide deacetylase homolog, YbaN in *Bacillus subtilis*
Tatsuya Fukushima¹, ○Taichi Tanabe¹, Tsutomu Sato², Hirofumi Yoshikawa³, Junichi Sekiguchi¹ (¹Dept. Appl. Biol., Shinshu Univ., ²Dept. Appl. Biol., Tokyo Univ. Agric. Technol., ³Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Bacillus subtilis*, polysaccharide deacetylase, sporulation, phase-dark spore, dipicolinic acid, spore coat