The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

3C09-3 青枯れ病菌に感染するバクテリオファージの単離及びゲノム解析

○永田 祥子, 川崎 健, 藤元 勇樹, 藤江 誠, 宇佐美昭二, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】青枯れ病菌*Ralstonia solanacearum*は世界中の土壌に分布し、経済的に重要な作物を含む多数の植物に感染して枯死させる土壌伝染性の植物病原細菌である。一度汚染された土壌からこの病原菌を除去することは困難で、これまでにも様々な防除法が考えられてきたが、その発生を安定的に抑えられる根本的な解決法は未だ見つかっていない。そこで今回、宿主特異性の高さから生態系への影響が少ないウイルスを利用することを考えた。さらに、ウイルスは宿主に感染後増幅されるため、少量の散布であっても大きな効果が期待できる。本研究では青枯れ病菌に感染するファージを単離し、ゲノム解析を通して、この病気の解決につなげることを目的としている。
【方法・結果】日本各地からナス科植物を栽培した畑の土壌を採取し、SM bufferに懸濁後フィルター濾過を行った。この濾過液を用いプラークアッセイ法により *R. solanacearum* C319株に感染するファージのスクリーニングを試みた。確認されたプラークの内20プラークよりファージを単離し、6種の*Ralstonia*株（C319、M4S、Ps29、Ps65、Ps72、Ps74株）に対する感染性の有無、ゲノムサイズ及びゲノム構造の比較等から三種類（S-、M-、L-type）に分類した。この三種類はそれぞれ、S-type：約6.4kbの環状ssDNA、M-type：約8.9kbの環状ssDNA、L-type：約250kbpのdsDNAをゲノムとして有していた。またS-及びM-typeのファージはM13ファージ様の感染様式を示した。

Screening and characterization of novel *Ralstonia solanacearum* phages

○Shoko NAGATA, Takeru KAWASAKI, Yuhki FUJIMOTO, Makoto FUJIE, Shoji USAMI, Takashi YAMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Ralstonia*, plant pathogen, phage, host specificity

3C09-4 青枯れ病菌に感染するバクテリオファージの全塩基配列決定、遺伝子解析及び比較

○川崎 健, 永田 祥子, 藤江 誠, 宇佐美昭二, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】青枯れ病菌*Ralstonia solanacearum*は比較的穏和な気候の土壌を中心として世界中に分布し、経済的に重要な作物を含む33科200種以上の植物に感染して被害を与える。一度汚染された土壌からこの病原菌を除去することは困難であり、様々な対策が試みられているがどれも根本的な解決に至っていない。そこで、当研究室では*Ralstonia*に感染するファージに着目しスクリーニングを行っている。宿主域、ゲノムサイズ及びゲノム構造から、現在までに少なくとも3タイプの*Ralstonia*ファージを単離できている。これらファージの遺伝子解析、比較等を通して殺菌酵素等の有用遺伝子のスクリーニング、*Ralstonia*防除ツールとしての利用さらには*Ralstonia*の分子生物学的研究ツールとしての可能性も視野にいれ研究を行っている。
【方法・結果】当研究室で単離した3タイプのファージ（S-type：約6.4kbの環状ssDNA、M-type：約8.9kbの環状ssDNA、L-type：約250kbpのdsDNA）の内、まずはゲノムサイズが小さく比較的解析が容易なS-及びM-typeのファージについてその全塩基配列の決定、比較を試みている。このS-、M-typeのファージは、ゲノムサイズ、ゲノム構造的には類似しているが感染する*R. solanacearum*株に違いがあり*Ralstonia*ファージの宿主選択性を理解するのに有用であると予想される。またこの2タイプのファージはともにM13ファージ様の感染様式をとることから*Ralstonia*研究における遺伝子改変ツールとして利用が期待できる。

DNA sequence analysis and characterization of novel *Ralstonia solanacearum* phages

○Takeru KAWASAKI, Shoko NAGATA, Makoto FUJIE, Shoji USAMI, Takashi YAMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Ralstonia*, plant pathogen, phage, host specificity

3C09-5 光合成細菌の色素合成遺伝子を用いたバイオセンサーシステムの開発

○藤本 浩之[1], 山城 秀仁[1], 若林 雅人[1], 前田 勇[2], 宮坂 均[3], 川瀬 雅也[1], 八木 清仁[1]
([1]阪大院・薬, [2]宇都宮大・農, [3]関西電力・総研)

【目的】バイオセンサーは生化学的応答を利用した検出デバイスである。検出に用いられるレポーターは主にLacZやLux(Luc)またはGFPであり、これらは定量性や迅速性といった利点を備えている。しかし測定機材や反応基質を必要とし、その応用範囲は制限されている。このことから、我々はカロテノイドを合成する光合成細菌に着目し、視覚的な検出が可能で、かつ反応基質が不要な、新規バイオセンサーシステムの開発を試みた。
【方法及び結果】海産性光合成細菌の*Rhodovulum sulfidophilum*は、カロテノイドの一種であるスフェロイデン(SE;黄色)をスフェロイデノン(SO;赤色)へ変化させる。この反応は*crtA*がコードしているSE酸化酵素が担っている。まず、我々は*crtA*を欠損させることで、SEが異常蓄積し黄色を示す色素変異株を得た。次に、ジメチルスルフィド(DMS)の存在で転写誘導を起こす*ddh*オペロンのプロモーター領域*P*ddhと、レポーター遺伝子として発現する*crtA*を組込んだプラスミドを構築した。このプラスミドを色素変異株に導入した組換え株は、DMSの添加によりSOを蓄積し、黄色から赤色への色調変化を示した。以上のように、色素変異株、*crtA*遺伝子、プロモーター領域*P*ddhを組合せて用いることで、DMSを検出することが可能なバイオセンサーの構築に成功した。

A novel biosensor system using carotenoid biosynthesis gene from photosynthetic bacterium

○Hiroyuki FUJIMOTO[1], Hidenori YAMASHIRO[1], Masato WAKABAYASHI[1], Isamu MAEDA[2], Hitoshi MIYASAKA[3], Masaya KAWASE[1], Kiyohito YAGI[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ., [3]KEP Co., Inc.)

Key words biosensor, DMS, *crtA*, photosynthetic bacteria

3C10-1 Tn*5*を導入した*Bradyrhizobium* sp. CE-3のCe^{3+}依存性ラムナン分泌能欠失変異株の遺伝子解析

○西川 昌志[1], 宮本 薫[1], 鈴木 徹[2], 岩間 智徳[1], 河合 啓一[1], 村瀬 博宣[3]
([1]岐阜大・農, [2]岐阜大・生命・セ, [3]シーシーアイ（株）)

当研究室で分離された*Bradyrhizobium* sp. CE-3（以下CE-3株）は、希土類元素の一種であるセリウム(Ce)あるいはマンニトール存在下で菌体外にラムナンを分泌する。本研究では、CE-3株によるCe^{3+}存在下におけるラムナン分泌のメカニズムを遺伝子レベルで解析するために、*Escherichia coli* S17-1/pSUP2021を用い、CE-3株のゲノムDNA中にTn*5*が転移した遺伝子破壊変異株を得た。変異株はTn*5*由来のカナマイシン耐性及びCE-3株が示すポリミキシン耐性をマーカーとして選抜した。得られた変異株を0.030mM Ce含有1/100希釈肉汁寒天平板培地及び1%マンニトール含有同培地に塗布し、30℃で10日間培養し、ラムナン分泌の有無を観察した。Ce添加培地及びマンニトール添加培地において野生株とラムナン分泌能に違いが見られた変異株をライブラリーとした。この内、Ce添加培地においてのみラムナン分泌が欠失した変異株C-1ではTn*5*が挿入した遺伝子のアミノ酸配列は*Rhodobacter shaeroides*のアセチルトランスフェラーゼと41%の相同性が認められた。一方、マンニトール添加培地においてのみラムナン分泌が欠失した変異株M-1では、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110のオキシドレダクターゼと90%の相同性が認められた。このことから、C-1株及びM-1株において、これらの遺伝子発現産物がラムナン分泌に関与していることが示唆された。

Genetic analysis of Tn*5* - induced deficient mutants on Ce^{3+} - dependent rhamnan secretion of *Bradyrhizobium* sp. CE-3

○Masashi NISHIKAWA[1], Kaoru MIYAMOTO[1], Tohru SUZUKI[2], Tomonori IWAMA[1], Keiichi KAWAI[1], Hironobu MURASE[3]
([1]Fac. Agric., Gifu Univ., [2]LSRC., Gifu Univ., [3]CCI Co.)

Key words mutant, rhamnan, cerium, *Bradyrhizobium*

NII-Electronic Library Service