

1116-4 アシドロコンポスト化における微生物叢形成の分子生物学的解析

下山 武文, 吉成 彩香, 〇末松 孝敏, 中山 亨, 西野 徳三
(東北大院・工・生工)

【目的】アシドロコンポスト化 は、弱酸性条件下で、五年以上もの間安定に持続するユニークな生ゴミ処理プロセスである。これまでの分子生物学的解析により、アシドロコンポスト化では乳酸菌を優占種とする微生物叢が安定に形成されていることが明らかとなっている。しかしながら、稼動開始時に乳酸菌を種菌として添加しないプロセスにおいて、稼動開始後、その微生物叢が乳酸菌を主体とするものに遷移していく過程は明らかにされていない。そこで本研究では、PCR-DGGE法により初期のコンポストの微生物叢の推移を追跡した。さらに、アシドロ方式の生ゴミ処理機に、外部から*Bacillus subtilis*を添加し、添加微生物の消長を定量PCRで追跡することにより、本プロセスの微生物学的安全性を考察した。【方法と結果】コンポストを定期的にサンプリングし、微生物 DNA を抽出、精製後、PCR-DGGE法によりコンポスト内の微生物種を決定した。その結果、稼動開始直後において乳酸菌は検出されなかったが、約二週間後に乳酸菌が出現し、その後、乳酸菌の種類も増加した。一方、*B. subtilis*を液体培養し、集菌後、アシドロ方式の生ゴミ処理機に添加した。一定時間毎にコンポストをサンプリングし、DNA抽出物について定量PCRを行い、*B. subtilis*と乳酸菌の細胞数をそれぞれ測定し、優占種である乳酸菌に対する*B. subtilis*の存在比を求めた。その結果、添加時に乳酸菌の細胞数の260 倍存在した*B. subtilis*の細胞数は約3 日後に乳酸菌と同程度となり、一週間後には乳酸菌の10分の1以下まで減少することがわかった。

Microflora analyses of acidulocomposting

Takafumi SHIMOYAMA, Ayaka YOSHINARI,
〇Takatoshi SUEMATSU, Toru NAKAYAMA, Tokuzo NISHINO
(Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words compost

1117-1 *Pseudomonas aruginosa* のトリクロロエチレン関連物質に対する走化性。

〇金 慧恩, 黒田 章夫, 滝口 昇, 加藤 純一
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】*Pseudomonas aruginosa* はトリクロロエチレン(TCE)に対する負の走化性応答に関与する走化性センサー PctA, PctB および PctC を有する。面白いことに、*pctABC* 三重破壊株はTCE に対し正の走化性を示すようになる。本研究は、*Paeruginosa*のTCE に対する正の走化性センサーであるTlpFの解析を行った。【結果】TlpF を高発現した*Paeruginosa* PAO1株と*tlpF* 変異株を用い、TCE 関連物質に対する走化性応答を調べた。その結果、TlpF はTCE の他にテトラクロロエチレン、1,1- ジクロロエチレンおよび 1,2-trans-ジクロロエチレンを感知することがわかった。一方、1,1,1-トリクロロエタンや 1,2-cis- ジクロロエチレンは感知しなかった。*Pseudomonase putida* F1 に*tlpF* を導入し手走化性を計測したところ、同じような応答スペクトルを示した。以上の結果から、TlpF はCl₂C=および trans のClC=CCl 構造を認識していることが示唆された。Cl 基がないエチレンに対する応答をしらべたところ、*Paruginosa* は正の応答を示すことが判明した。しかし、TlpF はエチレンの感知には関与していないことがわかった。現在、*Paeruginosa* PAO1の走化性センサー遺伝子破壊株ライブラリーを用い、エチレン感知に関する走化性センサーの特定を行っている。

Bacterial Chemotaxis for trichloroethylene related product of *Pseudomonas aruginosa*

〇Hye-eun KIM, Akio KURODA, Noburo TAKIGUTI, Junichi KATO
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis, trichloroethylene, bioremediation, *Pseudomonas aeruginosa*

1116-5 *Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2- ニトロ安息香酸に対する走化性

〇石原 俊, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛
(関西大・工・生物工)

目的：多くの運動性細菌は、特定の物質に対して誘引・忌避応答を示す。この応答を走化性といい、中には、芳香族化合物に対して走化性を示す細菌も存在する。我々は、走化性を応用した環境モニタリングや効率的な環境汚染物質の分解法の開発を目指している。本研究では、2-ニトロ安息香酸(2-NBA) 分解菌*P. fluorescens* KU-7株の2-NBAに対する走化性について検討した。
実験方法及び結果：我々は、これまでに、*P. fluorescens* KU-7株の2-NBA分解酵素遺伝子について報告している^{1, 2)}。今回、走化性能を調べたところ、KU-7株は、2-NBAに対して走化性を示すことが明らかになった。そこで、2-NBA分解遺伝子群近傍の配列を調べたところ、2-NBAニトロレダクターゼ遺伝子(*nbaA*) の下流に、走化性レセプターとして知られているmethyl-accepting chemotaxis protein様遺伝子(*nbaY*) が存在した。*nbaY*が2-NBAに対する走化性に関与しているかどうかを検討するため、相同組換え法によって*nbaY*欠損変異株を作成した。この変異株は、2-NBAに対する走化性を示さなかった。このことから、*nbaY*は2-NBAに対する走化性レセプターをコードする遺伝子であることが強く示唆された。現在、*nbaY*の機能について検討している。

1) Muraki, T. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 69:1564-1572 (2003)
2)村木ら、日本農芸化学会2004年度大会

Chemotaxis of *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7 toward 2-nitrobenzoate

〇Shun ISHIIHARA, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA
(Dept. Biotech., Fac. Eng., Kansai Univ.)

Key words *Pseudomonas fluorescens*, 2-nitrobenzoate, chemotaxis

1117-2 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が無機塩培地上で生育する際に誘導されるアルデヒド脱水素酵素の機能解析

〇大畑 奈緒子¹, 吉田 信行¹, 桂樹 徹¹, 谷 吉樹², 高木 博史¹
(¹奈良先端大・バイオ, ²京都学園大・バイオ環境)

【目的】原油から単離された*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は炭素源を含まない無機塩最少寒天培地上で良好に生育するが、CO₂制限下では生育しない。しかしCO₂制限下でも培地に炭酸水素塩を添加すると生育することから、本菌はCO₂を効率的に利用している可能性がある。現在までに無機塩培地上で生育させた時に誘導されるタンパク質を同定し、そのうちの一つ、アルデヒド脱水素酵素(AldA) の遺伝子(*aldA*) をクローニングした。今回は組換えAldAを用いて機能解析を試みた。【方法および結果】これまでにN9T-4株と同様の生育を示す*Streptomyces*属、*Pseudomonas*属の細菌を単離しているが、これらの細菌が無機塩培地上で生育する際にも、AldAと相同性を示すタンパク質の発現が SDS-PAGE で確認できた。また、他の*Rhodococcus* 属について生育を検討したところ、*R. erythropolis* NBRC16296株がN9T-4株と同様の生育を示し、AldAの発現も見られた。*aldA*産物の機能を調べるために、発現ベクター pGEXに*aldA*を導入し、グルタチオン融合タンパク質として発現させた。融合タンパク質は不溶化していたため、リゾチムと 10% N- ラウロイルザルコシンの添加により不溶性画分の可溶化を行い、グルタチオンセファロース4Bにて精製した。その結果、発現した組換えタンパク質はホルムアルデヒドに特異的な活性が検出された。

Analysis of an aldehyde dehydrogenase induced by inorganic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4.

〇Naoko OHHATA¹, Nobuyuki YOSHIDA¹, Tohoru KATSURAGI¹, Yoshiaki TANI², Hiroshi TAKAGI¹
(¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ²Dept. Biosci. Biotech., Kyoto Gakuen Univ.)

Key words *Rhodococcus erythropolis*, inorganic growth, aldehyde dehydrogenase