

2E11-1 *Chromobacterium violaceum* における紫色色素合成遺伝子クラスターの Quorum Sensing による制御

○深町 勝正, 加藤 正史, 諸星 知広, 加藤 紀弘, 池田 宰
(宇都宮大工・応化)

【目的】 *Chromobacterium violaceum* はアシル化ホモセリンラクトン (AHL) をシグナル物質とした quorum sensing (QS) により紫色色素 violacein の生産を制御しているが、QS による violacein 合成遺伝子クラスター (*vioABCDE*) の転写制御に関する報告はほとんどない。本研究では、短アシル鎖 AHL に応答する ATCC 31532 株と、長アシル鎖 AHL に応答する ATCC 12472 株について、AHL による violacein 合成遺伝子クラスターの転写制御機構の解析を行った。

【方法及び結果】 ATCC 12472 株の AHL レセプター遺伝子 (*cvrR*) 発現プラスミドを構築し、*vioA* の上流約 700bp と *lacZ* の転写融合プラスミドとともに大腸菌に形質転換し、*lacZ* の転写活性を調べたところ、AHL の存在下で *lacZ* の転写活性が誘導されたことから、この領域にプロモーターの存在が示唆された。さらに短い領域に絞り込みを行ったが、その内部に既知の QS のプロモーターである *lux box* とのコンセンサス配列を発見することは出来なかった。現在 ATCC 31532 についても同様の方法で解析を行っている。

Regulation of violacein biosynthetic cluster by quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*

○Katsumasa FUKAMACHI, Masashi KATO, Tomohiro MOROHOSHI, Norihiro KATO, Tsukasa IKEDA
(Dept. Appl. Chem., Utsunomiya Univ.)

Key words quorum sensing, *Chromobacterium violaceum*, acyl homoserine lactone, violacein

2E11-2 植物病原菌 *Pantoea ananatis* (*Erwinia ananas*) における Quorum Sensing 機構の解析

○諸星 知広, 中村 祐太, 加藤 紀弘, 池田 宰
(宇都宮大工・応化)

【目的】 植物病原菌 *Pantoea ananatis* (*Erwinia ananas*) はイネやタマネギなどの農作物に感染し、多くの被害を出している。我々は環境中から単離した *P. ananatis* SK-1 株が quorum sensing (QS) のシグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を生産することを明らかにし、AHL 合成遺伝子 (*eanI*) と AHL レセプター遺伝子 (*eanR*) をクローニングすることに成功した。本研究では、*EanI/EanR* を介した QS による遺伝子発現制御機構の解析を行った。

【方法及び結果】 アラビノースの添加により *EanR* の発現が誘導されるプラスミドと、QS のプロモーターである *ean box* 領域と *lacZ* の転写融合プラスミドをそれぞれ作製し、大腸菌に導入して転写活性測定を行った。その結果 *ean box* の転写活性は *EanR* の発現を誘導した場合に抑制され、AHL の添加により再び活性化したことから、*EanR* はネガティブレギュレーターとして機能している事が明らかとなった。現在 *eanI* および *eanR* 破壊株の作製を行い、タマネギの葉に対する病原性の変化を調べている。

Characterization of quorum-sensing system in phytopathogen *Pantoea ananatis* (*Erwinia ananas*)

○Tomohiro MOROHOSHI, Yuta NAKAMURA, Norihiro KATO, Tsukasa IKEDA
(Dept. Appl. Chem., Utsunomiya Univ.)

Key words quorum sensing, *Pantoea ananatis*, acyl homoserine lactone, phytopathogen

2E11-3 *Bifidobacterium longum* 内在性プラスミドからの挿入配列の同定と塩基配列解析

○吹谷 智¹, 杉山 友彦², 加納 康正², 横田 篤¹
(¹北大院・農・応生科, ²京都薬大・遺伝子工)

【目的】

ビフィズ菌は産業上有用な細菌であるが、遺伝子操作系の開発が遅れており、その遺伝子機能については報告が少ない。本研究では、ビフィズ菌におけるランダム変異導入系の構築を目指して、*Bifidobacterium longum* の内在性プラスミドから挿入配列を同定し、その塩基配列を解析した。

【実験方法】

B. longum BK 株計 13 株の内在性プラスミドの鎖長を比較し、鎖長の長い約 6.5 kbp のプラスミド pBK283 を同定した。pBK283 の 4.5 kbp 断片をクローン化し、pSug283Sp を得た。制限酵素地図作成およびショットガンシーケンシングによりその特徴を解析した。

【結果と考察】

pBK283 由来の 4.5 kbp 断片は、既知の *B. longum* 内在性プラスミド pKJ50 と制限地図が類似する一方、pKJ50 相同領域への何らかの DNA 断片の挿入が示唆された。塩基配列を決定したところ、pKJ50 とほぼ完全に塩基配列が一致する領域の内部に、1.6 kbp のトランスポゾン様因子 TLS16 が挿入されている事が明らかになった。

TLS16 中には転位酵素であるトランスポゼースをコードする CDS が存在していた。推定アミノ酸配列の相同性解析の結果、既知のトランスポゼースに共通のドメインが保存されており、TLS16 は IS605 ファミリーに属する挿入配列と予想された。現在、各種ビフィズ菌ゲノムにおける TLS16 の保存性の解析を行っている。

Identification and characterization of a putative insertion sequence in a cryptic plasmid from *Bifidobacterium longum*

○Satoru FUKIYA¹, Tomohiko SUGIYAMA², Yasunobu KANO², Atsushi YOKOTA¹

(¹Divi. Appl. Biosci., Res. Facul. Agric., Hokkaido Univ., ²Dept. Mol. Genet., Kyoto Pharm. Univ.)

Key words *Bifidobacterium*, transposable element

2E11-4 大腸菌の固体並びに液体培養細胞とバイオフィルム形成細胞における遺伝子発現相違解析

菊田 圭介¹, 吉田 可奈子¹, 明前 敬子¹, 古川 壮一¹, 荻原 博和¹, 山崎 真狩²
(¹日大・生物資源, ²日大院・総合科学)

【目的】 バイオフィルム (以下 BF) とは、微生物が固体と液体の界面に形成する高次構造体である。固体表面に生育するという点で BF と固体培養細胞 (コロニー形成細胞) は類似しているが、固体培養細胞は気体と固体界面に形成されることからそれらは別のものであると考えられる。本研究では、大腸菌 K-12 株を用いて、DNA マイクロアレイ解析により固体並びに液体培養細胞と BF 形成細胞における遺伝子発現を網羅的に解析し、比較検討した。

【方法及び結果】 供試菌株として *Escherichia coli* K-12 (MG1655) を使い、培養は全て 30°C、24 時間の条件で行った。各々の培養細胞から RNA 抽出を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。解析の結果、BF 形成細胞では、繊維遺伝子群 (*fim*) などの発現が亢進していた。BF 形成において繊維は細胞の初期付着に重要な働きをしていることが緑膿菌の研究を通して明らかにされており、今回改めて大腸菌においても確認することができた。一方、固体培養細胞では BF 形成細胞に比較して *curli* (細胞外繊維状タンパク質構造物) の形成に関する遺伝子群 (*csg*) などの発現が亢進していた。従来、*curli* は BF 形成に寄与することが確認されていたが、今回新たに固体培養細胞でより強く発現が誘導されていることを明らかにすることができた。

Difference in the gene expression profiles among solid cultured, liquid cultured and biofilm forming *Escherichia coli*

Kikuta Keisuke¹, Kanako Yoshida¹, Keiko Myozen¹,

○Soichi Furukawa¹, Hirokazu Ogihara¹, Makari yamasaki²

(¹College of Bioresource Sciences, Nihon University, ²ARISH, Nihon University)

Key words Biofilm, Microarray, *Escherichia coli*