

- 2P-1021 高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 の三量体型オートトランスポーター アドヘシン遺伝子下流にコードされる外膜リボタンパク質 OmlT の分子解析
 ○久野 雅大¹, 石川 壽人¹, 石川 裕¹, 堀 克敏^{1,2,3}
 (¹名工大院・工, ²名工大・界面微生物工研, ³JST さきがけ)

【背景・目的】トルエン分解グラム陰性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 は非常に高い固体付着能力を有し、外膜タンパク質 AtaA がこの性質に関与していることが明らかになっている。AtaA は三量体型オートトランスポーター アドヘシン (TAA) ファミリーに属する。TAA は他のタンパク質の仲介なしに外膜に輸送されファイバー様構造物を構成することが知られている。本研究では、ataA 下流に近接する外膜タンパク質をコードする遺伝子の分子解析を行った。

【実験方法・結果】この遺伝子は、N末端側が SmpA/OmlA、C末端側が OmpA の C 末端と相同性をもつリボタンパク質をコードしていた。さらに、RT-PCR の結果から ataA と同一オペロン上に存在することが明らかとなり、我々はこの遺伝子を omlT と名付けた。相同組換えを利用して Tol 5 野生株のゲノムから omlT を欠損させた変異株を取得し、ウェスタンプローティング、付着試験を行った。その結果、OmlT 欠損株でも外膜画分に AtaA が検出されたことから、OmlT が AtaA の分泌には関与しないことが明らかとなかった。次に、プレートへの付着細胞を染色により定量したところ、OmlT 欠損株の付着性が野生株に比べ減少していた。

Molecular analysis of the outer membrane lipoprotein OmlT encoded by the 3'-adjacent gene to trimeric autotransporter adhesin of the highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5

○Masahiro KUNO¹, Masahito ISHIKAWA¹, Yu ISHIKAWA¹,
 Katsutoshi HORI^{1,2,3}
 (¹Dept. Mat. Sci. Eng., Nagoya Inst. Tech., ²Res. Centr. Interfacial Microb.,
 Nagoya Inst. Tech., ³PRESTO, JST)
Key words trimeric autotransporter adhesin, lipoprotein, adhesion, OMP

- 2P-1023 植物病原菌 *Pantoea ananatis* における菌体凝集の クオラムセンシングによる制御
 ○緒方 優二, 諸星 知広, 池田 宦
 (宇都宮大院・工・物質環境)

【目的】植物病原菌 *Pantoea ananatis* はイネやタマネギなどの農作物に感染し、多くの被害を引き起こしている。我々は環境中から単離した *P. ananatis* SK-1 株がクオラムセンシング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*) のクローニングに成功するとともに、*eanI* 破壊株はタマネギ葉への壊死症状の誘導が消失することを明らかにした。本研究では、SK-1 株においてクオラムセンシングが菌体凝集に及ぼす影響を調査した。【方法・結果】SK-1 野生株及び *eanI* 破壊株の菌体凝集率を比較したところ、*eanI* 破壊株のみ高い凝集率を示すことが明らかとなり、*eanI* 破壊株に AHL を添加したところ、凝集率は親株と同じレベルにまで低下したことから、菌体凝集が AHL を介したクオラムセンシングにより制御されることが明らかになった。また、凝集率の経時変化を測定したところ、SK-1 野生株も対数増殖前期までは凝集率が増加するが、対数増殖後期で凝集率が減少したことから、クオラムセンシングにより凝集阻害因子の発現が制御される可能性が示唆された。次に、トランスポゾン変異導入により構成的に菌体凝集を示す変異株の作成を行ったところ、AHL 生産能は残存したまま構成的に菌体凝集を示す変異株の取得に成功した。現在、トランスポゾン転移点の解析を行っているところである。

Cell aggregation is regulated by quorum sensing in plant pathogen *Pantoea ananatis*

○Yuji OGATA, Tomohiro MOROHOSHI, Tsukasa IKEDA
 (Dept. Mater. Environ., Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words quorum sensing, *Pantoea ananatis*, aggregation, acylhomoserine lactone

- 2P-1022 *Agrobacterium tumefaciens* クラウンゴール非形成 変異株の原因遺伝子の探索
 ○野川 優洋, 下川 剛広, 渡邊 麻起子, 岡本 唯,
 田中 貴道, 野末 雅之, 小島 峰雄
 (信大・繊維・応生)

Agrobacterium tumefaciens は植物病原菌でクラウンゴール病を引き起こす。我々はトランスポゾン Tn5挿入変異により、クラウンゴールができない非病原性変異株を単離した。本研究では非病原性変異株から変異遺伝子（病原性関連遺伝子）の単離を行った。

実験方法
 非病原性変異株からゲノム DNA を調製し、これを鋳型 DNA とした TAIL-PCR 法または Inverse PCR 法によって Tn5 挿入部位の DNA 断片を単離した。

結果および考察
 TAIL-PCR 法から B273 変異株で *ibvI* 遺伝子（アセト乳酸合成酵素）が変異していることが分かったが、他変異株からはアーティファクトが増幅してきた。一方、Inverse PCR 法では、B-240 変異株で既知の病原性遺伝子 *virA* が、B-244 変異株ではクラウンゴール形成に関与するオーキシン生合成遺伝子 *tmsI* が破壊されていることが分かった。B-236 変異株では 2 つの遺伝子、糖の輸送に関与する ABC トランスポーターと 2 成分制御系のレスポンスレギュレーターが破壊されていた。B-284 変異株は *trpE* 遺伝子（アントラニル酸合成酵素）が Tn5 が挿入されていた。B273 変異株のアセト乳酸合成酵素はバリン・ロイシン・イソロイシンの合成に関与しており、これら遺伝子が破壊された変異株はアミノ酸要求性を示した。アミノ酸要求性を示す変異株は植物内で病原性を持つほど増殖できないために、クラウンゴールが形成されないのでないかと考えられた。

Isolation of new virulence-associated genes from *Agrobacterium tumefaciens*

○Masahiro NOGAWA, Takahiro SHIMOKAWA, Makiko WATANABE, Yui OKAMOTO, Takamichi TANAKA, Masayuki NOZUE, Mineo KOJIMA
 (Dev. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, transposon mutagenesis, PCR

- 2P-1024 パレイショ葉面菌 *Microbacterium testaceum* 由来 アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子のクローニングと機能解析
 ○池野谷 仁¹, 王 文昭¹, 諸星 知広¹, 染谷 信孝², 池田 宦¹
 (¹宇都宮大院・工・物質環境, ²北海道農研セ)

【目的】多くのグラム陰性病原菌は、シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を介した細胞間情報伝達機構 クオラムセンシングにより、その病原性の発現を制御している。本研究では、パレイショ (*Solanum tuberosum*) の葉面に生息する細菌群集から単離した AHL 分解細菌 *Microbacterium testaceum* STLB037 株から AHL 分解遺伝子をクローニングとともに、その AHL 分解機構を解析することを目的とした。【方法・結果】STLB037 株染色体を制限酵素処理により断片化し、pUC118 ベクターに導入することでゲノムライブラリーを作成した。約 3,000 クローンの AHL 分解活性を調べたところ、1 つの明確な AHL 分解活性を示すクローニングを得ることに成功した。シーケンス解析により、本クローニングには 4 つの ORF が存在し、個々の ORF について AHL 分解活性を調べたところ、*aaiM* と命名した ORF のみで AHL 分解活性を示すことが明らかとなった。*AiiM* による AHL 分解機構を調べるために、AHL を精製 *AiiM* により分解し、分解産物の構造を HPLC により解析したところ、*AiiM* は AHL のラクトン環を加水分解することで開環させる AHL ラクトナーゼであることが明らかとなっただ。

Identification and characterization of acylhomoserine lactone-degrading gene from *Microbacterium testaceum* isolated from the leaf surface of potato.

○Masashi IKENOYA¹, Wenzhao WANG¹, Tomohiro MOROHOSHI¹, Nobutaka SOMEYA², Tsukasa IKEDA¹
 (¹Dept. Mol. Environ., Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., ²Natl. Agric. Res. Cent. Hokkaido Reg.)

Key words quorum sensing, *Microbacterium testaceum*, acyl homoserine lactone, lactonase