

3P-1025 青枯病菌に感染する新奇バクテリオファージの探索と解析○小寺 星, 藤原 亜希子, 川崎 健, 藤江 誠, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)

【背景・目的】 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (以下RS) は比較的温暖な地域を中心に世界中に分布し、経済的に重要な農作物等に青枯病（立枯病）を引き起こす土壌伝染性細菌である。現在、化学的な土壌消毒や生物的防除などの様々な対策や研究が行われているが、根本的な解決には未だ至っていない。そこで当研究室ではこれに対し、本菌に感染するバクテリオファージの利用を考え、診断ツール化、予防・防除ツール化、RSの研究ツールの開発を試みている。現在既に少なくとも6種類のファージの単離に成功しているが、実際に青枯病菌対策として実用化するためには、より多様なファージストックの増強が望まれる。そこで本研究では、自然界からさらなる新奇青枯病菌感染ファージの探索・取得と、その詳細な解析を行う事を目的とした。

【実験方法・結果】 青枯病菌M4S株等を宿主としたブラークアッセイ法により、自然界の土壌から新たに3種のファージ (RSK1, RSK2, RSK3) の単離に成功した。それらのゲノム断片について塩基配列およびデータベース解析を行った結果、何れも強い溶菌活性を有するT7型ファージであることが示唆された。中でもRSK1は2種類の溶菌酵素遺伝子を有し、その一つは既報のphage P4282溶菌酵素遺伝子と非常に高い相同性を示した。またRSK1について電子顕微鏡観察を行った所、およそ50nmほどの頭部を持つT7型ファージの形態が観察され、RSK1がT7型ファージである事が裏付けられた。現在は、既存のファージとは違った特徴を有するこのRSK1を中心に詳細なゲノム解析を行っている。

Screening and characterization of novel bacteriophages infecting *Ralstonia solanacearum*○Sei KOTERA, Akiko FUJIWARA, Takeru KAWASAKI,
Makoto FUJIE, Takashi YAMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)**Key words** *Ralstonia solanacearum*, plant pathogen, phage**3P-1027 糖質を単一炭素源としたポリ ((R)-3- ヒドロキシブタン酸-co-3- ヒドロキシプロピオン酸) の微生物合成**○今村 聡美, 鈴木 麻美絵, 折田 和泉, 中村 聡,
福居 俊昭
(東工大院・生命理工・生物プロセス)

[目的] 微生物が貯蔵物質として蓄積するポリヒドロキシアルカン酸は環境低負荷型の生分解性プラスチックとして期待されている。我々はこれまでに人工代謝経路の構築により、糖質を単一炭素源としてポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸) [P(3HB-co-3HP)] 共重合体を合成したが、3HP分率の向上が課題であった。本研究では3HP-CoA供給の向上を目的として、3HPから3HP-CoAを生成する酵素の探索とその利用について検討した。

[方法および結果] 緑色非硫黄細菌 *Chloroflexus aurantiacus* 由来 propionyl-CoA synthase中の3HP-CoA synthetaseドメイン (Acs) の組換え型酵素は3HP-CoAに対して0.065 mMと小さなKm値を示したが、PHA生産菌 *Ralstonia eutropha*での活性発現は確認できなかった。*R. eutropha*由来 propionyl-CoA synthetase (PrpE)の組換え型酵素は 3HPに対するKm値が3.2 mMと大きいものの、*prpE*を導入した*R. eutropha*株の無細胞抽出液で3HP-CoA合成活性を検出した。そこで、マロニル-CoAから3HPを生成するマロニルCoAレダクターゼ McrとPrpEを共発現させた組換え*R. eutropha*株の共重合PHA合成能について検討したところ、3HP分率は1.0 mol%以下と低かったものの蓄積PHA中に3HPを検出した。

Microbial synthesis of poly((R)-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from sugar as a sole carbon source○Satomi IMAMURA, Mamie SUZUKI, Izumi ORITA,
Satoshi NAKAMURA, Toshiaki FUKUI
(Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol.)**Key words** polyhydroxyalkanoate, PHA, 3HP-CoA synthetase, propionyl-CoA synthetase**3P-1026 *Rhodococcus opacus* B4 における有機溶媒耐性機構の解析**鶴田 功輔, 喜多 晃久, ○田島 誉久, 中島田 豊,
加藤 純一
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】 *Rhodococcus opacus* B4は有機溶媒耐性を示すことから疎水性バイオプロセスにおける宿主として利用が期待される。しかし、*Rhodococcus*属を含むグラム陽性細菌における有機溶媒耐性機構の解明は、疎水性バイオプロセスを実現するための重要課題であるものの、ほとんどなされていない。また、有機溶媒耐性機構を解明し利用することは、微生物を利用した疎水性ケミカルの生産性向上のブレイクスルーになると考えられる。そこで本研究では*R. opacus* B4における有機溶媒耐性機構の解明を目的とした。

【方法及び結果】 *R. opacus* B4のゲノム情報を利用して排出ポンプ (efflux pump) 遺伝子群を選択し、*R. opacus* B4のトルエン暴露の有無による転写量を比較した。その結果、6遺伝子 (*eff-7*, *eff-10*, *eff-21*, *eff-22*, *eff-23*, *eff-24*) について暴露時に発現量の増加が確認された。これらを発現するベクターを野生株および有機溶媒耐性の低下したΔ*sigB*株に導入してknock-in株を構築した。それらをトルエンとヘキサンに暴露させ、スポット培養により有機溶媒耐性の評価を行ったところ、*eff-21*発現株ではヘキサンの耐性に、*eff-22*発現株はトルエンとヘキサンの耐性に関与することが示された。

Mechanism of organic solvent tolerance in *Rhodococcus opacus* B4○Kousuke TSURUTA, Akihisa KITA, ○Takahisa TAJIMA, Yutaka
NAKASHIMADA, Junichi KATO
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)**Key words** organic solvent tolerance, efflux pump, *Rhodococcus opacus***3P-1028 PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* における 3- オキソアシル-CoA レダクターゼの解析**○栗田 俊輔, 御船 淳, 折田 和泉, 中村 聡, 福居 俊昭
(東工大院・生命理工・生物プロセス)

[目的] 微生物がエネルギー貯蔵物質として生合成するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は生分解性バイオマスプラスチックとしての利用が期待されている。代表的なPHA生産菌 *Ralstonia eutropha* ではNADPH-アセトアセチル-CoAレダクターゼPhaB1がC₆モノマーである(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA ((R)-3HB-CoA) の供給に関与する。一方、本菌のゲノム解析よりPhaB1のパラログとしてPhaB2、PhaB3が見いだされているが、これらの諸性質やPHA生合成における機能については知見がない。そこで本研究ではこれらPhaBパラログの解析を行った。

[方法および結果] *phaB1*、*phaB2*、*phaB3*を大腸菌内で発現させ、クロマトグラフィーによりそれぞれの組換え型酵素を精製した。これらを用いてC₄基質であるアセトアセチル-CoAを基質とした活性測定を行ったところ、いずれの酵素も数mM程度の低いKm値を示し、10 mM以上の濃度で基質阻害を受けた。PhaB2のV_{max}はPhaB1、PhaB3の約1/10であった。また、いずれの酵素もC₆基質である3-オキソヘキサノイル-CoAに対する活性は低く、C₄特異的であった。植物油からP(3HB-co-3HHx)を生合成可能な*R. eutropha* H16C_{ΔC}株からさらに*phaB1*を破壊したH16C_{ΔC}Δ*B*株はPHA合成能が大きく減少している。本株に各PhaBパラログ遺伝子を仮宿主域ベクターを用いて導入したところ、いずれの組換え株においてもPHAの共重合体組成に大きな変化はなかったものの、PHA合成能が相補されたことから、比活性の低いPhaB2でも高発現により(R)-3HB-CoA供給に機能できることが示された。

Characterization of 3-oxoacyl-CoA reductases from PHA-producing bacterium *Ralstonia eutropha*○Shunsuke KURITA, Jun MIFUNE, Izumi ORITA,
Satoshi NAKAMURA, Toshiaki FUKUI
(Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol.)**Key words** polyhydroxyalkanoate, PHA, acetoacetyl-CoA reductase, enzyme activity