

2P-2005 Rhodococcus jostii RHA1 におけるヒ素耐性遺伝子群の解析

○宮内 啓介¹, 藤田 真由¹, 鈴木 雅¹, 中村 昌博¹,
遠藤 銀朗¹, 福田 雅夫²
(¹東北学院大・工・環境建設,²長岡技大・工・生物系)

ポリ塩化ビフェニル分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA1 のゲノム配列を調べたところ、ヒ素耐性遺伝子群と相同性を示す3つのORFが見いだされた。これらは5価のヒ素を3価に還元する *arsenate reductase* (ArsC)、3価のヒ素を細胞外に排出する *pump* (ArsC)、転写制御因子 (ArsR) とそれぞれ相同性を示したため、それぞれ *arsB*, *arsC*, *arsR* と命名した。本研究では、これらのORFのヒ素耐性への関与を調べることにした。まず、RHA1株の5価および3価のヒ素に対する耐性をLB液体培地を用いて調べた。その結果、10 mMの5価のヒ素、および3 mMの3価のヒ素存在下においては、ヒ素非存在下とほぼ同じ生育を示すのに対し、30 mMの5価のヒ素および10 mMの3価のヒ素存在下においては培養48時間後においても生育を示さなかった。次に、*arsRBC*の破壊株を、相同組換えを用いて作製した。破壊株は5価および3価のヒ素に対する耐性を失っており、耐性は*arsRBC*の相補によって回復した。さらに、ArsRタンパク質の結合領域を調べるため、*arsR*上流領域をレポーター遺伝子 (*luxAB*) の上流に結合したレポータープラスミドをRHA1株に導入し、ヒ素に対する応答を調べた。その結果、開始コドンの100 bp上流まで欠失したレポータープラスミドを導入した際にもヒ素に対する応答が観察された。逆転写PCR、プライマー伸長法の結果、およびArsR結合配列と予想される部位が開始コドンにかかっていることから、ArsRの真の開始コドンは、アノテーションで予想されたものより下流にあることが強く示唆された。

Characterization of arsenic resistance genes in *Rhodococcus jostii* RHA1

○Keisuke MIYAUCHI¹, Mayu FUJITA¹, Masashi SUZUKI¹,
Masahiro NAKAMURA¹, Ginro ENDO¹, Masao FUKUDA²
(¹Dept. Eng. Tohoku-gakuin Univ.,²Dept. Eng. Nagaoka Univ. Tech.)

Key words arsenic, *Rhodococcus*

2P-2007 IncP-7 群プラスミド pCAR1 が宿主のバイオフィーム形成に与える影響の解析

李 昇昱¹, 高橋 裕里香¹, 大浦 啓², 柿原 健佑², 山根 久和¹, 野村 暢彦², 野尻 秀昭¹
(¹東大・生物工学セ,²筑波大院・生命環境)

プラスミドは宿主に難分解性物質分解能や多剤耐性能といった新たな形質を付与するだけでなく、宿主の生育を遅らせるといった影響を与えることもある。これらの解析は主に固体培地や試験管といった実験室環境で行われてきた。しかし細菌は環境中では浮遊状態で存在することは少なく、「バイオフィーム」と呼ばれる立体構造で存在することが近年明らかになってきた。バイオフィーム中でプラスミドが宿主の振る舞いに与える影響を解析することは実環境中でのプラスミドの挙動を知る基盤情報となると期待されるが、報告例は非常に少ない。そこで本研究ではカルバゾール分解プラスミド pCAR1 と3種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440株, *P. aeruginosa* PAO1株, *P. fluorescens* Pf0-1株) を用いて、宿主細菌が pCAR1 を保持することで、形成するバイオフィームの構造に差異が見られるかどうか解析することを目的とした。LB培地及びコハク酸を唯一の炭素源とする培地での静置培養において、pCAR1保持株と非保持株の形成するバイオフィームを共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、PAO1株とPf0-1株では大きな構造の変化は見られなかった一方で、KT2440株では pCAR1 を保持すると菌体が糸状 (filamentous) になる様子が観察された。また、PAO1株ではコハク酸培地において、pCAR1 を保持すると非保持株よりバイオフィームが脱落しやすくなる現象を見出している。

Effects of carbazole degradative plasmid pCAR1 on biofilm formation of three *Pseudomonas* strains.

Seunguk LEE¹, Yurika TAKAHASHI¹, Kei OURA²,
Kensuke KAKIHARA³, Hisakazu YAMANE¹, Nobuhiko NOMURA²,
○Hideaki NOJIRI¹
(¹Biotech. Res. Center, Univ. Tokyo,²Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words biofilm, plasmid, pCAR1, *Pseudomonas*

2P-2006 新規脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチック分解酵素の精製とその諸性質

○江口 智昭¹, 大嶋 恵², 市橋 文恵³, 野村 暢彦⁴,
内山 裕夫⁵, 中島 敏明⁶
(¹筑波大院・生命環境,²筑波大院・生命環境,³筑波大院・生命環境,⁴筑波大院・生命環境,⁵筑波大院・生命環境,⁶筑波大院・生命環境)

現在利用されている脂肪族ポリエステル系生分解性プラスチックは、一般的に物性が低く、他の用途への展開が難しい。その解決法の1つとして、脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックの開発が進んでいるが、一方でその自然環境での分解性や分解様式等に関する知見は非常に少ない。我々はこれまでに脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックを分解する菌のスクリーニングを行った結果、*Roseateles* 属の細菌に強い分解活性を見出した。本菌株(TB-87株)は、脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックエマルジョンを強力に分解することが確認されている。そこで本菌株から分解酵素を精製し、それを解析することにより、脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックの分解様式を解明することを目的とした。*Roseateles* sp. TB-87株を30℃、200rpmで24h培養し、遠心分離で培養液上清を取得し、各種クロマトグラフィーにて酵素を精製した。本酵素の分子量は約27kDaで、各種 *p*-nitrophenyl ester を用いた試験では *p*-nitrophenyl caproate に対する活性が最も高かった。本酵素は各種脂肪族芳香族系生分解性プラスチックのエマルジョンを分解した。

Purification and characterization of enzyme that can biodegrade new aliphatic-aromatic polyester

○Tomooki EGUCHI¹, Megumi OSHIMA², Humie ICHIHASHI³,
Nobuhiko NOMURA¹, Hiroo UCHIYAMA³, Toshiaki NAKAJIMA⁶
(¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba,²Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba,³Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba,⁴Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba,⁵Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba,⁶Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words biodegradable plastic, aliphatic-aromatic copolyester

2P-2008 ヨシの根圏から分離した新規ノニルフェノール分解菌の分解特性と増殖特性

○遠山 忠¹, 村下 学², 田中 靖浩¹, 菊池 慎太郎²,
森 一博¹
(¹山梨大院・医工総合,²室蘭工院・工・応理化)

【目的】ヨシの根圏から分離した *Stenotrophomonas* sp. IT-1、グラム陰性細菌 IT-4 および *Sphingobium* sp. IT-5 は、新規のノニルフェノール分解菌であり、ノニルフェノールを唯一の炭素源として利用して増殖する。ここでは、分離菌株によるノニルフェノール分解の経路、アルキルフェノール類とビスフェノール類に対する分離菌株の分解活性とヨシの根分泌物が分離菌株の増殖と分解活性に及ぼす影響を検討した。

【実験方法と結果】4-*tert*-オクチルフェノール (4-t-OP) を唯一の炭素源として添加した無機塩培地で分離菌株を培養し、4-t-OPの分解代謝物を分析した結果、3菌株は *ipso*-substitution 反応を介して4-t-OPを資化していることが明らかとなった。また、4-t-OPを炭素源として培養した分離菌株の細胞懸濁液を用いたアルキルフェノールとビスフェノールの分解実験を行ったところ、分離菌株は実験に供した炭素数が3から9のアルキルフェノール類と3種類のビスフェノール類 (BPA, BPF, BPS) の全てに対して高い分解活性を示した。さらに、ヨシの根抽出物を添加した無機塩培地で分離菌株の増殖を観察した結果、分離菌株はヨシの根抽出物を炭素源として利用して増殖することが明らかとなり、ヨシ根圏での植物と分解菌の共生関係による化学物質分解の特徴の一部を明らかにすることができた。

Characterization of degradation and growth activities of novel nonylphenol-utilizing bacteria isolated from *Phragmites australis* rhizosphere

○Tadashi TOYAMA¹, Manabu MURASHITA², Yasuhiro TANAKA¹,
Shintarou KIKUCHI², Kazuhiro MORI¹
(¹Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi,²Div. Appl. Sci., Muroran Inst. Tech.)

Key words biodegradation, nonylphenol, bisphenol, plant-bacteria interaction