

2Ep21 真菌に対する抗菌ペプチド Thanatin 誘導体の作用評価

○大島 雄¹, 斉藤 洵己¹, 橋本 茂樹², 松本 謙一郎¹, 田口 精一¹
(¹北大院・工,²東理大・基礎工)
staguchi@eng.hokudai.ac.jp

【目的】抗菌ペプチドは生体内で合成される数十アミノ酸からなるペプチドであり、抗生物質に代わる新たな抗生物質として期待されている。カメムシ由来の抗菌ペプチドである Thanatin(TN)は、幅広い抗菌スペクトルを持ち、原核生物だけでなく一部の糸状菌に対しても抗菌活性を示す。我々はこれまでに、TNの2つのCys残基を、側鎖に炭素数6~12のアルキル基を有する非天然アミノ酸に置換した誘導体が、アルキル基の炭素数に依存して細菌に対する抗菌活性が向上し、抗菌スペクトルが拡大することを見出していた。そこで今回は、真菌に対するTN誘導体の抗菌活性評価を行った。

【方法と結果】炭素数の異なる長さのアルキル基を側鎖に持つ4種類のTN誘導体(C6,C8,C10,C12誘導体)と野生型TNを用いて、4種類の真菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。その結果、野生型TNは *Trichoderma viride* に対してのみ20 µMで抗菌活性を示した一方、C6,C8,C10誘導体は *T. viride* だけでなく *Aspergillus oryzae* に対しても20 µMで抗菌活性を示した。C12誘導体はすべての被検菌に対して40 µM以下の濃度で抗菌活性を示さなかった。またTN誘導体の中でC8のみが *Candida utilis* に対して20 µMで抗菌活性を示し、殺菌的に作用することがわかった。以上の結果からTN誘導体のアルキル側鎖の炭素数が真菌に対する抗菌活性に影響することがわかった。

Antifungal activity of modified Thanatins with alkyl side chains

○Yu Ohshima¹, Junki Saito¹, Shigeki Hashimoto², Ken'ichiro Matsumoto¹, Seiichi Taguchi¹
(¹Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,²Fac. Ind. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

Key words antimicrobial peptide, antibiotics, fungi, Candida

2Fa01 枯草菌の高発現ベクターの構築

○伊澤 恭平, 大箸 信一, 袴田 佳宏
(金沢工大・ゲノム研)
yhakamada@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【背景】洗剤や医薬品、食品など酵素が利用されている製品は身近にあふれており、酵素や機能性タンパク質は重要な役割を持っている。これら酵素やタンパク質を工業的に安価に大量に供給できるようにすることが課題である。そこで、菌体外に酵素を分泌する枯草菌に着目し、枯草菌を宿主とした高発現ベクター系の構築を目的とした。

【方法】レポーター遺伝子として枯草菌由来のβ-1,4-glucanase 遺伝子(*bglC*)を使用した。まず、プロモーター領域を含んだ *bglC* を pHY300PLK にクローニングした。枯草菌ゲノム情報よりSD配列の自由エネルギーや *cre* 配列のコンセンサス配列を考慮して有用プロモーターを4種類選択し、*bglC* のプロモーターと置換した。それぞれの変異体におけるCMCase活性をAZO-CMCを基質として測定した。また、アミノ酸シグナル配列の10番目のトレオレニンにイソロイシンに、11番目のシステインをロイシンに置換し変異体を構築した。xylanase 遺伝子(*xynA*)のプロモーター変異体と *bglC* のシグナル変異体のキメラベクターを構築し、形質転換体のCMCaseを測定した。

【結果・考察】4種類のプロモーター置換体のCMCase活性を測定した結果、*xynA* プロモーターは4.64 units/ml、その他の置換体は3.19~3.76 units/mlであった。またシグナル変異体では、4.04 units/mlとなり、変異を導入していない株の2.73 units/ml と比べ高かった。現在 *xynA* プロモーターとシグナル変異体のキメラ遺伝子を作製中であるが、さらにプロモーター中の *cre* 配列、SD配列、シグナル配列への変異導入により、目的タンパク質の発現・分泌量の向上が期待される。

Construction of high performance vector for *Bacillus subtilis* strain 168

○Kyohei Izawa, Shinichi Ohashi, Yoshihiro Hakamada
(Genome Biotech. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Bacillus subtilis*, vector, mutation, performance

2Ep22 再生促進医療機器被覆のための細胞選択的接着ペプチドの効率的探索

○大脇 潤己¹, 蟹江 慧¹, 加藤 竜司¹, 趙 瑛梓¹, 桑原 史明², 佐竹 真³, 本多 進³, 兼子 博章³, 成田 祐司², 本多 裕之¹
(¹名大院・工・生物機能,²名大院・医・心臓外科学,³帝人株式会社)
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

長期的に生体内移植される医療機器表面の副作用の多くは、人工物の移植によって周囲の細胞秩序と環境が大きく乱れることによって生じる。このような問題に対して、近年の組織工学と再生医療が発展し、生体内の細胞環境を乱すことなく細胞組織再生を促進させることにより移植治療効果の向上につながる事が知られている。医療機器表面において求められる被覆分子は「目的の細胞は接着させ、目的以外の細胞は接着させたくない」という機能を有するものである。これまで幾つかの細胞選択的ペプチドが発見されてきているが、多くは偶然特定の細胞外マトリクスの中から発見されることが多く、その探索法は非効率的であった。本研究では、目的の細胞を選択的に接着させる「細胞選択的ペプチド」の取得を、クラスターリング解析とペプチドアレイ細胞アッセイ法を組み合わせ、効率的に多くのペプチドを取得する確立を目指した。また、ペプチドの性質のルール化から、物理化学的に合成分子で模倣できるペプチド性質の発見を試みた。

Screening of Cell-selective adhesion peptides for the application of regenerative medicine

○Junki Owaki¹, Kei Kanie¹, Ryuji Kato¹, Yingzi Zhao¹, Fumiaki Kuwabara², Makoto Satake³, Susumu Honda³, Hiroaki Kaneko³, Yuji Narita², Hiroyuki Honda¹
(¹Dept. Biotech, Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.,²Dept. Cardiac Surgery, Grad. Sch. Medicine, Nagoya Univ.,³Teijin Limited)

Key words Regenerative medicine, Cell-selective adhesion peptides, Peptide array

2Fa02 合成ガス資化性好熱性細菌 *Moorella thermoacetica* における遺伝子組換え技術の開発

○喜多 晃久^{1,2}, 岩崎 祐樹², 奥戸 慎也², 酒井 伸介⁵, 高岡 一栄⁵, 鈴木 徹³, 村上 克治¹, 矢野 伸一¹, 澤山 茂樹^{1,4}, 田島 馨久², 加藤 純一², 西尾 尚道², 中島 田 豊²
(¹産総研・バイオマス研セ,²広島大院・先端・生命機能,³岐阜大院・連農,⁴京大院・農,⁵三井造船・技術開発セ)
sigmafactor@khf.biglobe.ne.jp

【目的】*Moorella*属細菌は、合成ガス(H₂+CO² or CO)からの物質生産における宿主として有望である。広島大学においても、合成ガスから酢酸およびエタノールを生産する *Moorella* sp. HUC22-1株が分離されている。本菌株の工業的な利用には分子育種が必要である。そこで、ゲノム情報が公開されている *M. thermoacetica* ATCC39073株をモデル株として、遺伝子組換え技術の開発を試みた。【方法・結果】ATCC39073株の *pyrF* を破壊して、5-fluoroorotic acid耐性を示すウラシル要求性株を1株取得し、形質転換の宿主とした(Δ *pyrF*株)。エレクトロポレーションによる形質転換効率は1.5×10²CFU/µg DNAであった。次いで、*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E株由来の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*ldh*)を Δ *pyrF*株の染色体上へ挿入した。得られた *ldh*挿入株はフルクトースを炭素源として培養した場合に、6.8 mMの乳酸を生産した。現在、*ldh*挿入株の *ldh*転写量解析および、乳酸デヒドロゲナーゼ活性測定を行っている。なお、本研究の一部はJST 研究成果最適展開支援事業(A-STEP)の一環として行われた。

Development of Genetic Transformation System in Carboxydophilic Thermophilic Acetogen *Moorella thermoacetica*

○Akihisa Kita^{1,2}, Yuki Iwasaki², Shinya Okuto², Shinsuke Sakai⁵, Kazue Takaoka⁵, Tohru Suzuki³, Katsuji Murakami¹, Shinichi Yano¹, Shigeki Sawayama^{1,4}, Takahisa Tajima², Junichi Katou², Naomichi Nishio², Yutaka Nakashimada²
(¹BTRC, AIST,²Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.,³United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ.,⁴Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.,⁵Mitsui Engineering & Shipbuilding Co. Ltd.)

Key words Thermophilic, Acetogen, *Moorella*, Genetic Transformation