

2Fp05 メタゲノムデータベースを利用した細菌性ペプチドのスクリーニング

○岡村 好子¹, 鈴木 克彦², 鈴木 洋子², 原 清敬³, 竹山 春子⁴
 (1)広島大院・先端・生命機能,²早大・スポーツ科学,³神戸大院・自科,⁴早大・先進理工・生医)
 okamura@hiroshima-u.ac.jp

【目的】アミノ酸が数個つながっただけのジペプチド、トリペプチド他のオリゴペプチドには、予想外にも多くの生理活性効果がある。細菌性ペプチドには、好中球の走化因子であるトリペプチドfMLP(f-Met-Leu-Pro)や、抗腫瘍活性をもつargyran Aなどが知られている。現在、生理活性の強いペプチドや、その生産に関わる酵素の分離に高い関心が集まっている。本研究は、創業実績のあるカイメンから分離した共生細菌のメタゲノム配列を取めたデータベースを利用し、ペプチド生産酵素の *in silico* スクリーニングを行い、ペプチド生産株を探索した。

【方法・結果】

ペプチド合成経路としてアミノ酸リガーゼを標的とし、ATP-binding モチーフをもつ ORF を検索した。488 件ヒットしたなかでリガーゼのホモログ 120 件を選び、以下のアッセイを行った。アミノ酸リガーゼ活性として、アミノ酸添加時の ATP 消費量を測定し、好中球の炎症反応を計測することで、免疫応答促進効果を測定した。

その結果顕著に ATP を消費したクローンは 13 クローンあった。また、33 クローンにおいて、顕著な炎症反応が観察された。上位 5 件でみると 2 件は ATP の消費をとまなわなかった。以上の結果より、*in silico* スクリーニングを介することによって高効率に陽性クローンを取得でき、免疫応答促進ペプチドの分離が期待された。

Screening for bacterial peptides based on the metagenome database of sponge-associated bacteria

○Yoshiko Okamura¹, Katsuhiko Suzuki², Yoko Suzuki², Kiyotaka Hara³, Haruko Takeyama⁴

(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.,²Sch. Sport.Sci., Waseda Univ.,³Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ.,⁴Dept. Life. Bio-Med., Sch. Adv.Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words bacterial peptide, sponge-associated metagenome, metagenomic libraries

2Fp07 カイメン共生細菌メタゲノムからの新規カドミウム濃縮及び耐性遺伝子の特定

○小原 洋太郎¹, 岡村 好子¹, 岩本 浩二², 白岩 善博², 竹山 春子¹
 (1)早大・理工,²筑波大院・生命環境)
 haruko-takeyama@waseda.jp

カイメンには有用遺伝子を持つ細菌が生息しているが、その多くが難培養微生物である。当研究室では、このような有用遺伝子を利用するため、メタゲノム法により共生細菌から遺伝子を収集してきた。本研究では、メタゲノム法により得られたカドミウム濃縮活性を示すメタゲノム断片 MAG23-XhoI からカドミウム濃縮遺伝子を特定し、その機能を評価した。方法としては、メタゲノム MAG23-XhoI 上の各 ORF 及び遺伝子クラスターを保持するクローンを 100 μM Cd(NO₃)₂ を含む LB 培地で培養し、原子吸光分析で菌体内カドミウム濃度を測定した。その結果、hypothetical protein を発現する菌体でカドミウム濃縮が見られた。このタンパク質はシステインを含むペントペプチドリピートを保持しており、リピート内のシステインでカドミウムと結合すると考えられた。しかし、ペントペプチドリピート領域を発現する菌体を用いた場合は、カドミウム濃縮遺伝子より低いカドミウム濃縮活性を示したことから、カドミウム濃縮にはカドミウム濃縮遺伝子の全配列が必要であると示唆された。また、カドミウム濃縮遺伝子を持つ菌体を 600, 1,000 μM Cd(NO₃)₂ を加えた LB 培地で培養したところ、600 μM 以上のカドミウムで成長が阻害されたが、Acetyl-CoA シンターゼと相同性を示す遺伝子を共発現させた場合には生育が回復した。ゆえに、acetyl-CoA シンターゼ様のタンパク質はカドミウム耐性に関与すると考えられた。

Identification of novel cadmium accumulation and resistance from metagenome

○Yotaro KOHARA¹, Yoshiko OKAMURA¹, Koji IWAMOTO², Yoshihiro SHIRAIWA², Haruko TAKEYAMA¹

(¹Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.,²Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Cadmium accumulation and resistance gene, Sponge metagenome

2Fp06 次世代シーケンサーを用いた塩化エテン類分解 デハロコッコイデス培養系の解析

○北嶋 瑞樹¹, 養田 正文¹, 岩本 めぐみ², 宮島 隆³, 臺場 昭人⁴, 矢木 修身⁵, 塚原 正俊⁶, 照屋 盛実^{7,8}, 喜久里 育也^{7,9}, 藤森 一浩^{7,10}, 今田 有美^{6,7}, 鼠尾 まい子^{6,7}, 佐藤 友紀^{7,9}, 矢野 修一^{6,7}, 三輪 友希乃^{6,7}, 町田 雅之^{7,9}, 平野 隆^{7,10}

(¹東農工大・工・生命工,²PaGE Science,³TM ソフトウェア,⁴アクセルリス,⁵日大院・総合研究,⁶トロピカルテクノセンター,⁷沖縄先端ゲノムプロジェクト,⁸沖縄県工業技術センター,⁹沖縄科学技術振興センター,¹⁰産業技術総合研究所)
 mizuki_kitajima@yoy.lab.tuat.ac.jp

揮発性有機塩素化合物で汚染された土壌や地下水を浄化する方法として、微生物を利用したバイオレメディエーションが期待されている。クロロエテン類に関する浄化は *Dehalococcoides* 属細菌を中心とする微生物複合体(コンソーシア)が担っていることから、コンソーシアの微生物群を正確に把握することが、浄化の成否に重要な要素となる。本研究では、シズジクロエテンを電子受容体として添加して、作製したコンソーシアのゲノムを対象に、次世代シーケンサー SOLiD 3 を用いてシーケンス解析を行った。その結果、現在同定されている 3 種類のクロロエテン脱塩素化酵素 *iceA*, *bvcA*, *vcrA* が確認された。それぞれの存在量の違いから、このコンソーシアには数種類の *Dehalococcoides* 属細菌が存在していることが示唆された。さらに、独自に開発した手法でデータベース上の 16S rRNA 遺伝子との比較定量を行い、コンソーシア中に存在する微生物の種類とその存在比を算出した。

Analysis of Chloroethene Degrading Consortium Containing *Dehalococcoides* sp. by the Next Generation Sequencer

○Mizuki Kitajima¹, Masafumi Yohda¹, Megumi Iwamoto², Takashi Miyajima³, Akito Daiba⁴, Osami Yagi⁵, Masatoshi Tsukahara⁶, Morimi Teruya^{7,8}, Ikuya Kikuzato^{7,9}, Kazuhiro Fujimori^{7,10}, Yumi Imada^{6,7}, Maiko Nezu^{6,7}, Yuki Sato^{7,9}, Shuichi Yano^{6,7}, Yukino Miwa^{6,7}, Masayuki Machida^{7,9}, Takashi Hirano^{7,10}

(¹Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²PaGE Science Co.,Ltd.,³TM Software,⁴Accelrys,⁵ARISH, Nihon Univ.,⁶ITC,⁷OGCP,⁸OITC,⁹OSTC,¹⁰AIST)

Key words *Dehalococcoides*, SOLiD

2Fp08 B型肝炎ウイルスが有する細網内皮系回避機構の解析

○高木 来海, 黒田 俊一
 (名大院・生命農)
 skuroda@agr.nagoya-u.ac.jp

生体内に投与されたナノ構造体は、肝臓、脾臓、肺などに存在する細網内皮系 (reticuloendothelial system, RES) と呼ばれる貪食細胞群に速やかに捕捉される。一方、ヒトに感染するウイルスの中には、体内に侵入すると RES を回避しながら標的臓器に吸着し感染成立させるものがある。B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) も血流中に侵入後、RES を回避しヒト肝臓特異的に感染するが、その回避機構は不明である。2003年、我々は DDS (drug delivery system) キャリアとして、HBVの表面構造を模したバイオナノカプセル (bio-nanocapsule, BNC) を開発した。In vivo イメージングによりマウスに静注された BNC は RES を回避したので、BNC は HBV と共通の RES 回避機構、具体的には両粒子表面に存在する重合アルブミン結合領域 (poly-albumin receptor, PAR) が寄与していると考えられた。そこで、BNC の PAR 活性と RES 回避能の関係を検討したところ、BNC は重合アルブミン提示により RES を回避することが示された。以上から、今後開発されるナノ構造体 (DDS キャリア) に PAR ペプチドを表面修飾すれば、血中アルブミンが介在する RES 回避能が付与可能と考えられた。

Analysis of reticuloendothelial system-evasion mechanism possessed by hepatitis B virus

○Kurumi Takagi, Shun'ichi Kuroda
 (Grad. Sch. Biol. Agr. Sci., Nagoya Univ.)

Key words drug delivery system, bio-nanocapsules, reticuloendothelial system, virus