

2La13 MALDI-TOF/MSを用いたイネ種子由来 *Methylobacterium* 属細菌の分類法の確立と応用

○谷 明生¹, 奥村 麻理絵¹, 金原 和秀², 鈴木 信弘¹
(¹岡山大学・植物研,²静岡大・工・物質工)
atani@rib.okayama-u.ac.jp

(目的) 植物地上部の共生細菌群集の中で *Methylobacterium* 属細菌が多くを占めている。本属細菌は植物から放出されるメタノールを栄養源として優占化していると考えられているが、植物種と微生物種との相互作用や関連性は不明である。本研究ではMALDI-TOF/MSを応用した本属細菌の分類体系を確立すると共に、イネ種子から分離した本属細菌の分類へ応用することを目的とする。
(方法と結果) 本属細菌の総タンパク質抽出物をサンプルとしてMALDI-TOF/MSで分析した結果、分析範囲 (m/z 2000-20,000) の間で検出されるピークは、リボソームタンパク質の19個の質量と一致した。各種培養条件で長時間培養しても、マススペクトルの変動はほとんどなかった。本属細菌の基準株で解析し、簡便に種を判別することの出来る系統樹の作成法を構築した。施肥条件の異なるイネ農林18号のもみ殻・玄米から分離した本属細菌を解析した結果、施肥条件によって分離される菌が異なることが分かった。また他国で栽培された品種の異なるイネから分離した菌も同様に解析した結果、日本を含めた3国で共通する本属細菌は検出されなかった。このことから、イネ種子内の本属細菌は植物種・栽培環境に大きく影響を受けていることが示唆された。

Establishment and application of a method for classification of *Methylobacterium* sp. by MALDI-TOF/MS

○Akio Tani¹, Marie Okumura¹, Kazuhide Kimbara², Nobuhiro Suzuki¹
(¹Inst. Plant Sci. Res.,²Dept. Mat. Sci. Chem. Eng., Shizuoka Univ.)

Key words methylo-troph, methanol, MALDI-TOF/MS, Plant-microbe interaction

2La15 日和見感染真菌 *Candida albicans* の細胞壁プロテオーム解析

○上田 知美, 青木 航, 北原 奈緒, 森坂 裕信, 黒田 浩一, 植田 充美
(京大院・農・応用生命)
mieda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】

C. albicans は、ヒトの皮膚や口腔などの上皮組織に常在の日和見感染真菌であるが、エイズやガン、免疫抑制剤の投与、高齢化などにより宿主の免疫力が低下するとその病原性を発揮し、カンジダ症を引き起こすことが知られている。既存の抗真菌剤の効能が十分でなく、また多剤耐性菌の増加といった問題が存在し、治療が困難とされている。特に血流に乗り全身に渡ってその病原性が広がる深在性カンジダ症においては、致死率が40%以上と非常に高い。高齢化社会を迎えるにあたり患者数が増加の一途を辿ると考えられるため、カンジダ症の有効な診断・治療法の開発が強く望まれている。そこで新規治療法確立に向け、二次元高速液体クロマトグラフィーと質量分析を用いた解析法による *C. albicans* の病原性につながると思われる細胞壁タンパク質の網羅的探索を行った。

【方法と結果】

C. albicans は酵母形と菌糸形をとる二形性真菌であるが、菌糸形はその細胞表層で宿主と相互作用し、宿主細胞組織を破壊するため、特に病原性が高い。そこで、菌糸形の細胞表層に重要な病原性因子が数多く存在するのではないかと考えて、菌糸形に特異的に存在する細胞壁タンパク質のプロテオーム解析を行った。その結果について、まとめて報告する。

Proteome analysis of *Candida albicans* cell wall proteins

○Tomomi Ueda, Wataru Aoki, Nao Kitahara, Hironobu Morisaka, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words *C. albicans*, Proteome, Cell wall protein, LC/MS/MS

2La14 大腸菌と Q β RNA ファージとのモデル共進化系における宿主と寄生者の全ゲノム変化解析

○柏木 明子¹, 四方 哲也^{2,3,4}
(¹弘前大・農学生命,²阪大院・情報・バイオ情報,³阪大院・生命機能,⁴ERATO, JST)
kashi_a1@cc.hirosaki-u.ac.jp

宿主と寄生者間での軍拡競争では、一方の変化に抗し他方が変化し、さらにそれに抗し変化するサイクルが繰り返されるため両者の進化速度の上昇が考えられる。ゲノムサイズの小さい寄生者の経時的なゲノム解析の報告例はあるが、両者の全ゲノムの経時変化を解析した例は未だない。そこで、本研究では大腸菌とそれに感染するRNAバクテリオファージQ β (Q β ファージ) を用いたモデル共進化系を構築し (第62回生物工学会年會にて報告)、両者のゲノム変化を解析し、共進化系では宿主と寄生者の変異固定速度が増加すること示した。大腸菌とQ β ファージを混合し、両者を含む培養液を毎日継代する共進化系と大腸菌にQ β ファージを感染後増幅したファージを分離し新たに大腸菌に感染を繰り返すQ β ファージ単独進化系を約165世代継続した。Q β ファージのゲノム解析は、3'-RACE法と5'-RACE法を用いて決定した。大腸菌のゲノム解析は、イルミナ社GA IIxを用いて解析した。GA IIxで検出された変異はジデオキシ法で確定した。大腸菌の変異固定速度は既に報告した大腸菌の長期間培養の結果 (岸本ら, 2010, PLoS Genetics) より約10倍大きく、また、共進化系でのQ β ファージの変異固定速度は、本研究の単独進化系より約3.4倍大きかった。

実験室内で環境を一定に保つことが可能な条件で世代時間の短い大腸菌を用いたモデル共進化系を用いることにより、宿主と寄生者での軍拡競争を伴う共進化系では両者の進化速度が大きくなることを明らかにした。

Ongoing Genomic Changes in Experimental Coevolution of RNA Bacteriophage Q β and *Escherichia coli*

○Kashiwagi Akiko¹, Tetsuya Yomo^{2,3,4}
(¹Facul. Agr. Life Sci., Hirosaki Univ.,²Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.,³Grad. Sch. Frontier Biosci.,⁴ERATO, JST)

Key words *Escherichia coli*, phage, genome, coevolution

2Lp01 超音波処理によるLAL固定化ビーズの単分散化-エンドトキシンの高感度・迅速検出—

○戸田 千尋¹, 青柳 秀紀¹, 森崎 克己²
(¹筑波大院・生命環境,²興和・電機光学事業部)
aoyagi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

【目的】注射薬、輸液など非経口医薬品の製造時にエンドトキシン (ET) 混入がないことの確認は必須であり、社会的にもETの迅速、高感度測定が求められている。我々は、LAL試薬を表面に固定化させたマイクロビーズを開発し、ET濃度に起因したビーズの凝集に伴い生じる速やかな光透過率の上昇を攪拌比濁法 (EX-100, 興和) で計測することにより、従来法に比べてET測定的大幅な迅速・高感度化に成功した¹⁾。しかしながら、ビーズの粒形には分布があり、試薬の最適化にはビーズの単分散化が望まれる。本研究では、超音波を用いてビーズを単分散化させ、ET検出を更に迅速かつ高感度に行うことを目的とした。

【方法と結果】LALを表面に固定化する前のマイクロビーズを様々な条件で超音波処理した。ビーズの分散状態は、顕微鏡観察とレーザー光散乱装置 (EX-300: 興和) を用いて、評価した。超音波照射後、水溶性蛋白質のCoagulogenでビーズ表面を被膜し、さらにLAL試薬を混合してETを作用させ、攪拌比濁法でET検出を行った。その結果、適切な強度、処理時間、周波数で超音波処理した場合、検出時間の短縮と高感度測定が可能となった (ET濃度0.0005EU/mlを35.2分で検出)。また、作成したビーズ試薬を凍結融解しても良好にET測定が可能であり、本試薬の実用性が示唆された。超音波処理はETの混入なしにビーズ粒子を分散できる有効な方法である。現在、超音波処理条件の最適化と分散剤との併用を検討中である。1)H22生物工学会要旨p.174.

Monodispersion of coagulogen-conjugated microbead using ultrasonication ~rapid and highly sensitive endotoxin detection~

○Chihiro TODA¹, Hideki AOYAGI¹, Katsumi YABUSAKI²
(¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba,,²Dev. Elec. Opt., Kowa Co. Ltd.)

Key words ultrasonic, endotoxin, micro bead