

2P-005 Isolation and Characterization of a High Current-producing Novel Bacterial Strain

○ Samson Viulu¹, Kohei Nakamura², Akihiro Kojima²,
Yuki Yoshiyasu², Sakiko Saitou², Kazuhiro Takamizawa^{1,2}
(¹United Grad. Sch. Agri. Sci., Gifu Univ., ²Fac. Appl. Bio. Sci. Gifu Univ.)
knak2007@gifu-u.ac.jp

Geobacter species have been increasingly used in microbial fuel cell (MFC) studies and *Geobacter sulfurreducens* has been reported as the highest current producing microbe in pure cultures. A novel ethanol-utilizing Fe(III)-reducing bacterial strain OSK2A^T identified as a novel subspecies of *Geobacter sulfurreducens* was isolated and characterized from a lotus field in Aichi. Strain OSK2A^T is closely related to strain PCA^T based on the 16S rRNA, nifD, recA, rpoB and gyrB gene sequences. It is capable of growth with ethanol as the most distinguishing substrate compared to its closely related strain. Strain OSK2A^T is Gram negative and motile while strain PCA^T is immotile. Optimum growth occurred at 30-37 °C and neutral pH with tolerance of 1% NaCl. Chemotaxonomic characterizations revealed a dominant presence of several fatty acids such as 16:1 ω7c, 16:0, 14:0, 15:0 iso, 16:1 ω5c, and 18:1 ω7c. MK-8 was the major respiratory quinone as is commonly reported for *Geobacter* spp. Other substrates utilized for growth and coupled to the reduction of Fe(III) were acetate, H₂, pyruvate, lactate and formate. Electron acceptors utilized with either acetate or ethanol as substrates were fumarate, sulfur, Fe(III)-NTA, Fe(III) citrate and Fe(III) hydroxide. MFC results showed that the novel strain is capable of higher current production compared to strain PCA^T. Such discovery will provide insight into features that may lead to improved current production in MFC by enhanced use of microbes in pure cultures for improved MFC studies.

Isolation and Characterization of a High Current-producing Novel Bacterial Strain

○ Samson Viulu¹, Kohei Nakamura², Akihiro Kojima², Yuki Yoshiyasu²,
Sakiko Saitou², Kazuhiro Takamizawa^{1,2}
(¹United Grad. Sch. Agri. Sci., Gifu Univ., ²Fac. Appl. Bio. Sci. Gifu Univ.)

Key words ethanol utilization, Fe(III) reduction, *Geobacter*, MFC

2P-007 植物由来 *Pseudomonas* 属細菌による抗菌物質 2,4-ジアセチルフロログルシノール生産機構の解析

○ 横塚 隆宏¹, 染谷 信孝¹, 池田 幸¹, 諸星 知広¹
(¹宇都宮大院・工, ²農研機構・北農研)
seasonic_sea@hotmail.co.jp

植物由来 *Pseudomonas* 属細菌の中には、抗菌物質 2,4-ジアセチルフロログルシノール (DAPG) を生産するものが存在する。DAPG は植物病原性真菌に対して増殖阻害効果を示すが、ある種の *Pseudomonas* 属細菌は *Fusarium* 属真菌の菌体外代謝物であるフザリニン酸によって DAPG 生産が阻害される。本研究では、フザリニン酸により DAPG 生産阻害を受ける *Pseudomonas* 属細菌の系統解析を行うとともに、フザリニン酸による DAPG 生産阻害機構の解析を行った。様々な植物より単離した DAPG 生産性 *Pseudomonas* 菌株について 16S rRNA 塩基配列を基にした系統解析を行った結果、PHL1 から PHL5 と命名した 5 系統に分類されることが明らかとなった。これらの各系統の代表菌株をフザリニン酸添加培地で培養し、培養上清中の DAPG を酢酸エチルを用いて抽出後、C18 逆相カラムを用いた HPLC により検出したところ、PHL1 に属する *Pseudomonas* 属細菌株において DAPG 生産量が大幅に減少したが、他の系統の *Pseudomonas* 属細菌株では DAPG 生産阻害は確認されなかった。次に、フザリニン酸による DAPG 生産阻害機構を解析するため、フザリニン酸添加培地に様々な物質を添加し、DAPG 生産を回復させる物質の探索を行った。PHL1 に属する *Pseudomonas* sp. StFRB029 株を用いて探索を行った結果、フザリニン酸とともに FeCl₂ を添加すると StFRB029 株の DAPG 生産が回復することが明らかとなった。

Characterization of the production of antimicrobial 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) in Genus *Pseudomonas* isolated from the plant

○ Takahiro Yokotsuka¹, Nobutaka Someya², Tsukasa Ikeda¹, Tomohiro Morohoshi¹
(¹Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., ²Hokkaido Agric. Res. Ctr., NARO)

Key words *Pseudomonas*, 2, 4-diacetylphloroglucinol, fusaric acid, antifungal

2P-006 薬剤耐性 *Escherichia coli* が持つプラスミド及び耐性遺伝子の関連性と多剤耐性プラスミドライブラリーの作製

○ 山本 詩織, 中野 源紀, 田中 みち子, 北川 航, 曾根 輝雄,
浅野 行蔵
(北大院・農・応用菌学)
shi-yama@chem.agr.hokudai.ac.jp

薬剤耐性菌は抗生物質の使用により増加する。抗生物質は医療及び畜産・水産現場で使用され、特に畜産現場での使用量が多い。先行研究では、肉牛糞便 291 検体由来 *E. coli* 3,147 株には耐性菌及び多剤耐性菌が高率で存在することを明らかにし、耐性遺伝子の種類は地区毎に異なった特徴があった。本発表では、プラスミド上の耐性遺伝子を特定し、多剤耐性プラスミドのライブラリー作製を行った。単～11 剤耐性 52 株から、アルカリ溶菌又は S1-PFGE 法によりプラスミドを分離した。不和合性プラスミド及び耐性遺伝子の存在位置を、サザンブロット法により特定した。多剤耐性プラスミドは *E. coli* DH10B に挿入し、保存した。全株は 2～780kbp のプラスミドを 2 種類以上保有し、サイズ、耐性遺伝子及び不和合性プラスミドによって 112 種類に分類された。この内、約 51% が不和合性プラスミドで、11 剤耐性株のみから IncA/C が検出された。約 73% のプラスミド上には耐性遺伝子が存在し、多剤耐性株は複数の耐性遺伝子を乗せているラージプラスミドを保有していた。プラスミド毎に、乗っている耐性遺伝子の種類が異なっていた。耐性表現型が同じでも、遺伝子型は多様であった。従って、何回もの遺伝子の導入や転移等による多剤耐性化が推測された。多様な多剤耐性プラスミドをライブラリー保存することで、遺伝子の伝播性や宿主域の追及に活用することができる。

Genetic relationship between antimicrobial-resistance genes and plasmids in *Escherichia coli*, and construction of multiple-drug resistance plasmids library

○ Shiori Yamamoto, Motoki Nakano, Michiko Tanaka, Wataru Kitagawa,
Teruo Sone, Kozo Asano
(Lab. Appl. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, plasmid, resistance gene

2P-008 酵母におけるミスフォールドタンパク質のオートファジー・リソソーム系分解

○ 樋口 健吾, 加藤 昭夫, 阿座上 弘行
(山口大・農・生物機能)
azakami@yamaguchi-u.ac.jp

哺乳動物において小胞体内でミスフォールドしたタンパク質が分解除去される仕組みとして 2 通りの分解機構、ユビキチン・プロテアソーム (UPS) 系とオートファジー・リソソーム (ALS) 系が知られている。そこで、種々の構造安定性を示す変異リゾチームを酵母で発現させ、不安定型リゾチームが分解される機構について調べた。

Pichia pastoris で種々の変異型リゾチームを発現させ、その分泌に対するオートファジー阻害剤ウォルトマンニンの効果を調べた。その結果、安定型リゾチームの分泌はウォルトマンニンの有無に関わらず変化しなかったが、不安定型リゾチームの分泌はオートファジーの阻害により増加した。このことから、不安定型リゾチームの分解には ALS 系も関与することが示唆された。また、オートファジー阻害による分泌量の増加は、凝集性のアミロイド変異体において顕著であった。

また、種々の変異型リゾチームを発現させた *P. pastoris* において、オートファジー誘導の指標である Atg8 の発現とリゾチームの発現を蛍光免疫顕微鏡観察により調べた。その結果、安定型リゾチームの発現ではオートファジーの誘導は見られなかったが、不安定型リゾチームの発現によりオートファジーの誘導が観察された。その誘導は凝集性のアミロイド変異リゾチームを発現させたときに顕著に見られた。また、オートファジー阻害剤の添加時に不安定型リゾチームの蛍光が強まったことから、酵母でも UPS 経路をバックアップするタンパク質品質管理機構として ALS 経路が機能し得ることが示唆された。

Degradation of misfolded proteins by autophagy/ lysosome pathway in yeast.

○ Kengo Higuchi, Akio Kato, Hiroyuki Azakami
(Dept. Biol. Chem., Fac. Agric., Yamaguchi Univ.)

Key words autophagy, protein quality control, yeast