

- 2P-005 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の外膜ポーリンによるオートインデューサー 2 の不活化機構**
 ○森重 ナツミ¹, Mansur Fariha Jasin¹, 飯田 亮平¹, 野村 由一郎², 阿座上 弘行¹
 (¹山口大・農・生物機能, ²阪大院・歯)
 azakami@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】歯周病関連細菌の一つである *Eikenella corrodens* は、対数増殖期の中から後期にかけてオートインデューサー 2 (AI-2) を産生し、これによりバイオフィルムの形成に影響を及ぼす。しかし、定常期に入ると、AI-2 活性は劇的に減少することから、AI-2 の分解または不活化酵素の存在が示唆された。本研究では、*E. corrodens* の培養上清から AI-2 を不活化する酵素を精製し、その同定を試みたので、報告する。

【結果】*E. corrodens* を定常期まで培養後、培養上清を確安分画することにより、AI-2 不活化活性を有する画分 (30% 画分) を得た。30% 画分をさらに DEAE-Toyopearl や Q-Sepharose によるイオン交換クロマトグラフィーで精製を行った。精製したタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、約 40kDa の単一のバンドが確認された。このタンパク質の N 末端アミノ酸シーケンスを決定したところ、外膜ポーリン (PorA) のものと一致した。そこで、*porA* 遺伝子の欠損株を作成したが、この株の培養上清からは AI-2 不活化活性は見られなかった。これらの結果から、*E. corrodens* においてポーリンが AI-2 を不活化する可能性が示唆された。

以上の結果から、*E. corrodens* はポーリンを介して AI-2 を別の化合物に変換し、二段階のクオラムセンシングを行っている可能性が示唆された。

Inactivation mechanism of autoinducer 2 by outer membrane porin in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*

○Natsumi Morishige¹, Fariha Jasin Mansur¹, Ryohei Iida¹, Yuichiro Noiri², Hiroyuki Azakami¹
 (¹Dept. Biol. Chem., Fac. Agric., Yamaguchi Univ., ²Grad. Sch. Dent., Osaka Univ.)

Key words *Eikenella corrodens*, periodontopathogenic bacteria, quorum sensing, biofilm

2P-007 過栄養湖である霞ヶ浦底泥における各種細菌由来プロテアーゼ遺伝子の多様性

○坪井 隼, 山村 茂樹, 今井 章雄, 岩崎 一弘
 (国環研)
 tsuboi.shun@nies.go.jp

【背景と目的】淡水湖底泥の細菌群集は湖内の物質循環に重要な役割を担っている。霞ヶ浦のような過栄養湖においては、湖内の一次生産が物質負荷の重要な原因の 1 つである。一次生産により生合成されるタンパク質は主要な物質であるが、水環境底泥中のタンパク質分解機能を持つ細菌群集については殆ど明らかになっていない。そこで本研究では、霞ヶ浦底泥における細菌由来プロテアーゼ遺伝子の多様性及び系統学的な特徴を明らかにすることを目的とした。【方法】2007 年の底泥コア (直径 4 cm) サンプルの一部から DNA を抽出し、4 種の細菌由来プロテアーゼ遺伝子 (*apr*, *lap*, *npr*, *sub*) の検出を行った。その後、検出してきた細菌由来プロテアーゼ遺伝子のアンプリコンをクローンライブラリー法によりシーケンスし、それらのアミノ酸配列から系統分析を行った。【発表内容】本研究において、細菌由来プロテアーゼ遺伝子では、中性メタロプロテアーゼ遺伝子 (*npr*) 及びロイシンアミノペプチダーゼ遺伝子 (*lap*) が霞ヶ浦底泥から検出された。今回の発表では、この 2 種類の細菌由来プロテアーゼ遺伝子の多様性及びそれらの系統学的な特徴を主に発表する。

Diversity of bacterial protease genes in sediments of a hypereutrophic lake, Lake Kasumigaura

○Shun Tsuboi, Shigeki Yamamura, Akio Imai, Kazuhiro Iwasaki
 (Natl. Inst. Environ. Stud., NIES)

Key words Lake Kasumigaura, sediments, bacterial protease genes, diversity

2P-006 三価鉄が酪酸菌の代謝に与える影響

○船木 雄太
 (東京工科大院・バイオニクス)
 saiki509@gmail.com

<背景>プロバイオティクスの原料として使用される酪酸菌は大量培養が必要となる。しかし高濃度の大量培養には培地のコストがかかるため安価な培地での高濃度大量培養法の確立が求められている。本研究室では酪酸菌が三価鉄を加えた培地で培養することで増殖が促進されたことを確認した。そこで鉄濃度の変化によって酪酸菌の代謝にどのような影響があるかを調べた。

<方法>三価鉄の影響を調べるために鉄の濃度を 0, 10, 20, 30, 40, 50 mM と段階的に設定した培地で菌を培養し、増殖速度を調べるとともに代謝物を測定した。実験ではクエン酸鉄・n 水和物を三価鉄として使用した。窒素雰囲気下の嫌気状態の 20 ml 容バイアル瓶内で菌を培養した。菌数は光学顕微鏡と血球計算盤を用いた直接計数法で、代謝物は HPLC で測定した。測定対象物は乳酸、酢酸、酪酸である。測定条件は流動相: 過塩素酸、カラム: Shodex KC-811、温度: 40℃、流速 0.5 ml/min とした。

<結果と考察>三価鉄 0 mM の培地で培養させた菌の倍加時間が 1 時間なのに対し、三価鉄 20 mM 以上の培地で培養した菌は倍加時間が約 30 分と増殖速度が 2 倍になっていた。しかし最終菌体密度はどの濃度でも同じであった。各三価鉄濃度で培養させた菌の代謝物を測定した結果、20 mM の三価鉄を含む培地での代謝産物は鉄 0 mM の培地に比べ乳酸、酢酸、酪酸はそれぞれ 1.4 倍、6.8 倍、14.1 倍測定され、代謝物の増加がみられた。また、酪酸は鉄の有無に関わらず対数増殖期後の 8 時間目以降に生産されていることが分かった。しかし鉄の濃度による変化は 20 mM 以上では見られなかった。これらの結果、三価鉄が 20 mM 以上ある培地では代謝物が増加していることから、三価鉄は酪酸菌の発酵を促進していることが考えられる。

Effect of Fe(III) addition on the metabolism of *Clostridium butyricum*

○Yuta Funaki
 (Grad. Sch. Bionics, Tokyo Univ. Technol.)

Key words *Clostridium butyricum*, fermentation

2P-008 インドネシア産新規油脂生産酵母 *Lipomyces* 属及び *Myxozyma* 属

○山崎 敦史¹, Atit Kanti², 川崎 浩子¹
 (¹製品評価技術基盤機構・NBRC, ²インドネシア科学院・LIPI-RCB)
 yamazaki-atsushi@nite.go.jp

【背景と目的】油脂生産酵母 *Lipomyces* 属とその不完全酵母 *Myxozyma* 属は Lipomycetaceae 科に属する子のう菌系酵母である。報告された *Lipomyces* 属のうち *Lipomyces starkeyi* が高脂質生産で知られており、バイオ燃料の生産として期待されている。本研究ではインドネシア カリマンタン島とその周辺小島のマラチュア島の土壌から新規 *Lipomyces* 属及び *Myxozyma* 属を分離したため、その諸性質を報告する。

【方法と結果】土壌試料から無窒素培地 (NDM) を用いた希釈平板法により、33 株の Lipomycetaceae 酵母を得た。26S rRNA D1/D2 領域の塩基配列を用いて系統解析を行うと *Lipomyces* 属のクラスターに 2 株 (6 株)、*Myxozyma* 属のクラスターに 1 株 (2 株) の新種候補となりうる独立したクレードを形成した。

新種候補株のコロニーはムコイド状であり、発酵能、偽菌糸形成及び硝酸還元性能は認められなかった。これは Lipomycetaceae 科に共通する特徴である。*Lipomyces* 属のクラスターに位置した酵母 2 株は、子のう中に 20 個程度の琥珀色の球形胞子を形成したため *Lipomyces* 属の新種であることが示唆された。*Myxozyma* 属のクラスターに位置した酵母 1 株は胞子形成が認められなかったため *Myxozyma* 属の新種であることが示唆された。また、得られた新種候補株の中には *L. starkeyi* NBRC 10381^T と同程度の菌体乾燥重量の約 50% の脂質を生産するものがあつた。

本研究は (独) 科学技術振興機構 (JST) と (独) 国際協力機構 (JICA) が共同で実施している地球規模課題対応国際科学技術協力プログラムの助成により実施した。

Novel oleaginous yeasts of genera *Lipomyces* and *Myxozyma* isolated in Indonesia

○Atsushi Yamazaki¹, Atit Kanti², Hiroko Kawasaki¹
 (¹National Institute of Technology and Evaluation, NBRC, ²Indonesian Institute of Science, LIPI-RCB)

Key words *Lipomyces*, *Myxozyma*, taxonomy, lipid production