

2P-013 青枯病菌とファージのダイナミックな相互作用の解析

○園元 貴也¹, 川崎 健¹, 藤江 誠¹, 緒方 博之², 山田 隆¹
 (¹広島大院・先端物質,²京大・化研)
 tayamad@hiroshima-u.ac.jp

[背景・目的] 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は世界各地に分布する土壌伝染性の植物病原細菌であり、ナスやトマトなど経済的に重要な農作物を含む50科200種以上の植物に青枯病を引き起こし大きな被害をもたらしている。当研究室では次世代青枯病菌対策としてバクテリオファージに着目し多量のファージを分離・解析を行ってきた。本研究では、2013年2月にチェンマイのトマト農場の土壌サンプルから分離した14種のファージについてそれぞれ基礎情報を得るとともに特徴付けを行い、そして日本とタイの青枯病菌について、青枯病菌とファージの相互作用について解析を行った。さらに2014年2月にも同様の場所でサンプリングを行い、その結果について比較・検討を行っている。

[方法・結果] 新たに単離したファージ14種について青枯病菌59株を用いて、それぞれ宿主範囲、感染特性を調べた。また一部ゲノムDNAシークエンス解析を行い簡単な特徴付けを行った。その中の一つに *Pseudomonas phageDKZ* に類似したジャンボファージについて RSL2 と命名し、電子顕微鏡観察による形態観察、全ゲノムシークエンス解析による全塩基配列決定を行った。当研究室で分離した RSL1 との比較を行ったところ特徴的な tail 構造、未知遺伝子が存在することが示された。現在 RSL2 について MS によるプロテオーム解析や構造、遺伝子発現解析などを行っている。また2度目(2014年2月)のサンプリングにより分離されたファージについて、昨年同様に解析を行っており、これまでに複数種の新たなジャンボファージを見つけている。

Analysis of dynamic interaction between phages and *Ralstonia solanacearum*

○Takaya Sonomoto¹, Takeru Kawasaki¹, Makoto Fuzie¹, Hiroyuki Ogata², Takasi Yamada¹
 (¹Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

Key words *Ralstonia solanacearum*, bacterio phage, Jumbo phage

2P-015 大腸菌 L-アラニン排出輸送体 AlaE の膜貫通領域内荷電アミノ酸変異の生育に及ぼす影響

○金世怜, 堀初弘, 安藤太助, 磯貝恵美子, 米山裕
 (東北大院・農)
 yoneyama@bios.tohoku.ac.jp

[目的] 大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE は149個のアミノ酸残基で構成されており、4つの膜貫通領域を有するものと推定される。膜タンパク質の膜貫通領域に存在する荷電アミノ酸は機能上重要な役割を果たすことがよく知られている。そこで我々は AlaE の膜貫通領域に存在する3つの荷電アミノ酸 (Glu30, Arg45, Asp84) に着目し、これらのアミノ酸残基の意義を探索するために各残基を他のアミノ酸に置換した変異型 AlaE の表現型に及ぼす影響を検討した。

[方法] Glu30, Arg45, Asp84 各残基をシステインおよび荷電を保持した他のアミノ酸に置換した変異型 *alaE* 遺伝子を作製し、それらを Ala-Ala に高感受性を示す *alaE* 欠損変異株に導入した形質転換体の Ala-Ala に対する感受性および生育への影響を評価した。

[結果と考察] Asp84 では荷電を保持した変異型 AlaE (D84E) は野生型と同等の MIC を示したが D84C の MIC は低下していた。一方、Glu30 では E30C が高い MIC を示したのに対し、荷電を保持した E30D の MIC は低下していた。興味あることに、陽電荷をもつ Arg45 の場合、いずれの変異型 AlaE も著しく低い MIC 値を示した (R45C, 10 µg/ml; R45K, <1.25 µg/ml)。次に、活性低下が著しい R45C と R45K の生育に及ぼす影響を調べた結果、R45K は最少培地での生育が抑制されており、この生育抑制が低い MIC の原因と考えられた。一方、L培地では逆に R45C の生育が抑制されたことから、Arg45 の置換体は培地に含まれる L-アラニンの影響を受けるものと考えられた。

Effects of a mutation of charged amino acid residues in the transmembrane regions of L-alanine exporter AlaE on growth of *Escherichia coli*

○Kim Seryoung, Hori Hatsuhiro, Ando Tasuke, Isogai Emiko, Yoneyama Hiroshi
 (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Escherichia coli*, L-alanine, exporter

2P-014 大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE は基質交換反応を触媒する

金世怜, 伊原航平, 堀初弘, 安藤太助, 磯貝恵美子,
 ○米山裕
 (東北大院・農・生物産業創成)
 yoneyama@bios.tohoku.ac.jp

細胞膜を介する物質の取り込みと排出は細胞内の恒常性を保つ上で必須の機能である。これまで解析のし易さ等の理由から多くの取り込み輸送体が同定され詳細な研究がなされてきた。しかしながら、研究の難しさから一次代謝産物の排出輸送体の研究は遅れていた。我々は最近、大腸菌の L-アラニン (L-Ala) 排出輸送体 AlaE の同定に初めて成功した。AlaE の詳細な機能を解析するためには *in vitro* での AlaE 輸送活性の測定が必要である。これまで AlaE 欠損変異株 ($\Delta alaE$) および *alaE* 過剰発現株 ($\Delta alaE/pAlaE$) より反転膜小胞を調整し、小胞内への [³H]L-Ala の蓄積を解析した結果、AlaE はエネルギー依存的な能動輸送活性を有することを明らかとした。興味あることに L-Ala をローディングした $\Delta alaE/pAlaE$ 由来の反転膜小胞内外の基質濃度が同じ平衡条件下で [³H]L-Ala の蓄積量を測定すると、エネルギーの存在しない条件下でも一過性の [³H]L-Ala の小胞内への蓄積が認められたことから、AlaE はエネルギーの関与しない L-Ala 交換反応を触媒することが示唆された。次いで、AlaE がもつ3つのシステイン残基をアラニンに置換した活性を保持する cycteine-less AlaE を高発現した株から反転膜小胞を調整し同様の実験を行った結果、エネルギーの存在しない条件下でこの一過性の [³H]L-Ala の蓄積は野生型 AlaE の約2倍に上昇していた。これらのことから、systeine-less AlaE は一連の排出過程の中でエネルギーを必要としない交換反応が何からの影響を受けた変異型 AlaE であることが明らかとなった。

L-alanine exporter AlaE of *Escherichia coli* catalyzes substrate exchange reaction

Seryoung Kim, Kohei Ihara, Hatsuhiro Hori, Tasuke Ando, Emiko Isogai,
 ○Hiroshi Yoneyama
 (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ.)

Key words *Escherichia coli*, transporter, L-alanine

2P-016 High-level expression of secretive endoglucanase in *Escherichia coli* via chromosomal integration

○I-Hsin Yeh, Mu-En Chung, Yu-Chen Hu
 (Dept. of Chem. Eng., Natl. Tsing Hua Univ., Hsinchu, Taiwan)
 ychu@mx.nthu.edu.tw

Cellulase is a key factor for the development of a cellulose-based fermentation process. *E. coli* has been widely used in biofuel field because of its rapid growth rate and ease of genetic manipulation. In *E. coli*, foreign genes can be introduced and expressed via plasmid transformation or integration into its chromosome. However, plasmid-based methods tend to result in plasmid instability and unstable protein expression. In order to obtain an *E. coli* strain that stably expressed cellulase, we used bacteriophage λ Red system to integrate a transgene cassette harboring secretive endoglucanase (*OsmY-eglB*) into *lacZ* locus which facilitates the identification of transgene integration via blue/white screening. In addition, in order to enhance the expression of endoglucanase, we attempted to incorporate the chemically inducible chromosomal evolution (CICHe), a high gene copy integration system for *E. coli*. We expect that the developed *E. coli* using λ Red/CICHe hybrid method can stably and abundantly express and secrete endoglucanase, which will facilitate the production of lignocellulosic biofuels.

High-level expression of secretive endoglucanase in *Escherichia coli* via chromosomal integration

○I-Hsin Yeh, Mu-En Chung, Yu-Chen Hu
 (Dept. of Chem. Eng., Natl. Tsing Hua Univ., Hsinchu, Taiwan)

Key words cellulase, *Escherichia coli*, homologous recombination, gene expression