

3P-201 配列の特異性に着目した新規 LEA ペプチドの構築とタンパク質発現の高効率化への応用

○池野 慎也, 濱田 洋, 春山 哲也
(九工大院・生体工)
ikeno@life.kyutech.ac.jp

【目的】

LEA タンパク質は、浸透圧・乾燥ストレス時に細胞を保護するために植物や一部の動物細胞中で発現し、機能する。発表者らはその保護機能に着目し、LEA タンパク質の主配列をモチーフとした LEA ペプチドを設計し、大腸菌内で共発現させることで目的タンパク質の発現を高効率に行う手法を研究してきた。本発表では、LEA ペプチドの配列の特異性に着目し、それらにアミノ酸変異を導入したときのタンパク質発現量を評価した。

【方法及び結果】

Dual 発現ベクターの各プロモーターの下流に、LEA ペプチドの遺伝子と目的タンパク質の遺伝子を挿入し、共発現ベクターを構築した。その形質転換大腸菌に発現誘導剤を添加することにより、細胞内に目的タンパク質および LEA ペプチドを共発現させ、経時ごとにその発現効率の向上を検討した。これまでの研究で、タンパク質発現量増大の効果が得られた LEA ペプチド (AKDGTKEKAGE 配列) は、5 番目の配列が親水性であったため、疎水性を有するアミノ酸に置換した新規 LEA ペプチドを設計し、目的タンパク質と共発現させた。その結果、これまで得られていた発現量よりもさらにその発現量が増強された。また、規則性が求められていない 4 番目と 10 番目のアミノ酸配列に着目し、そこに変異を入れたペプチドライブラリーの設計を行い、共発現ライブラリーの構築を行った。

Design of new LEA peptides for boost protein expression in E.coli

○Shinya Ikeno, Hiro Hamada, Tetsuya Haruyama
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, peptide, protein expression, protein folding

3P-203 脂肪酸による白癬菌の抗真菌効果

○恵良 真理子¹, 境 志穂¹, 川原 貴佳², 完山 陽秀², 森田 洋³
(¹北九大院・国際環境工, ²シャボン玉石けん (株), ³北九大・国際環境工)
morita@kitakyu-u.ac.jp

【目的】

脂肪酸は自然界に広く分布しており、多くはトリグリセライドで動植物油脂の主成分として存在し、石けんの主成分など様々な材料として利用されている。この脂肪酸の抗菌効果については古くから研究が行われているが、真菌類に対する知見は乏しい。本研究では最も頻度の多い表在性皮膚真菌症の原因である白癬菌に着目し、炭素数の異なる脂肪酸塩の抗真菌効果を明らかにした。今回は脂肪酸に着目をするにより、白癬菌感染症の原因とされている、*Microsporum canis* と *Trichophyton violaceum* に対する抗真菌効果について検討を行った。

【方法】

脂肪酸のサンプルにはカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、ブランクとして Tween 80 調製水を用いた。脂肪酸のサンプルは脂肪酸、滅菌水、Tween 80 を混合したものを用いた。抗真菌試験は、検定菌として白癬菌感染症の原因となる *M. canis* NBRC 32464 と *T. violaceum* NBRC 31064 を用い、胞子懸濁液と脂肪酸のサンプルを混合させ攪拌を行いながら、一定時間経過した後、サンプリングを行い、サブロー寒天培地に塗布し、観察培地上に現れたコロニー数を計測し結果とした。

【結果】

抗真菌試験の結果、2 菌株とも脂肪酸の炭素数 8 ~ 12 個において接触 10 分で 4 オーダーの抗真菌効果を示した。MIC 値の結果、*M. canis* ではラウリン酸が *T. violaceum* ではカプリン酸が最も抗真菌効果が高いことが明らかとなった。つまり、脂肪酸の抗真菌効果は炭素数 10 ~ 12 個付近にピークがあることが示唆された。

Antifungal Activity of Fatty Acids Against Dermatophytosis

○Mariko Era¹, Shihō Sakai¹, Takayoshi Kawahara², Takahide Kanyama², Hiroshi Morita³
(¹Dept. Life Environ. Eng., Univ. Kitakyusyu, ²Shabondama Soap Co., ³Fac. Environ. Eng., Univ. Kitakyusyu)

Key words Dermatophytosis, fatty acid, fatty acid salt, antifungal

3P-202 攪拌槽内における機能遺伝子伝播条件の最適化

○中澤 駿介¹, 福田 洗平², 金原 和秀^{1,2}, 新谷 政己^{1,2}
(¹静大院・工・化バイオ, ²静岡大創造科技大院)
tmshint@ipc.shizuoka.ac.jp

【背景・目的】活性汚泥やメタン発酵では、多種類の微生物が複合的に機能を発揮する。こうした複合微生物系は解析が難しく、人為的な制御手法も未開発である。そこで、プラスミドを利用し、微生物群集の性質を変えることが出来れば、人為的な制御が可能になると考えられる。そのためには、微生物群集内におけるプラスミドの伝播をモデル化、最適化する必要がある。本研究は、プラスミドを利用したゲノムエンジニアリングという新たなシステムの実現に向けて、モデル攪拌槽内におけるプラスミドの接合伝達最適化を目的とし、様々な攪拌条件下における接合伝達頻度の比較を行った。

【方法】プラスミドとして、pBP136 を、供与菌として *Pseudomonas putida* SMDBS 株を、受容菌として *P. putida* KT2440 株を用いた。また、攪拌槽としては 125 mL 容のスピナーフラスコを用いた。1/3LB 液体培地 100 mL を入れたフラスコに、供与菌と受容菌を任意の密度で接種し、攪拌と静置の条件に設定した。実験開始から 0.45 分後に混合液を培地で希釈し、接合完了体の菌体数を最確数 (MPN) 法によって推算した。供与菌、受容菌、接合完了体の選択は、抗生物質を用いて行った。

【結果】接種した菌体密度を 10^8 CFU/mL とした場合、攪拌速度を上昇させると接合伝達頻度が低下した。一方、 $10^7, 10^6, 10^5$ CFU/mL とした場合、それぞれ 10, 30, 70~90 rpm の条件で接合伝達頻度が最大となり、菌体密度に応じて接合伝達頻度が最適となる条件が存在することが示唆された。また、菌体密度が 10^6 CFU/mL の際、攪拌による接合伝達頻度の変化が最大となった。

Optimizing of the horizontal gene transfer in stirring tub

○Shunsuke Nakazawa¹, Kouhei Fukuda², Kazuhide Kimbara^{1,2}, Shintani Masaki^{1,2}
(¹Appl. Chem. Biochem. Eng., Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ.,)

Key words plasmid, horizontal gene transfer, stirring condition

3P-204 抗腫瘍活性物質を生産する沖縄県由来担子菌の探索

○中里 凌¹, 田邊 俊朗²
(¹沖縄高専・専・生資工, ²沖縄高専・生資工)
tanabe@edu.okinawa-ct.ac.jp

【目的】抗癌剤は、正常細胞にも作用するため副作用が報告されている。一方、担子菌が副作用を抑え抗腫瘍活性を示すことが報告され、新たな抗癌剤として注目されている。本研究は抗腫瘍活性に注目し、生物多様性の高い沖縄本島や周辺離島から担子菌をスクリーニングし、副作用を抑えた癌治療に応用できないか検討する。

【方法】(1) 担子菌の単離：本島及び離島合わせて 24 地域の子実体・木片・土壌サンプルを採取した。木材腐朽菌の単離は PDA 培地、菌根菌の単離は MMN 培地を用い 25℃、相対湿度 75% で培養した。(2) 熱水抽出液の調製：単離株の抗腫瘍活性検討のため、液体培地 (酵母エキス 0.3%、ポリペプトン 0.3%、スクロース 1%、リン酸二水素カリウム 0.05%、リン酸水素二ナトリウム 0.05%) で 18 日間、25℃、200rpm の振盪培養を行った。遠心分離 (4℃、10000rpm、5 分) で菌体を回収後、オートクレーブ (121℃、20 分) にて熱水抽出液を調製した。(3) 細胞増殖抑制試験： 1.0×10^4 cells/well の Hela 細胞を 96well プレートに播種し、サンプルを加えて 24 時間、37℃、5%CO₂ で培養後、WST-1 にて生細胞数を測定し増殖抑制率を算出する。(4) アポトーシス試験：増殖抑制効果が見られた株を有望株とし、アポトーシスによる抑制かを判断するためギムザ染色にて形態学的変化を観察する。

【結果】本島及び離島より、計 536 株を単離することに成功した。単離株は、凍結保存した。震盪培養した 122 株の菌糸体を用いて、熱水抽出液を調製した。続いて、Hela 細胞を培養し増殖抑制能を有する有望株の選抜を行い、アポトーシス試験にて作用機序を解明していく予定である。

Screening of Basidiomycete producing antitumor substances from Okinawa.

○Ryo Nakazato¹, Toshiaki Tanabe²
(¹Bioresour. Eng. Ctrs., Adv. Ctrs., Okinawa Natl. Coll. of Technol., ²Dept. of Bioresour. Eng., Okinawa Natl. Coll. of Technol.)

Key words basidiomycetes, antitumor