

PK-009

水耕液中の原生動物による
ヒト病原菌の捕食作用

○佐藤 聖¹、龍田 典子¹、上野 大介¹、染谷 孝¹
¹佐賀大学農学部

【背景と目的】先に演者らは、水耕液中に常在する原生動物が、外来微生物を捕食することを明らかにした。そこで本研究では、水耕液中で種々の細菌の生存に及ぼす原生動物の影響を検討した。

【方法】九州の水耕栽培施設3箇所より採取した水耕液をメンブランフィルター（孔径 0.2μm）でろ過した除菌区と、ろ過しない未除菌区を設定した。これに非病原性大腸菌KMI株および*Aeromonas hydrophila*を約10⁸ cells/mLとなるようにそれぞれ接種し、30℃で5日間振とう培養（45 strokes/min）し、培養前後の大腸菌数を希釈平板法（コリフォームアガー）で測定した。

原生動物による細菌捕食の観察には、大腸菌KMI株をDTAFで染色した fluorescently labeled bacteria（FLB）を用いた。水耕液にFLBを加え、原生動物に数分間捕食させた後、蛍光顕微鏡（B励起）下で観察した。

【結果および考察】水耕液に接種した大腸菌KMI株および*A. hydrophila*の菌数は、除菌区ではほぼ無変化であったが、未除菌区では10¹~10²桁減少した。特に、*A. hydrophila*で減少がより顕著であった。これは、原生動物が菌種選択的に捕食している可能性を示す。

繊毛虫によるFLBの捕食では、わずか数十分間で細胞内一杯に細菌を取り込む様子が観察された。

これらの結果から、水耕液中には原生動物が常在微生物相の一員として存在し、外来微生物を捕食することが判明した。このような原生動物の捕食作用は、水耕液中の外来微生物抑制因子として、食中毒リスク低減に寄与する可能性がある。

Key words: protozoa, human pathogen, hydroponic
E-mail: 12555006@edu.cc.saga-u.ac.jp

PK-011

β-ラクタム系抗生物質分解活性を有する
新規アシル化ホモセリンラクトンアシラー
ゼMacQの結晶構造解析

○草田 裕之^{1,2}、安武 義晃¹、花田 智^{1,2}、鎌形 洋一¹、木村 信忠¹
¹産総研 生物プロセス、²筑波大・院 生命環境

β-ラクタム系抗生物質分解酵素の一種であるβ-lactam acylase (Bla)と細菌間シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHLs) 分解酵素の一種であるAHL-acylase (Aac)は、共通のアミノ酸配列のモチーフが保存されており、共にアミド結合の切断活性を触媒する酵素である。しかしながら、BlaとAacの活性を同時に示す酵素の報告例は極めて少なく、基質特異性に関わるメカニズムの解明が課題となっている。我々はこれまでに、多剤耐性を有する*Acidovorax* sp. MR-S7から、新規なAac酵素、MacQを分離した。本酵素の特徴は、アシル鎖長の異なる多様なAHL異性体を分解でき、さらにBla活性も保持する基質特異性が広い点にある。従って、MacQの基質認識のメカニズムを明らかにすることで、微生物による抗生物質耐性機構の更なる理解と、多剤耐性菌の出現機構を解明することに繋がると期待された。そこで本研究では、MacQのX線結晶構造解析を実施した。まず、精製したMacQを用いてシッティングドロップ蒸気拡散法を用いた結晶化スクリーニングにより、板状の結晶を獲得した。次に、MacQのX線回折実験と構造解析の結果から、MacQは既知のAacと比較して、2つの構造的な特徴を見出した。まず、既知のAacがヘテロ二量体であるのに対して、MacQはヘテロ四量体からなる高次構造体であった。また、MacQに特徴的に存在するα-subunitのC末端配列が、推定される基質結合部位に向かって接近していることが判明した。以上の解析結果から、これら2つの構造的な特徴がMacQの基質特異性の広さに寄与する可能性が示唆された。

Key words: β-lactam acylase, N-acylhomoserine lactonase
E-mail: kusada-hiroyuki@aist.go.jp

PK-010

水田土壌脱窒細菌*Azoarcus*属KH32C株はイネ
だけでなくアカクローバーの根にも定着する

○角田 洋子¹、西澤 智康¹、箱山 雅生¹、浦口 晋平¹、藤原 徹¹、大島 健志朗¹、服部 正平²、磯部 一夫²、大塚 重人¹、妹尾 啓史¹
¹東京大・院農、²東京大・院新領域

土壌微生物-植物間の相互作用機構は、根圏生態系における特異的な共存関係を築くための重要な役割を果たしている。これまでに我々は、水田土壌から分離した高N₂O還元型脱窒細菌*Azoarcus*属KH32C株の全ゲノム塩基配列を決定し、イネ科植物の根に定着して生育を促進することを確認した。KH32C株のゲノム解読から、マメ科植物エンドファイト*Sinorhizobium meliloti*の共生に関与する莢膜多糖合成遺伝子クラスター(*rkp*)の存在を見出した。そこで本研究では*Azoarcus*属KH32C株のマメ科植物根への定着を検証した。

希釈CGY寒天培地で嫌気培養したKH32C株をアカクローバー(*Trifolium pratense*)の種子に接種し、CaCl₂寒天培地プレートで栽培した(25℃、明条件)。栽培5日後、アカクローバーの根をLIVE/DEAD染色して根内部を蛍光顕微鏡観察した。また、KH32C株接種区のアカクローバーの根からDNAを抽出し、KH32C株の*rkpA*遺伝子領域のPCR増幅を行った。生育したアカクローバーの根の蛍光顕微鏡観察から、KH32C株は根内部で増殖している可能性が示された。さらに、KH32C株接種区の根部DNAで*rkpA*遺伝子がPCR増幅したことから、根に定着していることが示された。*Azoarcus*属KH32C株が有する植物との相互作用機構は、マメ科植物でも機能することが示された。

Key words: *Azoarcus*, Plant-microbe association, *Trifolium pratense*
E-mail: hiroko.kakuta@hotmail.co.jp

PK-012

Acidovorax sp. strain MR-S7株に由来するMacQ
酵素の基質特異性決定メカニズムの解析

○江淵 鉄平^{1,2}、草田 裕之^{1,2}、安武 義晃¹、花田 智^{1,2}、鎌形 洋一¹、木村 信忠¹
¹筑波大院・生命環境、²産総研・生物プロセス

【目的】*Acidovorax* sp. strain MR-S7株は、N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) を分解すると共に、β-ラクタム系抗生物質に対する耐性を有している。我々は、MR-S7株から抗生物質分解能を有するAHL分解酵素MacQの分離と結晶構造解析を実施し、MacQ酵素の機能と構造の相関関係について探索を行っている。本研究では、MacQの活性や触媒能に関わるタンパク質の構造を特定し、独特な基質特異性を有するMacQの進化過程を解明することを目的とする。【方法】MacQの結晶構造解析のデータや、基質特異性の異なるMacQと近縁なNtn-family酵素のアライメント解析を参考に、MacQに特徴的なタンパク質構造を予想し、アミノ酸配列を欠失した計3種類の変異体を作製した。次に、AHLや抗生物質に対する分解能を測定し、234番目のアミノ酸残基が活性に関わる重要なアミノ酸残基であることを明らかにした。さらに、226番目から232番目のアミノ酸配列を欠失した変異体を解析したところ、MacQ野生型がヘテロ四量体を形成するのに対し、変異体はホモ二量体であることを明らかにした。このことから欠失したアミノ酸配列がヘテロ体の形成に関与し、他のAHL分解酵素には存在しない基質を包むポケット構造を形成する上で重要な役割を果たしていることを明らかにした。

Key words: N-acyl-L-homoserine lactone, β-lactamase, AHL acylase