

## PK-013

## フランツ型拡散セルを用いた短鎖アシル化ホモセリンラクトン検出法の検討

○奈須野 恵理<sup>1,2</sup>、飯村 兼一<sup>1,2</sup>、諸星 知広<sup>1,2</sup>、池田 幸<sup>1,2</sup>、加藤 紀弘<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>宇大院工、<sup>2</sup>CREST JST

【目的】多くのグラム陰性細菌の日和見感染症やバイオフィルム形成は細胞間情報伝達機構クオラムセンシング (QS) により制御されている。QS機構のシグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) の検出用レポーター株 *Chromobacterium violaceum* CV026 と、AHL との相互作用を解析する細菌をフランツ型拡散セルの2つのチャンバー内でそれぞれ培養し、菌体を破壊せず培養槽内のAHLを短時間に検出する新規手法を検討した。

【方法】*Serratia marcescens* AS-1 と AHL 合成酵素を欠損させた *S. marcescens* AS-1  $\Delta$ spnI をモデル AHL 生産菌・AHL 非生産菌として用いた。増殖フェーズや外部添加する AHL 濃度を変えてドナーチャンバーに接種し、菌体は透過しないが AHL などの低分子が拡散可能な孔径 0.5  $\mu$ m 以下の膜で隔離されたレセプターチャンバーに *C. violaceum* CV026 を接種し数時間培養した。対数増殖期後期に達した *C. violaceum* CV026 の培養液の色調を反射型分光測色計で測定し、AHL 濃度依存的に生産される色素 Violacein に由来する色調の違いを  $L^*a^*b^*$  表色系で数値化することで AHL 量を評価した。

【結果と考察】AHL 検出の所要時間はレセプターチャンバーに接種するレポーター株を対数増殖期後期に調節することで短縮可能であった。*C. violaceum* CV026 の培養液を混ぜた寒天プレートに AHL 抽出液を滴下して Violacein の色素円の直径で AHL を検出する従来法と比べ、本検出法は AHL をわずか数時間で簡便に検出可能である。また、本法により細菌の増殖に伴う培養槽内の AHL 濃度の推移をモニタリングすることで、2 種細菌間における AHL の授受をシミュレーション可能であることが示唆された。

Key words: Quorum sensing, N-acyl-L-homoserine lactone, Franz cell  
 E-mail: e-nasuno@cc.utsunomiya-u.ac.jp

## PK-015

## 紅色光合成細菌を含む共培養系による嫌氣的安息香酸分解

○楠 木綿太<sup>1</sup>、松浦 克美<sup>1</sup>、春田 伸<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>首都大・院生命

安息香酸の嫌気下での分解は、環境浄化および物質循環に関与する微生物代謝であると考えられる。当研究室では、*Marinobacterium* sp. O 株と紅色光合成細菌 *Marichromatium* sp. P 株の共培養系が、光照射条件下で、安息香酸を唯一の炭素源とする培地で嫌氣的に生育することを報告している。光合成細菌 P 株に、安息香酸の利用性はなく、O 株は好氣的に安息香酸を分解できるが、単独では嫌氣的に生育できない。本研究では、両細菌間の物質授受を明らかにすることを目的とした。共培養系の培地に含まれる物質の中で両者の生育に必要な物質を探索した結果、チオ硫酸が必須であることが分かった。このことから、光合成細菌 P 株は電子供与体としてチオ硫酸を利用していることが考えられた。これまでの報告から、光合成細菌によるチオ硫酸の酸化産物として、硫酸およびテトラチオン酸が予想された。そこで、O 株による硫酸およびテトラチオン酸の利用性を検証した。炭素源として安息香酸を含む培地に O 株を接種し、気相を窒素ガスに置換し、嫌氣的に培養した。硫酸を添加した系では O 株の生育が見られなかった。一方、テトラチオン酸を終濃度 1 mM になるように添加し、培養過程で適時、追添加したところ、テトラチオン酸非添加の培養系に比べ、細胞数の増加が観察された。

以上から、本共培養系では、光合成細菌 P 株がチオ硫酸を酸化し、その酸化産物を O 株が電子受容体として安息香酸を分解していることが示唆された。光合成細菌 P 株は安息香酸の分解による産物を炭素源としている可能性を考えている。

Key words: marine photosynthetic bacteria, anaerobic benzoate degradation, tetrathionate respiration  
 E-mail: kusunoki-yuta@ed.tmu.ac.jp

## PK-014

スイートソルガム連作障害の原因解明と *Veronaeopsis simplex* Y34 を利用した同病害抑制について

○山本 翔也<sup>1</sup>、小松崎 佑樹<sup>1</sup>、塩津 文隆<sup>1</sup>、成澤 才彦<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>茨城大・院農

【目的】2012年7月、茨城大学内のスイートソルガム圃場において連作障害が発生した。主な病徴は、根部の褐変、地上部の黄化および生育遅延であり、土壌菌類に起因することが推察された。そこで本研究では、本連作障害の原因を解明し、さらに植物根部内生菌を利用した防除法の効果を検討した。

【方法】スイートソルガム圃場から罹病株および非罹病株を採取し、常法により糸状菌を分離した。確立した菌株は形態観察、および rDNA、ITS 領域のシーケンスデータの比較により同定した。また、分離頻度が高い菌類を選抜し、スイートソルガムへ接種し病原性を調査した。一方、今までにスイートソルガムへの生育促進効果が確認されているエンドファイト *Veronaeopsis simplex* Y34 を供試し、同様の条件で接種し、防除効果を求めた。

【結果】合計 85 菌株の糸状菌が分離された。罹病株から最も多く分離された菌類は *Fusarium* 属菌、次に *Alternaria* 属菌であり、それぞれ 42%、22% であった。一方、非罹病株からも同様に 2 属の菌類が分離され、その頻度は 14%、11% であった。接種試験では、選抜菌株を接種したすべての植物体で地上部重量の減少、および根の褐変や伸長の抑制が観察された。その中で *F. oxysporum* p18 を接種した植物は圃場で観察された病徴と同様の症状を示し、さらに *F. oxysporum* p314 は特に強い病原性を示した。以上より、圃場で発生した連作障害は *F. oxysporum* が主因であることが示唆された。また *V. simplex* Y34 を供試し、同病原菌による病害抑制試験を行ったところ、Y34 を処理した植物体の地上部乾燥重量が 25.7 mg となり、対照区の 16.7 mg と比較して有意に増加した。

Key words: dark-septate endophytic fungi, replant failure, *Veronaeopsis simplex*  
 E-mail: 13am214s@acs.ibaraki.ac.jp

## PK-016

The periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* produces an autoinducer-2-inactivating enzyme

○Azakami Hiroyuki<sup>1</sup>、Mansur Jasini<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. Biol. Chem., Yamaguchi univ.

*Eikenella corrodens*, periodontopathogenic bacterium, produces autoinducer-2 (AI-2) in the mid log phase, and AI-2 activity decreases dramatically during the stationary phase. Here we investigated the mechanism underlying the decrease in AI-2 activity. To analyze this mechanism, we purified AI-2 from the supernatant of mid-log-phase culture. Simultaneously, the stationary-phase culture supernatant was fractionated by ammonium sulfate precipitation. On incubating the purified AI-2 and MHF with each fraction, 30% fraction decreased both AI-2 and MHF activities. This suggests that AI-2 and MHF were rendered inactive in the same manner. We observed that an enzyme converts MHF to another form. These results suggested that *E. corrodens* produces an AI-2 inactivation enzyme, and that AI-2 may be degraded or modified by this enzyme. Moreover, we purified this enzyme using some ion-exchange chromatography. Purified enzyme was 40-kDa protein and its N-terminal sequence was corresponded to that of outer membrane porin of *E. corrodens*. No AI-2-inactivation activity was shown from the supernatant of porin deficient mutant strain. Therefore, it was suggested that the soluble porin might inactivate AI-2 in *E. corrodens*.

Key words: autoinducer, quorum sensing, inactivation, periodontal disease  
 E-mail: azakami@yamaguchi-u.ac.jp