

## P501

### 三角形の形態を有する好塩性微生物に存在する新規光応答性アニオンポンプ： 遺伝子クローニングと解析

<sup>1</sup>北陸先端大材料科学・<sup>2</sup>東工大院生命理工 ○八波利恵<sup>1,2</sup>・青野重利<sup>1</sup>・中村 聡<sup>2</sup>

#### 「緒言」

高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* は細胞膜に光駆動型アニオンポンプであるハロロドプシン (hR) を有している。照射により hR は塩化物イオンを細胞内へ取り込み、生じた膜内外の膜電位は ATP 合成酵素による ATP 合成に利用される。*Haloarcula japonica* TR-1 株は三角形平板状の形態を有する高度好塩性古細菌である。本研究では、*Ha. japonica* の hR 様タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行い、それらの塩基配列を決定した。さらに、hR 様タンパク質遺伝子の発現様式を明らかにした。

#### 「結果および考察」

##### (1) *Ha. japonica* hR 様タンパク質遺伝子のクローニング

各種高度好塩性古細菌に由来する hR 様タンパク質のアミノ酸配列間で保存性の高い領域に対応するプライマーを用い、*Ha. japonica* hR 様タンパク質遺伝子の PCR 増幅を行った後、得られた PCR 産物をプローブとして染色体からのクローニングを実施した。本菌 hR 様タンパク質遺伝子は 828 ヌクレオチドのオープンリーディングフレームからなり、276 アミノ酸をコードしていた。遺伝子配列から類推されるアミノ酸を類縁菌由来のものと比較したところ、これらの間には有意な相同性が認められた。とりわけ、chR と高い相同性を示したことより、本菌 hR 様タンパク質は chR ファミリーに属するものと考えられた。

##### (2) hR 様タンパク質遺伝子発現の転写に及ぼす照射および低酸素分圧の影響

*Ha. japonica* chR 遺伝子の転写における酸素分圧の影響を調べるために、本菌を暗所において高酸素分圧下および低酸素分圧下において培養を行った。それぞれの条件で培養した菌体より全 RNA を回収し、chR mRNA をノーザンハイブリダイゼーションにより検出した。その結果 cR mRNA はいずれの場合にも発現していないことがわかった。そこで次に、本菌を暗所下および照射下で培養し、*Ha. japonica* chR 遺伝子の照射の影響を調べた。その結果、chR mRNA は照射下培養した場合のみ発現していることが明らかとなった。以上の結果より、*Ha. japonica* chR 遺伝子の発現様式は高度好塩性古細菌に由来するいずれのイオンポンプのものとも異なり、照射によってのみ、転写が活性化されることが明らかとなった。

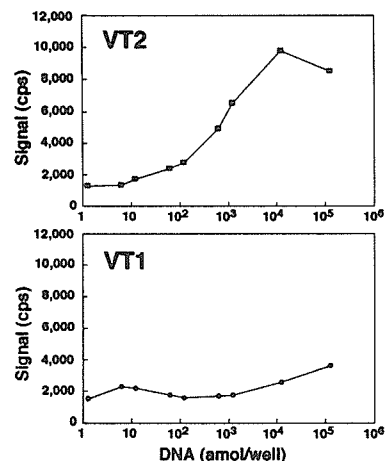
## P502

### 新規ユウロピウム錯体を用いた大腸菌 O157 ベロ毒素遺伝子検出系の構築

東工大院生命理工 上野仁之・鈴木麻美絵・八波利恵・山崎勝弘・梶谷康一・中村 聡

【目的】長い蛍光寿命を有するユウロピウム錯体をラベル剤とする、時間分解蛍光イムノアッセイ法が実用化されている。松本らが開発した新規ユウロピウム蛍光ラベル剤 (BHHCT-Eu) は高い安定性と強い蛍光を併せ持ち、イムノアッセイを含む各種検出系への幅広い応用が期待される。病原性大腸菌 O157 が産生するベロ毒素タンパク質は VT1 型および VT2 型の二つの血清型に大別され、さらに VT2 には 5 種のサブタイプ (VT2, VT2vha, VT2vha, VT2vhc および VT2vp) が存在する。ベロ毒素は A および B の 2 つのサブユニットから構成され、それらをコードする遺伝子は 1 つのプロモーターからポリシストロニックに転写される。本研究では、上述のユウロピウム錯体を利用したサンドイッチハイブリダイゼーションによる O157 ベロ毒素遺伝子検出系の構築を目的とした。

【方法・結果】堺市より分離された大腸菌 O157 より VT1 および VT2 遺伝子をクローニングした。各遺伝子の A サブユニット領域をファージベクター M13mp18/19 にサブクローニングしたものを、キャッチング DNA とした。一方、B サブユニット領域をプラスミドベクター pBR322 にサブクローニングした後、ニックトランスレーションによりビオチン化したものをプローブ DNA とした。これらを用いたサンドイッチハイブリダイゼーション系により、VT1・VT2 両遺伝子の検出を試みた。キャッチング DNA をマイクロタイタープレートに固定化した後、PCR 増幅したベロ毒素遺伝子断片 (検体) をプローブ DNA と共に加えて、ハイブリダイゼーションを行った。そして、ユウロピウム錯体で標識したストレプトアビジンを加え、時間分解蛍光測定を行った。VT2 遺伝子検出系では、VT2 遺伝子を 100~10,000 amol/well の濃度範囲で定量が可能であり、VT1 遺伝子はほとんど検出されることが明らかとなった (図 1)。逆に、VT1 遺伝子検出系では VT1 遺伝子のみが測定可能であり、VT2 遺伝子はほとんど検出されなかった (データ示さず)。以上より、本研究のサンドイッチハイブリダイゼーション系は VT1 および VT2 遺伝子の測り分けが可能であることがわかった。今後は、より高い感度での検出を目指す。



(図 1) VT2 遺伝子検出系を用いた測定結果