

発表番号：4F020

発表日時：3月30日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

アラスカ永久凍土氷楔由来放線菌の休眠に関わる遺伝子特定の試み

Identification of genes specific to dormancy of actinomycetes from permafrost ice wedge in Alaska
○池 晃祐¹、寺島 美亜²、北川 航^{1,3}、加藤 創一郎^{1,3}、鎌形 洋一^{1,3}、浅野 行蔵¹ (¹北大院農、²北大低温研、³産総研生物プロセス)

○ Kosuke IKE¹, Mia TERASHIMA², Wataru KITAGAWA^{1,3}, Soichiro KATO^{1,3}, Yoichi KAMAGATA^{1,3}, Kozo ASANO¹ (¹Hokkaido Univ., Grad. Sch. Agr., ²Hokkaido Univ., Inst. Low Temp., ³AIST., Bioprod. Res. Inst.)

無芽胞形成のバクテリアには環境ストレスに対応して「生存してはいるが増殖しない」状態に陥るものがある。このような状態は休眠(dormancy)と呼ばれている。我々のグループはアラスカの楔状に発達した永久凍土層から新属新種の無芽胞形成放線菌 *Tomitella biformata* AHU 1821^T を単離し、本菌を人工的に休眠状態へ誘導可能であることを見出した。このような休眠状態が氷中などでの長期生残に関与していると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。本研究では休眠中の生理や生残性に関与する遺伝子の特定を目的とし、本菌株の休眠および増殖細胞を用いたプロテオーム解析を行い、得られた候補遺伝子の破壊株の構築・解析を進めた。休眠細胞の調製は次のように行った。液体栄養培地で前培養した *Tomitella* 菌体を生理食塩水で2度洗浄した後、フルクトースを加えた液体最小培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるよう接種した。本培養は 30 mL 容バイアルチューブに 20 mL の培地を添加し、チューブの口をブチルゴム栓で覆う酸素制限状態で行った。溶存酸素濃度がほぼ 0 になるまで振盪培養した後、静置に切替えて培養を継続した。本手法で約 2 年静置して得た休眠細胞と通常の好氣的な対数増殖期細胞からビーズ式細胞破碎によって全タンパク質を抽出し SDS-PAGE に供したところ、休眠細胞においてもタンパク質がほとんど分解されずに細胞内で保存されていることが観察された。これらサンプルを質量分析によるプロテオーム解析に供した結果、休眠細胞からは 15,471 スペクトル、1,002 タンパク質を、対数増殖期細胞からは 15,872 スペクトル、1,454 タンパク質を検出・同定した。これらの中から休眠生理に関与しているタンパク質を特定するため、対数増殖期と比べて休眠細胞で 3 倍以上の発現かつ 50 以上の全スペクトラルカウントのタンパク質のみを選抜した結果、12 種類のタンパク質が選抜された。その中でも我々は一酸化炭素脱水素酵素(Carbon monoxide dehydrogenase、以下 CODH)に注目した。プロテオーム解析により CODH の 3 つのサブユニットすべてが休眠細胞から特異的かつきわめて高頻度(大サブユニットが 22 ユニークペプチド、アミノ酸配列被覆度 40.9% ; 中サブユニットが同 12、13.39% ; 小サブユニットが同 5、49.38%) に検出されたためである。CODH には一酸化炭素と水から二酸化炭素とプロトンを生成するエネルギー獲得反応を触媒する機能が知られおり、低酸素・貧栄養の本休眠系で *Tomitella* 細胞が CODH を利用したエネルギー代謝によって生残性を高めていると予想される。現在、相同組換えを利用した *Tomitella* の CODH 破壊株を構築し、その休眠誘導への寄与または休眠中の役割を検討中である。

Dormancy, Proteome, Carbon monoxide dehydrogenase

発表責任者：池 晃祐 (k-ike@chem.agr.hokudai.ac.jp)