

28pmS-005

複数回膜貫通領域を持つ c-di-GMP 合成酵素の大腸菌膜上での局在
土橋 成慈¹, 稲垣 孝規¹, 日暮 恭子¹, ○北村 昭夫¹, 平田 隆弘¹(¹城西国際大
薬)

【目的】細菌感染症における持続的感染や抗菌薬の透過性低下の要因として、病巣でのバイオフィーム形成の関与が示唆されている。バイオフィーム形成は、細菌特有のセカンドメッセンジャーである c-di-GMP の菌体内濃度により制御され、c-di-GMP の合成あるいは分解に関わる酵素群は、大腸菌において 30 種類あると推定されている。今回、推定 8 回膜貫通領域を持ち、di-guanylate cyclase 活性に重要な GGDEF ドメインを有する、c-di-GMP 合成酵素 YcdT に注目し、大腸菌菌体膜上における GFP-YcdT の局在を観察した。【方法】大腸菌の染色体 DNA を鋳型として PCR により *ycdT* を増幅し、pTrc99A 由来 GFP 融合ベクターへ GFP の C 末端側に融合する様に導入した。ベクターは、高い活性を持つ *trc* プロモーターと、低活性に改良した p206 型の 2 種類を使用した。構築したプラスミドを *Escherichia coli* TG1 株及び BW25113 株に導入した。GFP 融合 YcdT の活性は、0.3%軟寒天培地上での菌の運動性低下を指標として評価した。GFP 蛍光を利用した菌体内での GFP-YcdT の局在は、LB 寒天培地での培養後 24,48,72 時間後のコロニーを少量懸濁、アガロースを塗布したスライドグラスを用いて観察した。【結果】*gfp-ycdT* 遺伝子導入菌の 0.3%軟寒天培地での運動性は、*ycdT* 遺伝子導入菌と同様に、野生株と比べて大きく低下した。このことより、YcdT の N 末端側に GFP を融合させた GFP-YcdT も生物活性を維持していることが明らかとなった。蛍光顕微鏡による観察では、培養 24 時間後から極局在が観察された。また、全ての菌株において、培養時間に依存して、極局在する割合が増加していた。