

2023 年度  
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	中村 彰彦
研究機関名	静岡大学
所属部署名	農学部
役職名	テニュアトラック准教授
研究課題名	プラスチックを探して壊すバイオマイクロドロンの創出
研究実施期間	2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日

### 研究成果の概要

ビブリオ菌 (*V. anguillarum*) のゲノム中キチン加水分解酵素を DsRed 及び SuperTagRFP に置き換えた菌を作成したがキトビオースでの蛍光シグナルの上昇が確認できなかったため、大腸菌を用いたコンセプト検証に切り替えた。バクテリアに特化した gRNA 配列評価を行うプログラムを利用し、Cas9 をコードする pCasPA 及び gRNA をコードする pACRISPR プラスミドに 2 つの gRNA 配列を乗せたものを同時に導入することで大腸菌 (BL21 株) のセンサータンパク質 Tsr の削除に成功した。

テレフトル酸 (TPA) を検出して酵素生産をさせるシステム構築のため、*Pseudomonas testosteroni* 由来 TphR と転写制御配列の下に DsRed を繋いだプラスミドを作成した。そのままでは TPA の感受性が低いため、*Pseudomonas testosteroni* 由来の TTT 輸送体ファミリー及び *Rhodococcus jostii* 由来 MFS 輸送体ファミリーの TPA トランスポーターを共発現させたところ、*R. jostii* 由来酵素で TPA 感受性の改善が見られた。DsRed を PET 加水分解酵素に置き換え比較したところ、TphR 結合配列を改変したプラスミドで、TPA 存在下でより強い PET 加水分解酵素の活性が培養液中に確認できた。

走化性用 TPA センサータンパク質の作成では、走化性スクリーニングのための顕微鏡観察系を確認した。陽性対象のセリン存在下で時計回りの鞭毛回転が確認できた。基質結合状態の X 線結晶構造が報告されている大腸菌由来 Tar に TPA が結合するように改変し、走化性スクリーニングを進めている。

PET 結合ドメインは更に吸着特異性を向上させた変異体の創出に成功した。詳細な吸着特性の解析の後、PET 加水分解酵素との融合体を作成し菌に導入する予定である。