

平成18年度 修士論文

海洋細菌産生青紫色素“violacein”の 抗腫瘍細胞作用

“Anti-tumor cell properties of a purple pigment “violacein”
produced by a marine bacterium”

高知工科大学 大学院 工学研究科 基盤工学専攻

榎本研究室 1095124 細川 覚司

概 要

海洋細菌産生青紫色素“violacein”の抗腫瘍細胞作用

本研究室では室戸海洋深層水より青紫色素 violacein を産生する新規細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 を見出した。また、本研究において *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生した violacein が白血病細胞 HL60、U937 に対してアポトーシスによる細胞死を誘導することを見出した。

violacein は、熱帯・亜熱帯地方の土壌や水域から分離される細菌である *Chromobacterium violaceum* の産生する青紫色素である。この violacein は熱帯・亜熱帯地方の風土病の病原体 *Trypanosoma* に対する抗生作用を持つことから、その治療薬として研究が進められてきた。また近年、腫瘍細胞に対して細胞死を誘導することが報告されている。この violacein が持つ生理活性の重要性から *Chromobacterium violaceum* のゲノムの全塩基配列決定がブラジルの国家プロジェクトとして行なわれた。しかし、*Chromobacterium violaceum* は日和見感染細菌であり、感染した場合、重篤な敗血症を引き起こすことが知られている。このため、violacein の大量培養による工業的生産は難しい。結果、violacein を十分利用することは行なわれていない。

一方、本研究室で得た violacein を産生する *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 は、人体の体温である 37℃ では生存できないため、人体に対して病原性を持つことは少ないと考えられた。このことから、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 は *Chromobacterium violaceum* の代わりに violacein の大量生産に用いることができると考えた。

第 1 章では、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 が産生する青紫色素 violacein の腫瘍細胞に対する毒性について述べた。violacein を白血病細胞 HL60、U937 に添加したところ、腫瘍細胞の増殖を阻害し、高濃度の violacein では腫瘍細胞を死滅させることが判明した。細胞毒性は Trypan Blue と MTS Assay を使用し、生存細胞による IC₅₀ を求めた。Trypan Blue では IC₅₀ 値は HL60、U937 共に約 0.5 μM であった。MTS Assay では HL60 は約 0.7 μM となり、U937 は約 1.0 μM であった。このことより、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 産生 violacein が腫瘍細胞に対して細胞毒性を持つ

ことが判明した。

第 2 章では、violacein による細胞毒性で引き起こされた細胞死の機構について述べた。アポトーシスによる細胞死の過程で活性化される、特異的蛋白分解酵素である Caspase を調べた。Caspase の検出は蛍光標識された Caspase Inhibitor を使用した。結果、白血病細胞 HL60、U937 共に violacein 添加後、活性化 caspase が検出された。さらに、Caspase-3 基質を使用し Caspase-3 の活性の測定を行った結果、violacein 濃度 2.0 μ M を添加した白血病細胞 HL60、U937 では Caspase-3 の活性が見られた。また、violacein と Caspase Inhibitor を添加したものでは活性は見られなかった。これらの結果から、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 産生 violacein は白血病細胞 HL60、U937 に対してアポトーシスによる細胞死を誘導することが判明した。