

平成 20 年度修士卒業論文

*Pseudoalteromonas* のヴィオラセイン合成酵素遺伝子  
vioA のクローニングと発現

Cloning and expression of the violacein-synthesizing enzyme gene  
vioA from *Pseudoalteromonas*.

高知工科大学大学院

工学研究科 基盤工学専攻

1115002 阿波連 毅成

2009 年 3 月

## 第一章 はじめに

---

### 1-1. 要約

青紫色素ヴィオラセイン(violacein)産生に至るまでに酵素 vioA~vioE を必要とする事が分かっている。そのため、ヴィオラセイン産生細菌である *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株 vioA のクローニングと発現に取り組んだ。まず、vioA 塩基配列が決定されている violacein 産生細菌の *Chromobacterium violaceum*、*Janthinobacterium lividum*、*Pseudoalteromonas tunicata* の遺伝子間の相同性を元にプライマーを設計し、520P1 株のゲノムを鋳型として vioA を増幅する PCR を試みたが、目的の遺伝子を得る事が出来なかった。520P1 株の同属である *P. tunicata* の vioA 遺伝子を元にプライマーを設計し、PCR を行った。これにより 520P1 の vioA 遺伝子の一部が得られたので、この PCR 産物の塩基配列を決定し、この配列を元に再度プライマーを設計し 520P1 vioA の全塩基配列を決定した。

次に vioA タンパク質の発現を調べるため、ベクター pET28(a) に全塩基配列を決定した 520P1 株 vioA 遺伝子を組み込み、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。これにより得られた形質転換体を培養し、イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシド (IPTG) による誘導を行いタンパク質の発現を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた。

### 1-2. 背景

本研究室が室戸海洋深層水から得た青紫色素産生細菌 *Pseudoalteromonas* sp.520P1 株 (1) は青紫色素 violacein を産生する事が分かっている (2)。ヴィオラセインは抗菌作用、抗腫瘍作用、抗トリパノソーマ作用をもつ事が知られている (3)。ヴィオラセイン合成経路については遺伝子解析や酵素学的研究が行われてきた (4-6)。*C. violaceum* のヴィオラセイン合成遺伝子群は、vioA、vioB、vioC、vioD、vioE から構成され、トリプトファンを基質として vioA、vioB、vioE、vioD、vioC が順次触媒する反応によりヴィオラセインが生合成されると推定されている (4)(Fig.1)。

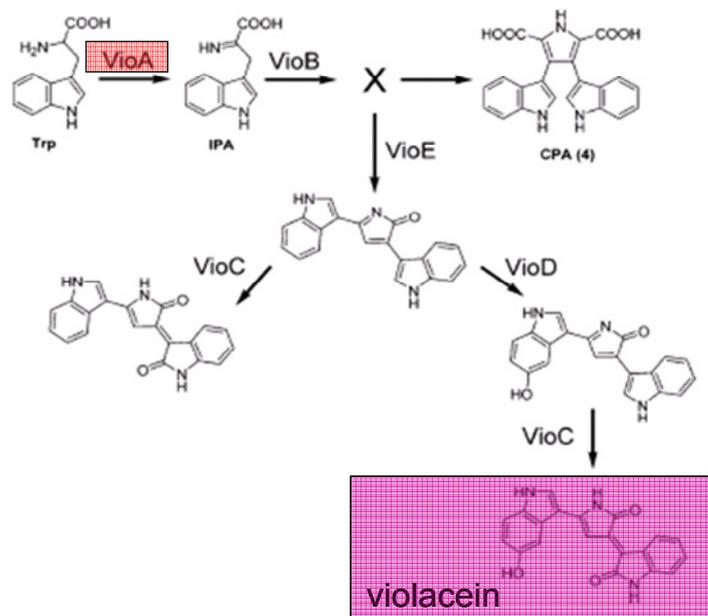


Fig.1 ヴィオラセインの合成経路

Fig.1 に見られるとおり、酵素 *vioA* はトリプトファンを基質とするため、中間体を基質とする他の酵素 *vioB*~*vioE* と比べ酵素活性の研究が容易である。そのため、まず *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株 *vioA* のクローニングとタンパク質発現に取り組んだ。Balibar *et al.* (4)は、*C. violaceum* の組み換え *vioA* 酵素を使ってトリプトファンを基質とする反応を試験管内で行い、生産物であるインドール-3-ピルビン酸 (IPA) が生じる事を HPLC による分析で示した。しかし、520P1 株と *C. violaceum* ではアミノ酸の相同性がかなり低い事より、酵素の特性が違っていることが予想されるため、520P1 株の *vioA* のクローニングとタンパク質発現に取り組んだ。