

平成 20 年度修士論文

ヴィオラセイン生合成を制御する  
オートインデューサーの合成酵素遺伝子の  
クローニング

Cloning of the synthesizing enzyme gene of autoinducer  
regulating the biosynthesis of violacein

高知工科大学大学院

工学研究科 基盤工学専攻

1115006 小畑 貴裕

2009 年 3 月

## 概要

室戸海洋深層水から単離された海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株の産生する青色素は本研究室によって「violacein」であることが同定された。violacein は抗腫瘍作用、抗トリパノソーマ作用などの効果を有することが報告されており、疾病の治療薬として応用が期待できる。520P1 株の色素産生は、細胞密度を感知して集団行動を制御するクォーラムセンシング (QS) 機構によって制御されていると考えられ、QS 機構におけるシグナル伝達物質であるオートインデューサー (AI) の分泌によって色素産生が起こる。グラム陰性細菌の AI は *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) であり、520P1 株においては *N*-(3-oxooctanoyl)-homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL) と *N*-tetradecanoyl-homoserine lactone (C14-HSL) の存在が確認されており、色素産生は 3-oxo-C8-HSL で制御されている。

本研究では 520P1 株の AI 合成酵素遺伝子をクローニングすることを目的とし、520P1 株の色素産生が QS 機構によって制御されていることを解明しようとした。

実験方法は次のように行った。520P1 株のゲノム DNA を 4000 ~ 9000bp の大きさをランダムに切断したものをプラスミドに挿入し、ゲノムライブラリーを作製した。それをもとに大腸菌を形質転換した。組換え大腸菌群は寒天平板培地(X-gal 入り)に 1 つずつ数十個の区画に区切った中に画線培養した。その後、AHL レポーター株である *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (AHL 存在下でガラクトシターゼを合成し、X-gal を分解して青色に着色する) をその寒天平板培地上と一緒に画線培養した。そして青くなったレポーター株に近接した大腸菌を選択した。選択した大腸菌の培養液から酢酸エチルによって AI(AHL) 様物質を抽出した。抽出物はレポーター株を用いたプレートアッセイを行い AHL の存在を確認した。レポーター株を使用した逆層の薄層クロマトグラフィーによって標準 AHL と比較し、520P1 株の AHL との相違を調べた。その結果、AI 合成大腸菌の産生する AI は、520P1 株の色素産生を制御していると思われる AHL(3-oxo-C8-HSL) と同一かまたはそれに構造に近いものであることがわかった。AI 合成大腸菌からプラスミドを回収し、挿入 DNA の塩基配列を決定した。さらに AI 合成酵素遺伝子の存在を確認するため、決定した塩基配列中のオープンリーディングフレーム (ORF) の解析を行い、AI 合成酵素遺伝子の候補である 6 つの ORF を見つけることができた。この 6 つの ORF のどれかが AI 合成酵素遺伝子である可能性が高い。