

かび臭物質生合成経路解明のための生合成関与遺伝子の 発現クローニング法の構築

○東北学院大学大学院 学生員 阿部 隆弘
前澤工業株式会社 正会員 及川 栄作
東北学院大学工学部 正会員 石橋 良信

1. はじめに

湖沼の富栄養化に伴って発生するアオコは藍藻が異常増殖した様のことである。この藍藻の中には異臭(かび臭)や毒物(アオコ毒)を産生する種が知られている。藍藻によって産生されたかび臭物質や毒物は水道水に混入して、人々に不快な異臭味水の被害や健康に影響を及ぼす懸念があり、安全でおいしい水供給の観点から、その発生状況の現状把握や分析法の確立が早急に求められている。

本研究者はこのような藍藻によるかび臭や毒物の大量発生メカニズムの解明や発生予防対策に役立てる目的でかび臭を高感度で迅速に測定できるバイオセンサーの構築¹⁾や、これらの物質を産生する藍藻類の16S-rRNA塩基配列に基づく系統発生的分類、かび臭産生藍藻類のかび臭生合成に関与する酵素活性の測定を試みている。

かび臭物質の生合成に関与する遺伝子を単離して、その構造や機能などの特徴を把握することは、かび臭生合成メカニズムの解明や、かび臭発生を発生前に抑制することができる因子などの発見に役立つと考えられる。

2. かび臭物質 2-MIB の生合成経路

藍藻によるかび臭物質 2-メチルイソボルネオール(2-MIB)の生合成経路の初期段階は二通り知られる。イソプレノイド生合成経路のメバロン酸経路と非メバロン酸経路²⁾のうちのどちらによるかは明確にされていない。その後の生合成経路は右図のようであると考えられている。二つの経路の最終産物である、イソペンテニルニリン酸(IPP)はIPPイソメラーゼによって異性体のジメチルアリルニリン酸(DMAPP)に変換される。次にゲラニルニリン酸合成酵素がIPPとDMAPPを基質として重縮合反応を起こさせて、ゲラニルニリン酸(GPP)を生成する。さらにボルネオール合成酵素はGPPを基質として環化反応によってボルニルニリン酸(BPP)を生成する。BPPは内在性のフォスファターゼによって脱リン酸化され、ボルネオールとなる。ボルネオールはボルネオールメチルトランスフェラーゼによってメチル基が付加されて2-MIBとなる。

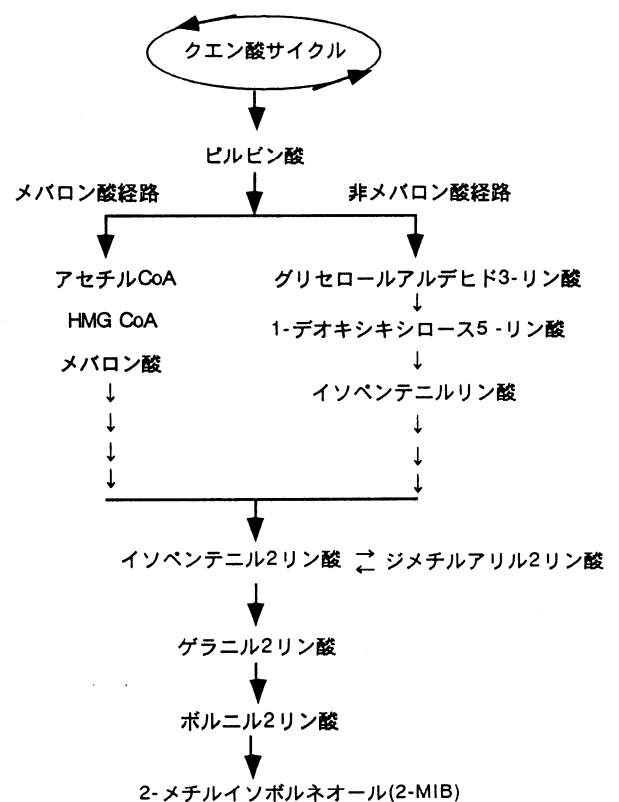


図 かび臭物質2-MIB生合成経路

キーワード：かび臭物質、藍藻、遺伝子クローニング

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央1丁目13-1 TEL 022-368-7418 FAX 022-368-7070

3. 発現クローニング法の原理

本研究室で開発した発光型かび臭バイオセンサーはかび臭分解遺伝子の一部と微生物発光遺伝子(*lux* operon)の一部を連結した DNA をプラスミド上に保有する大腸菌を用いている。この大腸菌を塗抹した寒天培地や培養液にかび臭物質、カンファール、ボルネオールを添加すると 30 分ほどで発光が検出される。発光はその後弱まり 25℃~37℃の培養温度では一晩で発光は検出されなくなる。また、発光遺伝子に換えて β -ガラクトシダーゼ遺伝子(β -gal)を連結した場合の一晩培養後の寒天培地はかび臭物質などを添加した場合は白いコロニーが形成され、添加しない場合は薄い青のコロニーが形成される。この場合発光遺伝子を用いた場合のようにルミノメーターの測定や x-線フィルムの現像などの操作を必要とせず容易であるがコロニー色が薄い青であるため識別しにくいといった課題がある。 β -gal を用いて、コロニーの色がはっきりと区別できるようになれば、2-MIB の前駆物質であるボルネオールを合成する遺伝子を含むゲノミックライブラリーからボルネオール合成遺伝子を発現したクローンのみを識別してクローン化する方法を構築することができのではないかと考えられる。

4. 実験方法

そこで、本研究では *camR* に β -gal を融合させたプラスミドを構築し (今までとは転写方向が逆)、このプラスミドを保有する大腸菌を予めカンファールおよびボルネオールを塗抹した寒天培地に画線して、その後のコロニーカラーの変化を観察した。

5. 実験結果

camR に β -gal を融合させたプラスミドを保有する大腸菌を用いて実験を行ったところカンファールを添加したものも、添加しないものも青いコロニーが形成された。これは遺伝子産物である β -gal-CamR 融合タンパク質がオペレーター DNA に結合できなくなり、誘導物質がない場合もオートレギュレーターとして知られる CamR が自らの発現を制御できなくなったものと考えられた。次に *ori* の異なるコピー数の高いプラスミドに新たな *camR* 遺伝子を挿入して、これを同じ大腸菌に導入した。これは β -gal-*camR* 融合遺伝子のオペレーター/プロモーター部位に後から導入した CamR タンパク質を結合させて、カンファールの添加されない場合にオートレギュレート作用によって抑制能を強めさせるためである。この大腸菌を用いた結果、ボルネオールおよびカンファールを添加しないコロニーは白であり、添加したコロニーは青くなった。

6. おわりに

今後は、すでに植物のコモンセージからクローン化されているボルネオール合成遺伝子を同じ大腸菌に導入して、同様な反応が得られるかの検討や本方法を 2-MIB 産生藍藻類からのボルネオール合成遺伝子のクローニングに応用したいと考えている。

参考文献

- 1) 及川栄作、木村憲司、石橋良信(1995)上水かび臭物質2-MIBバイオセンサーの開発、日本農芸化学会1995年度大会講演要旨集pp.176
- 2) Rohmer. M., Knani, M., Simonin. P., Sutter. B. and Sahm. H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.