

VII-3

かび臭生合成経路解明のためのかび臭前駆物質合成遺伝子単離法の考案

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状態の表れである。この藍藻の中に異臭（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与えると懸念され、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求められている。

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事が出来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、二通り知られている(図 1)。すなわち、メバロン酸経路と非メバロン酸経路¹⁾であり、藍藻によるかび臭物質生合成経路のはじめはこのうちのどちらかによる。両者を併記した現在の生合成経路は下図のようである。両経路の最終産物であるイソペンテニルリニン酸(IPP)は IPP イソメラーゼにより異性体のジメチルアリルリニン酸(DMAPP)に変換される。次にゲラニルリニン酸合成酵素が IPP と DMAPP を基質として重縮合反応を生じさせ、ゲラニルリニン酸(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リニン酸(BPP)を生成する。BPP は内在性のフォスファターゼにより脱リン酸化され、ボルネオールとな。最終的に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 になると推測されている。

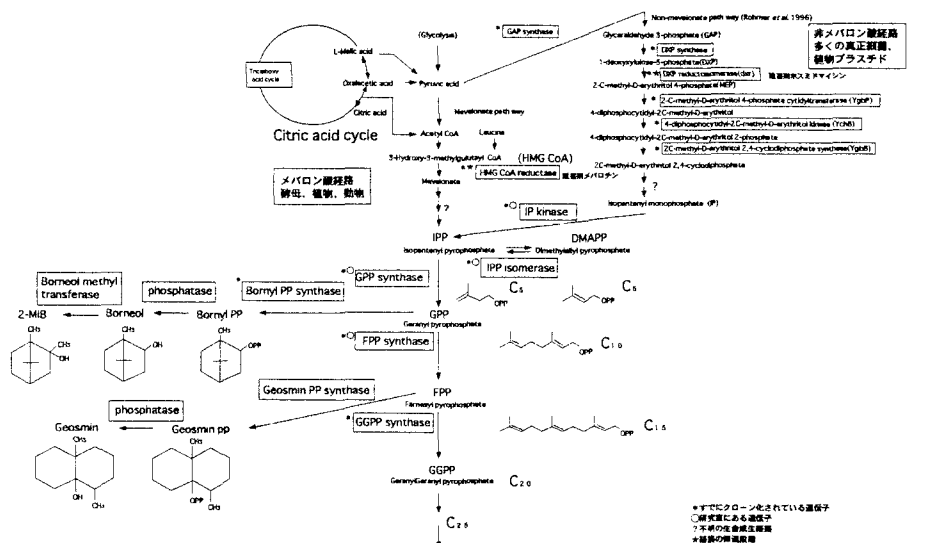


図 1 かび臭物質生合成経路

3. 発現クローニング法の原理

本研究で考案した発現クローニング法は、大腸菌(*E.coli*)発現をコロニーの色の変化により選別できるリポーター遺伝子(β -gal 遺伝子) とかび臭分解遺伝子の一部(*camR* 遺伝子)を plasmid 上に保有する *E.coli* を使用することにより、*E.coli* コロニーの色の変化でかび臭物質の存否を簡略的に識別できるスクリーニングシステムを用いている。この *E.coli* を予め Camphor、Borneol を塗抹した寒天培地に画線した場合は青色のコロニーが形成され、Camphor、Borneol を塗抹してない場合には白色のコロニーを形成する。この方法を用いることにより、2-MIB の前駆物質である Borneol の合成遺伝子を含むかび臭産生藍藻類の genomic library から、Borneol 生合成遺伝子を発現したクローンのみを識別し単離できると推測される。本研究では、明瞭にコロニー色が識別できる β -gal 遺伝子及び *camR* 遺伝子を用いた plasmid の構築を試み、Camphor、Borneol によって誘導がなされるか否かを確認するとともに、*E.coli* 生体内でのモノテルペン生合成遺伝子によるモノテルペンの産生を高めさせる IPP イソメラーゼ遺伝子、GPP 合成遺伝子、IP を IPP にリン酸化する IP Kinase 遺伝子を用いて、コモンセージから Total RNA、poly(A)+RNA を調製し RT-PCR によりクローン化した Borneol 生合成遺伝子を *E.coli* 発現させ、*E.coli* 生体内で生合成させた Borneol によっても誘導されるかの確認実験を行った。

4. 実験方法

本研究では *camR* プロモーターに β -gal 遺伝子を連結した plasmid(*camR*-*P*- β -gal plasmid)及び *camR* のみの plasmid(*camR* plasmid)を構築し、これらの plasmid を保有する *E.coli* を予め Camphor、Borneol を塗抹した寒天培地に画線した後、コロニー色の変化を観察した。次に、*camR* plasmid にコモンセージから RT-PCR によりクローン化した Borneol 生合成遺伝子を挿入した plasmid(*camR*+Borneol plasmid)と *camR*-*P*- β -gal plasmid にさらに IP Kinase 遺伝子を挿入した plasmid(*camR*-*P*- β -gal +IPK plasmid)の両方の plasmid を保有する *E.coli* を寒天培地に画線した後、コロニー色の変化を観察した。尚、後者の実験は *camR*-*P*- β -gal plasmid と *camR* plasmid を導入した *E.coli* をコントロールとして用いた。培養条件は、37℃で24時間培養し、その後、室温の暗所で2日間静置させ、コロニー色の変化を観察した。

5. 実験結果

camR-*P*- β -gal plasmid と *camR* plasmid を保有する *E.coli* を用いた Camphor、Borneol による誘導実験では、Camphor、Borneol を添加したコロニー色は青色を呈し、添加しないコロニー色は白色を呈した。*camR*+Borneol plasmid と *camR*-*P*- β -gal plasmid を保有する *E.coli* を使用した実験では、Borneol 合成遺伝子が導入されたコロニーの色は青色を呈し、Borneol 合成遺伝子が導入されていないコロニーの色は白色を呈した。この結果から本研究で構築したスクリーニングシステムは、*E.coli* 生体外に存在する Borneol 及び *E.coli* 生体内で産生された Borneol において、その存否を識別できることが確認された。

6. おわりに

今後は、本研究で考案した方法を 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。尚、実験の遂にあたり、卒業研究生菅野正聡さん、菱沼和幸さんの労に負うところ大である。記して感謝する。

参考文献

- 1) Rohmer. M., Knani, M., Simonin, P., Sutter. B and Sahn. H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.*295, 517-524.