

河川水中からのビオラセイン生産細菌の単離と関連遺伝子群の解析

東北学院大学大学院工学研究科 学生会員 片倉 啓佑
 東北学院大学大学院工学研究科 正会員 宮内 啓介
 東北学院大学大学院工学研究科 正会員 中村 寛治

1. はじめに

ビオラセインは青紫色の色素で、*Chromobacterium violaceum* などのグラム陰性細菌によって生産され¹⁾、抗腫瘍活性、抗菌活性、抗原生動物活性等の生理活性をもつ物質であることが報告されている²⁾。ビオラセインは、L-トリプトファンを基質とし、ビオラセイン合成遺伝子群中の *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD*, *vioE* にコードされているタンパク質によって合成される³⁾ (図1)。

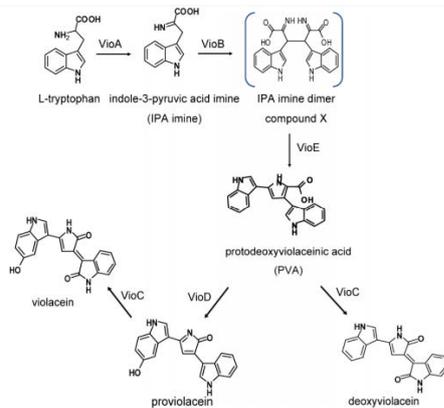


図1 ビオラセイン合成経路⁴⁾

さて、環境浄化技術のうち、生物学的手法として、バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションが知られている。前者は、汚染現場に生息している分解細菌を、酸素や栄養源を添加することで活性化させ汚染物質の分解を促進する手法で、後者は、外部で培養した特定の分解細菌を汚染現場に添加し汚染物質を分解する手法である。一般的に、バイオオーグメンテーションの方が、分解能力の高い微生物を活用できるため浄化時間が短く、近年注目されている技術である。

しかし、バイオオーグメンテーションでの環境浄化の成功例は殆どない。それは、汚染現場に添加した分解細菌が汚染物質を分解する前に土着の原生動物により捕食されてしまい、その細菌数を維持でき

ないことが原因であるとされている⁵⁾。

当研究室の過去の研究では、ビオラセイン合成遺伝子群を導入したトリクロロエチレン分解細菌が原生動物による捕食を回避したことが示され⁶⁾、実際の汚染現場での活用が期待されている。一方、ビオラセイン生産細菌とビオラセイン合成遺伝子群に関しては報告例が多くないのが現状である。

そこで本研究では、ビオラセイン産生に関わるビオラセイン合成遺伝子群の解析を目的とし、ビオラセイン生産細菌を単離し、単離した菌株のビオラセイン合成遺伝子群の取得、解析を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプリング

ビオラセイン生産細菌の取得のために、2020年7月3日に宮城県多賀城市野田の玉川にてサンプリングを行った。サンプリングポイントは上流、中流、下流の3ポイントとした。試料は50ml 遠心管で採水し、採水後1時間以内に実験に使用した。

2.2 ビオラセイン生産細菌の単離

試料を10, 100, 1000, 10000倍に希釈し、各々を Difco™ R2A Agar (BD社製) に200μl ずつ塗布し、30°Cで約5日培養した。生えた紫色のコロニーを新たなR2A寒天培地に同条件で画線培養し、この作業を3回繰り返し純化した。

2.3 16S rRNA 遺伝子の解析

単離した菌株を同定するために16S rRNA 遺伝子のPCR増幅を行った。テンプレートは、単離した菌株の各々のコロニーから、シカジーニクス® DNA抽出試薬(関東化学社製)を用いて、添付のマニュアルに従い抽出した。また、プライマーペアは27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')と1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')、酵素は、PrimeS-

キーワード バイオレメディエーション ビオラセイン 原生動物 捕食

連絡先 〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1 東北学院大学工学部 中村寛治研究室

TAR GXL DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を使用した。PCR 反応は、Pre heating 98°C/2 分の後、変性 98°C/10 秒、アニーリング 55°C/15 秒、伸長 68°C / 1.5 分を 30 サイクル、Post extension 68°C / 1.5 分で行った。塩基配列の決定は、PCR 増幅産物を Sphacryl™ S-300 High Resolution（GE Healthcare 社製）で精製後、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific 社製）を用いて、添付のマニュアルに従ってシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific 社製）で塩基配列を両方向から決定した。

2.4 ビオラセイン合成遺伝子群の単離と解析

ビオラセイン合成遺伝子群のシーケンス解析を行うために PCR 増幅を行った。テンプレートは 2.3 の抽出 DNA を用いた。プライマーペアは、vioMV-1307F（5'-AGC GAT CAC TAT CCG GTG C-3'）、vioMV9427R2（5'-GGA CCA CTT CCT GTA TCG G-3'）、酵素は、Tks Gflex DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を使用した。PCR 反応は、Pre heating 94°C / 1 分の後、変性 98°C / 10 秒、アニーリング 60°C / 15 秒、伸長 68°C / 8.5 分を 30 サイクル、Post extension 68°C / 8.5 分で行った。塩基配列の決定は 2.3 と同様に行った。

3 結果と考察

3.1 ビオラセイン生産細菌の単離

多賀城市野田の玉川でサンプリングをし、紫色の色素を生産する細菌を 6 種類単離した。菌株を各々 KP1, KP2, KP3, KP4, KP5, KP6 と命名した。

3.2 菌株の同定

単離した菌株 6 株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。各々 BLAST で相同性検索を行った所、全て *Chromobacterium* 属細菌と非常

に高い相同性が示された。また、6 株のうち 3 株は上流、残りの 3 株は中流のポイントから単離した菌株であることから、時期的に *Chromobacterium* 属細菌が優占化していた可能性がある。

3.3 ビオラセイン合成遺伝子群の単離と解析

ビオラセイン合成遺伝子群を単離するためにプライマーの設計を行った。*Chromobacterium violaceum* JCM1249, *C. vaccinii* XC0014, *C. vaccinii* 21-1, *C. vaccinii* NCTC9370 のビオラセイン合成遺伝子群の周辺領域の塩基配列を Clustal W で比較し、共通する配列を基に設計した。Forward プライマーを 5 種類、Reverse プライマーを 6 種類設計し、PCR 増幅を行った結果、そのうちのひとつのプライマーの組み合わせで、6 株全てから約 8kb の DNA が増幅された。

これらをシーケンス解析した結果、6 株全てが既知のビオラセイン合成遺伝子群の遺伝子構造と同様の構造を有していることが判明した（図 2）。

参考文献

- 1) Hoshino, T. Appl., Microbiol. Biotechnol., Vol. 91, pp.1463-1475, 2011.
- 2) Durán, N., Justo, G.Z., Ferreira, C. V., Melo, P.S., Cordi, L. and Martins, D., Biotechnol. Appl. Biochem., Vol. 48, pp.127-133, 2007.
- 3) Momen, A.Z.M.R. and Hoshino, T., Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol.64, pp.539-549, 2000.
- 4) ZHANG Xi.: <http://hdl.handle.net/10173/603>
- 5) Winkler, J., Timmis, K.N. and Snyder, R. A., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 61, pp. 448-455, 1995.
- 6) 中村寛治, 渡邊暁, 成田賢人, 土木学会論文集 G (環境), Vol.70, No.7, III_39-III_46, 2014

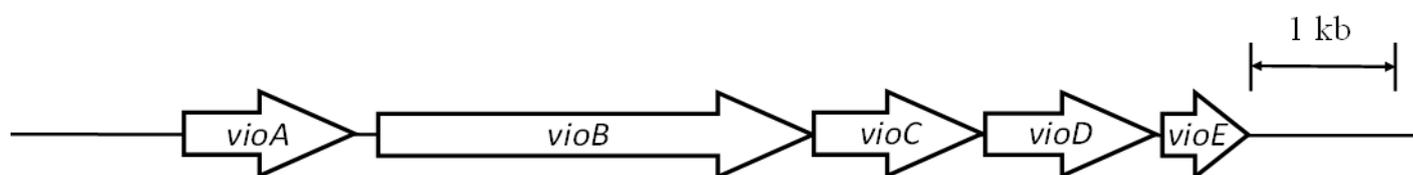


図 2 単離した菌株のビオラセイン合成遺伝子群の遺伝子構造