



平成14～15年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2)研究成果報告書

赤潮殺藻細菌が生産する 赤潮殺藻プロテアーゼの殺藻分子機構の解明

(課題番号：14560070)

平成16年3月

研究代表者 カトヨシキ 加藤純一

(広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻)

はしがき

本報告書は、平成 14 年度から平成 15 年度まで科学研究費補助金・基盤研究(C)(2)の助成を受け研究を行った成果を取りまとめたものである。研究代表者である著者(加藤純一)、広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻博士課程前期佐伯香織君で研究を遂行した。

研究組織

研究代表者 加藤純一

(広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻・教授)

交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,900	0	2,900
平成 15 年度	1,100	0	1,100
総計	4,000	0	4,000

研究発表

(1) 学会誌発表

加藤純一、李宣沃、大竹久夫、満谷淳

赤潮を殺藻する海洋性細菌とその活用をめざした基礎研究

月刊海洋、号外 No. 35、155-159 (2003).



Lee S. O., Kato J., Nakashima K., Kuroda A., Ikeda T., Takiguchi N., and Ohtake H.

Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine

bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:1366-1369 (2002).

(2) 著書

加藤純一、李宣沃、大竹久夫、満谷淳（分担執筆）

環境修復と有用物質生産-環境問題へのバイオテクノロジーの利用-
シーエムシー出版（2003）.

第 1 章 緒言

1.1 はじめに

赤潮とは、水中の微生物、特に植物プランクトンの異常増殖による着色現象のことである。赤潮などの異常繁殖は養殖魚貝類に様々なダメージを引き起こし、また他の海洋生物の殺滅につながる。こうした現象を引き起こす原因は主として N、P などの流入による富栄養化である。赤潮は北半球温帯域の工業化、人口集中の進んだ国の内湾、内海に多くみられたが、最近では発生がより大規模化、長期化し、発生海域が世界的に拡大している。

このような漁業被害を引き起こす赤潮プランクトンは、渦鞭毛藻類、ラフィド藻類、珪藻類など多岐にわたっている。その中でもラフィド藻類に属する *Chattonella antiqua* や *Chattonella marina* は大規模な赤潮を形成することで知られている。これら渦鞭毛藻は夏季を中心として赤潮を形成する。一方で、珪藻に属する *Skeletonema costatum* は春季・夏季の他に冬季にも沿岸域に偏在するが、有明海において 1 月から 3 月にかけて異常増殖して赤潮を形成し [1]、養殖ノリに重大なダメージを与えている (Fig. 1.1)。ノリは海藻の一種であり、海水中の N や P などの栄養塩を吸収して生育する。しかし、ノリ養殖漁場に珪藻赤潮が発生し、N や P などの栄養塩が珪藻類により過剰に摂取された場合、ノリの栄養状態が悪化し、いわゆる「色落ち」と呼ばれる黄変状態を呈する現象が発生する。2000 年に有明海で発生したノリ色落ち被害のニュースは、3 年余を経過した現在でも記憶に新しい。マスコミ報道によれば、福岡・佐賀・長崎・熊本の 4 県における平成 12 年度のノリ生産額は 272 億円と、前年度の生産額 408 億円に比して約 136 億円の減少を示し、本件は赤潮による水産被害としては史上最大規模のものとなった。

1.2. これまでの赤潮対策

水産業の現場からは、赤潮に対する具体的な対策が強く求められている。赤潮の発生を防ぐ工夫や、発生した赤潮をできるだけ小規模に抑え短期間で消滅させる工夫は、水産業、とくに各種養殖業の安定操業を図る上で、きわめて重要であると考えられる。赤潮の発生には環境汚染が深く関わっていることは周知の事実であり、「水質汚濁防止法」(昭 45 法 138)、「瀬戸内海環境保全特別措置法」(昭 48 法 110)などの排水規制をはじめとする措置が採られているように汚染物質の海域への流入を防ぐことが最善の方法である。しかし現在のわれわれの生活習慣からすれば現状は厳しい。これまでの赤潮に対する直接的な対策としては、超音波による処理、過酸化水素などの化学薬品による殺滅法、海面回

収法、硫酸アルミニウムなどの薬品による凝集沈殿法やモンモリロナイトなどの粘土による吸着法などが検討されてきた。しかし、広い海域を対象とし、さらに生態系に対する配慮などから、ほとんど実用化されていない。現在、赤潮発生時は生け簀の移動、餌止めなどの一時的な緊急対策を講じているのみであり、有効な直接的対策の確立が望まれている。

そのような中で近年、赤潮対策に関する研究が進むにつれ、赤潮を殺藻する能力を有する様々な細菌群の存在が明らかになり単離・同定されている [2]。これら自然環境中に存在している微生物を利用することで環境調和型の赤潮防除技術の開発が期待され、現在様々な研究が進められている。

1.3 本研究の目的

微生物による赤潮の殺藻は、細菌の攻撃による殺藻及びウイルス感染による殺藻が知られている。細菌の殺藻様式として、宿主に接触して直接攻撃を行う方法、微生物の代謝産物によって溶解・殺藻がおこる方法の 2 通りが観察されている。

本研究で用いている *Pseudoalteromonas* sp.A28 株は有明海から単離された殺藻細菌である [3]。A28 株は前述した珪藻 *S. costatum* に対し殺藻能力を持つ(Fig.1.2)。本研究室では、A28 株を用いて赤潮藻類と赤潮殺藻細菌の相互関係について分子レベルで解析を進めているが、これまでの研究により A28 株は菌体外にプロテアーゼを分泌し *S. costatum* を殺藻することが明らかになっている [4]。EspI と称されるこの殺藻プロテアーゼは分子量 50kDa のセリンプロテアーゼである(Fig.1.3A)。当研究室では、これまでに赤潮殺藻プロテアーゼ遺伝子(*espI*)のクローニングに成功している [5]。*espI* の配列は 2073bp の読み取り枠(ORF)を含む。この ORF は分子量 71000 の 691 アミノ酸のタンパク質をコードする。精製した EspI の N 末端アミノ酸は、ORF 内の Ala-149 で始まるアミノ酸配列と完全に一致し、N 末端のプロセッシングが行われていることが示唆された。また、Ala-149 で始まる EspI は 543 アミノ酸から成り、その分子量は 54.6kDa と計算される。しかし精製した EspI の分子量 50kDa よりも大きいことから、EspI は C 末端側の 4.6kDa もプロセスされていることが示唆されている。相同性解析によると、Ala-149 で始まる 543 アミノ酸の EspI は *Pseudoalteromonas* sp.O-7 株 [6] の成熟プロテアーゼ AprI [7] と 82.9%、*Stenotrophomonas maltophilia* のプロテアーゼ StmPrI [8] と 48.6%の相同性を持つ。これらはどちらも菌体外セリンプロテアーゼである。この相同性解析の結果は、EspI の酵素的特性と一致する。EspI の C 末端配列においても AprI の C 末端領域と高い相同性 (63.3%)がある。そして AprI も C 末端のプロセスを受けることが報告されている。

A28 株の分泌する主要な細胞外セリンプロテアーゼは EspI に加えて EspII が存在する。しかし、

EspII は殺藻活性を全く示さなかった。また trypsin, pepsin, subtilisin, pronase E などの市販されている一般的なプロテアーゼもいずれも殺藻活性は示さなかった。このことから EspI による殺藻にはプロテアーゼ活性に加え何か他の機能が必要とすることが示唆された。

近年、当研究室の研究から A28 株がもう一つの殺藻プロテアーゼを生産することが見出された [9]。EmpI と称される殺藻プロテアーゼは、メタロプロテアーゼである。興味深いことに、EmpI の C 末端領域に見られた 2 つの繰り返しアミノ酸配列は、EspI の C 末端領域に見られる繰り返し配列と高い相同性を持っていた (Fig. 1.3)

V. vulnificus のメタロプロテアーゼは C 末端領域において EspI と高い相同性を持つ (Fig. 1.3)。このメタロプロテアーゼの C 末端領域は不溶性のタンパク質との結合に必須の領域であることが報告されている [10]。また、活性汚泥から分離された *Rarobacter faecitabidus* は酵母溶解活性を持つ細胞外プロテアーゼ RPI を生産することが報告されている。このプロテアーゼは N 末端側がセリンプロテアーゼドメイン、C 末端側はマンノースに対するレクチン様の親和性を持つマンノース結合ドメインである。マンノース結合ドメインを削った場合、この変異プロテアーゼはプロテアーゼ活性は保持するものの酵母細胞の溶解活性は失うことが報告されている [11]。

以上のことから、*Pseudoalteromonas* sp. A28 株のプロテアーゼの赤潮殺藻活性に必要な機能とは、*S. costatum* の細胞表層の何らかの物質を認識して結合する能力ではないかと考えた。この特異的結合能で EspI プロテアーゼは細胞表層に集積し、その後蛋白質分解活性で *S. costatum* を攻撃することにより、殺藻していると予想した。そして A28 株の C 末端領域にそのような機構が存在しているのではないかと考えた。そこで本研究では、すでにクローニングされている *espI* 遺伝子を用いて、タンパク質工学的手法により EspI の殺藻分子機構を解明することを目的としている。

1.4 研究概要

本報告書では、赤潮殺藻プロテアーゼ EspI の C 末端領域-GFP 融合タンパク質の機能解析を第 2 章で、赤潮殺藻プロテアーゼ EspI の C 末端 deletion mutant の機能解析を第 3 章にて述べる。なお、巻末には、参考文献のコピーを掲載した。



正常なノリ



赤潮発生により
「色落ち」したノリ

Fig. 1.1 有明海の養殖のりの赤潮による「色落ち」

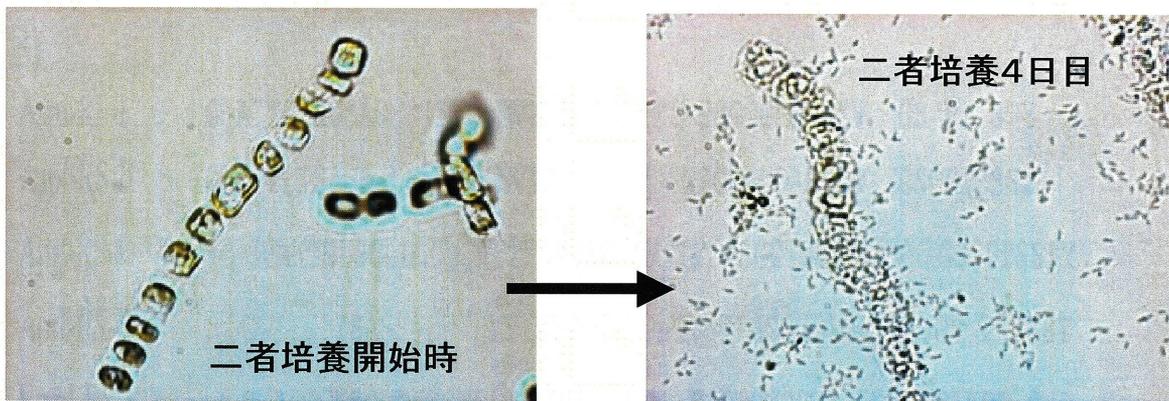
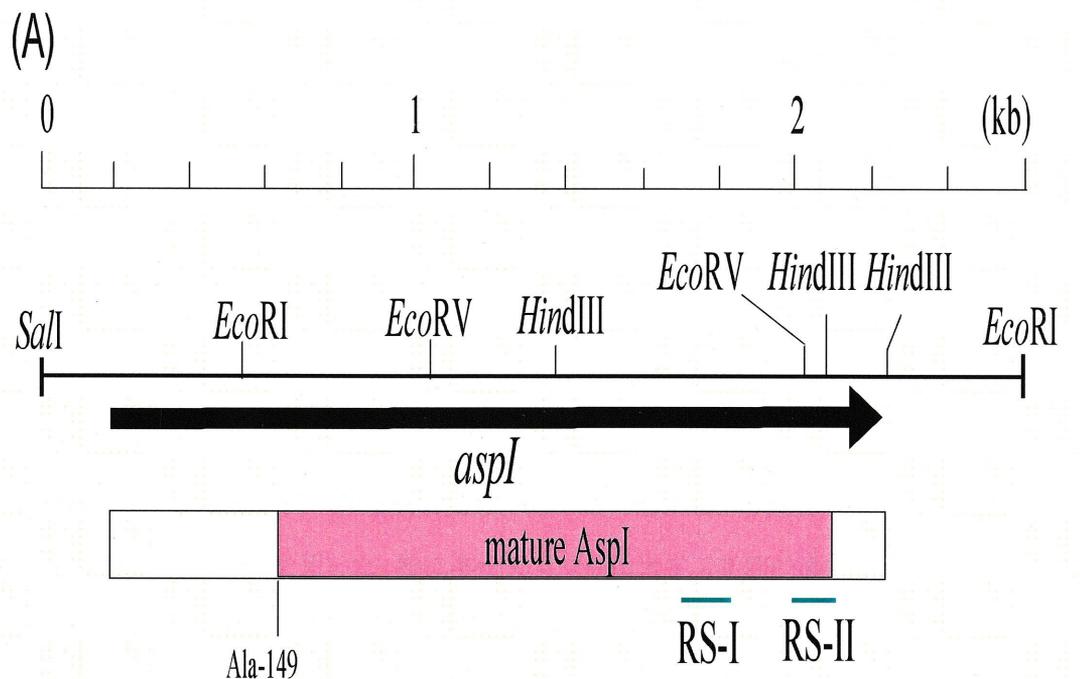


Fig. 1.2 *Skeletonema costatum* と *Pseudoalteromonas* sp. A28 株の二者培養

二者培養 4 日目には A28 株により *S. costatum* は殺藻されている。



(B)

AspI-RS-I	DGQAL T GLSGSASSQ T FY T MEV P TGAT N VT F T M SGG T GDADLYVRAGS A PT T ST Y
AspI-RS-II	GGT V T D ISASAGQ W KH Y TLEVPAG M AS F T V T T SGGSGDADLF V K F GSQ P T S SS Y
AprI-RS-I	D G V A K T GLSG A AGSNQ F F T FDVPAG K T N VT F T M SGG T GDADLY V K I GSQ P T S SS Y
AprI-RS-II	GG T IE D ISASSGQ W VH Y TIEV P E G MS D F T V K T F GGSGDADLF V K F GSQ P T S SS Y
EmpI-RS-I	NG V AR T GISG A AKDQ M F F TLEVPAG A T N LQ F NT T GGSGDADLY V MY G AK P T L SN F
EmpI-RS-II	NG V AR T GISG A AKDQ M F F TLEVPAG A T N LQ F NT T GGSGDADLY V MY G AK P T L SN F
<i>V. vulnificus</i>	N N T P GS N L T G N KGSE V F Y T F T V D R -N A T A V V S I SGGSGDADLY L K A G S K P T S SS W

Fig.1.3. (A) *Pseudoalteromonas* sp.A28 セリンプロテアーゼ AspI

(B) AspIC末端繰り返し配列の相同性比較

第 2 章 赤潮殺藻プロテアーゼ EspI の C 末端領域-GFP 融合タンパク質の機能解析

2.1 目的

前述したように、EspI の C 末端領域に見られる繰り返し配列には赤潮殺藻に必要な機能が存在していると予想した。その機能が赤潮珪藻の細胞表層に結合するような働きであるとするならば、GFP などでも蛍光標識することで直接観察することが可能ではないかと考えた。そこで、本章では、EspI の C 末端領域と GFP との融合タンパク質を構築し、赤潮に対する作用及び殺藻活性を試験した。

2.2 使用赤潮藻

赤潮藻類は、黄色植物門・珪藻綱に属し、沿岸域に偏在し、赤潮発生例の多い植物プランクトン、*Skeletonema costatum* を用いた。特に本研究では福山大学工学部の満谷淳先生から分譲していただいた *S. costatum* NIES-324 株を使用した。この株は無菌的に経代培養されたものである。

2.3 使用菌株及びプラスミド

本研究で用いた菌株及びプラスミドの詳細については Table 1 に示した。

2.4 使用培地及び培養条件

S. costatum の培養には改変 SWM-III 培地 [12] を用いた。培養条件は、人工気象器 (NK system BIOTRON) にて 22°C、 $35 \mu \text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ の白色蛍光 14 時間照射、10 時間暗条件で静置培養した。

Escherichia coli の培養には 2 × Y T 培地または LB 培地に必要な抗生物質を加えて用いた。通常の培養では 37°C、一晚培養した。

培地の詳しい組成及び抗生物質の濃度等については付録に示す。

2.5 実験方法

2.5.1 C 末端 - GFP 融合プラスミドの構築

セリンプロテアーゼ遺伝子 *espI* から PCR 増幅によって 3 種の異なるサイズの C 末端領域をそれぞれクローニングした。PCR により増幅させた断片をまず pGEM-T Easy vector (Promega) へ挿入した。得られたプラスミドを *EcoRI* 及び *SacI* で切断し、同じく *EcoRI* 及び *SacI* で切断した

pGFPuv(Stratagene)へ挿入することにより GFP 遺伝子との融合遺伝子を構築した。プラスミド構築の宿主には *E. coli* MV1184 株を用いた。PCR に用いたプライマーを以下に示す。

C 末端側

5' TTAGCTC GGC ACA ACA CCG CCA CCA CCA ACA GG 3'
SacI

N 末端側

aspI-C3 5' TTA TTA TTC GTT GTT ACC GCC TTT ATA CGG 3'

aspI-C5 5' TTA TTA ACC TGA ACC ACC AGA CGT CGT AAC 3'

aspI-C 5' GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA 3' (universal primer)

2.5.2 C末端 - GFP 融合タンパク質の発現及び精製

得られたプラスミドを用いて目的のタンパク質を発現させるため、宿主として *E. coli* BL21(DE3)pLysS 株を用いた。得られた形質転換株を 1mM の IPTG を加えた LB プレート上で 37℃、一晩培養し、UV を照射することで GFP の発現を確認した。

精製操作は次のとおりである。まず 2 × Y T 培地で形質転換株を 28℃、一晩前培養し、この培養液を 200ml の LB 培地へ 1 % 植菌した。これを 28℃ で 3.5 時間培養した後、IPTG を終濃度 0.1mM になるように加えた。さらに 3.5 時間培養した後、遠心分離により菌体を回収して 10ml の 20mM Tris-HCl(pH8.0) に懸濁した。これを -80℃ で凍結させ、氷中でゆっくり解凍させた後にこのサンプルを超音波破碎し、遠心分離して上清を回収した。さらにこのサンプルについて 10～40% 飽和の硫酸沈殿を行い、沈殿物を遠心で回収した。回収した沈殿物を 1M 硫酸アンモニウムを含む 50mM リン酸 buffer に再懸濁した。次にこれを疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を用いて分画した。HIC カラムには Hi Trap butyl FF 1ml(Amersham Biosciences)を用い、溶出は流速 1ml/min で 0.5～0M の硫酸アンモニウム濃度勾配により行った。活性画分を集め、20mM Tris-HCl(pH8.0) に対し一晩透析し、これをさらに陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。カラムは POROS HQ/M(PerSeptive Biosystem)を用い、溶出は流速 2ml/min で 0.1～0.35M の NaCl 濃度勾配によって行った。これらそれぞれのステップでの精製度の確認には、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。

2.5.3 赤潮に対する作用の観察及び殺藻活性の検出

部分精製した C 末 - GFP 融合タンパク質を *S.costatum* 培養液 1ml に対し 200 μ l 加え、人工気象器で数日間培養後、倒立型蛍光顕微鏡(OLYMPUS)で観察した。

2.6 結果

C末端領域をPCRで増幅し、pGFPuvベクターへ挿入することにより、GFP遺伝子との融合プラスミドを構築した。これを*E. coli* BL21(DE3)pLysS株へ形質転換し、IPTG添加した寒天培地に形成したコロニーにUVを照射したところ、蛍光を発することが確認された。以上のことからC末端 - GFP融合蛋白質が発現し、その融合蛋白質は蛍光を発することが確認できた(Fig.2.1)。

この形質転換体を用いてGFP-C末融合タンパク質を精製するため、大量発現を試みた。しかし、目的のタンパク質は発現するものの、封入体を形成してしまっていたため、培養条件を検討した。そこでIPTGの添加濃度を下げ、さらに28°Cで培養することにより可溶性画分に回収することができた(Fig.2.2)。

次に精製方法を検討した。細胞破碎液から、飽和濃度10～40%の硫酸沈殿により目的タンパク質を含む画分を回収し、このサンプルをさらに疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を用いて分画した。HICの活性画分を回収し、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ活性画分を集めた。この段階である程度の精製が確認できた(Fig.2.2)。

このサンプルを用いて、赤潮に対する作用を試験した。部分精製したC末 - GFP融合タンパク質を*S. costatum*培養液に添加し人工気象器で数日間培養後、蛍光顕微鏡で観察した。しかし、*S. costatum*の自家蛍光により、融合タンパク質の*S. costatum*細胞への吸着は観察することができなかった。また殺藻活性については検出されなかった(Fig.2.3)。

2.7 考察

本章ではEspIのC末端領域に見られる繰り返し配列に赤潮殺藻に関わる特別な機構が存在していると予想し、研究を進めた。C末端領域のみにGFPを蛍光標識として付加し、その発現に成功した。しかし、赤潮に対してどのような働きを持つか、また、その局在を観察するまでにはいたらなかった。この結果について、赤潮の自家蛍光により観察が困難であるということもその理由の一つではあるが、それ以前に実験方法にも更なる改善の必要性が考えられる。本実験ではC末-GFP融合タンパク質を完全精製せずに用いており、また、*S. costatum*へ添加する濃度などについても検討を行っていない。更には、培養方法として、容器に1.5mlのホワイトチューブを用いたが、生育に光条件が必要な*S. costatum*にとってこの培養環境は不適切であったと考えられる。このように多くの課題が残されたが、これらの点を改善することで、よりよい結果を得られるかもしれない。

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristics	Source or reference
Algae		
<i>Skeletonema costatum</i> NIES-324	Diatom	NIES
Bacteria		
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. A28	Alga-lutic marine bacterium	3
ASPI	<i>aspI</i> deletion-insertion mutant derived from A28, Km ^r	4
<i>E. coli</i>		
MV1184	<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>rpsL</i> , <i>thi</i> ($\phi 80 lacZ \Delta M15$), $\Delta(srl-recA)306::Tn10(tet^r)/F'[traD36, proAB^+, lacI^q, lacZ\Delta M15]$	
HB101	<i>supE</i> 44, $\Delta(mcrC-mrr)$, <i>recA</i> 13, <i>ara</i> -14, <i>proA</i> 2, <i>lacY</i> 1, <i>galK</i> 2, <i>rpsL</i> 20, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>leuB</i> 6, <i>thi</i> -1	
JM109	<i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> , <i>hsdR</i> 17($r_K^- m_K^+$), <i>e</i> 14 ⁻ (<i>mcrA</i>), <i>supE</i> 44, <i>relA</i> 1, $\Delta(lac-proAB)/F'[traD36, proAB^+, lacI^q, supE, thi, \Delta(lac-proAB), \Delta hsd5(r^- m^-), [F', proAB, lacI^q \Delta M1$	Promega
NM522	<i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> (λ CI 857, <i>ind</i> 1, <i>Sam</i> 7, <i>nin</i> 5, <i>lacUV5-T7gene</i> 1), <i>dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)	Promega
BL21(DE3)pLysS	BL21(DE3)pLysS transformant of pEC01~pEC01.5	this study
<i>B. subtilis</i>		
168 trpC2	<i>trpC2</i>	13
<i>B. subtilis</i> [pBS01~pBS01.5]	<i>B. subtilis</i> transformant of pBS01~pBS01.5	this study
<i>B. subtilis</i> [pBS02~pBS02.5]	<i>B. subtilis</i> transformant of pBS02~pBS02.5	this study
Plasmids		
pBluescript KS+	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap ^r	
pUC118	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap ^r	
pGEM-T Easy	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap ^r	Promega
pIVEX2.4c	expression vector, Ap ^r	Roche
pEC01	2.8-kb <i>aspI</i> fragment cloned into the pIVEX2.4c	this study
pEC01.1~pEC01.5	2-kb~2.5-kb <i>aspI</i> deletion fragment cloned into the pIVEX2.4c	this study
pASS3.42	<i>E. coli</i> - <i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain A28 shuttle vector, Ap ^r Km ^r 3	
pPA01	2.8-kb <i>aspI</i> fragment cloned into the pASS3.42	this study
pPA01.1~pPA01.5	2-kb~2.5-kb <i>aspI</i> deletion fragment cloned into the pASS3.42	this study
pHY300PLK	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, Ap ^r Tc ^r	TAKARA
pBS01	2.8-kb <i>aspI</i> fragment cloned into the pHY300PLK	this study
pBS01.1~pBS01.5	2-kb~2.5-kb <i>aspI</i> deletion fragment cloned into the pHY300PLK	this study
pWH1520	<i>E. coli</i> - <i>B. megaterium</i> shuttle vector, Ap ^r Tc ^r	MoBiTec
pBS02	2.8-kb <i>aspI</i> fragment cloned into the pWH1520	this study
pBS02.1~pBS02.5	2-kb~2.5-kb <i>aspI</i> deletion fragment cloned into the pWH1520	this study

□

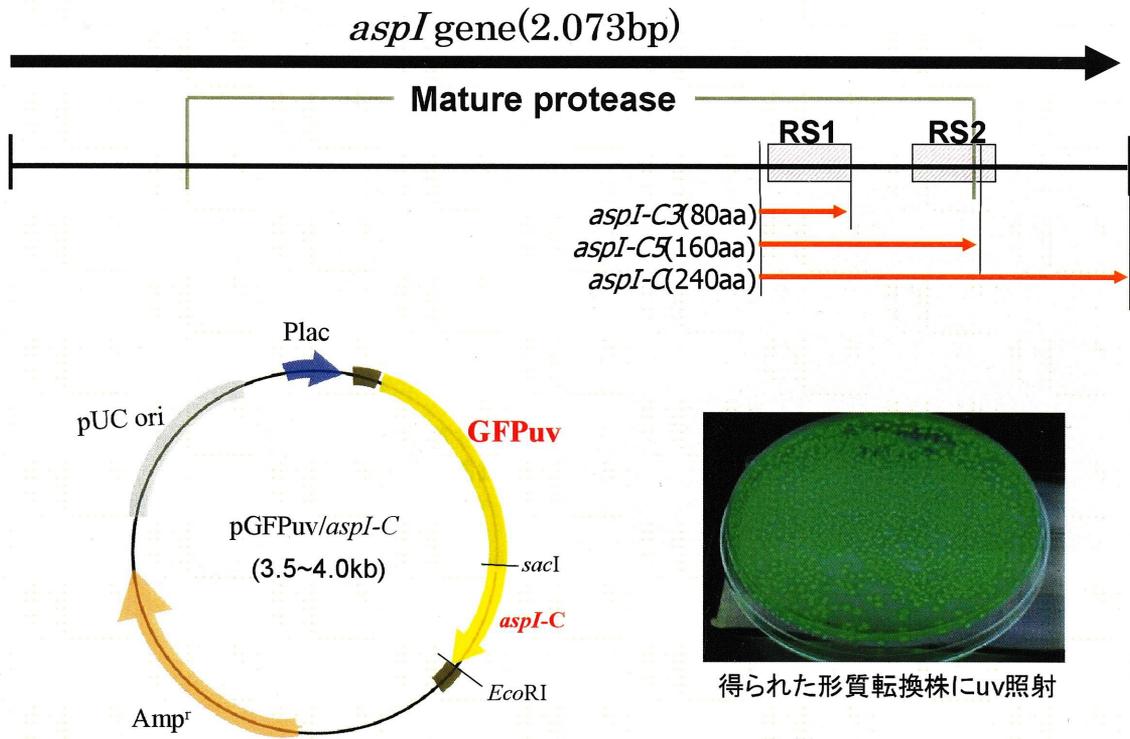


Fig.2.1. GFP-C末融合タンパク質の構築

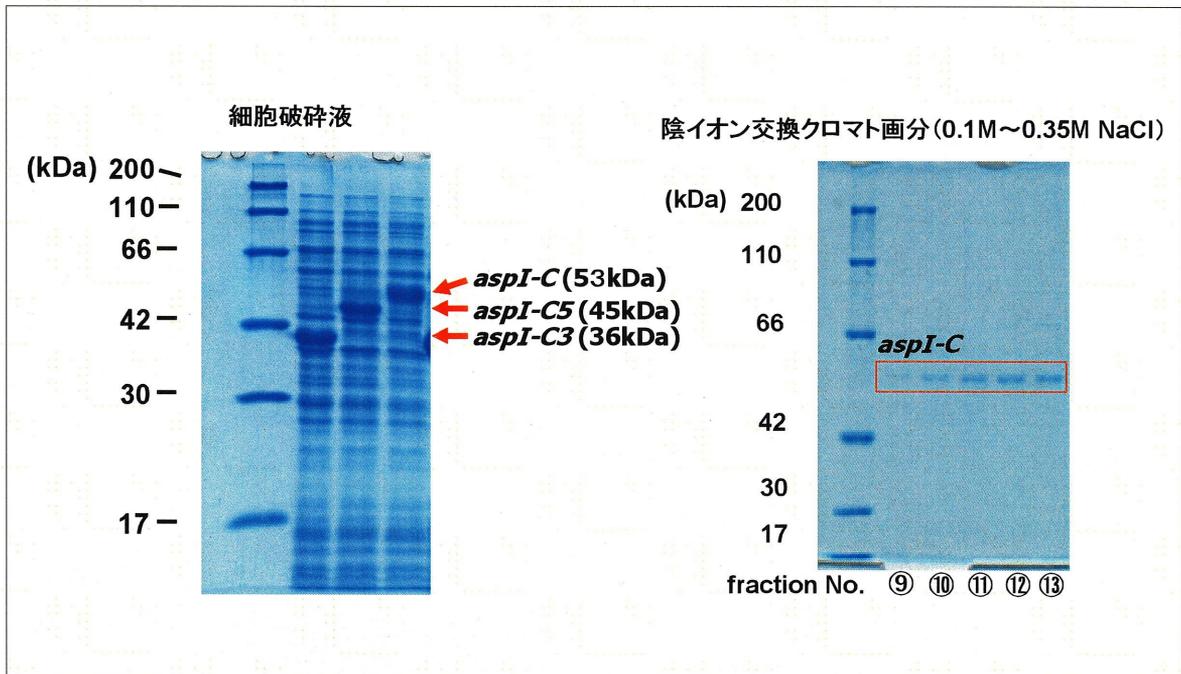


Fig.2.2. 融合タンパク質の大腸菌での発現・精製

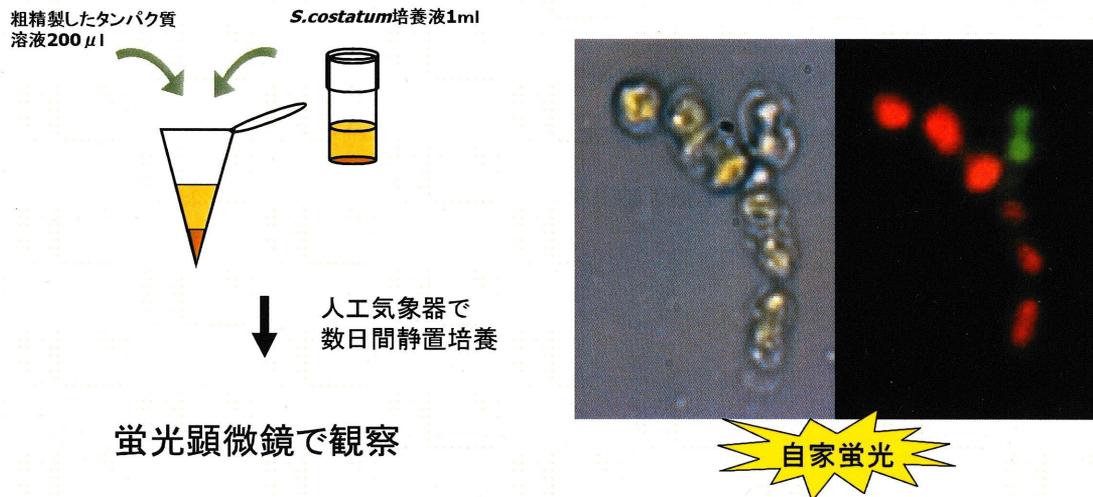


Fig.2.3. 殺藻活性の検出及び局在の観察

第 3 章 赤潮殺藻プロテアーゼ AspI の C 末端 deletion mutant の機能解析

3.1 目的

第 2 章では、C 末端領域のみを用いてその機能を解析することを試みたが、その機能を決定付けるような結果を得ることはできなかった。そこで、本章では、プロテアーゼ全体に視点を移し、C 末端領域を削ることによって EspI 変異蛋白質がどのような活性を持つのか、その機能を解析することにした。

3.2 使用赤潮藻

赤潮藻類として、*S.costatum* NIES-324 株を用いた。

3.3 使用菌株及びプラスミド

本研究で用いた菌株及びプラスミドの詳細については Table 1 に示した。

3.4 使用培地及び培養条件

赤潮藻類 *S. costatum* の培養には改変 SWM-III 培地を用いた。培養条件は、人工気象器 (NK system BIOTRON) にて 22°C、 $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ の白色蛍光 14 時間照射、10 時間暗条件で静置培養した。

殺藻微生物 *Pseudoalteromonas* sp.A28 株の培養には改変 SWM-III 培地に 0.1% カシトン (Difco)、0.05% 酵母エキス (Nacalai tesque) を添加した培地 (以後、ASWM 培地と略す) を用いた。また形質転換においては LBN 培地を用いた。培養温度はすべて 28°C にて行った。

E. coli 及び *B. subtilis* の培養には 2 × Y T 培地または LB 培地に必要に応じて抗生物質を加えて用いた。通常の培養では 37°C、一晚培養した。

培地の詳しい組成及び抗生物質の濃度等については付録に示す。

3.5 実験方法

3.5.1 *espI* の C 末端 deletion plasmid の構築

EspI の C 末端欠失蛋白質をコードする *espI* deletion 遺伝子を PCR により構築した。プライマーは以下のようにそれぞれ設計した。それぞれの deletion mutant のアミノ酸配列は Fig.1 に示す。

N 末端側

5' GAG TAA TCA CCA CGT AAT GCG TGC 3'

C 末端側

PIAS1 5' TTA TTA TGA TGC TGC TGC CAC AGC GGC TGC 3'

PIAS2 5' TTA TTA ACC TGT ACC GCC ACT CAT TGT GAA 3'

PIAS3 5' TTA TTA TTC GTT GTT ACC GCC TTT ATA CGG 3'

PIAS4 5' TTA TTA AGA AGT TGT TAA ATC ACC CAC AAG 3'

PIAS5 5' TTA TTA ACC TGA ACC ACC AGA CGT CGT AAC 3'

3.5.2 *E. coli*における *EspI* deletion mutant の発現

espI とその deletion 遺伝子を大腸菌発現ベクター pIVEX2.4c(Roche diagnostics)へ T7 プロモーターと同じ向きにクローニングした。PCR 産物を *EcoRI* で切断し、*EcoRI* 及び *SmaI* で切断した pUC118 へ挿入した。これをさらに *EcoRI* 及び *BamHI* で断片を切り出し、*espI* から *EcoRI* 及び *SaI* で切り出したプロモーター領域の断片と共に *SaI* 及び *BamHI* で切断した pIVEX2.4c へ挿入した(Fig.3.1)。*espI* については pBluescript II KS+へすでにクローニングされているので、これを *SaI* 及び *BamHI* で切断し、同じく *SaI* 及び *BamHI* で切断した pIVEX2.4c へ挿入した。結果得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株へ導入した。得られた形質転換株をアンピシリン添加の LB 培地で 37°C に保ち培養し、0.1mM の IPTG により発現を誘導した。

3.5.3 *Pseudoalteromonas* sp. A28 株における *EspI* deletion mutant の発現

次に *Pseudoalteromonas* sp. A28 株を用いて *EspI* とその誘導体の発現を試みた。*espI* とその deletion 遺伝子を *E. coli*-*Pseudoalteromonas* シヤトルベクター pASS3.42 へクローニングした。3.5.2 で構築した pUC118/*espI* シリーズを *EcoRI* 及び *XbaI* で切断し、*espI* から *EcoRI* 及び *SaI* で切り出したプロモーター領域の断片と共に *XbaI* 及び *XhoI* で切断した pASS3.42 へ挿入した(Fig.3.2)。*espI* については *XbaI* 及び *XhoI* で切断し同じく *XbaI* 及び *XhoI* で切断した pASS3.42 へ挿入した。

宿主には、A28 株のゲノム上で野生型 *espI* 遺伝子を遺伝子組み換え技術により破壊し ESPI と称した *espI* 変異株を用いた。この株に得られたプラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入した。

3.5.4 *Bacillus subtilis* における *EspI* deletion mutant の発現

次に *B. subtilis* を用いて EspI とその誘導体の発現を試みた。*B. subtilis* は細胞外タンパク質など毒性の強いタンパク質の過剰発現に宿主としてしばしば用いられる。

3.5.4.1 発現プラスミドの構築

espI とその deletion 遺伝子は *E. coli*-*B. subtilis* シャトルベクター pHY300PLK(Takara)へテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターと同じ向きにクローニングした。3.5.2 で構築した pUC118/*espI* シリーズを *EcoRI* 及び *XbaI* で切断し、*espI* から *EcoRI* 及び *SaI* で切り出したプロモーター領域の断片と共に *XbaI* 及び *SaI* で切断した pHY300PLK へ挿入した(Fig.3.2)。*espI* については *XbaI* 及び *XhoI* で切断し *XbaI* 及び *SaI* で切断した pHY300PLK へ挿入した。得られたプラスミドを *B. subtilis* 168 株へ導入した。

また、より強力な発現誘導が可能な *E. coli*-*B. megaterium* シャトルベクター pWH1520 (MoBitec) についても同様に *espI* とその deletion 遺伝子のクローニングを行った。*xyIA* プロモーターと同じ向きに挿入した。上記のように構築した pHY300PLK/*espI* シリーズを *XbaI* 及び *SaI* で切断し、同じく *XbaI* 及び *SaI* で切断した pBluescript II KS+へ挿入した。これをさらに *KpnI* 及び *BamHI* で切断し、同じく *KpnI* 及び *BamHI* で切断した pWH1520 へ挿入した。得られたプラスミドを *B. subtilis* 168 株へ導入した。

3.5.4.2 発現サンプルの調整

テトラサイクリン(以下 Tc と略)添加の 2×YT 培地で 37°C、一晚培養した *B. subtilis* 形質転換体を Tc を添加した 10 の LB 培地に 1%接種し、ジャーフェーマンター(MODEL MDS-U MARUBISHI)を用いて 37°C で培養した。通気量は 1.0L/min、攪拌数は 300rpm とした。OD₆₀₀=0.3 になるまで培養し、終濃度 5%になるように xylose を添加した。さらに OD₆₀₀=1.5 になるまで培養し、8000rpm,20min の遠心分離により菌体を除去し上清を回収した。これに 60%飽和の硫酸アンモニウムを加え 4°C で一時間攪拌し、8000rpm,20min の遠心分離によりタンパク質を沈殿させた。沈殿タンパク質は TM バッファー(20mM Tris-HCl (pH7.8), 2mM MgCl₂)に再懸濁し、約 100 倍に濃縮した。この濃縮液を TM バッファーに対し一晚透析しサンプルとした。

3.5.4.3 プロテアーゼ活性測定

プロテアーゼ活性測定法には Charney and Tomarelli の方法を用いた。酵素緩衝液(20mM Tris-HCl

pH7.8)に培養上清を濃縮したサンプルを適当に希釈し、このサンプル 100 μ と基質(酵素緩衝溶液に溶解した 2%のアゾカゼイン(SIGMA))400 μ l とを混合攪拌後、30°Cに保ち反応させた。反応停止液(10% トリクロロ酢酸)500 μ l を加え、激しく攪拌後、15000rpm,5 分間遠心分離し、上清を得た。この上清の 400nm における吸光度を測定することにより遊離のチロシン量を求めた。プロテアーゼ活性は 1 時間に 400nm の吸光度を 1 増加させる酵素量を 1 unit(以下略称 U)とした。

3.5.4.4 電気泳動

タンパク質の確認には SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を用いた。Laemmli 法に従って、分離ゲル 10 - 12.5%、濃縮ゲル 5%のポリアクリルアミドゲルで行った。染色には Coomassie Brilliant Blue R-250(メタノール : 酢酸 : 脱イオン水=2 : 1 : 7)による染色及び銀染色 (シルバーステインキット、ATTO) を用いた。

3.5.4.5 タンパク質濃度の測定

Protein Assay (BioRad) により測定した。Protein Assay 溶液を 5 倍希釈し、この希釈溶液 1 ml に対して適当に希釈したサンプルを 1-10 μ l 加え、ボルテックスにより攪拌した。10 分後、595nm の吸高度を測定した。また同時に既知濃度の BSA を用いて検量線を作成し、これを用いてタンパク質濃度を計算した。

3.5.4.6 プロテアーゼ活性染色

プロテアーゼ活性染色には通常の SDS-PAGE ゲルに 0.5%のスキムミルクを加えた skim milk-SDS-PAGE を用いた。10%の skim milk-SDS-PAGE ゲルで電気泳動を行い、そのゲルを 2.5% Trinton X-100 溶液に浸し 4°Cで 30 分保ち、続いて TM バッファー(20Mm Tris-HCl (pH7.8),2mM MgCl₂) に浸し 37°C、1 時間反応させ、0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。その後、脱色液(メタノール : 酢酸 : 脱イオン水=1 : 1 : 8)によって透明なバンドが現れるまで脱色した。

3.5.4.7 赤潮殺藻活性の検出

赤潮殺藻活性の検出には 2 通りの方法を用いた。

ASWM 寒天培地上で *S. costatum* を数日間培養し、ペーパーディスクにろ過滅菌したサンプルを 10 - 20 μ l 添加してこのプレート上に置き、人工気象器で数日間培養した。ペーパーディスクの周りに形

成されるハローによって殺藻活性を試験した。

一方で、改変 SWM-III 培地 2ml で数日間培養した *S. costatum* に対し、ろ過滅菌したサンプルを 200 μ l 添加し、人工気象器で数日間培養し観察した。

3.5.5 EspI deletion mutant の精製

3.5.5.1 粗酵素液の調整

テトラサイクリンを加えた 2 \times YT 培地で 37 $^{\circ}$ C、一晚培養した *B. subtilis* 形質転換体を、1.5 ℓ の LB 培地に 1%接種し、ジャーファーメンター(MODEL MDS-U MARUBISHI)を用いて 37 $^{\circ}$ Cで培養した。通気量は 1.0L/min、攪拌数は 400rpm とした。OD₆₀₀=0.3 になるまで培養し、終濃度 5%になるように xylose を添加した。さらに OD₆₀₀=1.5 になるまで培養し、8000rpm,20min の遠心分離により菌体を除去し上清を回収した。これに 60%飽和の硫酸アンモニウムを加え 4 $^{\circ}$ Cで一時間攪拌し、8000rpm,20min の遠心分離によりタンパク質を沈殿させた。沈殿タンパク質は TM バッファー(20mM Tris-HCl pH7.8, 2mM MgCl₂)に再懸濁し、約 100 倍に濃縮した。この濃縮液を TM バッファーに対し一晚透析し粗酵素液とした。

3.5.5.2 陰イオン交換クロマトグラフィー

粗酵素液について陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期バッファーには TM バッファーを用いた。カラムは POROS HQ/M (PerSeptive Biosystem) を使用し、溶出は流速 2ml/min で 0~1M の NaCl 濃度勾配によって行った。

3.5.5.3 Mini Prep Cell (調整用電気泳動)

陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、活性画分を集め、Ultra Filter Unit (USY-1, ADVANTEC)により約 5 倍に濃縮した。この試料について Mini Prep Cell(Bio Rad)装置を用いて精製を行った。分離ゲル 8%、濃縮ゲル 4%から成るゲルカラムの Native-PAGE で精製を行った。泳動バッファーと溶出バッファーは 25mM Tris-HCl, 192mM glycine の溶液を用い、電気泳動は 400V, 3mA で行った。溶出流速は 0.1ml/min、分画サイズは 0.2ml とした。詳細な操作方法は添付のマニュアルに従った。

3.5.6 赤潮殺藻活性の検出

Mini Prep Cell により精製した AspI deletion mutant を用い、赤潮殺藻活性の検出を試みた。

3.6 結果

C 末端領域を削った 5 種類の deletion 遺伝子を PCR により増幅し(Fig.3.1.)、発現系を検討するためそれぞれの発現ベクターへ挿入し発現系の検討を行った。

3.6.1 *Escherichia coli*における EspI deletion mutant の発現

PCR により増幅した deletion 遺伝子は *E. coli* 発現ベクター pIVEX2.4c(Roche diagnostics)へ T7 プロモーターと同じ向きにクローニングした(Fig.3.2.)。結果得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株及び JM109(DE3)へ導入した。発現ベクター pIVEX2.4c そのものを導入した BL21(DE3)pLysS はよく生長したが、組み換えプラスミドを導入した形質転換株は大変生長が乏しかった。

3.6.2 *Pseudoalteromonas* sp. A28 株における EspI deletion mutant の発現

大腸菌による EspI deletion mutant の過剰生産が困難なので、*Pseudoalteromonas* sp.A28 株における発現を試みた。*espI* 遺伝子の欠失誘導体は *E. coli* - *Pseudoalteromonas* シャトルベクター pASS3.42(Fig.3.3.)へクローニングした(Fig.3.2.)。これを *Pseudoalteromonas* sp. A28 株の *espI*破壊株 ESPI へ形質転換させるため、エレクトロポレーション法を用いた。ベクターである pASS3.42 については、 $2 \times 10^6 / \mu\text{gDNA}$ の効率で形質転換体を得られた。しかし、様々な条件を検討したが、*espI* やその deletion mutant を組み込んだ pASS3.42 組み換えプラスミドでは形質転換体を得られなかった。

3.6.3 *Bacillus subtilis*における EspI deletion mutant の発現

更なる発現系の検討として、*Bacillus subtilis* を宿主として用いた。*espI* とその欠失遺伝子は *E. coli* *B. subtilis* シャトルベクター pHY300PLK(Tskara)へテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターと同じ向きにクローニングした(Fig.3.2.)。これを *B. subtilis* 168 株へ形質転換した。得られた形質転換体はすべて通常の増殖を示した。*B. subtilis* 形質転換体の培養上清は skimmilk-SDS-PAGE ゲルを用いて解析した。細胞外タンパク質は培養上清に 60%飽和の硫酸アンモニウムを加えて沈殿させた。

沈殿タンパク質は TM バッファー(20mM Tris-HCl pH7.8, 2mM MgCl₂)に再懸濁し、これをサンプルとした。プロテアーゼ活性染色の結果、これら組み換えプラスミドを導入した株に特異的なバンドを検出することができた(Fig.3.4)。しかし、その発現量は大変少量であり、*B. subtilis* 由来のプロテアーゼの発現量をはるかに多く、更なる研究を進めるには困難が生じた。プロテアーゼ活性においてもベクターのみを導入した株と大きな差がなかった。

そこでより効率のよい発現を目指し、発現ベクターを変更した。xylose により発現誘導が可能な *E. coli* *B. megaterium* シャトルベクター pWH1520 を用いた。*espI* とその deletion 遺伝子を XylA プロモーターと同じ向きに挿入した(Fig.3.2)。得られたプラスミドを *B. subtilis* 168 株へ導入した。

この形質転換体において、発現条件を検討した。37°C で OD₆₀₀=0.3 になるまで培養し、xylose の添加により発現の誘導を行った。様々な誘導時間におけるプロテアーゼ活性染色及びプロテアーゼ活性測定を行ったところ、誘導時間が長くなるにつれてプロテアーゼ活性は上昇するが、目的とする *EspI* deletion mutant のプロテアーゼ活性は減少した(Fig.3.5)。

これらの形質転換体から上記と同様にサンプルを調整し、活性染色及びプロテアーゼ活性測定、赤潮殺藻活性の検出を行った。組み換えプラスミドを導入した *B. subtilis* 形質転換体の上清画分には特異的なバンドが検出された。また、これらのサンプルを 1 mM の phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) で処理することにより、これらのプロテアーゼ活性の特異的なバンドは失われた(Fig.3.7)。

また、このサンプルについて赤潮殺藻活性を試験した。結果、コントロールとしてベクターのみを挿入した株を含むすべてのサンプルについて殺藻が確認された(Fig.3.6)。

一方で、*S.costatum* を重層したプレート上に deletion mutant をレプリカし、殺藻活性を試験した。結果、赤潮を殺藻したことが示唆されるハローの形成が確認された(Fig.3.7)。

3.7 考察

本章では、赤潮殺藻プロテアーゼ *EspI* の C 末端領域を削ったタンパク質を構築・発現させ、その変異プロテアーゼとしての機能を解析する目的で実験を進めた。まずこれら deletion 遺伝子の発現にホストとして大腸菌を用いたが、野生株、及び発現ベクター pIVEX2.4c のみを保持する株に比べ著しく生長が乏しかった。これは、これら *EspI* 及びその変異タンパク質が大腸菌にとって有害であり生育に悪影響を及ぼしていると考えられる。

そこで発現系を変更し、次に *EspI* の親株である *Pseudoalteromonas* sp.A28 株をホストとして用い

ることとした。様々な条件でエレクトロポレーションによる形質転換を試みたが、ベクターである pASS3.42 以外は形質転換体を得ることができなかった。pASS3.42 はコピー数約 10 の多コピー数のプラスミドである。したがって *aspI* やこの deletion 遺伝子が *Pseudoalteromonas* sp. ASPI 株の生長に伴い多数増幅されることで、この発現プロテアーゼが生育に有害に働いてしまっていると考えられる。

次に発現系として *B. subtilis* について検討した。*B. subtilis* はプロテアーゼなどの多くの細胞外タンパク質を生産しており、毒性にも強く、細胞外タンパク質の過剰発現に宿主としてしばしば用いられる。そこで AspI の発現系としても利用できるのではないかと考えた。まず、*E. coli* *B. subtilis* シャトルベクターである pHY30PLK を用いてこれら変異遺伝子をクローニングし、*B. subtilis* へ形質転換して発現を行った。プロテアーゼ活性染色の結果、ベクターのみを保持する *B. subtilis* と比較して、AspI とその誘導体を導入した株の上清フラクションにはそれぞれ特異的なプロテアーゼのバンドが検出された。しかし、宿主である *B. subtilis* 自身の有するプロテアーゼのバンドに比べ著しく発現量が少なく、またプロテアーゼ活性にも AspI の活性であると示唆されるような大きな差が現れなかった。これでは、バックグラウンドが高すぎるため以後の実験に用いることが困難であり、また精製するには少量すぎる。そこで、より効率よく大量に発現させる方法を検討した。*E. coli* *B. megaterium* シャトルベクターである pWH1520 は、xylose オペロンを持ち、xylose による発現調節・誘導が可能である。このベクターが *B. subtilis* にも利用できないかと考え、プラスミドを構築し形質転換を試みた。結果、形質転換体を得ることができたので、この株を用いて発現させることにした。発現条件の検討により、xylose による誘導が長すぎると細胞外に分泌された AspI の活性は低下していくことが分かった。これは、AspI が大量に発現しすぎて自己分解を起こしている、または *B. subtilis* 由来のプロテアーゼによって分解されている、あるいは過剰な発現で封入体を形成してしまっている、などの要因が考えられる。結果、OD₆₀₀=0.3 で xylose 添加後 OD₆₀₀=1.5~2.0 になるまで培養し、上清を回収することで最も効率的な発現を行うことができた。また、このように早い段階で回収することで他の *B. subtilis* 由来のタンパク質（特にプロテアーゼ）発現も少量に抑えられることが結果として示された。

後者の発現系を用いて、それぞれ活性染色により発現を確認したところ、AspI 及びその deletion mutant すべてにおいて、特異的なプロテアーゼのバンドが検出された。0.1mM の PMSF 処理を行うと、このバンドは失われた。これはこのバンドがセリンプロテアーゼであることを意味する。以上の結果から、AspI 及びその deletion mutant は *B. subtilis* において細胞外タンパク質として発現し、これらはすべてプロテアーゼ活性を保持していることが示唆された。C 末端の繰り返し配列の存在はプ

ロテアーゼ活性には関与していないと言えるであろう。

さて、C 末端領域はプロテアーゼ活性とは無関係であると考えられるが、それではやはり赤潮殺藻に関与しているのではないかという更なる期待が持たれるところである。そこで、これらの発現プロテアーゼについて赤潮殺藻活性の検出を試みた。上清を濃縮した段階でのサンプルでは、ベクターのみを保持する *B. subtilis* の培養上清でも赤潮が殺藻されてしまった。これは、*B. subtilis* が目的のプロテアーゼ以外にも様々な細胞外タンパク質を分泌していることから、赤潮の生育に有害な物質が含まれているのではないかと考えられる。したがって、このまま殺藻活性の検出に用いるのは困難であり、更なる精製の必要性が示唆された。

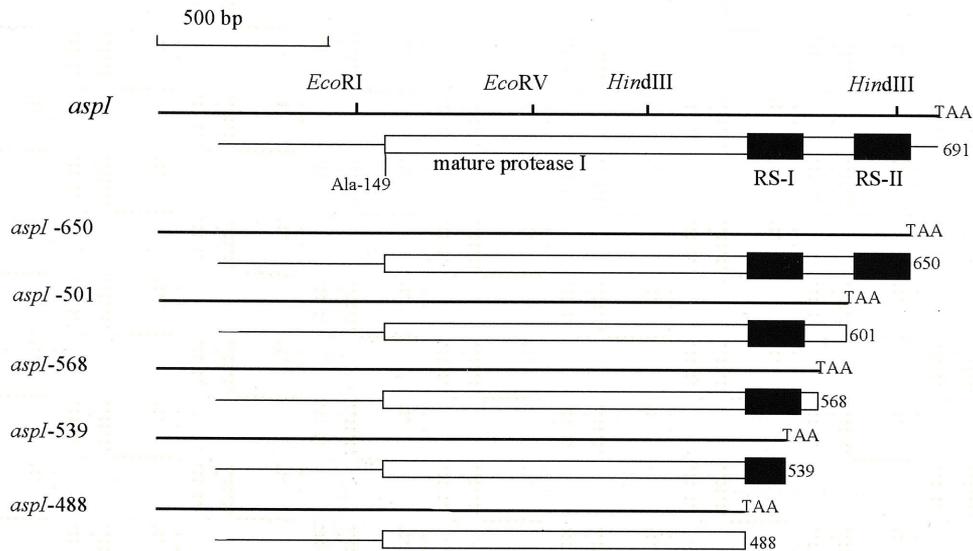


Fig.3.1. C末端領域deletion mutantの構築

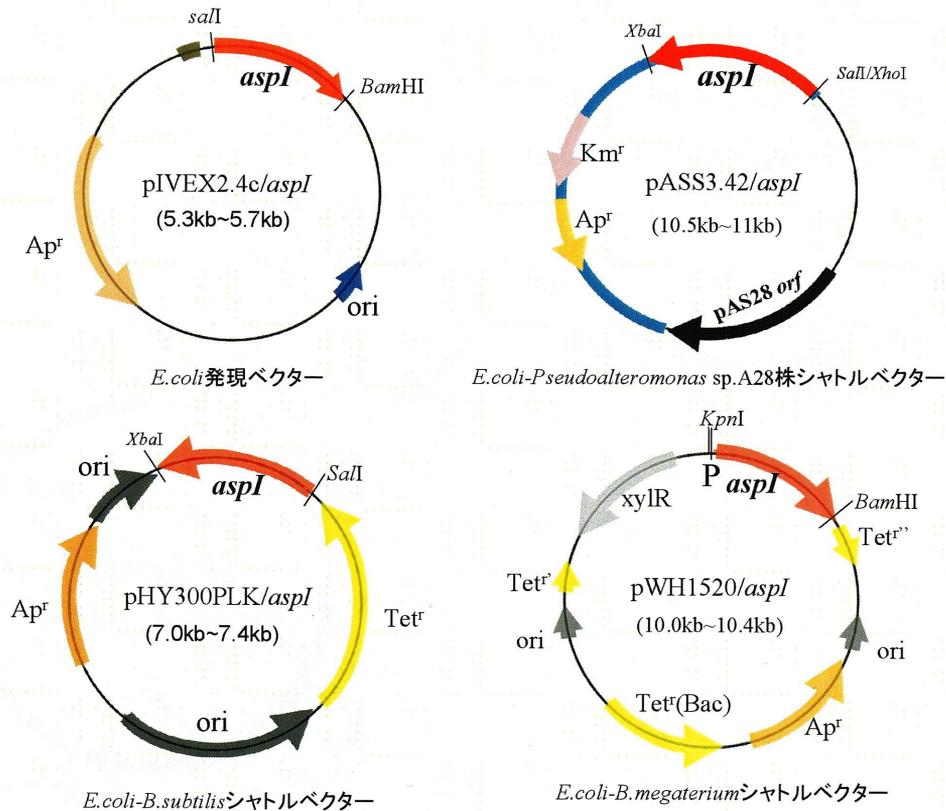


Fig.3.2. 発現プラスミドの構築

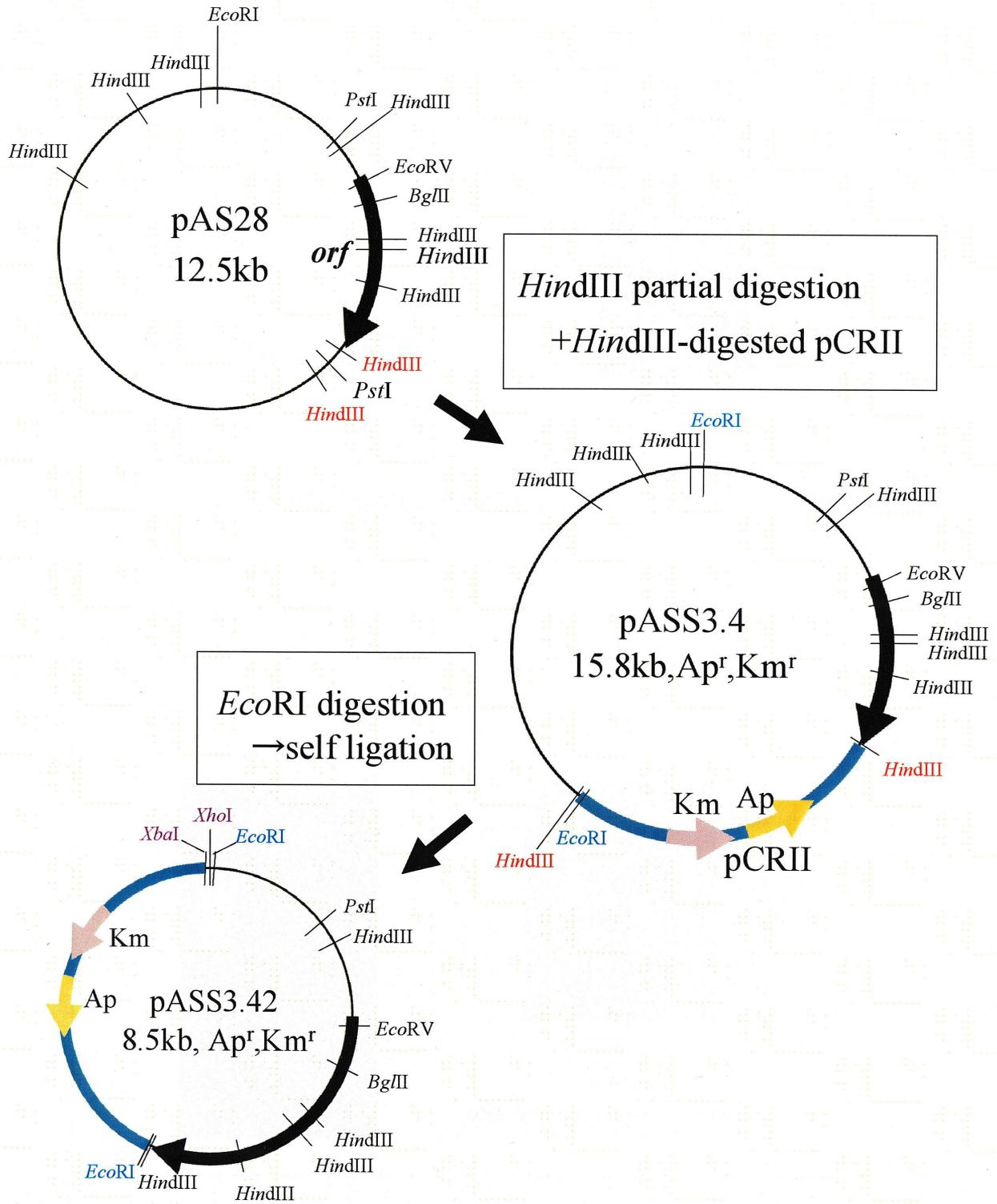


Fig.3.3. *E.coli*-*Pseudoalteromonas* sp.A28株シャトルベクター

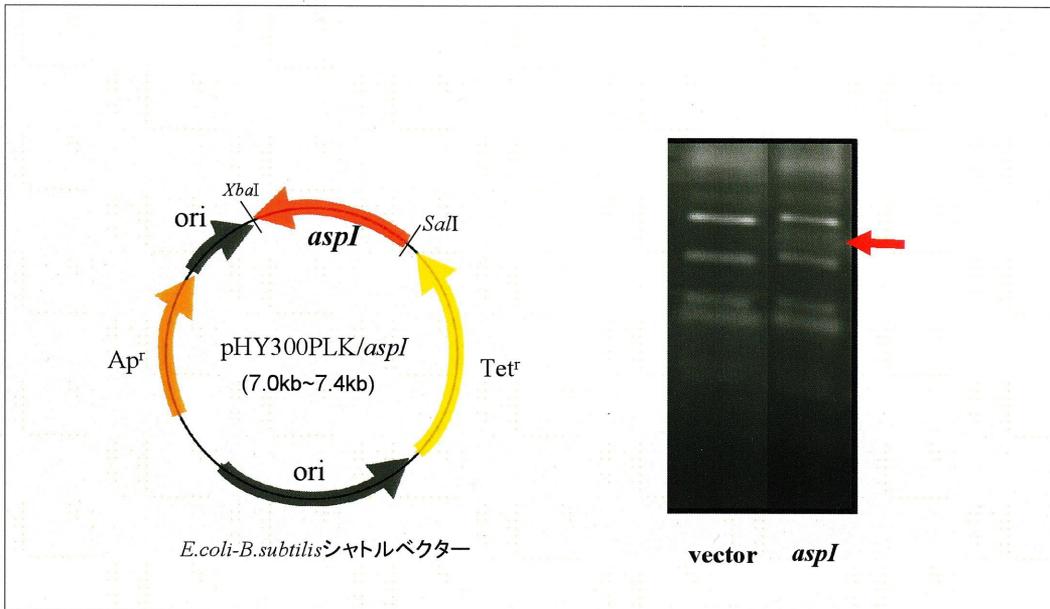


Fig 3.3. *B. subtilis*[pPHY300PLK]によるプロテアーゼ発現

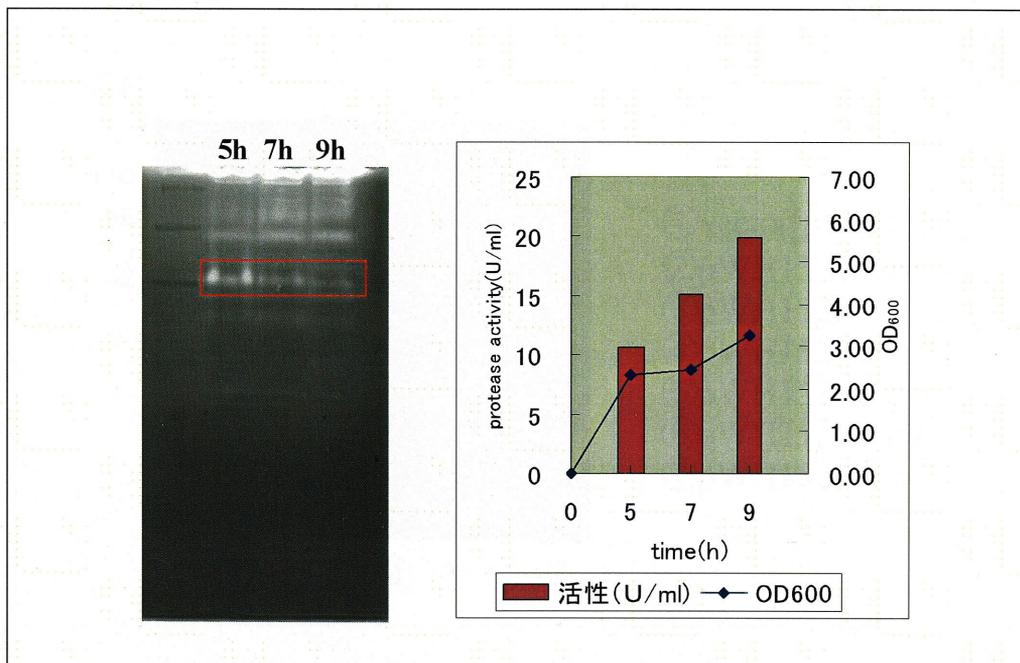


Fig.3.4. xyloseによる誘導時間の検討

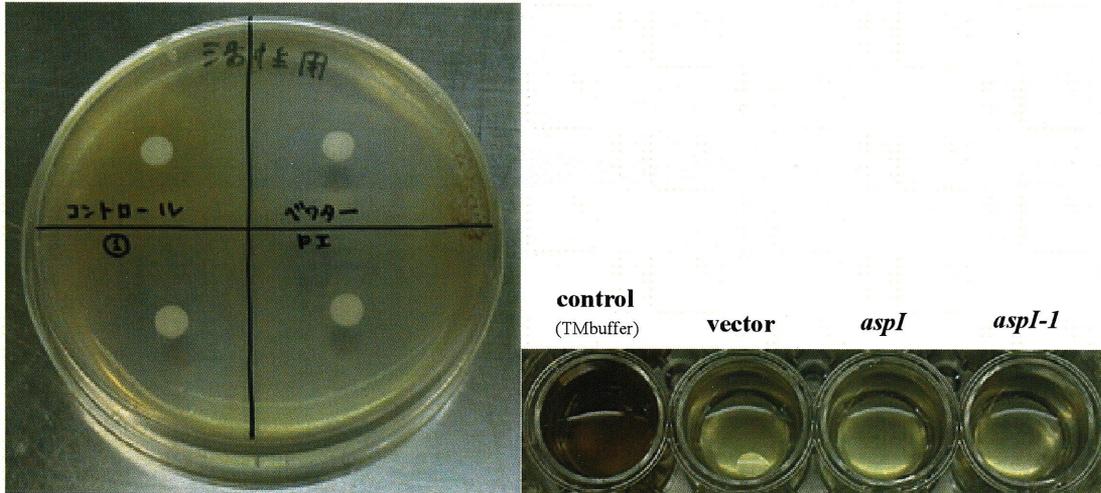


Fig.3.5. 上清サンプルによる*S.costatum*殺藻

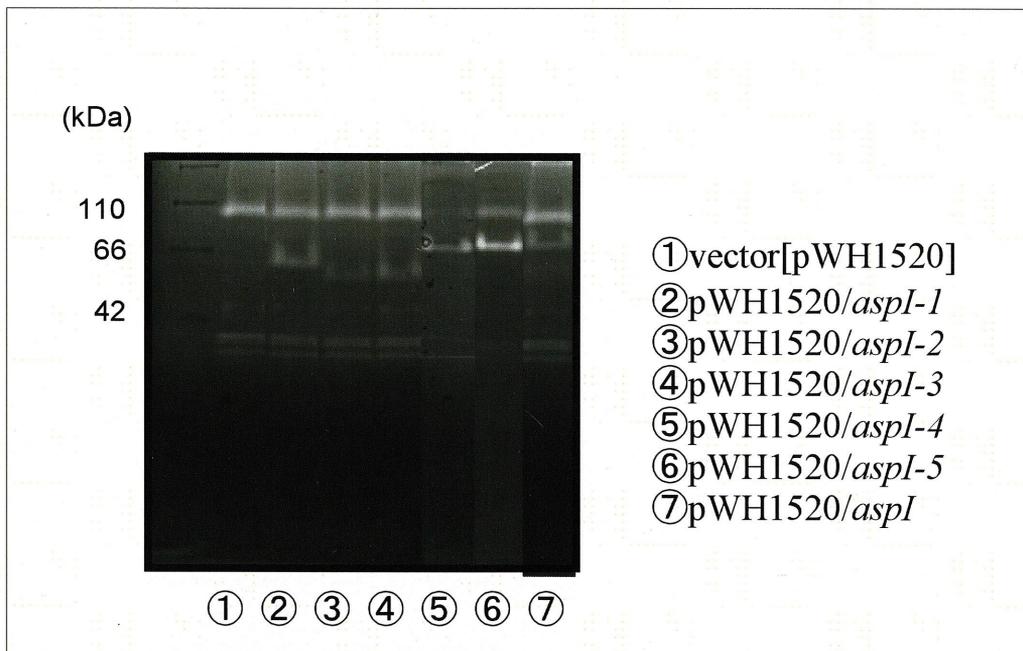


Fig.3.6 deletion mutantの発現プロテアーゼ活性染色

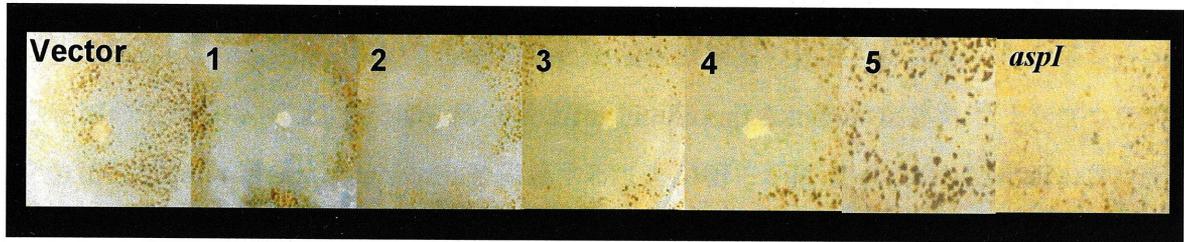


Fig.3.7. 二者培養による殺藻活性検出

第 4 章 総括

当研究室では、A28 株を用いて赤潮藻類と赤潮殺藻細菌の相互関係について分子レベルで解析を進めているが、これまでに、*Pseudoalteromonas* sp.A28 株は菌体外セリンプロテアーゼを分泌し *Skeletonema costatum* を殺藻することが明らかになっており、市販のプロテアーゼは殺藻能力を持たないことから、この殺藻プロテアーゼにはプロテアーゼ活性のみならず特別な機構が存在していることが示唆されてきた。さらに、赤潮殺藻プロテアーゼ EspI のクローニングに成功している。そこで、本研究ではこの EspI を解析することによる殺藻メカニズムの詳細な解明を目的とした。EspI のアミノ酸配列より、C 末端領域には 2 つの繰り返し配列が存在しており、この領域に赤潮殺藻に関わるメカニズムが存在すると仮定し研究を進めた。

そこでまず、C 末端領域がどのような機構を持つのかを調べるため、C 末端領域のみに GFP を蛍光標識として付加し、大腸菌を用いた発現に成功した。しかし、赤潮に対してどのような働きを持つか、その局在を観察するまでには至らなかった。より高濃度な発現と精製法の確立、また自家蛍光を防ぐような観察方法の確立、*S. costatum* へ添加する濃度の検討など、今後さらなる改善が必要とされる。

次に、プロテアーゼ全体に視点を移し、C 末端領域を削ることによって EspI mutant がどのような活性を持つのか、その機能を解析することにした。赤潮殺藻プロテアーゼ EspI の C 末端領域を削ったタンパク質を構築・発現させ、その変異プロテアーゼとしての機能を解析する目的で実験を進めた。まずこれら deletion 遺伝子の発現に宿主として大腸菌を用いたが、野生株、及び発現ベクター pIVEX2.4c のみを保持する株に比べ著しく生長が乏しかった。これは、これら AspI 及びその変異タンパク質が大腸菌にとって有害であり生育に悪影響を及ぼしていると考えられる。そこで発現系を変更し、次に EspI の親株である *Pseudoalteromonas* sp.A28 株を宿主として用いることにした。しかしベクターである pASS3.42 以外は形質転換体を得ることができなかった。pASS3.42 は多コピープラスミドであるため、大量に発現することで、この発現プロテアーゼが *Pseudoalteromonas* sp.A28 株の生育を阻害してしまっていると考えられる。そこで次に *B. subtilis* について検討した。*B. subtilis* はプロテアーゼなどの多くの細胞外タンパク質を生産しており、毒性にも強く、細胞外タンパク質の過剰発現に宿主としてしばしば用いられる。そこで EspI の発現系としても利

用できるのではないかと考えた。まず、*E. coli*・*B. subtilis* シャトルベクターである pHY30PLK を用いてこれら変異遺伝子をクローニングし、*B. subtilis* へ形質転換して発現を行った。プロテアーゼ活性染色の結果、ベクターのみを保持する *B. subtilis* と比較して、EspI とその誘導体を導入した株の上清フラクションにはそれぞれ特異的なプロテアーゼのバンドが検出された。しかし、宿主である *B. subtilis* 自身の有するプロテアーゼのバンドに比べ著しく発現量が少なく、またプロテアーゼ活性にも AspI の活性であると決定付けるような大きな差が現れなかった。これでは、バックグラウンドが高すぎるため以後の実験に用いることが困難であり、また精製するには発現量が少なすぎる。そこで、より効率よく大量に発現させる方法を検討した。xylose による発現調節・誘導が可能な *E. coli* *B. megaterium* シャトルベクター pWH1520 について、*B. subtilis* にも利用できないかと考え、プラスミドを構築し形質転換を試みた。結果、形質転換体を得ることができたので、この株を用いて発現を試みた。発現条件の検討により、OD₆₀₀=0.3 で xylose 添加後 OD₆₀₀=1.5~2.0 になるまで培養し、上清を回収することで最も効率的な発現を行うことができた。また、このように早い段階で回収することで他の *B. subtilis* 由来のタンパク質（特にプロテアーゼ）発現も少量に抑えられることが結果として示された。それぞれ活性染色により発現を確認したところ、EspI 及びその deletion mutant すべてにおいて、特異的なプロテアーゼのバンドが検出された。PMSF 処理によりこのバンドは失われることから、これはセリンプロテアーゼである。以上の結果から、AspI 及びその deletion mutant は *B. subtilis* において細胞外タンパク質として発現し、これらはすべてプロテアーゼ活性を保持していることが示唆された。C 末端の繰り返し配列の存在はプロテアーゼ活性には関与していないと言えるであろう。一方で、それではやはり赤潮殺藻に関与しているのではないかという更なる期待が持たれるところである。そこで、これらの発現プロテアーゼについて赤潮殺藻活性の検出を試みた。上清を濃縮した段階でのサンプルでは、ベクターのみを保持する *B. subtilis* の培養上清でも赤潮が殺藻されてしまった。これは、*B. subtilis* が目的のプロテアーゼ以外にも様々な細胞外タンパク質を分泌していることから、赤潮の生育に有害な物質が含まれているのではないかと考えられる。したがって、この状態でのサンプルを殺藻活性の検出に用いるのは不適當であり、更なる精製の必要性が示唆された。

本研究では C 末端領域を削ったプロテアーゼの構築・発現に成功し、これらすべての deletion mutant についてプロテアーゼ活性を保持することが明らかになった。しかし赤潮

殺藻活性を明らかにすることはできず、殺藻機構の解明までには至らなかった。

Pseudoalteromonas sp. A28 株のプロテアーゼが持つ殺藻機構とは、*S. costatum* の細胞表面の何らかの物質を認識して結合し、その後蛋白質分解活性で *S. costatum* を溶解するのではないかと考えている。その認識機構が C 末端領域に存在すると予想すると、C 末端領域を削ったプロテアーゼは殺藻能力が失われるはずである。まずはこれを明らかにし、更にその詳細なメカニズムを解明することで、赤潮殺藻認識結合に関与する領域を特定できるであろう。更にこれを用いて特定の生物に結合するように操作してやれば、その特定の生物を特異的にピンポイント攻撃するような「分子レーダー爆弾」の構築が可能となり、*S. costatum* だけでなく各地で猛威をふるっている他の様々な赤潮藻類に対しても応用できるようになるかもしれない。一刻も早く実用化に向けて考察され、地球に優しい微生物農薬が実用化されることを切に願っている。

参考文献

- [1] 岡市友利：赤潮の科学, pp20. 恒星社厚生閣
- [2] Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguchi, and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima bay, Japan. *Fish Sci.*61:618-636.
- [3] Kato, J., J. Amie, Y. Murata, A. Kuroda, A. Mitsutani, and H. Ohtake. 1998. Development of a genetic transformation system for an alga-lysing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2061-2064.
- [4] Lee, S. -O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani, and H. Ohtake. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4334-4339.
- [5] Lee, S. -O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani, and H. Ohtake. 2000. Purification and characterization of the algicidal extracellular serine protease of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. *Proceeding of ISEB 2000 Kyoto, Japan*:1061-1065.
- [6] Tsujibo, H., Y. Toshida, C. Imada, Y. Okami, K. Miyamoto, and Y. Inamori. 1991. Isolation and characterization of a chitin degrading marine bacterium belonging to the genus *Alteromonas*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57:2127-2131.
- [7] Tsujibo, H., K. Miyamoto, K. Tanaka, Y. Kaidzu, n C. Imada, Y. Okami, and Y. Inamori. 1996. Cloning and sequence analysis of a protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas* sp. Strain O-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1284-1288.

- [8] Windhorst, S., E. Frank, D. N. Georgieva, N. Genov, F. Buck, P. Borowski, and W. Weber. 2002. The major extracellular protease of Nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. J. Biol. Chem. 277:11042-11049.
- [9] Lee, S. O., J. Kato, K. Nakashima, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2002. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:1366-1369.
- [10] Cheng, J. C., C. P. Shao, and L. I. Hor. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the protease gene of *Vibrio vulnificus*. Gene 183:255-257.
- [11] Shimoi, H., Y. Imamura, T. Obata, and M. Tadenuma. 1992. Molecular structure of *Rarobactor faecitabidus* Protease I. J. Biol. Chem. 267:25189-25195.
- [12] Chen, L. C. M., T. Edelstein, and J. Maclachlin. 1969. *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. J. Phycol. 5:211-220.
- [13] Vagner, V., E. Dervyn and S. D. Ehrlich. 1998. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. Microbiology 144:3097-3.

付録

1. 主な使用培地

1) 改変 SWM-III 培地(*S. costatum* 保存用培地)

NaNO ₃	2.0mM
NaH ₂ PO ₄	0.1mM
Na ₂ SiO ₃	0.2mM
Na ₂ EDTA	0.03mM
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.002mM
Tris	500mg
P-I metals	10ml
filtered sea water	1000ml
S-3 vitamins	2ml

1-1) P-I metals mixture(in 10ml)

H ₃ BO ₃	1mmol
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.035mmol
ZnCl ₂	0.004mmol
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.001mmol
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.000001mmol

1-2) S-3 vitamins mixture(in 2ml)

B1·HCl	0.5mg
Ca·Pantothenate	0.1mg
Nicotinic acid	0.1mg
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	10.0 μg
Biotin	1.0 μg
Inositol	5.0mg
Folic acid	2.0 μg
Thymine	3.0mg
VitaminB12	1.0 μg

赤潮殺藻細菌が生産する赤潮殺藻プロテアーゼの殺藻分子機構の解明

2) ASWM 培地 (殺藻微生物保存用培地)

Bacto-cacitone (Difco)	1.0g
Yeast extract (Nacalai tesque)	0.5g
改変 SWM-III 培地	1000ml

2-1)人工海水

NaCl	24.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.4g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.1g
KCl	0.7g
<hr/>	
Deionized Water	1000ml

3) LBN 培地 (殺藻微生物形質転換用培地)

peptone	16g
Yeast extract	5g
NaCl	24g
<hr/>	
DW	1000ml

4) 2×YT 培地

peptone	16g
Yeast extract	10g
NaCl	5g
<hr/>	
DW	1000ml

5) LB 培地

peptone	10g
Yeast extract	5g
NaCl	5g
<hr/>	
DW	1000ml

2. 抗生物質濃度

アンピシリン	100 μg/ml
カナマイシン	50 μg/ml
テトラサイクリン	10 μg/ml