

平成18年3月修了  
博士（工学）学位論文

新規海洋細菌が産生する色素ヴィオラセインとその抗腫瘍作用

Violacein Produced by Novel Marine Bacteria and its Anti-tumor Properties

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻

学籍番号 1076029

矢田 修一

Shuichi Yada



## **Abstract**

### **Violacein Produced by Novel Marine Bacteria and its Anti-tumor Properties**

Novel marine bacteria producing a purple pigment were isolated from the Pacific coast of Japan, and the purple pigment was identified as violacein. It was also found that the pigment induced apoptosis of leukemia cells.

Violacein is a pigment produced by *Chromobacterium violaceum* isolated from soil and water in tropical and subtropical areas. It is known that violacein from *C. violaceum* has anti-trypanosome and anti-tumor activities. These activities suggested the possibility of using violacein for the therapeutic purposes. Because of the importance of violacein, the DNA sequence of whole genome of *C. violaceum* was recently determined. However, *C. violaceum* can also act as an opportunistic pathogen for animals and human, and cause fatal septicemia accompanied with liver and lung abscesses. Therefore mass production of violacein using *C. violaceum* was thought to be difficult. On the other hand, violacein-producing novel marine bacteria isolated and characterized in this study are unlikely to be infectious to human because they could not survive at 37 °C, the temperature of human body. Therefore, the pigment-producing marine bacteria may meet the requirements for the mass production of violacein.

In the first chapter, we discussed the identification of 13 strains of marine bacteria which produced a purple pigment. These strains were divided into two groups based on their partial sequences of 16S rDNA. Nearly complete 16S rDNA sequences of two bacteria (strain 520P1 and strain 710P1) selected from each group were determined. The determined sequences showed close homologies of 99% and 97% to that of *Pseudoalteromonas denitrificans*. However, other properties of the isolated bacteria including the denitrification activity, the

utilization of various carbon sources, growth temperatures and the produced pigments indicated that they were different bacteria from *P. denitrificans*. Thus, the sequences of 16S rDNA of novel bacteria (*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 and *Pseudoalteromonas* sp. 710P1) were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ).

In the second chapter, we discussed the identification of the purple pigment from *Pseudoalteromonas* sp. 520P1. The properties of the purple pigment were compared to those of violacein from *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, using UV-VIS spectra, HPLC and MS. The UV-VIS spectra, the elution profiles in HPLC analysis, and the ions detected in MS analysis all indicated that the properties of the pigment were identical to those of violacein. Further analysis of the pigment by NMR revealed that the pigment showed typical spectra for violacein. Thus, the purple pigment from *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 was identified as violacein.

In the third chapter, we studied the anti-tumor properties of the purple pigment on leukemia cell lines U937 and HL60. The pigment from *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 inhibited the growth of leukemia cells and killed the cells at higher concentrations of the pigment. The  $IC_{50}$  values of the pigment were 0.5-0.6 $\mu$ M. After the addition of the pigment to leukemia cells, activated caspases were detected in the pigment-treated cells. These results indicated that the pigment caused the cell death by inducing apoptosis.

In conclusion, the purple pigment-producing bacteria characterized in this study were identified to be novel bacteria belonging to the genus *Pseudoalteromonas*. The pigment produced by the bacteria was identified as violacein. It was also found that the pigment induced apoptosis of leukemia cells. Since the bacteria are not likely to be infectious to human, they can be a possible source for the mass production of violacein.

## 目次

英文要旨 ( Abstract )	3
概要	7
緒言	10
第一章 青紫色素産生細菌の同定	
前書き	12
材料と方法	13
結果	14
DNA 塩基配列	14
生理的性質	17
考察	18
第二章 青紫色素の同定	
前書き	20
材料と方法	20
結果	21
色素の抽出・精製	21
紫外・可視吸収スペクトル	21
HPLC	22
MS、 MS/MS スペクトル	23
NMR スペクトル	24

考察	27
第三章 青紫色素の白血病細胞に対する細胞毒性	
前書き	28
材料と方法	29
結果	31
色素の細胞毒性	31
細胞死の機構	33
考察	34
総括	36
謝辞	38
参考文献	39
参考論文	43

## 概 要

### 新規海洋細菌が産生する色素ヴィオラセインとその抗腫瘍作用

室戸海洋深層水より青紫色素を産生する新規細菌を見だし、この色素をヴィオラセインと同定した。またこの色素が白血病細胞 HL60、U937 に対してアポトーシスの誘導による細胞死を引き起こすことを見出した。

ヴィオラセインは、熱帯・亜熱帯地方の土壌や水域から分離される細菌である *Chromobacterium violaceum* の産生する色素である。この色素は、熱帯・亜熱帯地方の風土病の病原体トリパノソーマに対して抗生作用を持つことからその治療薬として研究が進められてきた。また、最近では腫瘍細胞に対して細胞死を引き起こすことが報告されている。この色素がもつ生理活性の重要性から *C. violaceum* のゲノムの全塩基配列決定がブラジルの国家プロジェクトとして行われた。しかしながら、*C. violaceum* は、日和見感染細菌であり、感染した場合重篤な敗血症を引き起こすことが知られている。このため、大量培養による色素の工業的生産は難しく、結果として色素を十分利用することは行われていない。一方、本研究で得られたヴィオラセインを産生する新規細菌は、人の体温である 37℃ では生存できないため、人体に対して病原性をもつ可能性は少ないと考えられる。そのため、この海洋細菌を *C. violaceum* の代わりにヴィオラセインの大量生産に用いることができると考えられる。

第一章では、室戸海洋深層水から分離された 13 株の青紫色素産生細菌の同定について述べた。13 株の分離細菌の 16S rDNA の部分塩基配列を決定し、そのうち 228 塩基を比較した。その結果、13 株の細菌は、同じ配列を持つ 3 株と、この配列と 3 塩基異なる配列を持つ 10 株の 2 群に分かれた。この 2 群のうち最も早く分離され、その性質についての解明が進んでいた 520P1 株と 710P1 株を代表株として用い、16S rDNA のほぼ全長にわたる塩基配列と生理的性質に基づく同定を行った。その結果、16S rDNA の塩

基配列から両者とも *Pseudoalteromonas denitrificans* に近縁な細菌であることが分かった。特に 520P1 株の DNA 塩基配列は *P. denitrificans* の塩基配列に 99%の相同性を示した (710P1 株は 97%の相同性)。しかし、520P1 株および 710P1 株は、産生する色素、脱窒作用、糖等の資化、生育温度などその生理的性質において、*P. denitrificans* の性質と大きく異なっており、同属ではあるが異なる細菌であることが判明した。そこで分離細菌を *Pseudoalteromonas* 属の新規細菌、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 および *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 とし、その 16S rDNA 塩基配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した。

第二章では、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素の同定について述べた。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素と *P. luteoviolacea* の産生する青紫色素 ヴィオラセインの比較を、紫外・可視吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析 (MS) を用いて行った。その結果この 2 つの色素の性質は、紫外・可視吸収スペクトル、HPLC の溶出時間および MS スペクトルのいずれにおいても一致した。また、タンデム MS (MS/MS) による分析で得られたフラグメントイオンのスペクトルから、両色素は同じ骨格構造を持つことが推定された。さらに 520P1 株の青紫色素の NMR 分析より得られたスペクトルは、報告されたヴィオラセインのスペクトルと一致した。これらのことから *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、ヴィオラセインと同定された。

第三章では、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素の腫瘍細胞に対する作用について述べた。青紫色素をヒト骨髓球系白血病細胞 HL60 およびヒト単核球系白血病細胞 U937 に添加したところ、細胞の増殖を阻害し、高濃度の色素では細胞を死滅させる作用があることが判明した。生存細胞数の計数から求めた青紫色素の HL60、U937 に対する 50%抑制濃度(IC<sub>50</sub>)はおよそ 0.5-0.6 $\mu$ M であった。さらにこの細胞死の機構を

探るため、アポトーシスの過程で活性化される特異的蛋白質分解酵素であるカスパーゼについて調べたところ、色素添加後に細胞内に活性化カスパーゼが検出されることを見出した。これらの結果から *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、HL60 および U937 に対してアポトーシスの誘導による細胞死を引き起こすことが判明した。

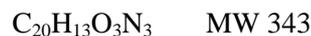
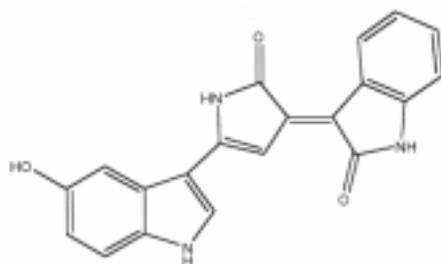
以上の結果から、室戸海洋深層水由来の細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 は、その 16S rDNA 配列がデータベースに登録されていない *Pseudoalteromonas* 属の新規細菌であり、この細菌の産生する青紫色素はヴィオラセインであること、この色素は白血病細胞に対してアポトーシスの誘導による細胞死を引き起こすことが分かった。青紫色素ヴィオラセインはその生理活性から医薬としての可能性が注目される。しかし主要なヴィオラセイン産生細菌である *Chromobacterium violaceum* が日和見感染菌であることから、色素の工業的利用は未だ進んでいない。ここで述べた *Pseudoalteromonas* 属の新規細菌は、海洋細菌であることから陸上環境への拡散の恐れはなく、また人体の体温である 37 で生育できないことから、人体への病原性はないと推測される。したがって、*C. violaceum* に代わるヴィオラセイン産生細菌としての利用が考えられる。

## 緒 言

ヴィオラセインとは中南米の熱帯・亜熱帯地方で分離される細菌 *Chromobacterium violaceum* が産生する青紫色素のことである。この色素は、アブ科昆虫が媒介するトリパノソーマ病を引き起こす鞭毛虫 *Trypanosoma* に対する抗生作用をもつため、トリパノソーマ病治療の目的でブラジルにおいて研究が進められてきた。

本研究では室戸海洋深層水の中から青紫色素を産生する新規細菌を分離し、この色素をヴィオラセインと同定した。また、この色素が白血病細胞に対してアポトーシスの誘導による強い抗腫瘍細胞作用を示すことを明らかにした。

Fig. 1 ヴィオラセインの構造式



*C. violaceum* は、熱帯・亜熱帯の土壌や水から単離された (Margalith, 1992; Duran and Menck, 2001)。この細菌の産生するヴィオラセイン(Fig. 1)は、グラム陽性細菌に対する抗生作用 (Margalith., 1992)、トリパノソーマ病を引き起こす鞭毛虫 *Trypanosoma* に対する抗生作用 (Leon *et al.*, 2001)、最近では、腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導作用が報告されている (Melo *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004)。また、*C. violaceum* の持つヴィオラセインの合成酵素群の遺伝子及び活性が明らかにされ、トリプトファンから始まるヴィオラセインの生合成経路についての研究が報告されている (Momen and Hoshino, 2000)。さらに、*C. violaceum* の全ゲノム配列は、ブラジルにおけるゲノムプロジェクトにより明らかとなっている (Brazilian National Project Consortium,

2003)。

ヴィオラセイン産生細菌は、現在 *C. violaceum* 以外に 2 種が報告されている。*C. violaceum* の近縁細菌 *Janthinobacterium lividum* (Matz *et al.*, 2004) と *Pseudoalteromonas luteoviolacea* である。*P. luteoviolacea* の産生するヴィオラセインについてはその物理化学的性質が報告されている (McCarthy *et al.*, 1985; Laatsch *et al.*, 1984) ）。しかしながら、これら 2 種の細菌が産生するヴィオラセインの *Trypanosoma* や腫瘍細胞に対する生理作用については報告されていない。

青紫色素ヴィオラセインの研究は、主に *C. violaceum* から得られるヴィオラセインを用いて進められて来た。しかしながら、*C. violaceum* は日和見感染菌であり、感染した人や動物で重篤な敗血症を引き起こすことが報告されている (Richard *et al.*, 1993) ）。したがって色素の実用的利用に不可欠な大量培養によるヴィオラセインの生産は、*C. violaceum* を用いる限り困難である。一方、室戸海洋深層水から分離した細菌 85 株のうち 13 株が青紫色素を産生していることが確認されている (Yada *et al.*, 2003) ）。そこで、本研究では、この 13 株の青紫色素産生細菌に注目し、その細菌の同定、色素の同定及び色素の生理作用について研究し、この分離細菌が *C. violaceum* に代わるヴィオラセイン産生菌として用いることができるかどうかを検討した。

細菌の同定には、DNA 塩基配列に基づく分子生物学的な手法と、形態及び生理的性質による手法の 2 つがあるが、本研究では、これらを総合して細菌の同定を行った。青紫色素の同定は、紫外・可視吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析 (MS)、核磁気共鳴 (NMR) を用いて行い、*P. luteoviolacea* の産生するヴィオラセインとの比較も行った。

分離細菌から得られた青紫色素の生理活性の検証は、白血病細胞に対する細胞毒性試験によって行った。また、その細胞死の機構を探るため、アポトーシスの過程で活性化される酵素の出現を観察した。

## 第一章 青紫色素産生細菌の同定

1999年から2002年にかけて室戸海洋深層水から13株の青紫色素産生細菌を分離した(Yada *et al.*, 2003)。この色素は、第二章で述べるようにヴィオラセインと同定された。この細菌を、*Chromobacterium violaceum* に代わるヴィオラセイン産生細菌として利用することを考える上で、産生細菌の同定及び生理的性質を把握することは不可欠である。そこで、まず始めにこれら13株についてその同定を行った。

ここで細菌の系統分類法の現状について述べる。細菌は、形態分化が乏しく視覚的にそれぞれの種を識別しにくい。このため細菌の分類では早くから遺伝情報が積極的に分類に取り入れられた。しかし、遺伝情報に基づく分類と従来の形態や生理的性質に基づく分類は必ずしも合致しなかった。そのため細菌分類に関する国際的な特別委員会は、従来の表現型に基づく分類と遺伝情報に基づく分類の比較から出る矛盾を調整するため、1987年に細菌の分類体系と種概念に関する勧告を出した。この中で“細菌の種は現在、系統的に定義できる唯一の分類学上の単位である。DNAの相同性はDNAの塩基配列を知る基準であり、現時点で最も適用可能なものである。”と述べ、細菌の分類は遺伝情報に基づく分子系統に重点を置くとした(Wayne, *et al.*, 1987)。本研究においても遺伝情報に基づく分類を基本とし、それに生理的性質の比較の結果を総合して同定を行った。

まず13株について細菌の同定に用いられる16S rDNAの部分塩基配列(228bp)の比較を行い、そのすべてが同じ細菌種に属するかどうかを確認した。その結果、この13株の青紫色素産生細菌は、同じ16S rDNAの部分配列を持つ3株と、この配列と3塩基異なる同じ配列を持つ10株の2群の細菌群に分かれることが明らかとなった。この2群の細菌群のうち、もっとも早い時期に分離され、その性質についてデータの集積が進んでいた520P1株と710P1株をそれぞれの細菌群の代表株として選択し同定を試みた。520P1株および710P1株の16S rDNAのほぼ全長に相当する塩基配列を決定し、DNAデ

ータベースから相同性の高い配列を検索する BLAST 法( Altschul *et al.*, 1990 )を用いて、高い相同性を示す細菌を検索した。16S rDNA 塩基配列の相同性検索によって近縁とされた細菌との生理的性質の比較も行った。これらの結果を総合的に考慮し、520P1 株及び 710P1 株の同定を行った。

< 材料と方法 >

#### 標準株

生理的性質の比較を行うため、*Pseudoalteromonas denitrificans* ( IAM14544 ) と *Pseudoalteromonas luteoviolacea* ( IAM14710 ) の 2 株を、東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子総合センターIAM カルチャーコレクションより入手した。

#### 16S rDNA 配列の決定

青紫色素産生菌のゲノム DNA は、5ml PPES-II 液体培地 ( Taga, 1968 ) を用いて 20 下で 3 日間培養した細菌より分離した。ゲノム DNA の抽出には QIAamp DNA Mini Kit ( Qiagen ) を用いた。16S rDNA は、ゲノム DNA を鋳型として、フォワードプライマー 5'-agagtttgatcctggctcag-3' ( Tm 値 60 : *E. coli* 16S rDNA 8-27 番目の塩基に相当 ) 及びリバースプライマー 5'-aaggagtgatccagccgca-3' ( Tm 値 64 : *E. coli* 16S rDNA 1542-1522 番目の塩基に相当 ) ( Hiraishi, 1992 ) を用いて PCR 法により増幅した。DNA ポリメラーゼは TaKaRa Ex Taq ( タカラバイオ ) を、プライマーはそれぞれが最終濃度 0.5 $\mu$ M になるように用いた。反応は、95 1 分で鋳型 DNA を変性後、95 15 秒、60 15 秒、72 30 秒を 35 サイクル行い、最後に 72 で 7 分間伸長反応を行った。反応後、PCR 産物は、QIAquick PCR Purification Kit ( Qiagen ) を用いて精製した。16S rDNA の塩基配列を決定するための反応は、Cy5.5 dye Terminator Kit ( Amersham Biociences ) を用いた。鋳型 DNA として精製した PCR 産物を用いた。塩基配列の決定には原核生物用のユニバーサルプライマー ( Hiraishi, 1992 ) を用いた。各細菌株の比較のための部分塩基配列の決定にはユニバーサルプライマーのうち r2L プライマー ( *E. coli* 16S rDNA 821-803 番目の

塩基に相当)を用いた。決定した部分塩基配列は、DNASIS(日立) clustalx を用い結合した。決定した 520P1 株、710P1 株の 16S rDNA の塩基配列と相同性の高い塩基配列を持つ細菌を BLAST 法(Altschul *et al.*, 1990)により DNA データベース GenBank の登録配列から検索し、相同性の最も高い塩基配列をもつ細菌を近縁種とした。16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹は近隣結合法(Saitou and Nei, 1987)により作成した。系統解析は clustal W を用い、その計算結果から Tree View により系統樹を描画した。

#### 520P1 株、710P1 株の生理的性質

増殖可能温度は、PPES-II 寒天平板培地に細菌を塗布し 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37 下でのコロニー形成の有無により確認した。またこのときコロニーの色の確認も行った。脱室作用の有無は、Zimmermann らの方法を用い確認した(Zimmermann *et al.*, 1979)。

細菌の資化試験は NCIMB Japan Co., Ltd に委託し、D-グルコース、D-マンノース、マルトース、D-グルコン酸、N-アセチルグルコサミン、クエン酸、D-マンニトールの資化を検証した。

#### < 結果 >

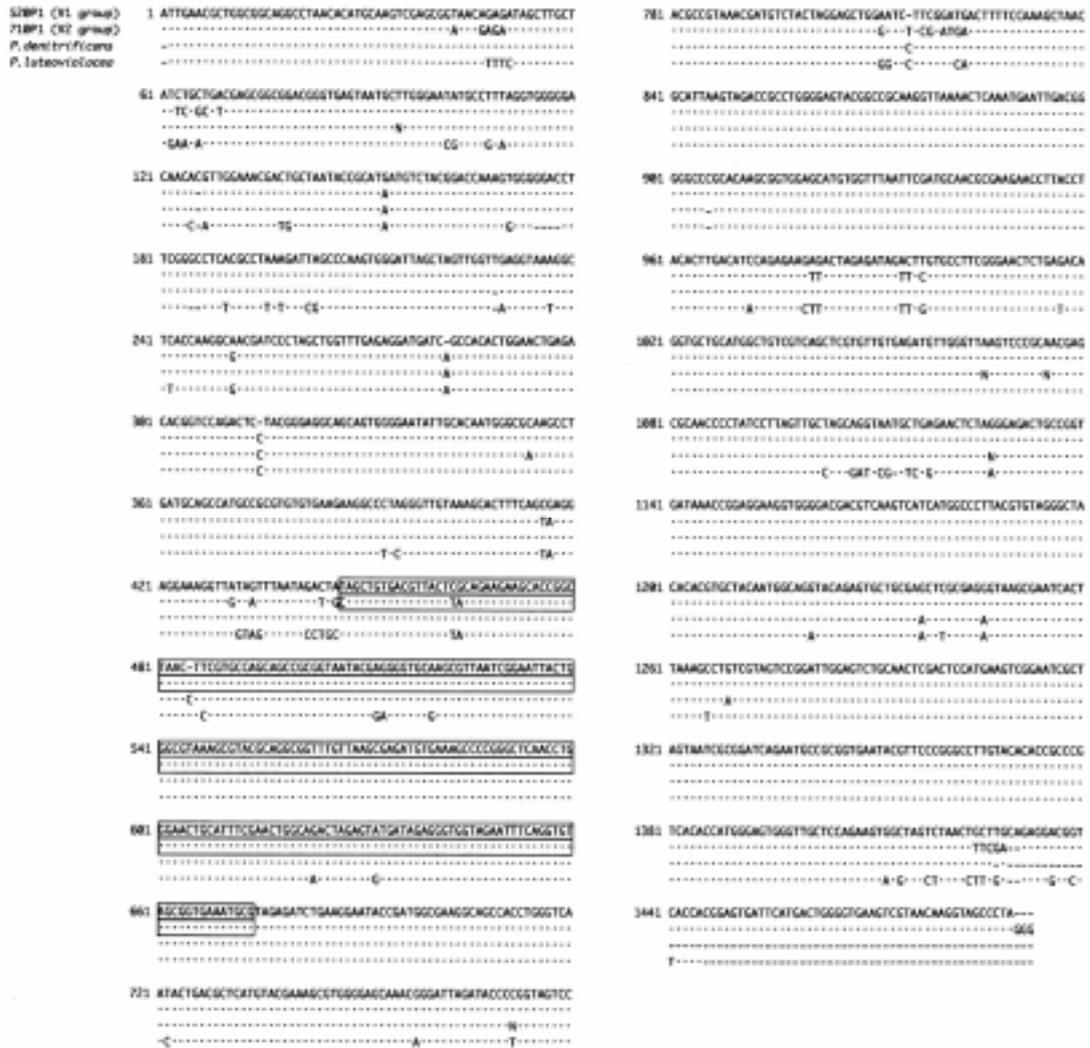
#### DNA 塩基配列

青紫色素産生菌 13 株は、1999 年から 2002 年にかけて室戸海洋深層水より分離した。分離した 13 株は、ユニバーサルプライマー-r2L を用いて決定した 16S rDNA の部分塩基配列 228bp(*E. coli* 16S rDNA の 473-702 番目の塩基の位置に相当)に基づき、同じ配列を持つ V1 グループ(520P1、402P1、417P1 の 3 株)とそれとは 3 塩基異なるが互いに同じ配列を持つ V2 グループ(710P1、315P1、315P3、315P4、315P5、315P11、516P1、612P1、710P2、714P1 の 10 株)の 2 群に分かれた。これらの細菌株は BLAST 法による塩基配列相同性検索により *Pseudoalteromonas* 属の細菌群であることが分かった。

この 2 群の細菌のうち、研究初期に分離されたため、その性質についてのデータの蓄

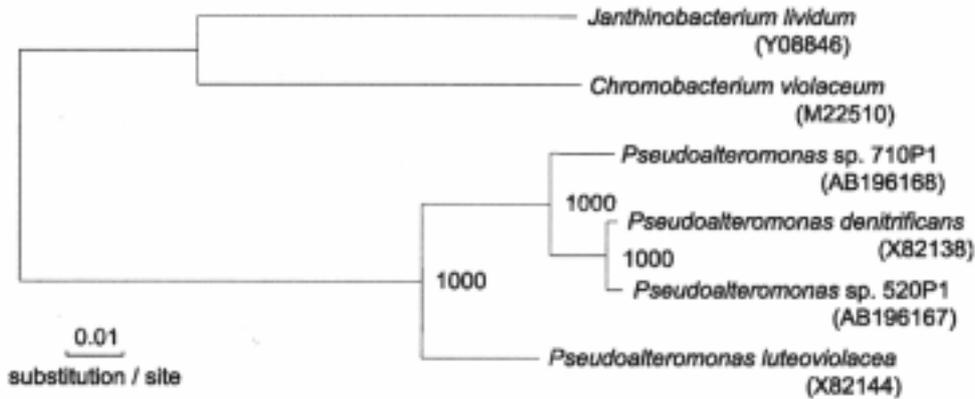
積があり、また色素産生量が他の株と比べ多かった 520P1 株 (V1 グループ)、710P1 株 (V2 グループ) をそれぞれの細菌群の代表株としてさらに詳しく同定を行った。520P1 株については 1486 塩基、710P1 株については 1489 塩基の 16S rDNA 塩基配列を決定した。これは、16S rDNA のほぼ全長にあたり、DNA データベース GenBank に登録された配列との相同性検索により、相同性の高い細菌を絞り込むことができた。*P. denitrificans* (GenBank accession no. X82138) が両細菌に最も相同性が高い細菌であった。520P1 株とは、1425 塩基中 14 塩基が異なり、5 塩基のギャップがみられ、その相同性は 99% であった (Fig. 2)。しかし、710P1 株は、*P. denitrificans* と最も相同性が高いにも関わらず、1425 塩基中 45 塩基が異なり 3 塩基のギャップがみられ、その相同性は 97% であった (Fig. 2)。また、*Pseudoalteromonas* 属で青紫色素ヴィオラセインを産生する細菌として報告されている *P. luteoviolacea* (GenBank accession no. X82144) とは、520P1 株、710P1 株のどちらにおいても 94% の相同性しかなく明らかに同属別種であった (Fig. 2)。520P1 株及び 710P1 株と既知のヴィオラセイン産生細菌との系統関係を Fig. 3 に示した。

Fig. 2 分離株および近縁種の 16S rDNA 塩基配列の比較



520P1 株 (DDBJ AB196167) と 710P1 株 (DDBJ AB196168) の 16S rDNA 塩基配列を GenBank 登録配列中最も相同性の高い *Pseudoalteromonas denitrificans* (GenBank X82138) および ヴィオラセイン産生海洋細菌 *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (GenBank X82144) の登録配列と比較した。図中の囲まれた部位は、分離した細菌 13 株の分類に用いた部分塩基配列である。

Fig. 3 ヴィオラセイン産生細菌と近縁種の系統樹



*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 と *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 を含むヴィオラセイン産生細菌と近縁種の無根系統樹を、16S rDNA の塩基配列をもとに近隣結合法により作成した。系統樹の分岐パターンのブートストラップは 1000 回抽出の検定結果を示す。*Janthinobacterium lividum*( Y08846 )、*Chromobacterium violaceum*( M22510 )、*Pseudoalteromonas luteoviolacea* ( X82144 ) は、既知のヴィオラセイン産生細菌である。*Pseudoalteromonas denitrificans* ( X82138 ) は、GenBank 登録塩基配列中、分離細菌の塩基配列と相同性が最も高かった細菌である。

### 生理的性質

生理的性質は、520P1 株、710P1 株と *P. denitrificans* の間で大きく異なっていた ( Table 1 )。520P1 株、710P1 株は、グラム陰性桿菌で増殖可能温度 10-25 °C、コロニーは青紫色であった。*P. denitrificans* は、グラム陰性桿菌で増殖可能温度 4-20 °C と 520P1 株、710P1 株より低温を好み、コロニーの色はその産生色素 prodigiosin のために赤色であった (Enger *et al.*, 1987)。*P. denitrificans* に特徴的な脱窒 ( denitrification ) 活性は、13 株の分離細菌すべてで認められなかった。520P1 株以外の 710P1 株を含む分離株は、脱窒の前駆反応である硝酸還元能を持っていた。さらに、520P1 株と 710P1 株は、本研究で検証した糖等の有機物に対し資化能を持たなかったが、*P. denitrificans* は D-グルコースとマルトースを資化する点においても異なっていた。これらのことから、16S rDNA 塩基配列の相同性が高い *P. denitrificans* と 520P1 及び 710P1 株は同属ではあるものの、表現型の異なる別の細菌と言える。また、両細菌とも *P. luteoviolacea* とは、増殖可能温度、糖資

化においてその性質は全く異なっていた。

16S rDNA 塩基配列による相同性の比較と近縁種との生理的性質の比較から、室戸海洋深層水から単離した 520P1 株と 710P1 株は、未だその 16S rDNA 配列が登録されていない、*Pseudoalteromonas* 属の新規細菌であることが判明した。そこでこれらの細菌を *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 (accession no. AB196167) 及び *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 (accession no. AB196168) とし、その 16S rDNA 塩基配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した。

Table 1 分離細菌の生理的性質

Strain	520P1	710P1	<i>P. denitrificans</i>	<i>P. luteoviolacea</i>
Gram staining	-	-	-	-
growth at:	10-25°C	10-25°C	4-20°C	15-37°C
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> reduced to NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- <sup>b</sup>	+	-	-
Denitrification with gas formatic	-	-	+	-
colony pigmentation:	violet	violet	red	violet
Utilization of <sup>a</sup> :				
D-Gulucose	-	-	+	+
D-Mannose	-	-	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
Maltose	-	-	+	+
D-Gluconate	-	-	-	-
N-Acetylglucosamine	-	-	-	+
Citrate	-	-	ND <sup>c</sup>	-
D-Mannitol	-	-	-	-

<sup>a</sup> Utilization of various carbon sources by strains 520P1 and 710P1 were studied by NCIMB Japan Co., Ltd. Data for *P. denitrificans* and *P. luteoviolacea* were according to Holt *et al.* (1994).

<sup>b</sup> Bacteria of V1 group except strain 520P1 showed the activity to reduce NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

<sup>c</sup> ND: not determined.

#### < 考察 >

*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 および *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 の 16S rDNA 塩基配列は、*Pseudoalteromonas denitrificans* の配列と最も相同性が高かった。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 と *P. denitrificans* の相同性は 99% と高く非常に近縁であると判断できるが、*P. denitrificans* の産生する色素は、赤色の prodigiosin であることや脱窒作用その他の生理的性質において大きく異なっていた。この結果に基づき、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1

は、*P. denitrificans* とは異なるデータベース未報告の新規細菌であると判断した。また *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 と *P. denitrificans* の相同性は、97%であり、産生色素や脱窒作用においても異なっていた。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、第二章で述べるようにヴィオラセインであることが分かった。そこで、ヴィオラセインを産生する海洋細菌 *P. luteoviolacea* と 520P1 株および 710P1 株の 16S rDNA 塩基配列の相同性を比較したが、94%の相同性しかなく、*P. luteoviolacea* とは明らかに別種であった。このことから、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 と *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 は、新たなヴィオラセイン産生細菌であると結論した。

## 第二章 青紫色素の同定

青紫色素の本体を明らかにするため、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する色素の物理化学的性質の分析を紫外・可視吸収スペクトル、HPLC、MS、NMR を用いて行った。

### < 材料と方法 >

#### 色素の抽出・精製

青紫色素産生細菌は、1,000 – 2,000ml の PPES-II 培地を用い、20℃ 下で 1 週間静置培養した。菌液は、4,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を廃棄した後、残ったペレットに元の培養液の 1/5 量のエタノールを加えて懸濁し、色素を抽出した。10,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を粗抽出色素とした。粗抽出色素は、ロータリーエバポレーターで乾固させ、元の培養液の 1/10 量のエタノールで再溶解し、再度 10,000 × g で 10 分間遠心分離し、その上清をカラム精製用色素とした。精製は、粗抽出色素をシリカカラム (20mm × 300mm, 移動相 2-プロパノール) で部分精製し、さらに色素画分を ODS カラム (20mm × 500mm, 移動相 40% (v/v) アセトニトリル水溶液) を用いて精製した。精製に用いたシリカ担体 (SIL-120-S150) と ODS 担体 (ODS-A-120-S150) はワイエムシーより購入した。

#### 紫外・可視吸収スペクトル

紫外・可視吸収スペクトルは、試料をエタノールに溶解し、自記分光光度計 (Beckman DU 640) を用いて測定した。

#### HPLC

HPLC は、ODS カラム (4.6mm × 150mm, Beckman Ultra sphere ODS 5μm) を用い、

移動相 40% (v/v) アセトニトリル水溶液、流速 1ml/min で行った。青紫色素の可視領域での最大吸収波長である 575nm で測定した。

#### MS、MS/MS スペクトル

色素試料は、メタノールに溶解し、ESI によってイオン化した。スプレー電圧は 4.5kV、キャピラリー温度 150 °C であった。MS/MS スペクトルも同じ条件で試験した。

#### NMR スペクトル

NMR スペクトルは、Varian <sup>UNITY</sup> INOVA 400 ( <sup>1</sup>H NMR, 399.91MHz; <sup>13</sup>C NMR, 100.56MHz ) を使用し、試料は重水素置換ジメチルスルホキシド ( DMSO-d<sub>6</sub> ) に溶解して用いた。

#### < 結果 >

#### 色素の抽出・精製

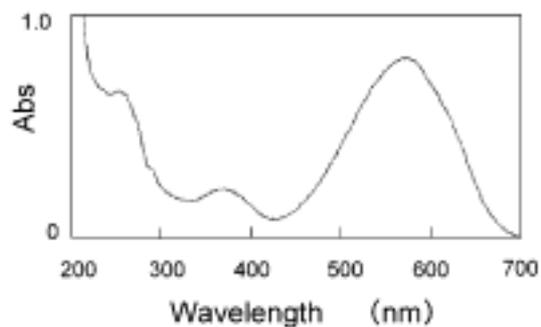
520P1 株から抽出した青紫色素及び *P. luteoviolacea* (IAM14710) から抽出したヴィオラセインは、水には不溶であったが、エタノール、2-プロパノール、DMSO には可溶であった。また、ヘキサン、クロロホルム、アセトニトリルには難溶性であった。抽出した青紫色素とヴィオラセインは、2-プロパノールを移動相とするシリカカラムを通し、溶出した色素を含む画分を 40% (v/v) アセトニトリル水溶液を移動相とした ODS カラムで精製した。

#### 紫外・可視吸収スペクトル

エタノール中の青紫色素及びヴィオラセインは、575nm に吸収極大を示し、両者の紫外・可視吸収スペクトルは非常によく似ていた ( Fig. 4 )。この結果から両色素が同一または極めて類似する発色団を有すると考えられた。Laatsch *et al.*, ( 1984 ) による報告に

見られるヴィオラセインのスペクトルとも酷似していた。

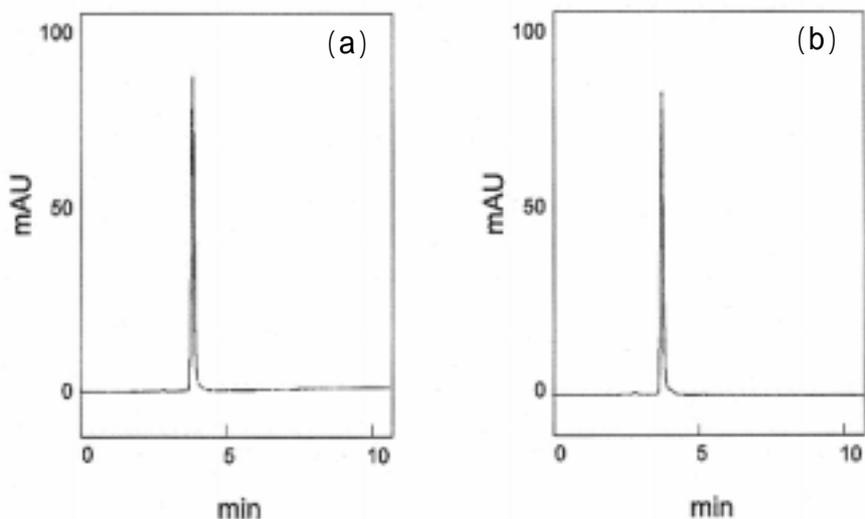
Fig. 4 青紫色素の紫外・可視吸収スペクトル



### HPLC

青紫色素とヴィオラセインを、ODS カラム (4.6mm × 150mm) を用いた HPLC によって分析したところ、同一の溶出時間が得られた (Fig. 5)。さらに、青紫色素とヴィオラセインの混合サンプルを HPLC で分析したところ、単一のピークを示した。このことは両色素が HPLC 上で全く同一の挙動を示す色素であることを示している。

Fig. 5 青紫色素の HPLC による分析

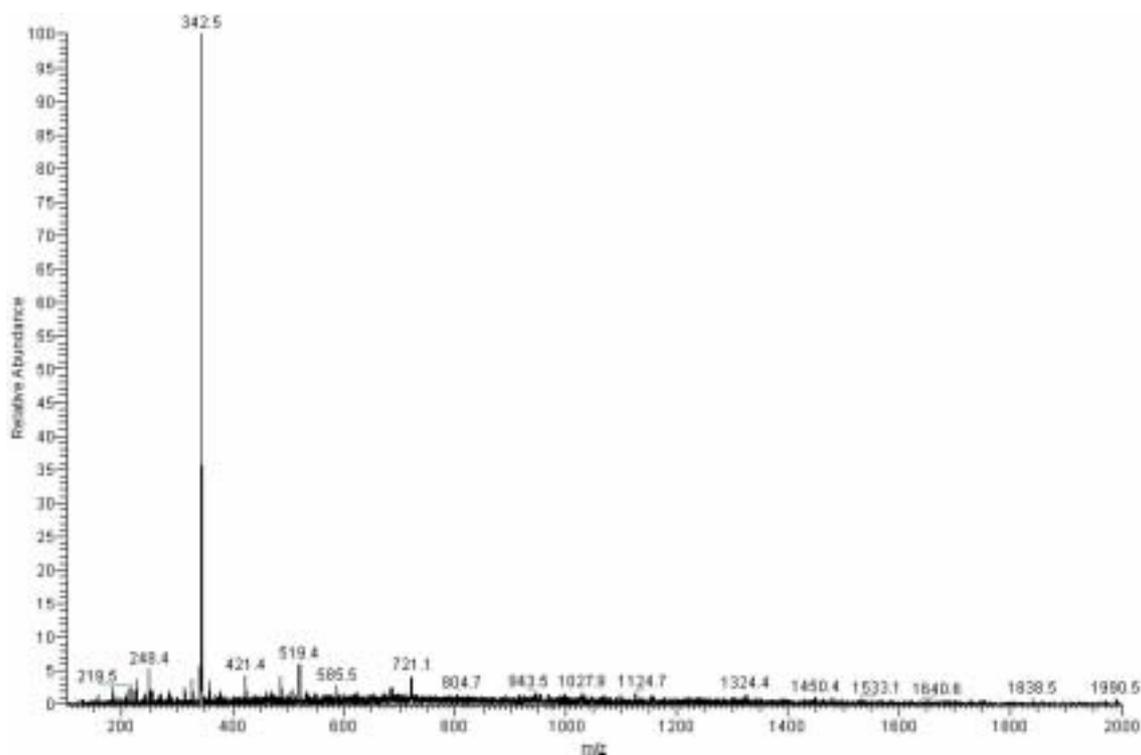


520P1 株および *P. luteoviolacea* から抽出、精製した青紫色素とヴィオラセインを、ODS カラムを用いて分析した。(a) 精製した青紫色素 (b) 青紫色素とヴィオラセイン混合物

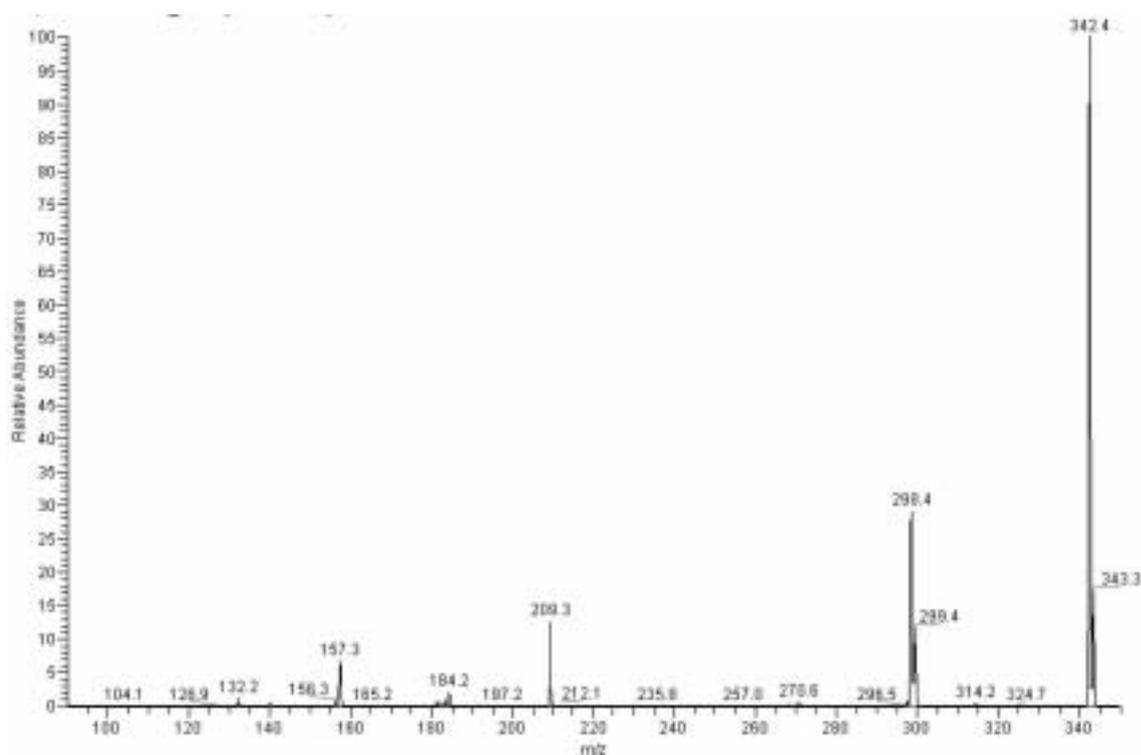
## MS、MS/MS スペクトル

青紫色素の MS スペクトルから  $m/z$  342,  $[M-H]^-$  のイオンが検知され、分子量は 343 であることが分かった ( Fig. 6(a) )。また、MS/MS スペクトルより、 $m/z$  342, 298, 209, 184, 157 の  $[M-H]^-$  イオンが検知された ( Fig. 6(b) )。また比較のために行った *P. luteoviolacea* 由来のヴィオラセインの分析でも同じイオンが検知された。この結果から、色素の分解で生じたフラグメントも青紫色素とヴィオラセインで共通であり、同じ分子量で同じ骨格構造を持つ色素であることが推定された。Lattsch *et al* ( 1984 ) が報告したヴィオラセインの MS スペクトルとも一致した。

Fig. 6 青紫色素の質量分析



( a ) MS スプレー電圧 4.5kV、キャピラリー温度 150



(b) MS/MS スプレー電圧 4.5kV、キャピラリー温度 150

## NMR スペクトル

Laatsch *et al* (1984) は *P. luteoviolacea* 由来のヴィオラセインについてその  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを報告している。また、Rettori and Duran (1998) は、*C. violaceum* 由来のヴィオラセインの  $^1\text{H}$  NMR スペクトルと  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを報告している。青紫色素の  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) では、11.85 (1H, d), 10.70 (1H, d), 10.59 (1H, s), 9.30 (1H, s), 8.95 (1H, d, J=8), 8.04 (1H, d, J=2.5), 7.55 (1H, d, J=1.5), 7.32 (1H, d, J=8.5), 7.21 (1H, d, J=2.0), 7.17 (1H, td, J=8.0, 2.0), 6.93 (1H, td, J=8.0, 2.0), 6.79 (1H, d, J=8.0), 6.75 (1H, dd, J=2.0, 8.0) 計 13 個の  $^1\text{H}$  を確認した (Fig. 7)。 $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz, DMSO- $d_6$ ) では 171.9, 170.4, 153.1, 147.9, 142.0, 137.2, 131.8, 130.0, 129.6, 126.5, 125.8, 122.6, 121.0, 118.8, 113.2, 113.6, 109.2, 105.9, 104.8, 97.1 計 20 個の  $^{13}\text{C}$  を確認した (Fig. 8)。これらの結果は上述のヴィオラセインの NMR スペクトルに関する報告と合致している。

Fig. 7 青紫色素の  $^1\text{H}$  NMR

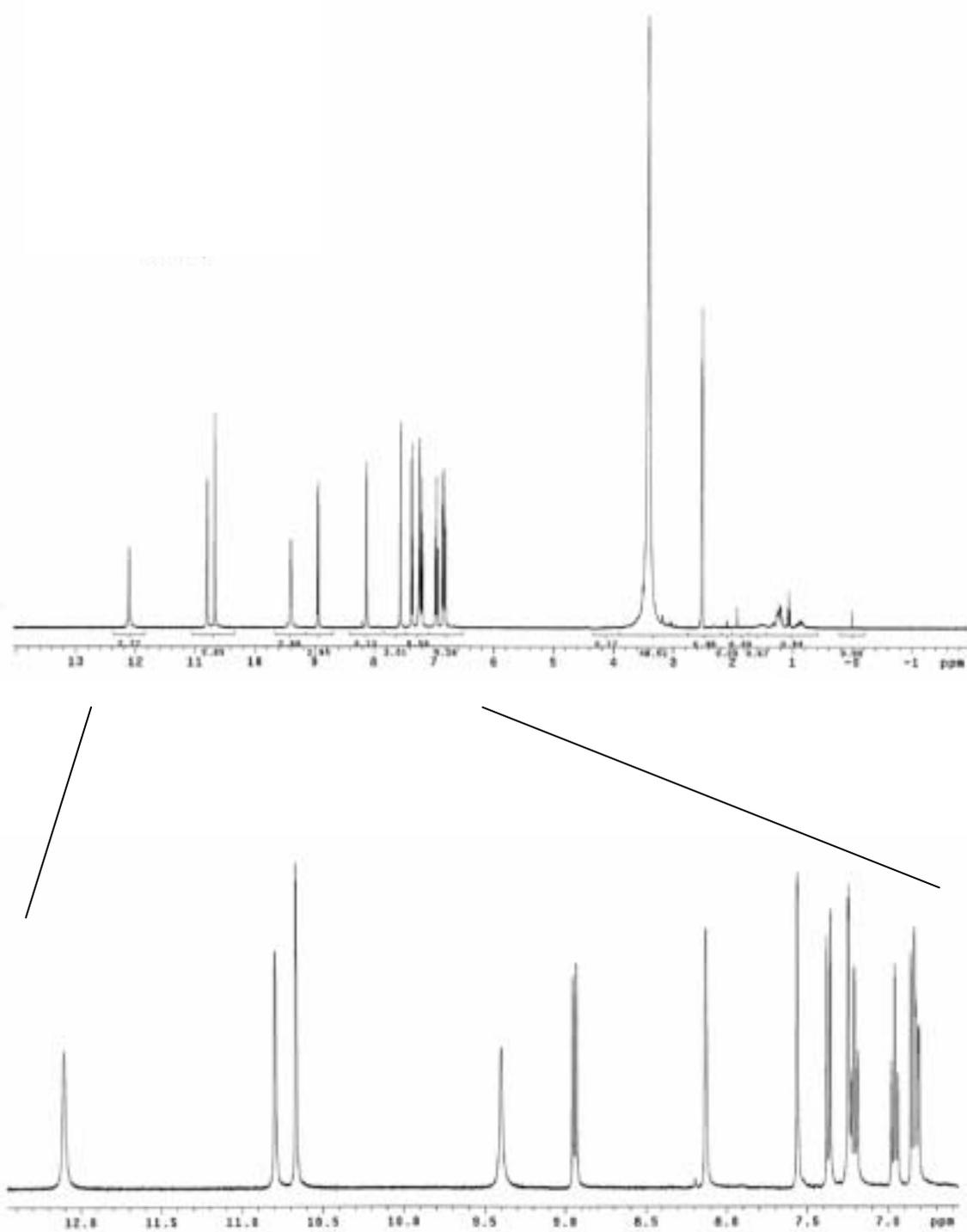
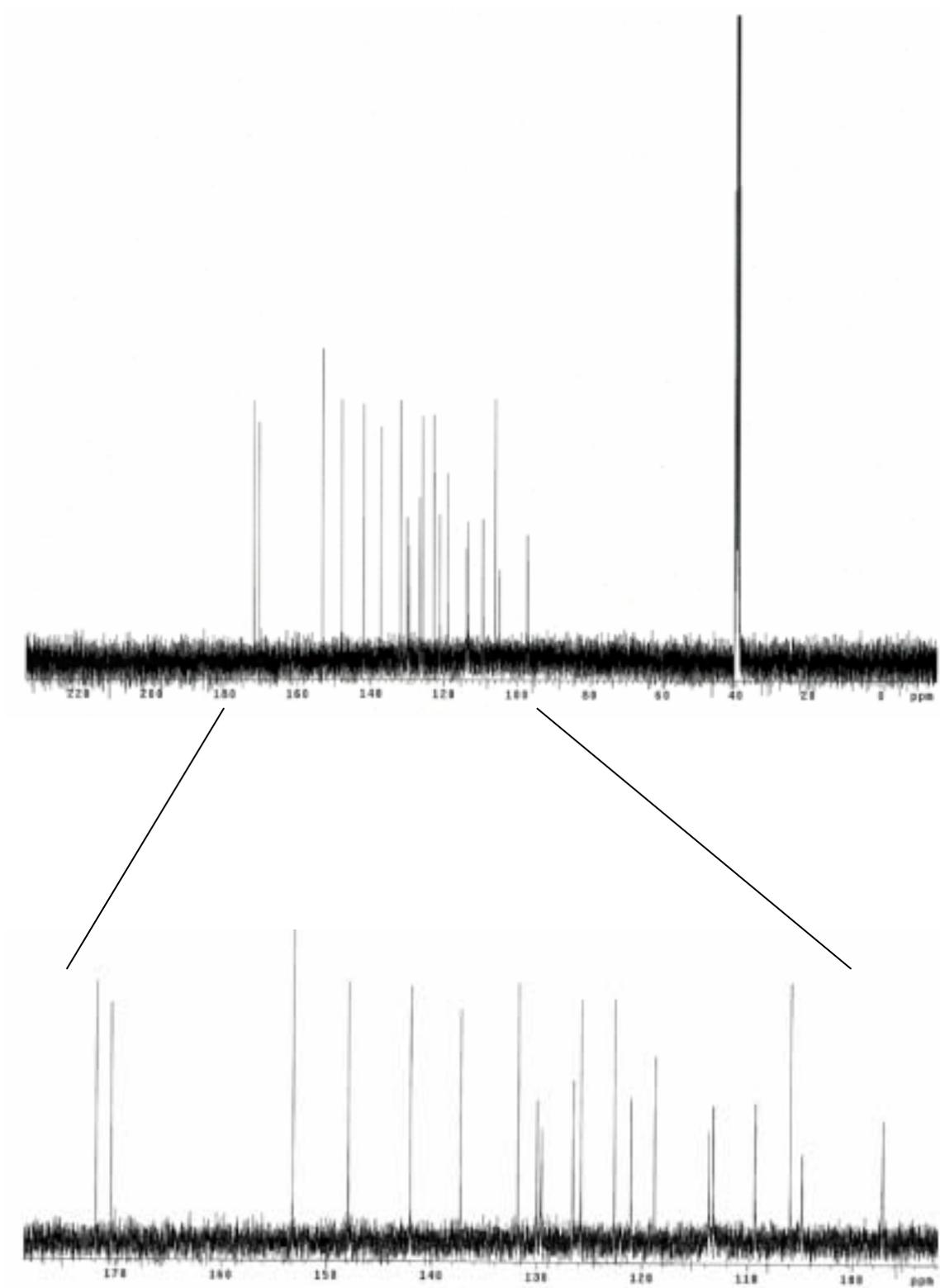


Fig. 8 青紫色素の  $^{13}\text{C}$  NMR



#### < 考察 >

*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、*P. luteoviolacea* の産生するヴィオラセインと同じ紫外・可視吸収スペクトルを示し、HPLC での溶出時間も一致した。また、MS、MS/MS スペクトルでも、同一のスペクトルを得たことから、ヴィオラセンと同じ分子量をもち、またその構造も同一である可能性が高いことが分かった。さらに、 $^1\text{H}$  NMR および  $^{13}\text{C}$  NMR による青紫色素の分析を行った結果、Laatsch *et al.*, (1984) の報告した *P. luteoviolacea* 由来のヴィオラセインの  $^1\text{H}$  NMR スペクトル、Rettori and Duran (1998) の報告した *C. violaceun* 由来のヴィオラセインの  $^1\text{H}$  NMR スペクトルと  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルと同一のスペクトルを示した。これらのことから、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 から得られる青紫色素は、ヴィオラセインであると結論した。

*Pseudoalteromonas* sp. 710P1 の産生する色素についても、紫外・可視吸収スペクトルおよび HPLC 分析において *Pseudoalteromonas* 520P1 の産生する青紫色素と同一の結果が得られた。このことから、710P1 株の産生する色素もヴィオラセインであると考えられる。

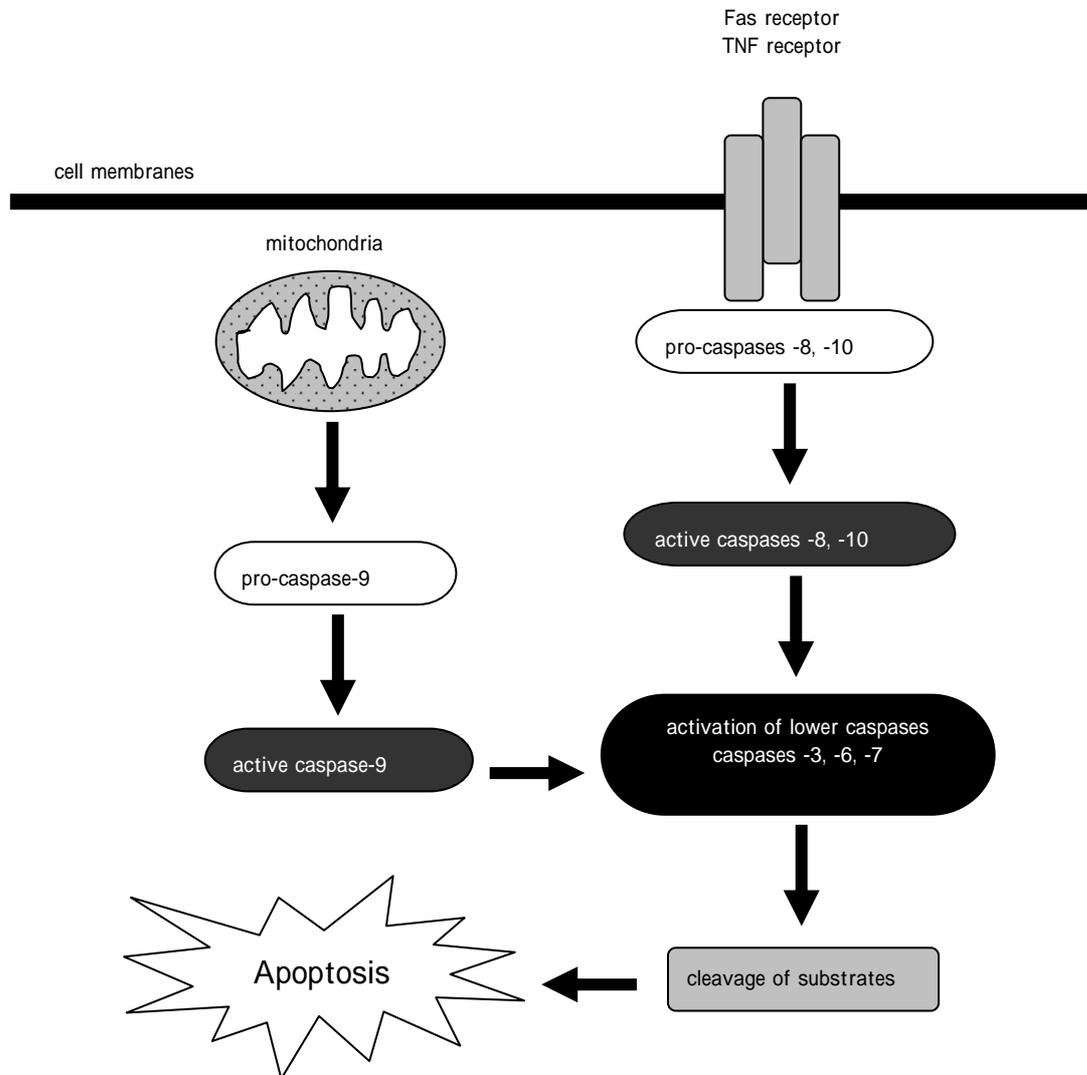
### 第三章 青紫色素の白血病細胞に対する細胞毒性

*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、ヴィオラセインであることが第二章で述べた分析によって明らかとなった。*Chromobacterium violaceum* が産生するヴィオラセインは、腫瘍細胞に対してアポトーシスを引き起こすことが報告されている (Melo *et al.*, 2003 ; Ferreira *et al.*, 2004 )。しかし、それ以外の細菌から得られるヴィオラセインの抗腫瘍作用は未だ報告されていない。抗腫瘍作用の検証は、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 をヴィオラセイン生産に利用する上で必須である。そこで *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 が産生する青紫色素の腫瘍細胞に対する細胞毒性を検証した。

細胞毒性の検証にはヒト骨髓球系白血病細胞 HL60 とヒト単核球系白血病細胞 U937 を用いた。これらの細胞はさまざまな研究において広く用いられているため、得られた結果の比較が容易であることから選択した。

細胞死には、アポトーシスとネクローシスの2種がある。アポトーシスは、発生の過程などで起こるプログラム死と呼ばれる細胞死の形態である。このとき細胞は、核の凝縮、断片化、細胞質の萎縮などの形態変化が起こり、最終的には、マクロファージに取り込まれ消化される。このアポトーシスには、レセプターから始まる経路とミトコンドリアから始まる2つの経路があり、そのいずれにもカスパーゼというシステインプロテアーゼが関与している (Wang *et al.*, 2005; Cho and Choi, 2005 )。アポトーシスは何種類かのカスパーゼの順序だった活性化によって進行する (Fig. 9)。レセプター経路では、カスパーゼ 8, 10 が、ミトコンドリア経路では、カスパーゼ 9 が活性化され、活性化されたカスパーゼの作用によって下流のカスパーゼ 3, 6, 7 が活性化され、最終的にはアポトーシスへと進んでいく。本研究では、青紫色素による細胞死がアポトーシスによるものかどうかを検証するため、細胞内での活性化カスパーゼの出現を観察した。

Fig. 9 アポトーシスの経路とカスパーゼの関与



< 材料と方法 >

白血病細胞株

白血病細胞は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分与された、ヒト単核球系白血病細胞 U937 (登録番号 JCRB9021) と、ヒト骨髄球系白血病細胞 HL60 (登録番号 JCRB0085) を用いた。

### 細胞の培養

白血病細胞の培養は、10%ウシ血清、2.5 $\mu$ g/ml アンホテリシン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、50 $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI-1640 (Sigma) を用い、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下で行った。

### 色素の毒性試験

毒性の評価は、青紫色素を白血病細胞の培養液に加え、24 時間後に生存細胞数を直接計数し、50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めることによって行った。

前培養した白血病細胞は、4 $\times$ 230 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上清培地を廃棄した。その後、培養液を加えて再懸濁し、細胞数を顕微鏡で直接計数しながら細胞濃度が 5-7 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml になるように培養液を加えながら調節し、15ml の培養チューブに 5ml ずつ 12 本分注した。DMSO に溶解した青紫色素 (約 550 $\mu$ M) を、0.22-2.15 $\mu$ M の最終濃度となるよう 10 本のチューブに添加した。青紫色素の濃度は、メタノール中での分子吸光係数  $\epsilon_{570\text{nm}}$  を  $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  として計算した (Momen and Hoshino., 2000)。このとき DMSO 濃度はすべて最終濃度 0.39% (v/v) となるよう調節した。残りの 2 本のチューブのうち 1 本は、DMSO のみ最終濃度 0.39% (v/v) になるように加え、もう一本は、DMSO を加えないコントロールとした。これらをよく攪拌後、各サンプル 2ml ずつを 12 ウェルプレート 2 枚に分注した。37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、加湿下で 24 時間培養した後、細胞培養液 50 $\mu$ l に等量のトリパンブルーを加え攪拌後、改良ノイバウエル血球計算板 (Bright-Line) に試料をのせて、染色されない生細胞を顕微鏡により直接計数した。

### カスパーゼの検出

カスパーゼの検出には、活性化カスパーゼに特異的に結合する阻害剤に蛍光色素 (FITC) を付加したもの (CaspGLOW<sup>TM</sup> Fluorescein Active Caspase Staining Kit, BioVision)

を使用した。細胞濃度  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の培養液 1ml に青紫色素を最終濃度  $2.15 \mu\text{M}$  になるように添加したもの、ネガティブコントロールとして DMSO を色素添加量と同量加えたもの、さらに青紫色素最終濃度  $2.15 \mu\text{M}$  を含む培養液 1ml にカスパーゼ阻害剤  $1 \mu\text{l}$  を加えたものをコントロールとし、2-3 時間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、加湿下で培養した。その後、それぞれの培養液を 1.5ml チューブに  $300 \mu\text{l}$  ずつ分注し、それぞれに  $1 \mu\text{l}$  の阻害剤に蛍光色素 (FITC) が付加したものを添加し、さらに 1 時間培養した。培養液を  $230 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を廃棄後、洗浄緩衝液  $500 \mu\text{l}$  に再懸濁し、 $230 \times g$  で 5 分間遠心分離し上清を廃棄した。再度、洗浄緩衝液  $500 \mu\text{l}$  で細胞を洗浄した後、洗浄緩衝液  $10 \mu\text{l}$  を加え検鏡用の試料とした。FITC 用フィルターを装備した蛍光顕微鏡 (Olympus IX70) を用いて倍率 400 倍で観察し、露光時間 30 秒で蛍光顕微鏡写真を撮影した。

#### < 結果 >

##### 色素の細胞毒性

色素を溶解する DMSO は、培養液中に 1.3% 以上の濃度で存在すると HL60 細胞の分化を引き起こすことが一般的に知られている。また、DMSO は、U937 細胞に対しても培養液中に高濃度に存在すると細胞毒性を示す。そのため本研究における DMSO 濃度は、培養液中の最終濃度が 0.7% 以下になるようにして用いた。

*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の青紫色素は、白血病細胞 U937 と HL60 に対して毒性を示した。このとき、添加した色素量と同量の DMSO を加えたコントロールに死細胞は見られず、毒性は検出されなかった。青紫色素の U937 に対する作用は、 $0.43 \mu\text{M}$  の濃度で明らかと成り始め、細胞は増殖を抑制されて 24 時間後も細胞数は増えていなかった。 $1.29 \mu\text{M}$  では、ほとんどの細胞が死滅していた (Fig. 10)。U937 に対する青紫色素の 50% 抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、 $0.63 \mu\text{M}$  であった。HL60 に対する作用は、 $0.43 \mu\text{M}$  から認められ、 $1.08 \mu\text{M}$  では生細胞は見られなかった。HL60 に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $0.47 \mu\text{M}$  であった

( Fig. 11 ) さらに、2.15 $\mu$ M の青紫色素は、U937 に対し添加後 2 時間後から細胞死を誘導した。また、24 時間後に生細胞は確認できなかった。HL60 では、3 時間後から細胞死を引き起こしており、6 時間後には生細胞はほとんど見られなかった。

Fig. 10 U937 細胞に対する青紫色素の細胞毒性

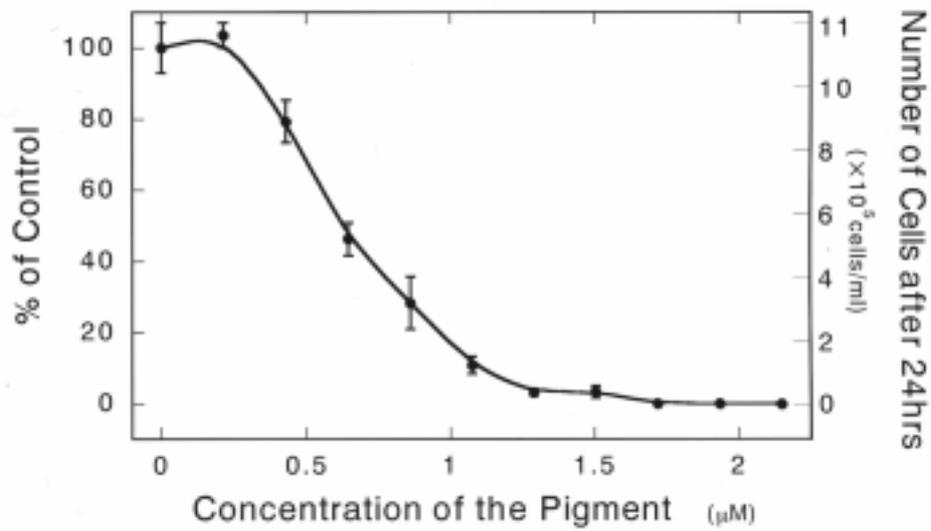
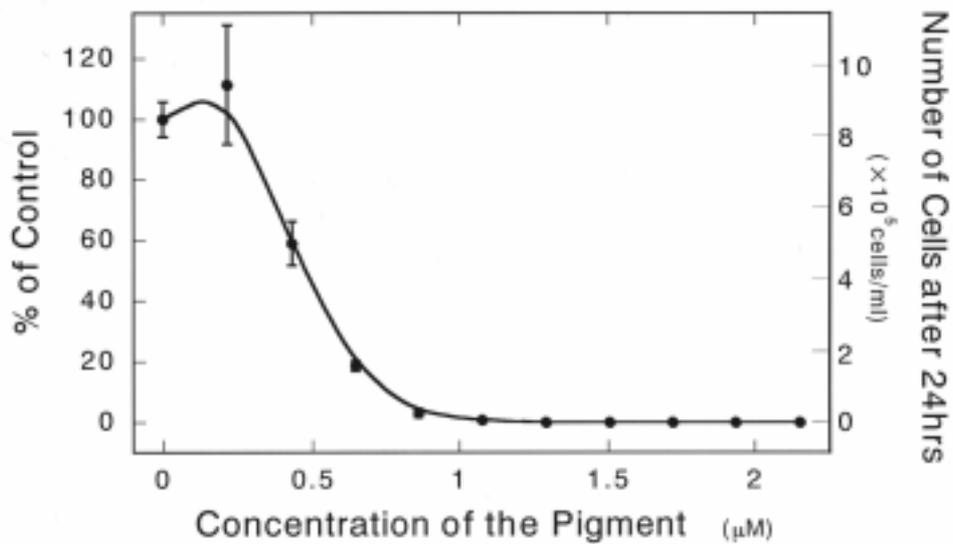


Fig. 11 HL60 細胞に対する青紫色素の細胞毒性



## 細胞死の機構

細胞死の機構がアポトーシスであることを検証するには、一般に細胞の形態変化(細胞質の凝縮、核の断片化)、DNAの断片化、カスパーゼの活性化などが指標とされる。ここでは青紫色素によって白血病細胞に起こる細胞死がアポトーシスであるかどうかを、アポトーシスを起こしている細胞で特異的に活性化される蛋白質分解酵素であるカスパーゼを検出することで判別した。活性化カスパーゼに特異的に結合する阻害剤に蛍光色素(FITC)が付加した試薬で細胞死が進行中の細胞を処理し、蛍光顕微鏡で細胞内に蛍光ラベルされた活性化カスパーゼが存在するかどうかを観察した。U937 および HL60 に対して  $2.15\mu\text{M}$  の青紫色素を添加すると、2-3 時間で細胞死を誘導することから、この時期の細胞に蛍光試薬を加え、1 時間培養後に細胞を観察した。このとき、U937、HL60 ともに細胞質が凝集しており細胞内の局所で蛍光が観察された(Fig. 12, Fig. 13)。青紫色素を添加していない細胞では、細胞内の蛍光は観察できなかった。以上の結果から青紫色素の引き起こす U937 と HL60 の細胞死はアポトーシスによるものであることが判明した。

Fig. 12 青紫色素により細胞死を誘導した U937 細胞中のカスパーゼの検出

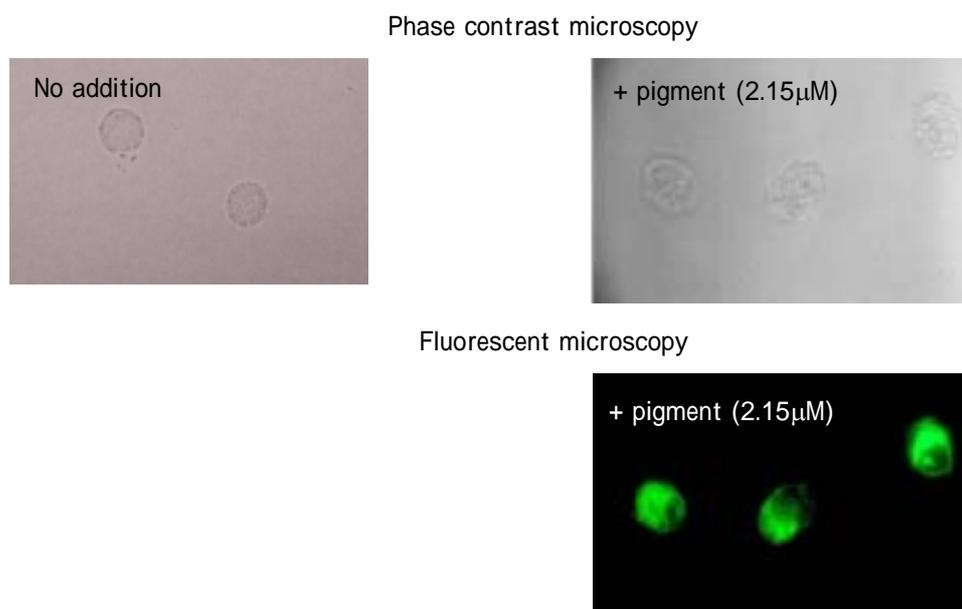
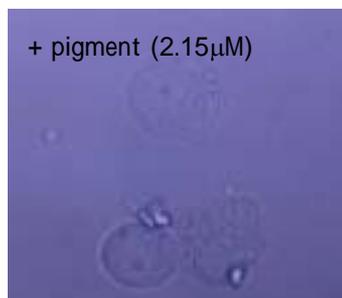
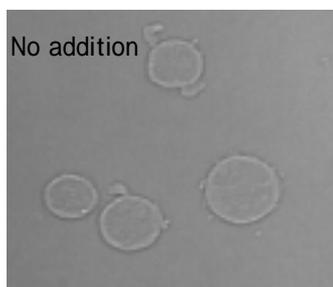
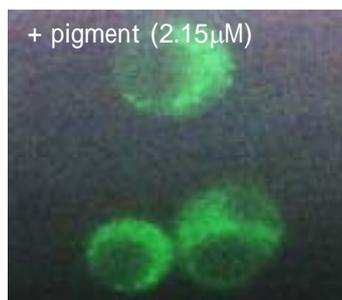


Fig. 13 青紫色素により細胞死を誘導した HL60 細胞中のカスパーゼの検出

Phase contrast microscopy



Fluorescent microscopy



#### < 考察 >

青紫色素は、ヒト単核球系白血病細胞 U937 と、ヒト骨髄球系白血病細胞 HL60 にアポトーシスによる細胞死を誘導した。また、HL60 細胞に対する  $IC_{50}$  は、 $0.47\mu\text{M}$  であった。*Chromobacterium* の産生するヴィオラセインを用いた HL60 細胞の細胞死は、Melo ら (Melo *et al.*, 2003) や Ferreira ら (Ferreira *et al.*, 2004) により  $IC_{50}$  が  $0.7\mu\text{M}$  と報告されている。これから青紫色素とヴィオラセインの HL60 細胞に対する細胞毒性は、ほぼ同等であると言える。

また Ferreira らは、*C. violaceum* の産生するヴィオラセイン  $2\mu\text{M}$  によって、HL60 細胞の細胞死が誘導されるにもかかわらず、同じ濃度のヴィオラセインは U937 細胞に対しては細胞死を誘導しないと報告している。しかし、本研究では、HL60 細胞の細胞死

誘導の  $IC_{50}$  と U937 細胞に対する  $IC_{50}$  がほぼ同じであることから、Ferreira らの結果とは明らかに異なっている。この結果の相違の原因として、U937 細胞が継代を繰り返すうちに形質変化を良く起こす細胞として知られているため、Ferreira らが用いた U937 細胞では、実験操作によるストレスや変異によりストレス耐性の細胞や抗がん剤耐性の細胞が選択されていた可能性が考えられる。

## 総括

紫外・可視吸収スペクトル、HPLC、質量分析の結果、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、比較のために測定した *Pseudoalteromonas luteoviolacea* のヴィオラセインと同一のスペクトルおよび HPLC における挙動を示した。また青紫色素の NMR スペクトルは、Laatsch *et al.*, (1984) の報告した *P. luteoviolacea* 由来ヴィオラセインの  $^1\text{H}$  NMR スペクトル、また、Rettori and Duran (1998) が報告した *Chromobacterium violaceum* 由来ヴィオラセインの  $^1\text{H}$  NMR と  $^{13}\text{C}$  NMR のスペクトルと同じスペクトルを示した。以上の結果から、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、ヴィオラセインと同定された。

*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 と *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 の 16S rDNA の塩基配列は、GenBank に同じ配列を持つ細菌が登録されていない未報告の細菌であった。今までにヴィオラセイン産生細菌として報告されている *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea* とは異なる新たな細菌と同定された。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の 16S rDNA の塩基配列は、*Pseudoalteromonas denitrificans* の塩基配列と 99% の相同性を示すことから、両者は近縁な細菌であると言える。しかし、産生色素、糖の資化、増殖可能温度、脱窒など多くの生理的性質が異なるため、その表現型からは異なる細菌と考えられる。また海洋細菌 *P. luteoviolacea* とは塩基配列の相同性や生理的性質から明らかに異なる細菌であった。

*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 の産生する青紫色素は、腫瘍細胞に対して細胞毒性を持つことが明らかになった。ヒト骨髄球系白血病細胞 HL60 に対する青紫色素の  $\text{IC}_{50}$  は  $0.47\mu\text{M}$  であり、Melo らや Ferreira らの報告した *C. violaceum* 由来ヴィオラセインの  $\text{IC}_{50}$   $0.7\mu\text{M}$  とほぼ同等の値と言える。そして、活性化カスパーゼの特異的蛍光染色により、この細胞死がアポトーシスによるものであることが判明した。本研究でのヒト単核球系白血病細胞 U937 に対する青紫色素の  $\text{IC}_{50}$  は  $0.63\mu\text{M}$  であり、HL60 に対する  $\text{IC}_{50}$  とほぼ同等と言う結果が得られた。この細胞死も、活性化カスパーゼの特異的染色によりアポ

トーシスによるものと分かった。しかし、Ferreira らは、 $2\mu\text{M}$  の *C. violaceum* 由来ヴィオラセインは、U937 細胞に対して細胞死を引き起こさないと報告している。この実験結果の食い違いは、U937 細胞の形質の違いが原因として考えられる。

ヴィオラセインはその抗腫瘍作用、抗トリパノソーマ作用など注目すべき性質を持っている。ヴィオラセインを実用の目的に供するには、その工業的な大量生産が必要であるが、ヴィオラセイン産生細菌として最も広く用いられている *Chromobacterium violaceum* は人や動物に日和見感染し、敗血症を引き起こすため、その工業的な利用は困難である (Richard., 1993)。本研究で分離された *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 は、人体の体温である  $37^\circ\text{C}$  では生存できないこと、海洋細菌であるため陸上施設での大量培養では外部環境への拡散を防げる点から *C. violaceum* に代わるヴィオラセイン産生細菌として利用できる可能性がある。

しかし、*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 を用いたヴィオラセインの工業的生産には、いくつか解決しておくべき課題がある。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 では、細胞数が定常に達した後に色素の産生が見られた。この現象は、細菌の発光、色素、毒素などの二次代謝産物の合成遺伝子発現を調節する quorum sensing 機構と似ている。この quorum sensing 機構には、二次代謝産物合成遺伝子の発現を促進するためのシグナル伝達を行う物質オートインデューサー (AI) が関与している (Taga and Bassler., 2003)。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 でも AI 様の働きをする物質が色素産生を誘導している可能性が考えられる。*Pseudoalteromonas* sp. 520P1 によるヴィオラセイン大量生産には、この色素産生の調節機構を明らかにする必要がある、色素合成酵素遺伝子群の同定とともにその解明が待たれる。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導と御助力を賜りました高知工科大学工学部榎本恵一教授に深く感謝の意を表します。また、学術レベル試問および公開論文審査において審査員をしていただいた高知工科大学向畑泰男教授、松元信也教授、大濱武教授、有賀修助教授に深く感謝いたします。

細菌の分離に際し、高知県室戸海洋深層水研究所前所長 谷口道子氏をはじめ、所員の皆様には多大な御協力を賜りました。また分離操作においては、高島正治氏、田口邦男氏に御協力いただきました。ここに深く感謝いたします。

青紫色素産生細菌の同定において、生理的性質の解析を協力していただいた竹崎智士氏に感謝いたします。

青紫色素の精製を指導していただいた長崎恵子氏に感謝いたします。

青紫色素の質量分析においてご協力いただいた、関西大学荒川隆一教授、大坂一生氏、高知工科大学古江正興教授に厚く御礼申し上げます。

NMR 解析においてご協力いただいた高知工科大学古江正興教授、細川隆弘教授、小広和哉助教授、南貴美氏、卞兆勇氏、王义氏に厚く御礼申し上げます。

細胞毒性試験を行うにあたり御指導していただいた、常磐短期大学佐塚正樹講師、試験操作及び解析においてご協力いただいた、細川覚司氏、須保麻葵子氏に深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり御協力いただいた堀沢栄講師、岡上聖華氏、工藤彰人氏、中島敦志氏、谷口聖心氏、鄒艶霜氏、四国理科(株)小笠原博氏、ならびに環境生物工学研究室の卒業生および在籍する皆様に感謝しここに厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215, 403-410

Brazilian National Genome Project Consortium (2003) The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc Natl Acad Sci USA 100, 11660-11665

Cho SG and Choi EJ (2005) Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. J Biochem Mol Biol 35, 24-27

Duran N and Menck CF (2001) *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. Crit Rev Microbiol 27, 201-222

Enger , Nygaard H, Solberg M, Schei G, Nielsen J, Dundas I (1987) Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol Oct, 416-421

Ferreira C V, Bos C L, Versteeg H H, Justo G Z, Duran N, Peppelenbosch M P (2004) Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. Blood. 104, 1459-1464

Hiraishi A (1992) Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett Appl Microbiol 15, 210-213

Holt JG, Krieg NR, Sneath PA, Staley JT, Williams ST (1994) Bergey's manual of determinative

bacteriology ninth edition. Baltimore, USA. Williams & Wikins

Laatsch H and Thomson R H (1984) Spectroscopic properties of Violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. *J Chem So Perkin Trans*, 1331-1339

Leon LL, Mitanda CC, De Souza AO, Duran N (2001) Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother* 48, 449-450

Margalith PZ (1992) *Pigment Microbiology*. London, U.K. Chapman & Hall. Tokyo. pp 111-118

Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjellebergs S, Jurgens K (2005) *Appl Environ Microbiol* 70, 1593-1599

McCarthy SA, Sakata T, Kakimoto D, Johnson RM (1985) Production and isolation of purple pigment by *Alteromonas luteoviolacea*. *Bull Japan Soc Fish* 51, 479-484

Melo PS, Vidal BC, Haun M, Duran N (2000) Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36, 539-543

Melo PS, Justo GZ, Mariangela BMA, Duran N, Haun M (2003) Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cell. *Toxicology* 186, 217-225

Momen AZMR and Hoshino T (2000) Biosynthesis of Violacein: Intact Incorporation of the Tryptophan Molecule on the Oxindole Side, with Intramolecular Rearrangement of the Indole

Ring on the 5-Hydroxyindole Side. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 539-549

Rettori D and Duran N (1998) Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 685-688

Richard C (1993) *Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions. *Bull Soc Pathol Exot* 86, 169-73

Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425

Taga ME and Bassler BL (2003) Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA (Suppl 1 . 2)*, 14549-14554

Taga N (1968) Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. *Bull Misaki Mar Biol Inst Kyoto Univ* 12, 65-76

Wang ZB, Liu YQ, Cui YF (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29, 489-496

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PDA, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGW, Stackebrandt E, Starr EMP and Truper HG (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463-464

Yada S, Ohba M, Enomoto K (2003) Analysis of Bacterial Species in the Muroto Deep Seawater. Deep Ocean Water Research 4, 47-56 (in Japanese)

Zimmermann K, von Lengerken J (1979) Analytical methods for nitrate and nitrite determination in foods. 3. Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite using sulphanic acid/1-naphylamine, and of nitrite using resorcinol/zirconium (IV) oxychloride. Nahrung 23, 929-34 (in German).

## 「室戸海洋深層水」中の細菌種の分析

### Analysis of Bacterial Species in the Muroto Deep Seawater

矢田 修一<sup>1</sup>・大場 雅行<sup>2</sup>・榎本 恵一<sup>1</sup>

Shuichi YADA, Masayuki OHBA and Keiichi ENOMOTO

#### Abstract

Eighty-five strains of marine bacteria were isolated from the Muroto deep seawater at a depth of 320 m off the coast of Cape Muroto, Kochi Prefecture, Japan. The bacteria were analyzed based on the sequences of the 16S rRNA gene. Seventy-five strains were identified as 12 genera; 29 strains to the genus of *Vibrio*, 16 to *Pseudoalteromonas*, 9 to *Shewanella*, 6 to *Alteromonas*, 4 to *Marinobacter*, 3 to *Erythrobacter*, 2 to *Tenacibaculum*, 2 to *Dietzia* and 1 strain each to the genera of *Bacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina* and *Photobacterium*. Some of these strains were closely related to known bacteria including psychrotrophs, barophilic bacteria and bacteria which decompose hydrocarbons. Some other strains produced pigments reported to have physiological activities. On the other hand, the remaining 10 unidentified strains contained novel bacteria whose DNA sequences showed low homology with those of the already identified bacteria. Thus, the Muroto deep seawater has been demonstrated to be an important source for investigations of unknown, yet potentially useful, bacteria.

**Key Words:** deep seawater, bacterial species, 16S rRNA gene

#### 要 旨

「室戸海洋深層水」中の細菌種を、分離した細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて分析した。分離した85株のうち75株は、*Vibrio*属29株、*Pseudoalteromonas*属16株、*Shewanella*属9株、*Alteromonas*属6株、*Marinobacter*属4株、*Erythrobacter*属3株、*Dietzia*属2株、*Tenacibaculum*属2株、*Bacillus*属1株、*Halomonas*属1株、*Idiomarina*属1株、*Photobacterium*属1株、計12属に分類された。その中には、既知の低温細菌、深海細菌、石油分解細菌に近縁と考えられる細菌や、生理活性を持つと報告されている色素を産生する細菌が見出された。属を決定できなかった10株には、その塩基配列が既知の細菌のものと低い相同性しか示さない、未報告と考えられる細菌が含まれていた。

**キーワード:** 海洋深層水, 細菌種, 16S rRNA 遺伝子

#### 1. はじめに

近年、海洋深層水（以下、深層水と略す）は、その特徴である低温性、豊富な無機栄養塩類、清浄性

を利用して、養殖や藻類の培養、食料品、化粧品、食用塩などの原料として広く利用されている。このように深層水は、低温性などの物理的特性やその成分を多様な目的に利用できる再生型資源と認められ

<sup>1</sup>高知工科大学（〒782-8502 高知県香美郡土佐山田町宮ノ口185）

<sup>2</sup>三菱化学生命科学研究所（〒194-8511 東京都町田市南大谷11号）

<sup>1</sup>Kochi University of Technology

<sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

## 懸濁粒子数から見た「室戸海洋深層水」の 清浄性と安定性

Cleanliness and Stability of Muroto Deep Seawater Examined  
by Analysis of Suspended Particles

矢田 修一<sup>1</sup>・榎本 恵一<sup>1</sup>

Shuichi YADA and Keiichi ENOMOTO

### Abstract

The cleanliness and stability of Muroto deep seawater were examined throughout the year. Surface and deep seawater samples were collected monthly from January 2000 to December 2000 on the surface or from a depth of 320 m off the coast of Cape Muroto at the Kochi Prefectural Deep Seawater Laboratory. The numbers and sizes of suspended particles in the seawater samples were analyzed using a particle analyzer. In the deep seawater, the numbers of particles with diameters of 1 - 50  $\mu\text{m}$  were 334 - 844/ml (yearly average of 549/ml) and those with diameters of 10 - 50  $\mu\text{m}$  were only 10 - 28/ml (yearly average of 19.4/ml). Particle numbers of the deep seawater varied slightly from month to month, but no seasonal variations were observed. On the other hand, the numbers of particles with diameters of 1 - 50  $\mu\text{m}$  in the surface seawater samples were 1445 - 7289/ml (yearly average of 4416/ml) and showed clear seasonal variations. The particle numbers of the surface seawater were high in spring and summer, but low in winter. These results demonstrate that the Muroto deep seawater is cleaner and more stable in suspended particles contained than the surface seawater, and therefore it is better use for industrial uses, particularly for those having filtration processes.

**Key Words:** deep seawater, suspended particles, particle analyzer, seasonal variations

### 要 旨

「室戸海洋深層水」の清浄性と安定性を、海水中の懸濁粒子数を測定することにより検証した。2000年1月～12月にわたって深層水及び表層水を高知県海洋深層水研究所において毎月採水し、粒子アナライザーを用いて試料海水中の懸濁粒子数とその粒径を測定した。深層水は、同研究所の取水設備を用い、室戸岬沖水深320mから汲み上げられたものを使用した。解析の結果、深層水中の粒径1～50 $\mu\text{m}$ の懸濁粒子数は、334～844個/ml(年平均値549個/ml)であり、そのうち粒径10～50 $\mu\text{m}$ の粒子数は、10～28個/ml(年平均値19.4個/ml)と極めて少なかった。また、深層水中の懸濁粒子数の季節的な変動は認められなかった。それに対して、対照とした表層水中の粒径1～50 $\mu\text{m}$ の懸濁粒子数は、1445～7289個/ml(年平均値4416個/ml)と深層水中の粒子数の約8倍に達し、春から夏に増加し、冬に減少する明らかな季節変動を示した。これらの結果より、「室戸海洋深層水」は表層水に比べて清浄であり、しかもその清浄性は年間を通じて安定していることが明らかとなり、濾過工程の必要な深層水の産業利用での有用性が示された。

**キーワード:** 海洋深層水, 懸濁粒子, 粒子アナライザー, 季節変動

<sup>1</sup>高知工科大学(〒782-8502 高知県香美郡土佐山田町宮ノ口185)  
Kochi University of Technology