

## シアノファージ Ma-LMM01 のゲノムにコードされた 2 つ溶菌酵素遺伝子の大腸菌による発現

○<sup>ほそだなおひこ</sup>細田直彦<sup>1</sup>, <sup>よしだたかし</sup>吉田天士<sup>1</sup>, <sup>くろかわよういち</sup>黒川洋一<sup>1</sup>, <sup>たかしま</sup>高島ゆかり<sup>1</sup>, <sup>ひろいししんご</sup>広石伸互<sup>1</sup>, <sup>おがたひろゆき</sup>緒方博之<sup>2</sup>, <sup>ながさきけいぞう</sup>長崎慶三<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 福井県大・生物資源、<sup>2</sup> フランス・CNRS、<sup>3</sup> 水総セ・瀬戸内水研

### Expression of two lytic enzyme genes on a genome of the cyanophage Ma-LMM01 in *Escherichia coli*

○<sup>Naohiko Hosoda</sup><sup>1</sup>, <sup>Takashi Yoshida</sup><sup>1</sup>, <sup>Youichi Kurokawa</sup><sup>1</sup>, <sup>Yukari Takashima</sup><sup>1</sup>,  
<sup>Shingo Hiroishi</sup><sup>1</sup>, <sup>Hiroyuki Ogata</sup><sup>2</sup>, and <sup>Keizo Nagasaki</sup><sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Marine Bioscience, Faculty of biotechnology, Fukui Prefectural University,

<sup>2</sup> Centre National De La Recherche Scientifique, France, <sup>3</sup> National Research Institute of Fisheries and  
Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency

Keywords: *Microcystis*, Cyanobacteria, Cyanophage, Lysozyme

【目的】近年、湖沼において、有害・有毒ラン藻の大量発生による水資源の毒化、カビ臭の発生および景観の悪化といった問題が生じている。これまでに、演者らは有毒ラン藻 *Microcystis aeruginosa* NIES298 株に感染するシアノファージ Ma-LMM01 を世界で初めて分離し、その全ゲノムの解読を終了した<sup>1)</sup>。そのゲノム上に認められた約 180 個の ORF のうち、28 個の ORF について機能が予測されており、本ファージと宿主との相互作用を解明する上で、それらの機能を解明することは非常に重要である。本研究では、ファージ感染後、宿主の溶菌時に必要とされる 2 種の異なる溶菌酵素遺伝子に注目し、それらの大腸菌での発現を試みた。

【方法】Ma-LMM01 のゲノム情報をもとに、溶菌酵素遺伝子 (ORF69 および 95) を標的としたプライマーを設計し、Ma-LMM01 の DNA を鋳型として PCR を行った。増幅産物を pTrc 系ベクターに挿入し、大腸菌 JM109 に形質転換させた。カルベニシリン添加 LB 寒天培地にて形質転換体のスクリーニングを行ない、IPTG 誘導後、超音波破碎法を用い細胞由来の全タンパク質を SDS-PAGE に供した。

【結果および考察】ゲノム解析の結果、本ファージは感染初期と後期の 2 つの異なる遺伝子転写単位から構成されるものと推察され、ORF69 と ORF95 はいずれも後期転写遺伝子群のコード領域に認められた。ORF69 と ORF95 は、それぞれ 251 および 357 アミノ酸残基をコードし、それらの分子量は約 28.7 KDa および 42.7 KDa であると推定された。さらに 2 つの ORF について BlastX による相同性検索を行ったところ、ORF69 は *Pseudomonas* sp. の リゾチームと 44% の相同性を示した。また、ORF95 は 2 つの機能領域を有し、N 末端部は λ ファージ由来のリゾチームと 82.7%、C 末端部は *Synechocystis* sp. の細胞膜タンパク質に関与するメタロエンドペプチダーゼと 53.4% の相同性を示した。ORF69 の形質転換体は誘導開始 2 時間後より溶菌による顕著な OD 値の減少が見られ、約 28KDa のタンパク質の発現を確認した。一方、pTrc-OmpT ベクターを用いた ORF95 の形質転換体に対して発現誘導したところ、OD 値の減少が見られたが、タンパク質の発現量は少なく検出限界以下であった。現在、これら誘導タンパク質の更なる性状解析を進めている。高等生物由来のリゾチームと異なり、ファージタイプのリゾチームは基質特異性の高いことが知られており、宿主域の決定に関与する可能性が示唆されている。今後、Ma-LMM01 ゲノムがコードするリゾチームの基質特異性を明らかにすることで、ラン藻-ファージ間における相互作用の解明につながるものと期待される。

1) Yoshida, T. et al. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1239-47

細田直彦 Naohiko Hosoda: [s0674010@fpu.ac.jp](mailto:s0674010@fpu.ac.jp)