

遺伝子組換え菌によるトリクロロエチレンの効率的除去

大阪大学工学部

藤田 正憲（正員）

池 道彦（正員）

森 一博（学生員）

三山 歌奈子

日置 潤一

姫路工業大学工学部 武尾 正弘

1. はじめに

近年、わが国において有機塩素化合物による土壌、地下水汚染が顕在化している。半導体製造工程における洗浄剤として用いられるトリクロロエチレン（TCE）による汚染も例外ではない。TCEは生物による分解をうけにくく、汚染濃度が低いためその除去が困難であり、浄化方法の確立が急がれている。一方、自然界にはメタン酸化菌やトルエン酸化菌などTCEを分解する微生物の存在が知られているが、これらの微生物のTCE分解は共代謝によるため、共役基質であるメタンやトルエンなどの添加を必要とし、その応用を困難なものにしている。そこで本研究ではこの問題の解決策の一つとして遺伝子操作に着目し、*Pseudomonas putida* BH のフェノール分解遺伝子を各種菌株に導入し、TCEを効率よく分解する微生物の育種を試みた。

2. 実験材料および方法

○菌株およびプラスミド： フェノール分解菌 *P. putida* BH を用いた。また本株のフェノール分解遺伝子を広宿主域コスミドベクター pVK100 を用いてクローニングした組換えプラスミド pS10-45および pS4-92 を用いた。pS10-45 はフェノール分解酵素群の全てをコードするDNA断片が挿入されており、pS4-92 にはフェノールヒドロキシラーゼ（PH）のみをコードするDNA断片が挿入されている。宿主菌には *Escherichia coli* HB101 および *P. putida* KT2440 を用いた。

○培地および誘導物質： 菌体の培養にはLB培地を用いた。誘導物質としてのフェノールは5mMの濃度で培地に添加した。なお組換え菌の培養にはカナマイシンを25mg/lの濃度で培地に添加した。

○菌体の培養： 菌体は160rpmの回転振盪で対数増殖中期～後期まで増殖させた後、フェノールを含む培地に3%植菌し、12時間同様の回転振盪培養を行ってTCE分解試験に供した。培養温度は *P. putida* 菌株では30℃、*E. coli* HB101 では37℃に設定した。

○TCE分解試験： 上記の方法で培養した菌体を遠心分離（10,000×g; 4℃; 10min）により回収し、50mMリン酸カリウム緩衝液で洗浄後、菌体を再回収し、OD₆₀₀値が約2.5（実際には1.8から2.5）になるように同緩衝液に懸濁した。次に菌体懸濁液20mlを120ml容のバイアル瓶に入れ、リン酸カリウム緩衝液とTCE溶液を加えて全量を25mlとし、シリコンライナー付きのゴム栓およびアルミキャップで密閉した。バイアル瓶は25℃の水浴中で回転振盪（100rpm）し、経時的に気相の100μlを採取して、島津製作所製 GC-14A(C-ECD) を用いたヘッドスペース法によるGC分析に供した。

3. 実験結果および考察

（1）*P. putida* BH によるTCE分解

分解試験はTCE初期濃度を20mg/lにして行った。試験には対照としてフェノール誘導を行わない菌体も用いた。その72時間までの結果を図1に示す。図よりフェノール誘導を行った菌体において、試験開始後12時間で約12mg/lのTCEの減少が認められ、このことよりフェノール分解酵素がTCE分解を触媒することが明らかとなった。

（2）組換え菌 *E. coli* HB101 によるTCE分解

分解試験は *P. putida* BH の場合と同様にして行った。その72時間までの結果を図2に示す。図よりフェノール誘導を行った両プラスミド保持株でTCEの分解が認められ、このことよりTCE分解に関与する酵素は PH であるという推測がなされた。なお、この実験ではベクター（pVK100）のみを保持する株もフェノール誘導を行って対照として用いたが、TCE分解は認められなかった。

（2）組換え菌 *P. putida* KT2440 によるTCE分解

分解試験は *P. putida* BH の場合と同様にして行った。pS10-45 保持株のTCE分解の結果は *E. coli* HB101 を宿主とする場合と同様であったが、pS4-92 保持株のTCE分解はかなり悪くなった。

この原因は現在のところ不明である。

(4) *P. putida* BH および各種組換え菌の比較

図3に各種組換え菌のTCE残存率を試験開始1時間後の測定値に対する相対値で示し比較した。また各種組換え菌の初期の分解速度を図4に示した。図3より、顕著なTCE分解を示した組換え菌3株の48時間後のTCE残存率は全て、元株 *P. putida* BH と同等であった。また *P. putida* KT2440 は初期のTCE分解において元株を超える分解速度を示したが、分解そのものは速やかに停止する特徴を示した。一方、*E. coli* HB101 の場合、初期のTCE分解速度は元株に劣るものの、分解が他の菌株に比べて長時間持続する特徴を示した。このことから、PH が *E. coli* の菌体内で、より安定に保持され得ることが示唆された。即ち、同一の遺伝子から生産される酵素でも宿主の差によって、そのTCE分解特性に違いがでることが認められた。このことは目的や条件に合った組換え菌を構築する立場から見て大変興味深いといえる。

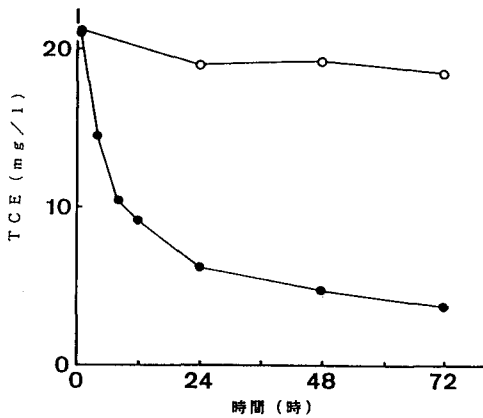


図 1. *P. putida* BH による TCE 分解
○:対照 : ●:フェノール誘導菌体

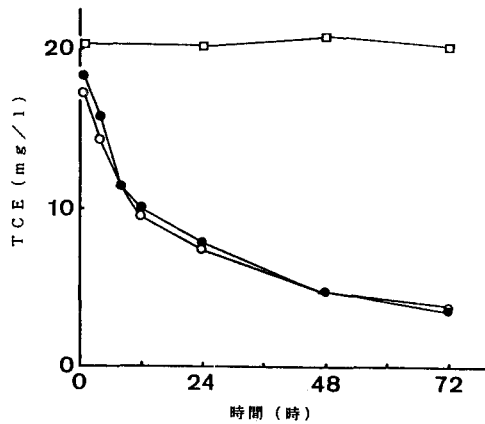


図 2. *E. coli* HB101 による TCE 分解
□:pVK100 : ●:pS10-45 : ○:pS4-92

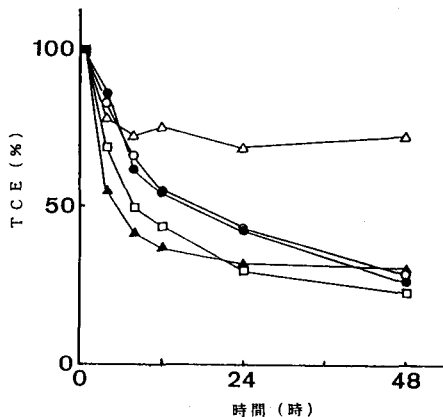


図 3. 各種菌株による TCE 分解
□:*P. putida* BH : ●:*E. coli* HB101(pS10-45)
○:*E. coli* HB101(pS4-92) : ▲:*P. putida* KT2440(pS10-45)
△:*P. putida* KT2440(pS4-92)

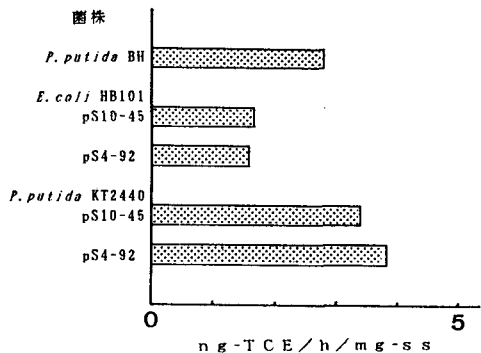


図 4. 各種菌株の TCE 分解速度