

II-545

camオペロンによる2-MIBの分解

東北学院大学大学院 学生員 ○山田 賢治、及川 栄作、清水 昭秀
同 工学部 正会員 石橋 良信

1. はじめに

上水におけるかび臭原因物質は、主にカンファーに似た二環性モノテルペンである2-メチルイソボルネオール(2-MIB)とギリシア語に由来する二環性セスキテルペンのジオスミン(geosmin)が同定されている。かび臭原因物質の処理方法には、前塩素処理や活性炭処理、オゾン処理、生物処理などの高度処理による処理方法があり、これらの単独または組み合わせによりほぼ除去可能であるとされている。処理過程で二次的に有害物質が生成されることが懸念される中でより安全で無害な生物処理に期待がよせられている。生物処理プロセス内での生分解にたずさわる微生物の挙動を解析する上で微生物の生理、生態、分解酵素、遺伝子を知ることは、重要である。

ところで、本研究に使用している cam オペロン¹⁾は、カンファーを唯一の炭素源として生育できる *Pseudomonas putida* 由来の遺伝子群でありカンファー分解の初発段階に働いている。cam オペロンにより 2-MIBが分解されることは、昨年度報告²⁾済みである。本研究では、組換え微生物、大腸菌遺伝子発現系、ガス質量クロマトグラフィー質量分析計(ガスマス)を用いて cam オペロンの基質特異性、2-MIB分解関与遺伝子の同定、分解産物予測、効率良く分解させるための高発現化 plasmidの構築などの実験を行った研究結果について報告する。

2. 研究方法

cam オペロンを挿入させた plasmidを保有する大腸菌を終濃度が50 µg/mlの7%シリツ入り3mlの2×LB液体培地で37℃一晩前培養し、この内の400 µlを同じ濃度の7%シリツと終濃度10 µg/ml又は20 µg/mlの2-MIB入りの40mlの液体M9最小培地入り、共栓付三角フラスコ2本に植え継ぎ、この時を培養0時間目とし、次に示す方法で抽出した2-MIB量を初期値として37℃で2~5日培養を続けた。培養途中で培養液の一部 2mlをフラスコ2059チューブに分取し、等量のジクロロメタンと0.2gのNaClを加え良く混合し2-MIBを塩析すると同時に抽出し、キャップ付きガラスチューブに移して次の操作まで4℃保存した。ジクロロメタン抽出したサンプルは、その後、ガスマスを使用して残存2-MIB量を測定した。2-MIB残存率の計算は、2本の試料の平均値を取り初期値を100%として計算した。

cam オペロンの基質特異性を調べる実験は、培地中にカンファーと2-MIBを同時に添加してどちらを優先的に分解するか調べた。cam オペロンの2-MIB分解に関与する遺伝子を同定する実験は、cam オペロンを部位特異的に欠失した plasmidを構築して行った。cam オペロンを高発現化する plasmidの構築は、ホストの大腸菌には、LE392を使用し plasmidとして多コピー性で一般的に使用されているクロニングベクターであるpBluescript SK⁻, KS⁻を用い、また、camRが camA, B, C, Dの遺伝子発現を抑制に調節するとの以前の知見から camRを欠失させた方が2-MIB分解が高まると考え、次のように高発現化 plasmidを構築した。1) cam オペロンが lacZ プロモーターにより誘導を受ける方向に挿入したもの(pBC-R⁺f, f:forward または、順方向と言う)、2) 1)と逆方向で cam オペロンが lacZ プロモーターにより誘導を受けない方向に挿入したもの(pBC-R⁺r, r:reverse または、逆方向と言う)、3) cam オペロンより調節遺伝子 camRを制限酵素地図¹⁾の5'側 Eco RI-Xho Iで欠失させた上で順方向に挿入されたもの(pBC-R⁻f)、4)同様に cam オペロンより調節遺伝子 camRを欠失させた上で逆方向に挿入したもの(pBC-R⁻r)の4種類である。この高発現化 plasmid構築図を図-1に示す。分解試験は、前培養後、2-MIBを添加したM9培地に植え継いでから OD_{600nm}が0.2になったところで lacZ遺伝子の誘導物質である IPTGを終濃度1mMになるように添加した(IPTG⁺)。

また、同時にIPTG無添加のものも用意した(IPTG⁻)。M9培地に植え継いだ時点を0時間目としてその後、8、16、24、48時間目にそれぞれ塩析、ジクロメタン抽出を行いガスマスにより残存2-MIB量を測定した。コントロールとしてpBluescriptKS⁻を保有する大腸菌を用いた。

3. 研究結果

1) カッファ-と2-MIB同時分解試験の結果、カッファ-は、一日でガスマスで測定できない値まで減少を示したが、2-MIBの減少は、全く見られなかった。この事実から、camA⁺は、2-MIBよりもカッファ-の方に基質特異性が高くカッファ-を優先的に分解することが示された。

2) camA⁺による2-MIBの分解には、camA⁺の全長が必要でカッファ-と全く同じ経路で分解がなされることが強く示唆された。

3) 2-MIBを効率よく分解させるために構築した本研究の高発現化 plasmidは、図-2、図-3に示されるようにplasmidのコピー数やIPTG添加によるlacZ 7'プロモーターの誘導によりよりも camA⁺の遺伝子発現を抑制に調節する遺伝子 camR を欠失させた場合に著しい2-MIB分解が示された。

4. おわりに

本研究を遂行するにあたり、camA⁺の遺伝子は、堀内忠郎教授(現創価大学)、相良康弘教授(現高知医科大学)より譲り受けたことを記し感謝する。

- 参考文献 1) 古賀秀雄、堀内忠郎:細菌P-450遺伝子の構造,細胞工学 6,62-71(1987)
2) 清水昭秀、及川栄作、大沼孝宏、石橋良信:土木学会第48回年次学術講演概要集,1222-1223,1993

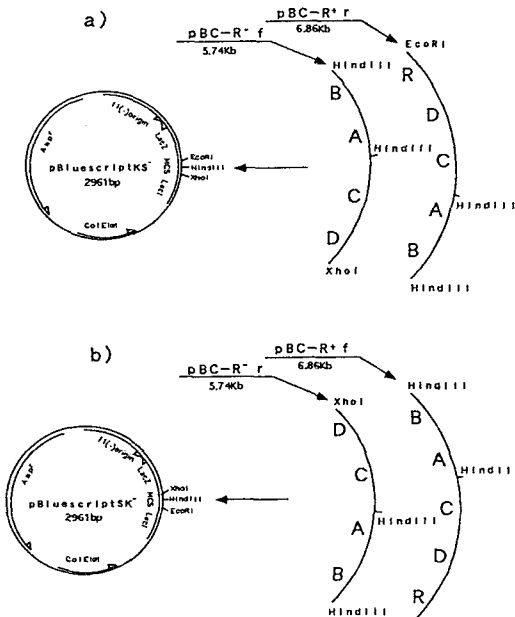


図-1 高発現化 plasmid の構築

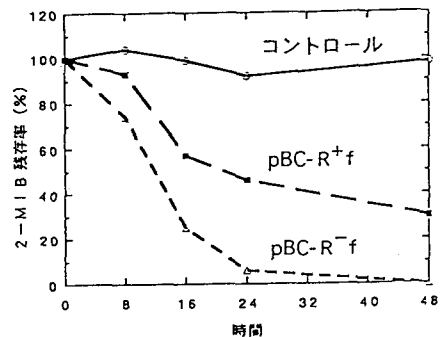


図-2 Cam オペロン 高発現化 plasmid による 2-MIB の分解 IPTG⁺

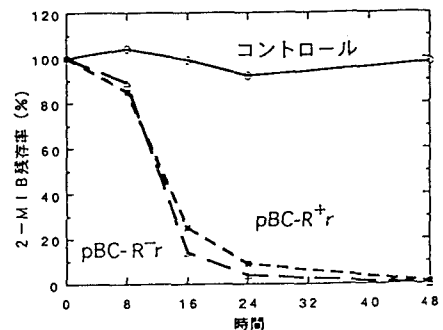


図-3 Cam オペロン 高発現化 plasmid による 2-MIB の分解 IPTG⁺