

## VII-63

## 遺伝子組み換え大腸菌に対する活性の誘導と固定化法の適用

兵庫県 正員 井上直子 京都大学工学研究科 学生員 大河内由美子  
 京都大学工学研究科 正員 越川博元 京都大学工学研究科 正員 寺島泰

## 1. はじめに

廃水処理への適用を目的とした遺伝子組み換え菌の開発も行われているが、その実用化に際しては多くの問題を残している。そこで、本研究では 2-ハロ酸に対する脱ハロゲン化酵素（デハロゲナーゼ）遺伝子<sup>1)</sup>を導入した遺伝子組み換え大腸菌（以下、クローン株）を一例として、デハロゲナーゼ活性発現とプラスミド量の関係について検討した。また、活性発現の安定化を図る一つの方法として固定化法の適用を試みた。

## 2. 実験方法

a: デハロゲナーゼに対する誘導物質の選定

アンピシリンを 0.01%、IPTG を 0.016% になるように添加した LB 培地 5mL を基本培地として、Bromoacetic acid、Chloroacetic acid、2-Chloropropionic acid (2-CPA)、3-Chloropropionic acid (3-CPA)、2,2-Dichloropropionic acid、2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、をそれぞれ最終濃度 1.5mM になるように添加した。ただし、基本培地のみの系を対照実験 (Control) とした。対照実験と同じ培地を用いて前培養を行ったクローン株をこれらの培地に 20μL 植菌し、37°C、200rpm で 15 時間振盪培養を行った。その後直ちに集菌し、デハロゲナーゼ活性の測定を行った。

b: クローン株と元株のデハロゲナーゼ活性発現の比較

2 本の 500mL 羽根付きフラスコに表 1 に示す組成の培地を 100mL ずつ分注し、最終濃度 2mM となるようにプロモ酢酸を添加した後、一方には前培養を行ったクローン株を、他方には前培養を行った *Burkholderia cepacia* (クローン株の元株) を 500μL ずつ植菌した。その後、37°C、150rpm の条件下で振盪培養を行い、経時的にデハロゲナーゼ比活性をそれぞれ測定した。

表1 培地の組成 (pH7. 0)

|                                                 |       |
|-------------------------------------------------|-------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.50% |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0.10% |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 0.10% |
| MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O            | 0.01% |
| Yeast Extract                                   | 0.50% |

c: プロモ酢酸がプラスミド量及びデハロゲナーゼ活性に及ぼす影響

2 本の 500mL 羽根付きフラスコにアンピシリンを 0.01% となるように添加した表 1 に示す組成の培地を 100mL ずつ分注した後、一方には最終濃度 2mM となるようにプロモ酢酸を添加し、他方にはプロモ酢酸を添加せず、前培養を行ったクローン株を 500μL 植菌した。その後、37°C、150rpm の条件下で振盪培養を行い、経時的にそれぞれの培地中菌体濃度とプラスミド濃度を測定した。また、上述と同様の条件でクローン株の培養を行い、培養開始 0、57.5、112.5 時間後にそれぞれ最終濃度 2mM となるようにプロモ酢酸を添加した。培養開始後から経時的にデハロゲナーゼ比活性、プラスミド濃度の測定を行った。

d: 菌体固定化法の適用

2L の羽根付きフラスコにアンピシリン 0.01%、プロモ酢酸 0.02% となるように添加した LB 培地を 500mL 入れ、クローン株を 1mL 植菌した。その後、37°C、150rpm の条件下で 20 時間培養し、集菌後 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5) に菌を懸濁し、固定化に供した。担体としては寒天、ポリアクリルアミドを用い、固定化に供する最適な菌体濃度を検討した後、それら固定化菌体 3mL 分を、それぞれ 100mL 三角フラスコに分注した 100mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 緩衝液 (pH9.5) 5mL の中に入れ、最終濃度が 50mM となるように 2-CPA (pH7) を添加して、これを反応液とした。その後直ちに各三角フラスコを 30°C 下に静置し、反応液中に遊離する塩素イオン濃度を測定することで固定化に供した菌体量当たりの脱ハロゲン活性を求め、固定化前の菌体における脱ハロゲン活性と比較し、固定化による活性の損失を調べた。

キーワード；遺伝子組み換え大腸菌、デハロゲナーゼ活性、プラスミド、菌体固定化

〒606-8501 左京区吉田本町 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 Tel,Fax:075-753-5171

### 3. 実験結果と考察

#### a: デハロゲナーゼに対する誘導物質の選定

各ハロゲン化合物におけるデハロゲナーゼ比活性の結果を図1に示す。これより、クローン株のデハロゲナーゼに対してはモノハロ酢酸、中でもプロモ酢酸が誘導物質として適していることが分かったが、これはクローン株に組み込んだ遺伝子固有の性質にものと考えられる。

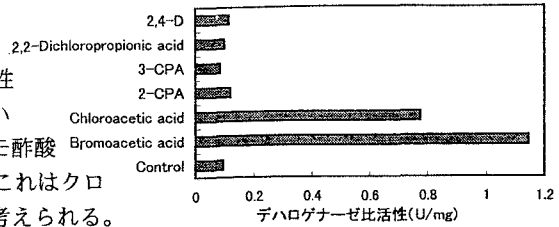


図1 誘導物質の選定

#### b: クローン株と元株のデハロゲナーゼ活性発現の比較

両菌株におけるデハロゲナーゼ比活性の経時変化を図2に示す。これより、クローン株では約 4.5 (U/mg)、*Burkholderia cepacia* では約 0.13 (U/mg) のデハロゲナーゼ比活性が得られることが分かり、クローン株におけるデハロゲナーゼの大量発現が確認された。

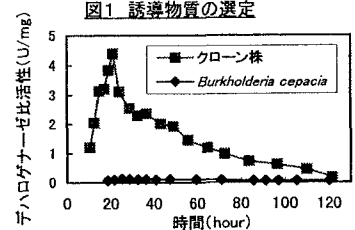


図2 クローン株と元株のデハロゲナーゼ比活性

#### c: プロモ酢酸がプラスミド量及びデハロゲナーゼ活性に及ぼす影響

プロモ酢酸の添加の有無による単位菌体量当たりのプラスミド濃度の経時変化を図3に、プロモ酢酸再添加によるデハロゲナーゼ比活性及び単位菌体量当たりのプラスミド濃度の経時変化を図4に示す。プロモ酢酸の誘導がかかっている場合はプラスミド量の低下が始まる時期が遅れること、プロモ酢酸を 2 mM 再添加する事で 10 時間程度、デハロゲナーゼ活性とプラスミド量の低下を抑えられることが分かった。これらの結果はプロモ酢酸がプラスミドを保持しない菌体の生育を抑えたためと考えられる。

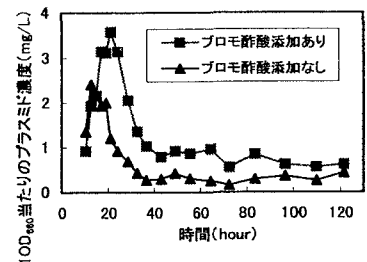


図3 プロモ酢酸添加の有無による単位菌体量当たりのプラスミド濃度の比較

#### d: 菌体固定化法の適用

クローン株の固定化に適する条件を検討した結果、各担体に固定化する最適な菌体濃度は、寒天では 8(mg/mL-担体)、ポリアクリルアミドでは 45(mg/mL-担体)であることが分かり、ポリアクリルアミドの方が高濃度の菌体を固定化することができた。また、固定化時の活性の損失を調べた結果、それぞれの活性残存率は寒天で 16%、ポリアクリルアミドで 1.3%となり、寒天の方が比較的穏和な固定化条件であった。

#### 4. 結論

本研究で用いたクローン株のデハロゲナーゼに対する誘導物質としてはプロモ酢酸が適していること、プロモ酢酸を培地中に添加することでデハロゲナーゼ比活性を高め、更にプラスミド量の低下を抑えることが分かった。しかし、実験期間中におけるプラスミド及び活性の持続性は得られなかった。そこで、活性の持続性向上を目的として固定化法の適用を試みた。寒天とポリアクリルアミドを担体として固定化菌体を作成した場合、寒天の方が固定化時の活性の損失が少かった。また、現在、これらの固定化菌体における活性の持続性を検討中である。

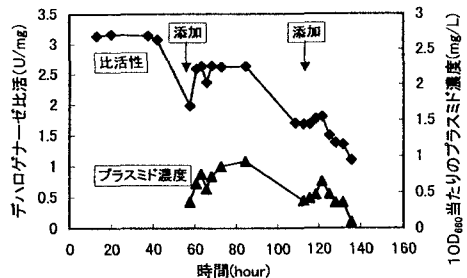


図4 プロモ酢酸再添加によるデハロゲナーゼ比活性とプラスミド濃度の経時変化

#### 参考文献

- 1) Y. Ohkouchi *et al.* Purification and characterization of 2-halo acid dehalogenase produced by 2,4-D degrading strain.