

VII-64

脱ハロゲン化酵素遺伝子のクローニングおよびその発現

京都大学大学院工学研究科 学生員 大河内由美子 正員 越川 博元 正員 寺島 泰

1. はじめに

近年環境汚染性の非生物物質が多量に生産されるにつれて、遺伝子クローニング技術を応用した微生物の改良・育種による汚染物質除去が着目されている。本研究では微生物による有機ハロゲン化合物からの脱ハロゲン化反応に着目し、反応を触媒する酵素、デハロゲナーゼに焦点を当てている。これまでに、本研究室で土壤中より単離した 2,4-D を分解資化する微生物、*Burkholderia cepacia* の菌体内で発現しているデハロゲナーゼに着目して精製を行い、その特性を報告している¹⁾。この *B. cepacia* が生産するデハロゲナーゼは 2-ハロ酸に特異的に作用し、DL 両光学異性体に作用することから、DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼに分類される。本報では、この DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングとその遺伝子発現について報告する。

2. デハロゲナーゼ遺伝子のクローニング

実験方法 炭素源として 1.0g/L の 2,4-D を加えた表 1 の培地 750mL を使用して *B. cepacia* を 30℃、24 時間培養した後、集菌・洗菌を行った。得られた *B. cepacia* の菌体（湿重量 0.5g）から染色体 DNA の抽出・精製を行い、*B. cepacia* の DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子クローニングを以下のそれぞれの手順に従って行った。

表 1 使用した培地組成

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1%
Na ₂ HPO ₄	0.1%
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.01%
炭素源	0.1%
(pH: 7.0)	

図 1 PCR に使用したプライマー対

Forward Primer
5'-GAATTCGAGGAGACACAAATGTC-3' (24mer)

Reverse Primer
5'-GAATTCCTAGCCCTCTCTGTGG-3' (24mer)

1) プラスミド pUCDEXL の構築 抽出した染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* で完全分解して DNA 断片を調製した。調製後の DNA 断片と pUC118/*EcoRI*/BAP（宝酒造）を 16℃下でリガーゼ反応により連結させ、*E. coli* JM109 に形質転換し、200mg/L のプロモ酢酸を含む LB プレートを使用してデハロゲナーゼ活性を有するコロニーのスクリーニングを行った。

2) プラスミド pUCDEXS の構築 *B. cepacia* が生産するデハロゲナーゼは、*Pseudomonas* sp. Strain 113 の DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼに分子量、反応特性ともに類似している¹²⁾。そこですでに報告されている 113 株のデハロゲナーゼ遺伝子の配列³⁾を基に ORF 領域に対応したプライマー対（配列は図 1）を合成し、抽出した染色体 DNA を鋳型とした PCR を行うことでクローニングを試みた。なおプライマー合成はバイオロジカ社に依頼した。各プライマーの 5'末端には *EcoRI* 部位が付加しており、PCR 増幅後、*EcoRI* で完全分解した後、1) と同様の方法クローニングを行った。

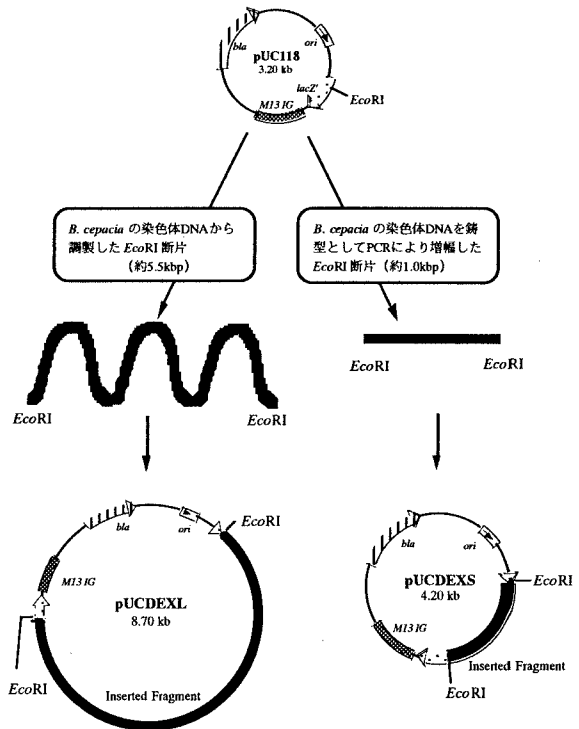


図 2 各プラスミドの構築方法

実験結果 上記 1)の方法によりデハロゲナーゼ遺伝子が挿入された約 5.5kbp のプラスミドを、また 2) の

キーワード 2,4-D 分解菌, DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ, クローニング, 酵素発現
連絡先 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻（京都市左京区吉田本町 TEL/FAX 075-753-5171）

方法により約 4.2kbp のプラスミドをそれぞれ得た。本文中では便宜上、前者を pUCDEXL、後者を pUCDEXS と表記する。

3. DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼの誘導物質の探索

実験方法 2. で得られたプラスミド pUCDEXL を導入した大腸菌株（以降 JM109/pUCDEXL と表記）に対し、以下の実験を行った。本実験ではアンピシリン 50mg/L を加えた LB 培地を基本培地として使用した。まずベクター上に存在する *lac* プロモーターの作用を調べるため、選択物質としてのプロモ酢酸 200mg/L を加えた基本培地を使用して、0~1.0mM の IPTG を添加して培養した場合のデハロゲナーゼ活性を測定した。続いて、野性株である *B. cepacia* および JM109/pUCDEXL を対象として、プロモ酢酸の酵素誘導物質としての効果を調べた。*B. cepacia* には炭素源として酵母エキス 1.0g/L を加えた表 1 の培地を、JM109/pUCDEXL は基本培地を使用して、それぞれ培養した際のデハロゲナーゼ活性を測定した。さらにデハロゲナーゼの誘導に効果的な物質を探索するため、JM109/pUCDEXL 株に対し、11 種類の有機ハロゲン化合物をそれぞれ 1mM 添加して培養した後に活性を測定すると共に、SDS-PAGE によりデハロゲナーゼ生産量の視覚的確認を行った。なお、デハロゲナーゼ活性は 100mM Tris/H₂SO₄ 緩衝液（pH9.5）中で粗酵素液を 25mM DL-2-クロロプロピオン酸と反応させ、30℃・10 分間に遊離した塩素イオン量を Iwasaki らの方法⁴⁾で測定することで算出した。1U は 1 分間に 1μmol の塩素イオンを遊離する酵素量と定義し、タンパク質 1mg 当たりの酵素量を比活性(U/mg)と表す。

結果と考察 表 2 に示すように、JM109/pUCDEXL では IPTG 添加による酵素活性の増大は起こらず、かつプロモ酢酸が存在することで高い比活性が得られた。また図 3 で示すように、野性株においてもプロモ酢酸を添加することで同様にデハロゲナーゼ活性が向上することから、*lac* プロモーター以外の作用が酵素発現に働いている可能性が考えられる。また JM109/pUCDEXL に対して、11 種類の有機ハロゲン化合物によるデハロゲナーゼ誘導効果を調べた結果を表 3 に示す。クロロ酢酸、プロモ酢酸、ヨード酢酸といったモノハロゲン化酢酸を添加した場合にのみ、顕著なデハロゲナーゼ活性の向上が見られた。さらに SDS-PAGE の結果（図は省略）からモノハロゲン化酢酸添加時に、粗酵素液中のデハロゲナーゼ生産量が增大することが明らかになった。

4. まとめ

B. cepacia が有する DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子産物であるデハロゲナーゼを誘導する物質の探索を行った結果、モノハロゲン化酢酸による酵素誘導が確認された。また野性株由来の固有プロモーターが作用している可能性が示唆された。

参考文献

- 1)大河内ら, 環境工学研究論文集, vol. 33, p.185-193, 1996
- 2) K. Motosugi *et al.*, J. Bacteriol., vol.150, No.2, p.522-527, 1982
- 3) Nardì-Dei V *et al.*, J. Bacteriol., vol.179, No.13, p.4232-4238, 1997
- 4) I. Iwasaki *et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, vol.29, No.6, p.860-864, 1956

表 2 IPTG 濃度とデハロゲナーゼ活性

IPTG (mM)	Specific Activity (U/mg)
0	3.73
0.3	3.85
1.0	3.11

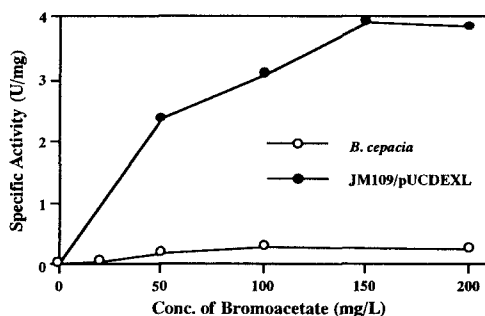


図 3 プロモ酢酸によるデハロゲナーゼの誘導

表 3 有機ハロゲン化合物による酵素の誘導効果
JM109/pUCDEXL の場合

Halogenated Compounds	S. A. (U/mg)	Relative Activity (%)
Control	0.30	100
Chloroacetate	0.65	217
Bromoacetate	1.79	597
Iodoacetate	3.10	1033
Dichloroacetate	0.35	117
Trichloroacetate	0.34	113
DL-2-Chloropropionate	0.38	127
3-Chloropropionate	0.34	113
2,2-Dichloropropionate	0.36	120
2,3-Dichloropropionate	0.25	83.3
2,4-Dichlorophenol	N.D.	—
2,4-Dichlorophenoxy acetate (2,4-D)	0.42	140