

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における PCB 分解遺伝子群転写抑制に関与する物質の特定

東北学院大学大学院工学研究科土木工学専攻 学生会員 伊藤 拓
東北学院大学工学部環境土木工学科 非会員 佐藤 謙太
東北学院大学工学部環境建設工学科 フェロー会員 遠藤 銀朗
長岡技術科学大学工学部 非会員 福田 雅夫
東北学院大学工学部環境建設工学科 正会員 宮内 啓介

1. 序論

発癌性、ホルモン異常、内臓障害、胎児への催奇性などの生物に対する有害性を示す難分解性の環境汚染物質ポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl, 以下 PCB) の処理と汚染の浄化は重要な課題の一つであると考えられる。PCB 汚染の微生物を用いた浄化を目的として、これまでの研究で PCB 分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA1 が単離され、その PCB 分解経路、及び分解に関与する遺伝子群 (*bph* 遺伝子群) が明らかにされている(図 1)。また、これらの分解遺伝子群の転写は BphS と BphT の 2 つのタンパク質の働きによってビフェニル存在下で活性化される。BphS がビフェニルを感知するセンサータンパク質であり、BphT は BphS からのシグナルを得て転写を活性化する転写活性化因子である。

RHA1 を PCB 分解に用いる際には、分解活性が高い菌株を調整する必要があるため、RHA1 株の *bph* 遺伝子群の発現を可能な限り高めることが期待される。

そこで本研究では、RHA1 株の PCB 分解能の指標として、PCB 初発分解遺伝子である *bphAa* のプロモーター領域(P *bphAa*)からの転写活性を用い、効率よく PCB を分解できる微生物を育種する知見を得ることを目的とした。

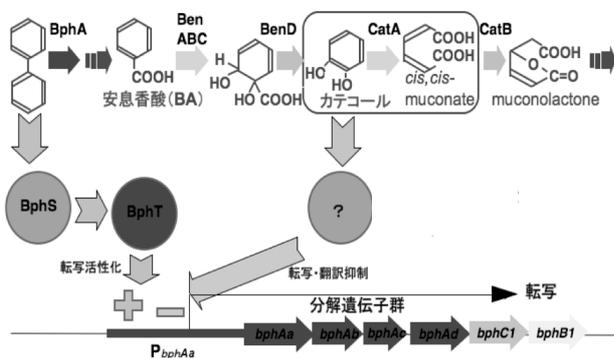


図 1 RHA1 株による PCB/ビフェニル分解経路と *bphAa* の転写制御機構

2. 実験材料および実験方法

2-1 供試細菌株

R. jostii RHA1 及びその遺伝子破壊株 (RHA1 Δ *benA*, RHA1 Δ *benD*, RHA1 Δ *catB*) を用いた。破壊株は相同組換えを用いて作製した。いずれの菌株も 30°C で培養した。

2-2 ルシフェラーゼ活性測定

安息香酸存在下でのビフェニルによる *bphAa* プロモーター活性化の様子を観察するために、レポータープラスミドとして pKLAFl を用いた。pKLAFl はルシフェラーゼ遺伝子の upstream に *bphAa* プロモーター領域を組み込んだもので、分解遺伝子発現の様子を発光量で確認することができる。また、*Rhodococcus* - *E. coli* シャトルベクターである pK4 を用いて構築されているため、RHA1 中で複製可能である。pKLAFl を導入した RHA1 と各遺伝子破壊株を 1/5LB 培地(2g Bacto trypton, 1g Yeast extract, 5g NaCl per liter)にビフェニル (終濃度 10mM) 及び、必要に応じてビフェニル+安息香酸 (終濃度 10mM)、ビフェニル+カテコール (終濃度 10mM) を加えた培地で培養し、三時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。

3. 実験結果及び考察

3-1 PCB 分解遺伝子群転写活性の観察

RHA1 株の PCB 分解遺伝子群の転写が時間の経過とともにどのように変化していくかを、レポータープラスミドを用いて観察した。その結果、菌液濃度をあらかず OD₆₀₀ は上昇し続けているにも関わらず、20hr 前後で転写活性の低下がみられた(図 2)。活性低下の原因として、RHA1 株のビフェニル分解産物の影響を考え、ビフェニル(BP)と共にその分解産物である安息香酸(BA)を培地中に加えて *bphAa* プロモーターの転写活性を測定したところ、転写活性化の抑制が見られた。この結果より、安息香酸を加えると *bphAa* プロモーターの転写活性化が抑制されることが明らかになった(図 3)。

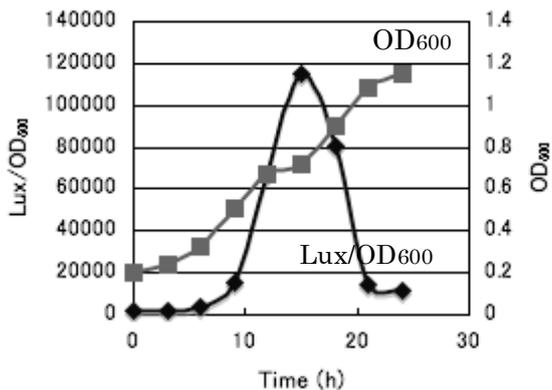


図2 RHA1株における *bphAa* プロモーター転写活性の変化

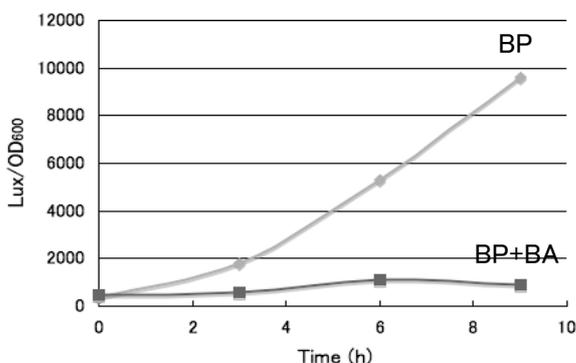


図3 RHA1株における安息香酸による *bphAa* プロモーター転写活性化抑制

3-2 転写活性化抑制の原因物質の究明

安息香酸は、RHA1株中でより下流の分解産物に分解される。そのため、*bphAa* プロモーターの転写活性化抑制の原因物質が安息香酸であるのか、さらに下流の分解産物であるのかの究明を行うことにした。安息香酸の分解遺伝子である *benA*、およびさらに下流の分解遺伝子である *benD*、*catB* それぞれの遺伝子破壊株を作製することにより、代謝経路を各段階で遮断した。各破壊株に pKLAFl を導入し、RHA1(pKLAFl)を対照として *bphAa* プロモーター転写活性を比較した。1/5LB 培地にビフェニル(BP)を加えたものと、それに加えて安息香酸(BA)、または安息香酸よりもさらに下流の分解産物であるカテコール(CAT)をそれぞれ添加(終濃度 10mM)した系を用意し、同様に活性を比較した。

その結果、安息香酸を加えた場合では、RHA1株では強い抑制がみられたが、 $\Delta benA$ 株および $\Delta benD$ 株ではRHA1株に比べ *bphAa* プロモーター転写活性化の抑制は弱まっていた(図4)。しかし、 $\Delta catB$ 株では、安息香酸によってRHA1株と同様の抑制がみられた(図5)。また、カテコールを加えた場合では、いずれの株でも強い転写活性化抑制がみられた(図4,5)。以上の結果から、*bphAa* プロモーターの転写活性化抑制の原因物質はカテコールか、CatBによる代

謝産物である *cis,cis*-muconate のいずれかであることが強く示唆された。

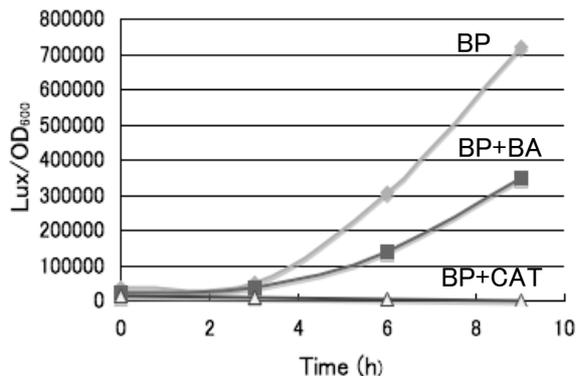


図4 $\Delta benA$ 株における *bphAa* プロモーター活性に対するBP、BA、CATの影響

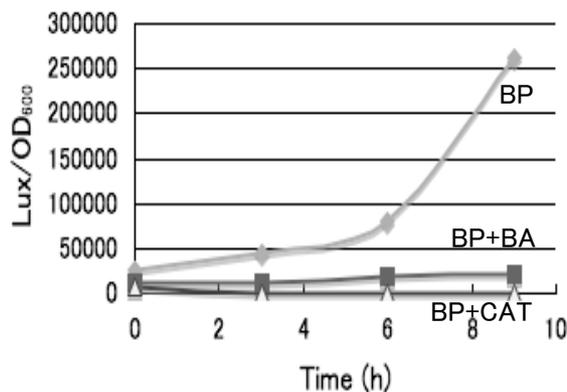


図5 $\Delta catB$ 株における *bphAa* プロモーター活性に対するBP、BA、CATの影響

4. 結論

RHA1をビフェニル存在下で培養した際、時間の経過とともに *bphAa* 遺伝子の転写活性は上昇したのち、低下することがわかった。また、その原因がビフェニルの分解産物である安息香酸の影響である可能性が示唆された。

さらに抑制の原因物質が、安息香酸か、より下流の分解産物であるかを解明するため、 $\Delta benA$ 株、 $\Delta benD$ 株、 $\Delta catB$ 株を作製し、解析した。安息香酸を加えた場合では、 $\Delta benA$ 株、 $\Delta benD$ 株では抑制が弱まっている様子が観察されたが、 $\Delta catB$ 株では、安息香酸によってRHA1と同様の抑制がみられた。また、いずれの株もカテコールによる抑制が見られた。この結果から、抑制の原因物質は、カテコールか、その代謝産物である *cis,cis*-muconate のいずれかであることが強く示唆された(図1)。

今後の課題としては、カテコールを *cis,cis*-muconate に変換するタンパク質をコードしている遺伝子 *catA* の破壊株を作製し、カテコールと *cis,cis*-muconate のいずれが抑制の原因物質であるかについて特定することが必要と考えられる。