

II-86

かび臭產生放線菌に対する 遺伝子工学的アプローチ

東北学院大学 学生員 ○佐藤 儀明

東北学院大学 今井 靖浩

東北学院大学 正 員 石橋 良信

1. はじめに

水につく異臭味、とくにかび臭は、全国各地の水道水源で問題になっている。かび臭の発生要因は統計的、理化学試験的には把握されつつある。しかし、これらかび臭產生微生物の生理・生態、かつ、かび臭物質の微生物体内での二次代謝機構を理解しなければ、その根本的解決にはならない。本稿では遺伝子工学的手法を用い、かび臭物質產生の基礎を追求しようと試みた。ここではプラスミドがかび臭產生に関与するかどうかの判断に伴い、かび臭產生放線菌の分離、同定、プラスミドの抽出方法、放線菌のCuring操作および形質転換方法について記述する。

2. 菌株および実験方法

1) 菌株 放線菌は抗生物質產生の観点から多くの研究がなされており参考の知見の多い故、当座の対象微生物として放線菌 *Streptomyces* 属を選択した。菌は本学付近に位置する加瀬沼および釜房湖底泥より採取し、クレンスキー寒天培地で培養分離した。実験には官能試験でかび臭の認められる加瀬沼 B、C 株(KS-B,C)および釜房湖 B、D 株(KM-B,D)を供した。

2) プラスミド DNA の抽出 かび臭物質生産においても放線菌 *Streptomyces* を継代培養すると世代を重ねるにつれてその臭気を出さない株に変化していく現象が認められる。この現象から二次代謝としてかび臭物質を生産する能力がプラスミド上にあるか否かを遺伝学的に知るために放線菌 *Streptomyces* から薬剤処理法によりプラスミド DNA の抽出を試みた。¹⁾

3) かび臭物質非生産株宿主の調製および形質転換 Curing操作はプラスミドを持たない宿主を作ることであるから、抽出したプラスミド DNA を再びもとの宿主に形質転換する際に欠かせない。細胞をプロトプラスト化して再生させるこのCuring操作は放線菌におけるトランスフォーメーション系では必須の技術である。一般に、そこで放線菌のようなグラム陽性菌では、細胞をプロトプラスト化して再生させてプラスミドを除去する方法が有効であるといわれている。

Curing操作では *E. coli* の形質転換に有効な CaCl_2 薬剤処理方法では要をなさない。代わりに岡西らのグループによって開発された細胞融合によるプロトプラスト化の技術²⁾を基礎とした。一方、形質転換方法によって再生したトランスフォーマントが、かび臭物質を再生産するか否かを観察し、その二次代謝機能あるいは関与がプラスミド DNA 上にあるかを調べた。

3. 結果および考察

かび臭產生放線菌からのプラスミド抽出法を下記の改良を駆使して確立した。*Streptomyces* は *E. coli* と違い、非常に硬く、クレンスキー液体培地ではリゾチーム作用効果も低く、溶菌が困難であった。そこで、培地条件を変更し、リゾチームによる細胞壁を溶かす作用をうけやすくするために、高濃度のグリシンを含む合成培地 (GGC 培地) を用いた。さらに、溶菌を確実にするために 0.1 N $\text{-NH}_4\text{OH}$ 、10 mM 3Na - EDTA、アルカリ処理を加えた。また、リン酸 2 水素カリウムによって DNase の活性を抑えることにより pH の上昇を防ぎ、リゾチーム液と RNase 液の同時作用を促進させた。溶菌液をセルロース粉末でろ過することにより、分解した細胞壁や染色体 DNA を除去し、Cleared lysate の収量を増大した。その結果、上水試験方法で使用するクレンスキー平板培地の硬い放線菌でも容易に溶菌できるようになった。さらに、DSB 透

析 (Dialysis Buffer 透析) 後、フェノール処理および 3 M酢酸ナトリウム添加を行うことにより、電気泳動の際の不要なたんぱく質等を除去できたことが特徴の 1 つである。写真-1 に回収されたプラスミドの一例を示す。

また、Curing に関して、加瀬沼 C 株および釜房湖 B、D 株いずれのプロトプラストも R 3 二重層再生培地において再生させ Curing することができた。官能試験においては Curing 操作前のかび臭物質生産株と比較していずれの株もかび臭物質生成は認められなかった。しかし、この手法によるプラスミドの除去率は数 10% と言われており、完全にプラスミドを保持せず、かつかび臭を発現しない欠損株の選択と調製を急いでいる。

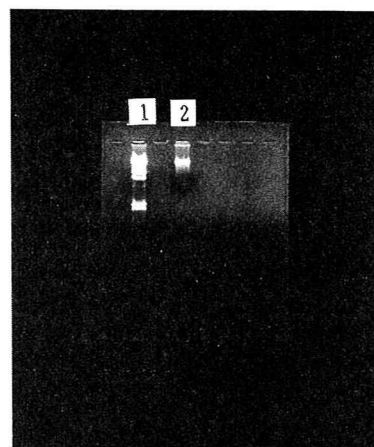
さらに、加瀬沼 C 株および釜房湖 B、D 株において、プロトプラストを調製して形質転換を試みたが、いずれの株も再生は認められなかった。その原因としては、クローニングした DNA 分子が大きく、形質転換率を著しく低下させたこと、また、プロトプラスト懸濁液中に染色体 DNA が遊離し、粘調になっていたこと、PEG 中で多量の DNase が存在し、プラスミドを分解してしまったことなどが考えられる。最も大きな原因としては、宿主の調製にあった。本実験では Curing した同じ菌を宿主に用いたが、このような場合プロトプラスト調製や再生の効率、トランスフォーメーションの効率、内在性プラスミドの Curing 等、多くの繁雑な予備実験を経て宿主を開発しなければならない。したがって、特別の場合を除いては英国 John Innes 研究所が開発した *S. lividans* 66 を宿主として用いるのも一案であろう。

4. おわりに

既存の抗生物質等の研究では、*Streptomyces* の二次代謝におけるこれらの形質発現はプラスミド上にあると考えられた時期があった。その後の研究により、得られたプラスミドのいくつかについて遺伝子のマッピングを行ったところそれは染色体上にあることが判明された。³⁾ かび臭消失などの形質変化の原因がプラスミド上にあるのか染色体 DNA 上にあるのか明確に判定はできないが、*Streptomyces* には多数の伝達性のプラスミドが存在し、転移因子であるトランスポゾンによって遺伝子が染色体 DNA へ組み込まれた結果起こると推測されていることから、現在は後者の説が有力視されている。今後、これらの事象に対応し、かび臭物質産生におけるプラスミド DNA 関与の有無およびその機能をより詳細に解析、検証していきたい。

最後に、本実験を遂行するにあたり、御教示賜った本学遠藤銀朗助教授、東北大学遺伝生態研究センター菊本敏雄助教授、東北大学農学部羽柴輝良助教授、農業環境技術研究所宮下清貴主任研究官に感謝する。

参考文献 1) 石橋良信、佐藤儀明、今井靖浩：かび臭問題解決のための遺伝子工学でアプローチ、第 41 回全国水道研究発表会投稿中。2) Okanishi, M and T. Manome : Isolation and characterization of plasmid DNAs in actinomycetes. J. Antibiotics, Vol. XXXIII, No.1, pp.88-91, 1980. 3) Cramer R. et al. : Chromosomal instability in *Streptomyces glaucescens* : Mapping of Streptomycin-sensitive mutants. J. General Microbiology, 129, pp.519-527, 1983.



1 サイズマーカー (λ DNA)

2 RNase 処理ぬ

写真-1 抽出されたプラスミド (釜房 B 株)