

II-134 カンファー分解geneによるかび臭原因物質（2-MIB）分解能発現

東北学院大学大学院 ○清水昭秀

東北学院大学大学院 及川栄作

東北学院大学工学部 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。このかび臭問題の解決には、かび臭産生微生物の二次代謝機構を理解しなければならない。さらに、かび臭分解菌に関する知見もかび臭除去の観点で重要である。ここでは、遺伝子工学的手法を用いたかび臭分解機構のための実験について報告する。

2. 実験方法

かび臭物質（2-MIB）の分解能実験は、凍結保存されていた菌株、*Pseudomonas* (1-1, 1-2), を 0.2 X PYG 培地にて一晚培養後、分解実験用基礎無機塩溶液（2-MIB 4 μ g/ml, イソノール 2 μ g/ml）200 ml に接種して 25 $^{\circ}$ C で振とう培養を行った。培養液中の 2-MIB は NaCl で塩析、ジクロロメタンで抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）にて経日変化の測定を行った。なお、2-MIB は揮散しやすく、培養にはパラフィルムでシールした 300 ml 共栓付き三角フラスコを用いた。

また、分解能が遺伝子上のどの部位に存在するかの実験は、*Pseudomonas* (1-1, 1-2) より染色体 DNA、プラスミド DNA を回収、調製した。それぞれを図-1 に示すフクロム P-450 遺伝子中の *Bam*HI で切り出された約 830 bp の DNA 断片とこの断片に含まれる *Sac*II, *Sma*I より切り出されたヘム結合領域を含む約 140 bp の DNA 断片の 2 つの断片をサリクロニグし、ランダムプライマー法により [α - 32 P] dCTP で標識をしてプローブの調製を行った後、サリハイブリグイゼーションを行った。なお、フクロム P-450 遺伝子を含む Cam^r ロンはシトルバクター pKT240 にクロニグされており、*Escherichia coli* LE392 株に形質転換を行った。

Cam^r ロンのみによる 2-MIB 分解実験は、M9 を培地に 2-MIB 濃度が 20 μ g/ml になるように添加し、*Pseudomonas* (1-1, 1-2) の分解実験と同じ方法で行った。コントロールにはクロニグに使用したシトルバクター pKT240 を M9 培地（2-MIB 20 μ g/ml）に接種したものを使用した。

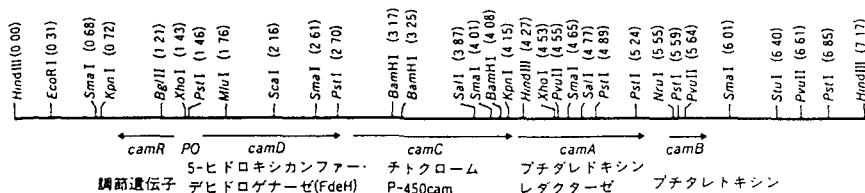


図-1 Cam^r ロンの構造と制限酵素地図¹⁾

PO: プローブ/オペレーターと思われる領域、() 内数字は kb 部位を示す。

3. 実験結果

Pseudomonas (1-1, 1-2) における 2-MIB の分解能を図-2 のように確認することができた。

一方、2-MIB と立体化学的に非常に類似した構造を示したカンファーを唯一の炭素源として生育できる、Cam^r ロン遺伝子は、フクロム P-450 遺伝子をコードしている。この P-450 遺伝子は、2-MIB と構造のよく似た物質を分解する際にかかわっていることから、2-MIB 分解にも P-450 遺伝子が関与して

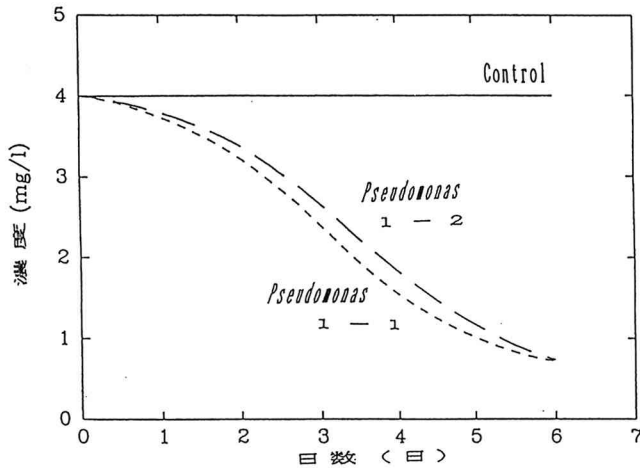


図-2 *Pseudomonas*による2-MIBの分解

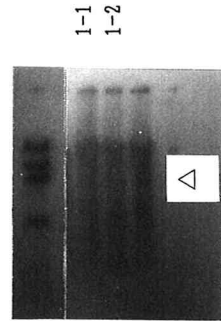


図-3 サザンハイブリダイゼーション
結果, (*Hind*Ⅲで切断)

いと見込まれる。このことから、*CamA⁺*のバクテリアから、哺乳動物にいたる間で高く保存されている領域であるヘム結合領域を上記のプロープにして、2-MIB 分解菌からのP-450Cam類似遺伝子の探索を、サザンハイブリダイゼーションにより行った。その結果、図-3に示すように *Pseudomonas* (1-1, 1-2) より調製した染色体の *Hind*Ⅲ で切り出される約 6.5 Kbpの DNA断片にサザンハイブリダイゼーションによる反応が認められ、分解能が染色体 DNA上にコードしていることが示唆された。

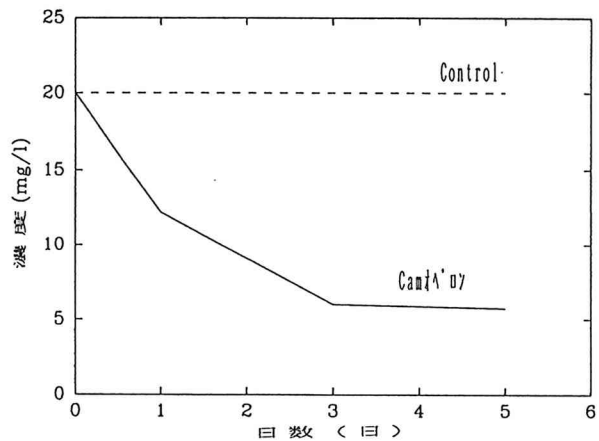


図-4 *CamA⁺*の遺伝子による2-MIBの分解

また、*CamA⁺*の遺伝子による2-MIB 分解能の確認を試みた結果、*CamA⁺*はカゾーのみでなく2-MIBをも図-4のように分解することが確認でき、2-MIB 分解に対しても *CamA⁺*に近いチクロ-A P-450 遺伝子の関与が予想された。

4. おわりに

かび臭分解機構に遺伝子工学を用いた研究は緒についたばかりであり、今後さらに究明すれば、より詳細な結果が得られることが期待できる。本実験を遂行するにあたり、*Pseudomonas* は大阪市環境科学研究所、芳倉太郎博士から、カゾー分解は九州大学薬学部、堀内忠郎教授（現創価大学）、相良康弘博士より譲りうけたことを記し感謝するとともに、卒研生安部儀明、渡辺 聡両君の労に感謝する。

参考文献) 古賀秀雄、堀内忠郎：細菌 P-450遺伝子の構造、細胞工学、6, 2, 142-151, 1987.