

II - 99

かび臭物質 2-MIB 分解遺伝子 P-450 cam オペロンの プロモーター変換による高発現化プラスミドの構築

東北学院大学大学院 学生員 ○清水 昭秀
同 学生員 及川 栄作
同 工学部 正会員 石橋 良信

1. 研究目的

水に着く異臭味、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。最近では毎年、近畿地方、関東地方を中心に 2100 万人以上の人々が被害を受けている。本研究では、このかび臭問題を取り上げ、より効果的な微生物によるかび臭物質の除去を目的として、遺伝子工学を駆使した方法で、まず、*cam*-分解代謝経路の初期段階を担いすでに本研究室において 2-MIB を分解することが明らかにされている遺伝子 *Cam* オペロンを用い、*Cam* オペロンの中の 2-MIB 分解に関与している構造遺伝子の同定を試みた。また、高発現化プラスミドの構築をしてこれを導入した組換え微生物を用いた分解実験を行った。

2. 研究方法

Cam オペロンの 2-MIB 分解に関与している遺伝子を同定する実験は、オペロン中の *cam A*, *B* を欠失させたプラスミド、*cam A*, *B*, *C* を欠失させたプラスミドをそれぞれ構築し、後に述べる分解試験に用いた。*Cam* オペロン高発現化プラスミドの構築は、① プラスミドとして大腸菌宿主ベクター系のマルチコピー-性で一般的に使用されているクロニクベクターである pBluescript を用いた。② pBluescript の *lac Z* プロモーター制御下の順方向と、非制御下の逆方向に配置したプラスミドを構築した。③ *Cam* オペロンの抑制に働く調節遺伝子 *Cam R* を欠失したものと欠失しないもののプラスミドの構築を行った。（①～③、図-1）

分解試験は、プラスミドを保有する大腸菌を終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ の 7% シリ入り 3ml の 2×LB 液体培地で 37℃ 一晚培養し、この内の 400 μl を同じ濃度の 7% シリ と終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ の 2-MIB 入りの 40ml の M9 液体培地に植え継ぎ 37℃ で 2～3 時間培養し、培養液の $\text{OD}_{600\text{nm}}$ が 0.2 になった所で *lac Z* 遺伝子の誘導物質である IPTG を添加した。また、同時に無添加のものも用意し残存率の相違を調べた。なお、培養は 48 時間行い 0, 8, 16, 24, 48 時間目に培養液の一部 2ml を分取し、塩析、ジクロロメタン抽出しその後、GC-MS (ガスクロマトグラフィー-質量分析計) を使用して残存 2-MIB 量を測定した。

3. 研究結果

- 1) *Cam* オペロンによる 2-MIB 分解は、*Cam* オペロンを構成している *cam* 遺伝子のうち *cam A*, *B* を欠失させた場合と、*cam A*, *B*, *C* を欠失させた場合とでどちらにも 2-MIB の減少は見られなかった。このことから、*Cam* オペロンによる 2-MIB を分解には、オペロン全長が必要であることが示された。
- 2) *Cam* オペロン高発現化プラスミドを保有する組換え体による 2-MIB 分解実験は、調節遺

伝子である *camR* を除いた場合に以前より明らかに増して減少を示し（図-2, 3）、*lacZ* β -非制御下の逆方向に配置した場合には、最も効率が良く16時間目に約90%の2-MIB減少を示し、さらに2日目で約100%の減少を示したため、以前より倍の速度効率で半分の時間で減少させることができた。（図-3）

- 3) 本研究は、高度処理プロセスでのかび臭原因物質の浄化機構解明やより効果的なかび臭物質除去のための強力な手段となり得ると考えられ、さらなる基礎研究、遺伝子工学の応用が期待される。

4. おわりに

本研究を遂行するにあたり *Cam* オペロン遺伝子は、九州大学薬学部、堀内忠郎教授（現創価大学）、相良康弘氏（現高知医科大学）より譲りうけたこと記し感謝するとともに、卒研生一同のみなさんに感謝する。

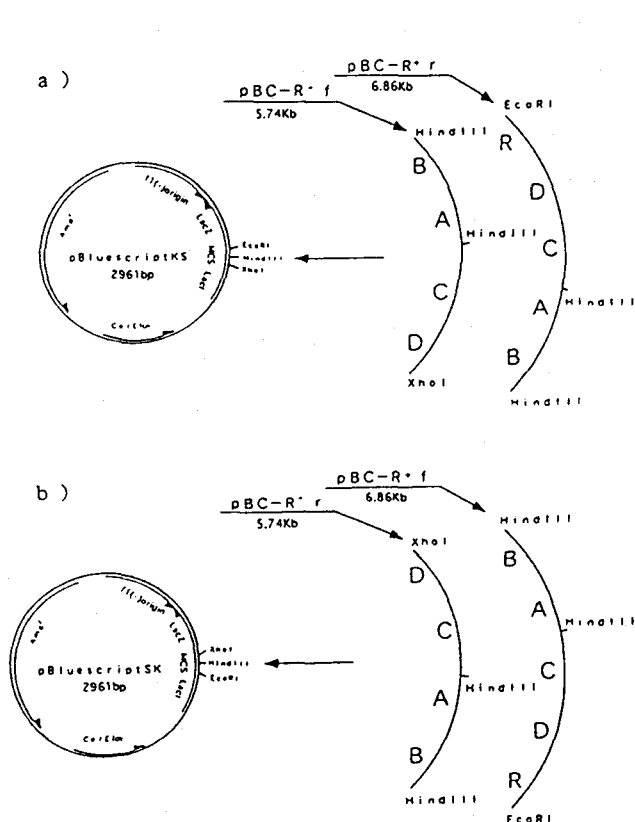


図-1 *Cam* オペロン高発現化プラスミドの構築

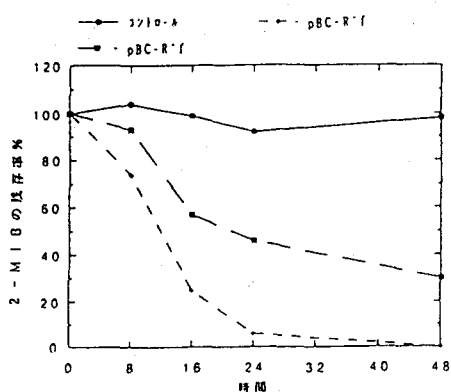


図-2 *Cam* オペロンの高発現化による2-MIBの残存率% (IPTG, *Ca²⁺*の濃度: *lacZ* β -非制御)

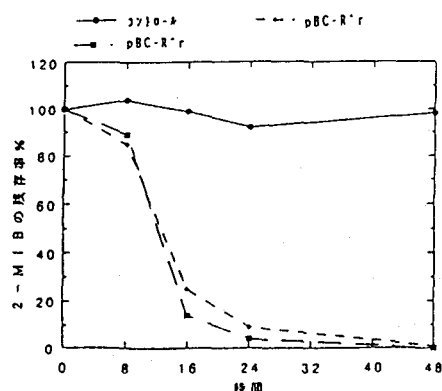


図-3 *Cam* オペロンの高発現化による2-MIBの残存率% (IPTG, *Ca²⁺*の濃度: *lacZ* β -非制御)