

ポリ塩化ビフェニル分解菌の分解遺伝子発現に関する研究

東北学院大学	学生会員	○伊藤 拓
東北学院大学	非会員	石山 洋介
東北学院大学	非会員	羽州 晃
長岡技術科学大学	非会員	福田 雅夫
東北学院大学	フェロー	遠藤 銀朗
東北学院大学	正会員	宮内 啓介

1 はじめに

環境を汚染する難分解性物質の一つとしてポリ塩化ビフェニル(以下 PCB)がある。PCB は化学的に非常に安定な物質であり、絶縁性、不燃性、高脂溶性、低揮発性に優れていることから幅広く利用され、大量生産された。その後、生物に対する有害性が発覚し、1970 年代には環境汚染物質と認識され使用・生産・廃棄が制限された。しかし、それ以前に生産された PCB の 1/3 が環境中に漏出したと推定されている。また、廃棄できず保管された PCB の処理も大きな問題となっている。

PCB を無害化する方法の一つとして、微生物の分解能力を活用した生物学的処理がある。この方法は安価で安全であるため、土壤汚染のような低濃度で広範囲の汚染を浄化する新しい環境浄化法として、また保管されている PCB の処理法として期待されている。

PCB 汚染の微生物を用いた浄化を目的として、PCB 分解菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 が単離された。これまでに、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 (Fig. 1)、2006 年にはそのゲノム配列が決定された(福田ら,2005)。また、これらの分解遺伝子群は、ビフェニル存在下で転写が活性化されることが明らかになっている。RHA1 を PCB 分解に用いるためには、分解活性が高い菌体を調整する手法の開発が期待される。現在までに *bph* 遺伝子群の転写に関与する因子はビフェニル等の芳香族化合物のみが知られているが、他の因子の存在も考えられる。一般的に細菌においては、生育に応じて遺伝子の発現が変化することが知られているため、本研究では RHA1 の培養上清中に *bph* 遺伝子群の転写や RHA1 の生育に影響を与える物質が存在するかを調べた。

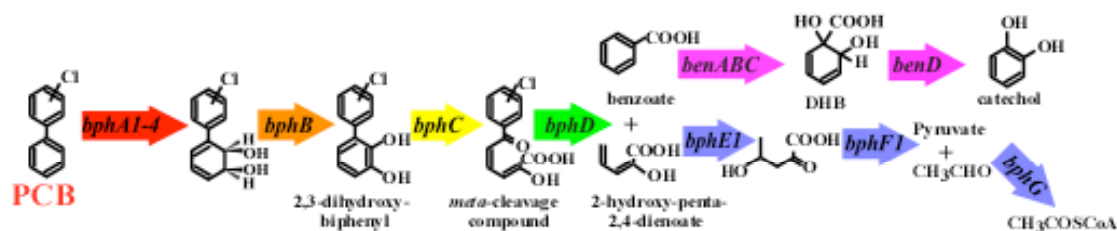


Fig. 1 *Rhodococcus* sp. RHA1 による PCB 分解経路と分解関与遺伝子群

2 材料と方法

2-1 供試細菌株

PCB 分解菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 にプラスミド pKLA1 を導入した組換え体を用いた。pKLA1 はレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子上流に PCB 分解遺伝子である *bphA1* のプロモーター領域が挿入されており、分解遺伝子の発現を発光量でモニター可能である。

2-2 使用培地

RHA1 の生育には 1/5LB 培地 (2 g bactotrypton, 1 g yeast extract, 5 g NaCl per liter) を用い、30℃で培養した。1/5LB で生育させた後の培養上清を 1/5LBCM (CM; conditioned medium) と標記する。また、1/5LB 培地の成分のうち、bactotrypton と yeast extract の濃度を 50 倍に調整した溶液を調整し、栄養源を補うために用いた。この溶液を 10xLB と標記する。

2-3 *bphA1* プロモーター活性の測定

RHA1 (pKLAF1) 株を各培地に植菌し、培養した。一定時間ごとに菌液を採取し、0.1% 1-decanal を加えて発光量を測定した。

2-4 菌体凝集の評価

RHA1 を各培地が入った試験管に植菌し、30℃で振とう培養した。1～2 日培養後、試験管の底に菌の凝集が見られるかを観察した。

3 実験結果および考察

RHA1 の 1/5LB 培地培養上清（以下 1/5LBCM）を作製し、RHA1 株を植菌して生育を観察した。その結果、生育は観察されず、また、1/5LBCM に 10xLB を 1/50 量加えることで、RHA1 の生育は回復した。このことから、1/5LBCM には生育に必要な栄養源が枯渇していることが示唆された。また、1/5LBCM には RHA1 が生育中に生産・変換した様々な化合物が含まれていると考えられる。

1/5LBCM 中に含まれる化合物の PCB 分解遺伝子発現への影響を調べるため、1/5LBCM+10xLB 培地と 1/5LB 培地にビフェニルを加えて RHA1 (pKLAF1) 株を培養し、0、12、18、24 時間後に *bphA1* プロモーターからの転写誘導を観察した。その結果、1/5LBCM+10xLB 培地で培養した菌液の方が高い発光値を示した。また、1/5LB 培地で培養した菌液において菌体の凝集が確認されたのに対し、1/5LBCM+10xLB 培地で培養した菌液では凝集が確認されなかった。この結果より、1/5LBCM 中にプロモーター活性を上昇させる物質が含まれている可能性、及び 1/5LBCM で培養することにより菌体凝集が阻止され、菌体表面積が増大したことによって活性が上昇した可能性が考えられた。

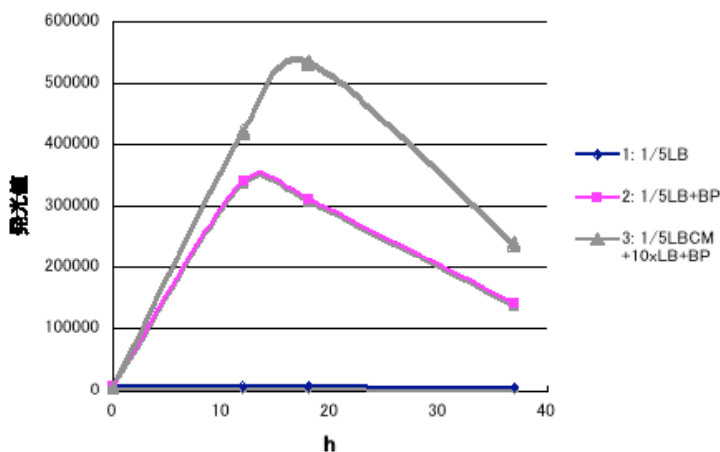


Fig. 2 *bphA1*のプロモーター活性
各培地にビフェニルを加えて発光値を測定した。

このうち菌体凝集についての知見を得るための実験過程において、RHA1 を、NaCl を含まない 1/5LB 培地で培養したとき、凝集が観察されることが明らかになった。NaCl の有無が菌体に与える影響を調べるため、菌体の全タンパク質の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動解析及び菌の形態の顕微鏡観察を行ったが、NaCl の有無による顕著な違いは観察されなかった。また、1/5LBCM+10xLB 培地に NaCl を加えて菌体を培養しても凝集は抑えられたことから、1/5LBCM には何らかの凝集阻止活性が含まれていることが示唆された。

これらのことから、培地に NaCl を添加しないことで、菌体の凝集が抑えられることが明らかとなった。凝集が抑えられることで、分解能の上昇と同時に菌体の取り扱いが容易になることが期待される。今後は NaCl が菌体の凝集に与える影響を探るとともに、1/5LBCM 培地中に含まれる凝集阻止成分の同定及びプロモーター活性に対する影響を解析することで、分解に適した菌体を調整することが可能になると考えられる。

4 参考文献

福田雅夫、宮内啓介、政井英司「*Rhodococcus* 属細菌の PCB 分解システム」蛋白質核酸酵素 vol.50 1541-7 (2005)