

PCB 分解菌の芳香族化合物分解・耐性能に関する研究

東北学院大学 正会員 ○宮内 啓介
東北学院大学 菊池 恵里
東北学院大学 高橋 理絵
長岡技術科学大学 福田 雅夫

1 はじめに

工場跡地等で、アルカン・芳香族化合物による土壤汚染が問題になるケースが多数あり、再開発の妨げになっている。このような汚染を解決する策の一つとして、微生物の持つ力によって汚染物質を分解するバイオレメディエーション法が注目を集めている。これまでに我々は、環境を汚染する難分解性物質の一つであるポリ塩化ビフェニル(以下PCB)分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のPCB分解機構について研究を進めてきた。RHA1株はPCBの他にも、ベンゼン、エチルベンゼン等の幅広い芳香族化合物を単一炭素源として生育可能であることが明らかとなっており、その性質を利用することで、幅広い芳香族化合物汚染の浄化にも対応可能であると考えられる。RHA1のPCB分解については、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(1、2)。本研究では、RHA1株のアルカン・芳香族化合物に対する耐性能を調べ、芳香族化合物分解に関与する遺伝子の破壊株を作製することで、耐性能と分解能の関係を調べることを目的として研究を行った。



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を用いた。また、RHA1株の *bphAa* 遺伝子を破壊した RHA1 Δ *bphAa* 株を構築し、実験に用いた。

2-2 使用培地

RHA1の生育には1/5LB培地(2g bactotrypton, 1g yeast extract, 5g NaCl per liter)を用いた。

2-3 *bphAa* 遺伝子破壊法

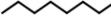
RHA1の遺伝子破壊は、Van der Geizeらの方法(3)に従っておこなった。*bphAa*遺伝子上流と下流のDNA領域約1.2kbをpolymerase chain reaction(PCR)で増幅し、遺伝子破壊用プラスミドpK1812を構築してRHA1に導入し、相同組換えを用いて遺伝子破壊をおこなった。得られた候補株は、PCRによって破壊を確認した。

2-4 疎水性物質耐性能の評価

RHA1を5mlの1/5LB培地が入ったスクリーキャップ付きの試験管にOD600=0.2になるように植菌し、疎水性化合物を0.5%加えたのち、30°Cで24hr培養し、OD600を測定した。

3 実験結果および考察

RHA1の各種疎水性物質に対する耐性を調べた。疎水性物質として、*n*-decane、*n*-octane、propylbenzene、*n*-hexane、ethylbenzene、*p*-xylene、*n*-heptanolを用いた。これらの物質0.5%存在下での、24時間後の生育を調べた。その結果、

化合物名	構造式	log P _{ow}	growth of	
			RHA1	$\Delta bphAa$
-	-	-	++	++
<i>n</i> -decane		5.6	-	-
<i>n</i> -octane		4.5	-	-
propylbenzen		3.6	+	+
<i>n</i> -hexane		3.5	-	-
ethylbenzene		3.1	+	+
<i>p</i> -xylene		3.1	+	+
<i>n</i> -heptanol		2.3	+	+

という結果であった。

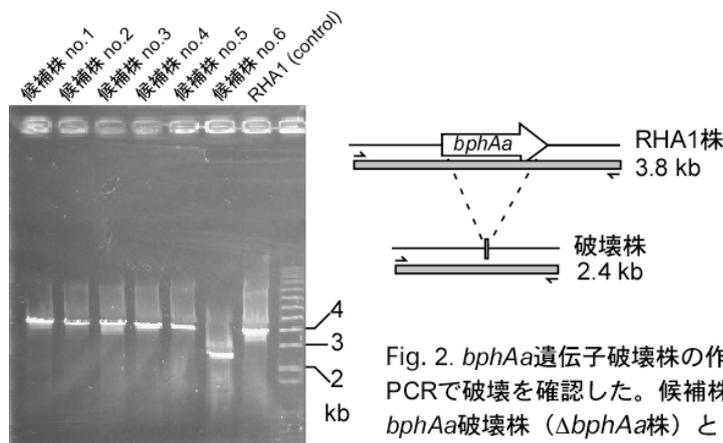


Fig. 2. *bphAa*遺伝子破壊株の作製 PCRで破壊を確認した。候補株no.6を *bphAa*破壊株 ($\Delta bphAa$ 株)とした

り、BphA を例にとると、BphAaBphAb が酸素添加酵素、BphAc と BphAd が BphAaAb に電子を伝達する役割を担っている。BphA は *bphAa bphAb bphAc bphAd* 遺伝子クラスターに、EtbA は *etbAa1 etbAb1 etbAc, etbAa2 etbAb2 etbAc, etbAd* の3つの遺伝子クラスターにコードされている。また、*etbAa1 etbAb1* と *etbAa2 etbAb2* は同一のアミノ酸配列をコードしている。今回の実験の結果、*bphAa* 破壊株の構築に成功した (Fig. 2)。得られた破壊株の各種化合物に対する耐性を調べたところ、野生株である RHA1 と同じ耐性パターンを示した (表)。また、この株のエチルベンゼンを基質とした生育を確認したところ、野生株である RHA1 株と同様の生育が確認された。このことから、*bphAa* 遺伝子を破壊しても、*etbAa1, etbAa2* 遺伝子はその役割を補填することが示唆された。以前の研究で、エチルベンゼン分解能を持たない菌株に *etbA* 遺伝子群を導入したところ分解能を示すことが明らかになっており (4)、今回の結果はこれと矛盾しない。分解能を失った株を作製し、耐性能との関係を明らかにするためには、さらに2つの遺伝子 (*etbAa1, etbAa2*) の破壊が必要であると考えられる。本研究において、RHA1 がエチルベンゼン等の芳香族化合物存在下でもその生育が阻害されないことが明らかとなった。今後は本菌の持つ疎水性物質に対する耐性機構を明らかにするとともに、長鎖のアルカンに対する耐性について明らかにする予定である。

4 参考文献

1. 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)
2. McLeod MP. *et al.* The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 103, 15582-7 (2006)
3. Van der Geize *et al.*, Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. FEMS Microbiol. Lett. vol. 205, 197-202 (2001).
4. Iwasaki T, *et al.* Characterization of Two Biphenyl Dioxygenases for Biphenyl/PCB Degradation in A PCB Degrader, *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. Biosci. Biotech. Biochem. vol. 71, 993-1002 (2006)

propylbenzene、ethylbenzene、*p*-xylene、*n*-heptanol に対しては耐性を示したが、*n*-decane、*n*-octane、*n*-hexane に対しては耐性を示さなかった (表)。耐性を示した化合物のうち、propylbenzene、ethylbenzene は RHA1 の生育基質となるが、*p*-xylene は生育基質とはならない。このことから、RHA1 株はこれらの物質を分解することで耐性を示すのではなく、疎水性物質そのものに対する耐性機構を保持していることが示唆された。今回用いた基質では、疎水性が高い物質 (logPow が 4.5 以上) には耐性を示さず、疎水性が比較的低い物質 (logPow が 3.1 以下) には耐性を示す、

上記の実験と平行して、分解能と耐性能の関係を調べるため、エチルベンゼンの分解に関与しているとされている *bphAa, etbAa1, etbAa2* の3種の遺伝子の破壊を試みた。RHA1 において、ビフェニルをはじめとする芳香族化合物分解の初発反応は、ジオキシゲナーゼと呼ばれる酵素による酸素添加反応である。これは、BphA と EtbA という酵素によって行われている。これらは複数のタンパク質からなる複合体であ