

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における安息香酸存在下での PCB 分解遺伝子群転写抑制機構の解析

東北学院大学	学生会員	○寒河江 秀和
東北学院大学		中澤 皓次郎
東北学院大学	学生会員	伊藤 拓
長岡技術科学大学		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、土壌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 jostii* 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(福田ら、2005、Fig. 1)、2006 年にはそのゲノム配列が決定された(McLeod ら、2006)。また、*bph* 遺伝子群はビフェニル存在下で転写が活性化されるが、ビフェニルと同時にその分解産物である安息香酸が存在すると *bph* 遺伝子群の転写活性化が抑制されることが明らかとなった。そこで本研究では、RHA1 が常に PCB 分解能を発揮するようにするために、安息香酸による転写活性抑制の原因を明らかにすることを試みた。

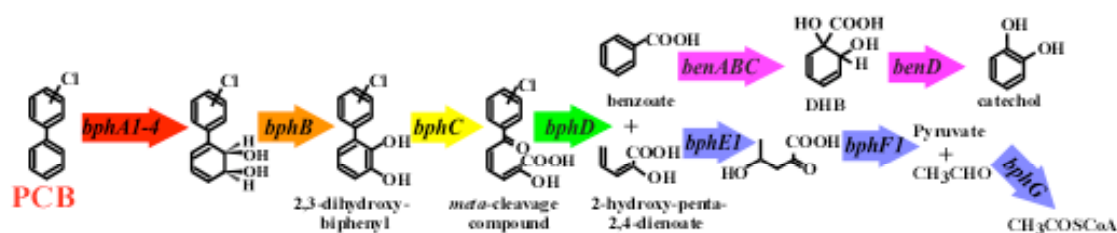


Fig. 1 *Rhodococcus sp.* RHA1 による PCB 分解経路と分解関与遺伝子群

2 材料と方法

2-1 供試細菌株

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 及びその遺伝子破壊株にプラスミド pKLAFl を導入した組換え体を用いた。pKLAFl はレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の upstream に PCB 分解遺伝子である *bphAa* 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°C で培養した。ビフェ

キーワード: PCB、バイオレメディエーション、微生物、遺伝子

連絡先: 宮内啓介 多賀城市中央 1-1 3-1

Tel: 022-368-7445

E-mail: kmiya@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

ニル、安息香酸、およびカテコールは10mM になるように加えた。

2-3 *crc* 相同性遺伝子の破壊

相同組換えによる *crc* 相同性遺伝子(4 種)の破壊をおこなった。各遺伝子の破壊はサザンハイブリダイゼーションを用いて確認した。

2-4 *bphAa* プロモーター活性の測定

RHA1 (pKLAFl) 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、100ul の菌液に 25ul の 0.1% 1-decanol を加えて発光量を測定した。発光量を菌液の濁度で割ったものをプロモーター活性とした。

3 実験結果および考察

安息香酸存在下での *bphAa* プロモーター活性の低下原因を調べるため、1/5LB 培地に、ビフェニル (BP)、ビフェニル+安息香酸 (BA)、ビフェニル+カテコール (CAT) をそれぞれ加えて RHA1(pKLAFl)株を培養し、*bphAa* プロモーターからの転写誘導を観察した。その結果、ビフェニルのみを加えた場合には、*bphAa* プロモーター活性は上昇したが、ビフェニル+安息香酸、ビフェニル+カテコールを加えた場合には *bphAa* プロモーター活性の上昇は観察されなかった (Fig. 2)。このことから、転写抑制に関与しているのは安息香酸自体ではなく、その下流代謝産物であるカテコール、もしくはその分解産物であると考えられた。

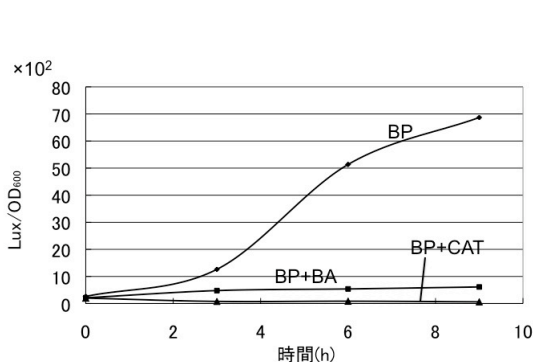


Fig. 2. RHA1株における各種基質存在下での*bphAa*プロモーター活性

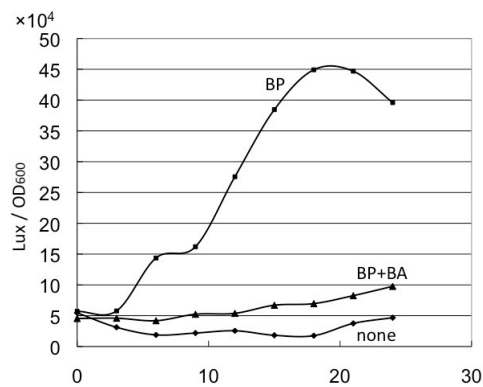


Fig. 3. ro6240破壊株における各種基質存在下での*bphAa*プロモーター活性

また同時に、この転写抑制に関わるタンパク質の同定を試みた。Moreno らは、安息香酸分解菌において、Crc というタンパク質が安息香酸分解遺伝子群の mRNA に結合することで、発現を抑制することを明らかにしている (Moreno ら、2008)。RHA1 のゲノム配列を検索したところ、*crc* 遺伝子と相同性を示す遺伝子が ro00291、ro02178、ro03883、ro06240 の4種類存在することが明らかとなった。そこでこれらの遺伝子破壊株を作製し、各遺伝子破壊株を用いて上記と同様の実験をおこなった。そのうち ro06240 破壊株の結果を Fig. 3 に示す。ro06240 の破壊によっては、ビフェニル存在下での *bphAa* プロモーター活性化の安息香酸による抑制は解除されなかった。他の3種の破壊株についても同様の結果であった。これら4種の遺伝子産物は相同性が高いため、そのうち一つを破壊しても、他の遺伝子とその機能を相補している可能性が考えられる。今後、2-4重破壊株を作製し、それを用いて解析をおこなう必要がある。本現象の原因となる遺伝子を同定することで、PCB 分解能を常に発揮する菌の作製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 **50**. 1541-7 (2005)
- McLeod MP *et al.* The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **17**. 103:15582-7 (2006)
- Moreno R, Rojo F. The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol.* **190**. 1539-45 (2008)