

トリクロロエチレン分解能を有する細菌への 蛍光遺伝子の導入および検出

東北学院大学 工学部 学生会員 ○渡辺 健幸
東北学院大学 工学部 正会員 中村寛治

1. はじめに

トリクロロエチレン (TCE) は金属部品などの脱脂洗浄等に使用されており、広く地下水を汚染している。また、発がん性の疑いがあり、TCE汚染の放置は好ましくはない。そのため、TCEを効率的に好気分解処理する方法として、フェノール資化細菌の有するフェノールヒドロキシラーゼ (以下、PH) を利用する方法がある。PHはフェノールの他にTCEに対しても分解能を有する。それゆえ、これまでに相同的組換えによってPH遺伝子群上流に強力なプロモーターを挿入し、構成的発現で、かつ高い分解能力を持つ組換え体の開発も試みられている¹⁾。

一方、このような組換え体は、自然環境下に放出されると、原生動物の捕食を受ける。それゆえ、混合系の微生物群集の中で、その捕食挙動を解析するためには、何らかの形でラベル化することが必要となる。そこで、本研究ではフェノール資化細菌 *Cupriavidus* sp. TW2 株を利用し、構成的な発現を行う *tac* プロモーターを相同的組換えにより PH 遺伝子群の上流に挿入すると共に、PH 遺伝子群の下流に緑色の蛍光タンパクをコードする GFP 遺伝子の導入を検討する。作製される組換え体が直接蛍光顕微鏡下で確認できるようになれば、自然環境下で、原生動物に捕食される様子等を直接観察することができる。

2. 実験材料および方法

2-1 使用した細菌について

本研究で使用した細菌は、神奈川県内で取得されたフェノール資化細菌 *Cupriavidus* sp. TW2 株 (以下、TW2 株) である。本細菌は、LB 培地にて 30℃ で一晚培養し、実験に使用した。

2-2 DNA 抽出法

DNA抽出は、前項のLB培地で培養した培養液を使用した。培養液 800 μ L を 2mL容積のプラスチックチューブに入れ、遠心分離にかけ(11,100 $\times$ g, 10 min, 4℃)、上澄液を捨てた。その後、既報の論文²⁾に従って、凍結融解、SDS処理、セラミックビーズにより破碎処理を行い、最終的に抽出したDNAは 50 μ LのTEに溶解した。

2-3 PH 遺伝子群の PCR 増幅および塩基配列の決定

TW2 株から抽出したDNAをテンプレートに、以下のプライマーを利用してPH遺伝子群の全域をPCR増幅した。PH-F (5'-CCG AAC TGC GCC GCT ATG ACT-3')およびPH-R (5'-CCG CCA GAA AAG ACC TCG TTC C-3')。これらのプライマーは*Ralstonia* sp. KN1 株³⁾ (以下、KN1 株) のPH遺伝子群の配列から、プライマーデザインソフトOligo 7 を使って設計した。PCR増幅にはタカラバイオ製Gflex DNAポリメラーゼを利用し、PCR条件は添付マニュアルに従って設定した。また、合成されたPH遺伝子群のDNA塩基配列をBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitおよび3130 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ製) により決定した。

2-4 相同的組換え部分の取得

相同的組換えに利用する部分を PCR 合成するために、前項で決定された KN1 株の PH 遺伝子群の DNA 塩基配列から、プライマーを設計した。合成された相同的組み換え用の DNA 断片は、図-1 に示すように、*phyZ*上流の F1 (約 600 bp)、*phyZ*下流の F2 (約 600bp)、および *phyE*の終点を含む R1 (約 1,200bp) とした。また、R1 中の *phyE*の終点の直ぐ下流に *EcoT22I* サイトがあり、このサイト(T4 ポリメラーゼ処理)を利用して GFP 遺伝子を挿入した。上流に挿入する *tac* プロモーターは日本遺伝子研究所に合成依頼し、GFP 遺伝子はプラスミドベクターpQBI63 の GFP 遺伝子(*XbaI*~*BamHI* 断片を T4 ポリメラーゼ処理)を利用した。

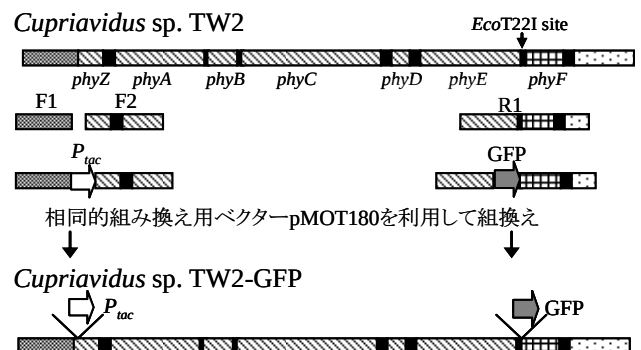


図-1 相同的組換えの手順

キーワード 相同的組換え 蛍光遺伝子

連絡先 中村 寛治 (宮城県多賀城市中央 1-13-1)

TEL 022-368-7493

2-5 接合による相同的組換え

相同領域を pMOT180 (文献 1 中の pMOK180 の耐性遺伝子をカナマイシンからテトラサイクリンに置き換えたベクター) に挿入し、これを大腸菌 *E.coli* 7-1 に導入しフィルター上で 30℃にて *Cupriavidus* sp. TW2 株と LB 寒天培地上で 1 日間接合を行なった。その後、接合した混合菌体は無機栄養塩類、乳酸 2 mM、テトラサイクリン 10 mg/L を含有するの寒天培地に塗布し、Single Crossover 株を選出した。図-2 に示すように、pMOT180 中には *lacZ* が導入されているため、pMOT180 全体が組み込まれた Single Crossover 株は X-gal を含む LB 寒天培地上で青色コロニーを形成する。次に、Single Crossover 株を LB 培地で 30℃で 1 日間培養し、希釈したものを X-gal を含む LB 寒天培地に塗布し、30℃で 2 日間培養し、出現する白色コロニーの Double Crossover 株を選出した。

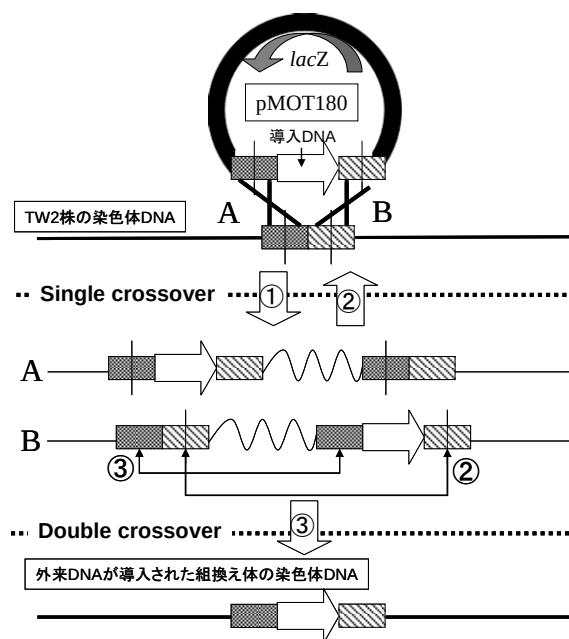


図-2 相同的組換えによる外来 DNA の導入過程

3. 実験結果

3-1 相同的組換えによる *Cupriavidus* sp. TW2-GFP 株の作製

本研究で行なった相同的組換えの過程を図-2 に示す。今回、導入を行ったのは図-1 で示した *tac* プロモーターと GFP 遺伝子である。これら外来 DNA は pMOT180 のマルチクローニングサイトに相同部分の DNA と共に組み込んだ。

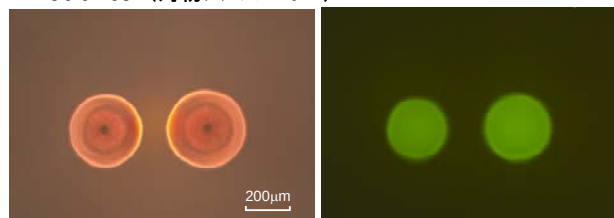
接合により①反応で作製される Single Crossover 株は図-2 に示す A と B の 2 種類である。A は前方の相同部分が組換えを起こして生成され、B は後方部分の相同部分が組換えを起こして生成される。本実験でも 2 種類の Single Crossover 株が観察された。

次に、図-2 に示すように、B の Single Crossover 株を培養した場合、ある確率で、②反応と③反応が起きる。②反応は①反応で組換えを起こした相同部分が再び組換えを起こす場合で、元の染色体 DNA に戻る。一方、③反応は、①反応とは異なる相同部分が組換えを起こした場合で、目的とする外来 DNA が挿入される。本過程によって、*tac* プロモーターと GFP 遺伝子を導入した。*tac* プロモーター導入は、形成されたコロニーにカテコールを滴下し、コロニーが黄変することによって確認した。PH 遺伝子群の下流にはカテコールを酸化し、黄変させるカテコール-2,3-ジオキシゲナーゼが存在するため本反応が起きる。また、GFP 遺伝子の導入は、生育したコロニーを蛍光顕微鏡下で観察し、その緑色蛍光によって確認した。最終的な組換え体は図-1 の最下部の *Cupriavidus* sp. TW2-GFP 株(以下、TW2-GFP 株)である。

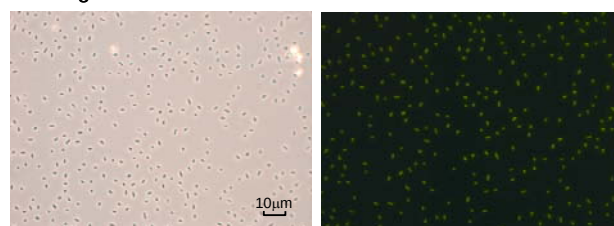
3-2 *Cupriavidus* sp. TW2-GFP 株の顕微鏡観察

前項の相同的組換えによって作製された TW2-GFP 株を LB 寒天培地上で一晩生育させ、コロニーおよび細胞レベルの顕微鏡観察 (Zeiss 製 AXIO Imager.A1 Filter set 16) を行なった。図-3 に結果を示す。上部の 2 枚の写真はコロニー、下部 2 枚の写真は Cell の観察結果である。図に示すとおり、GFP 遺伝子の導入によって Cell レベルでのラベル化が可能となった。

A. Colonies (対物レンズ 10×)



B. Single Cells (対物レンズ 100×)



(位相差顕微鏡)

(蛍光顕微鏡)

図-3 顕微鏡によるコロニー(A)と Cell(B)の観察結果

4. 結論

Cupriavidus sp. TW2 株を利用し、相同的組換えにより *tac* プロモーターと GFP 遺伝子を染色体上に導入した結果、蛍光顕微鏡下で Cell レベルの観察が可能な組換え体の作製に成功した。

(参考文献)

- 1) 中村寛治ほか；環境バイオテクノロジー学会誌, Vol.2, 39-45, 2002.
- 2) 中村寛治ほか；環境工学論文集, Vol.36, 1-10, 1999.