

PCB 分解菌の PCB 分解遺伝子転写抑制に関する因子の探索

東北学院大学 工学部 学生会員 ○佐藤俊哉
東北学院大学大学院 工学研究科 学生会員 伊藤 拓
長岡技術科学大学 工学部 非会員 福田雅夫
東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗
東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介

1. 序

ポリ塩化ビフェニル(PCB)はベンゼン環が二つ繋がったビフェニル(BP)骨格の水素が塩素で置換されたものの総称で、極めて毒性が強くダイオキシン類の一つとして規制されており環境汚染物質として問題となっている。

PCB 汚染の微生物を用いた浄化を目的として、これまでの研究で PCB 分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA1 が単離され、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) が明らかにされている(図 1) (福田ら、2005 年)。これらの分解遺伝子群は BP 存在下で転写が活性化されていること、活性化には BphS1、BphT1 の 2 種類のタンパク質が正の制御因子として関与することが今までの研究で明らかになっている(Takeda ら、2010)。また、分解遺伝子の 1 つである *bphAa* プロモーターの BP 存在下での転写活性化は、安息香酸(BA)を添加することで抑制されることが明らかになっている(伊藤、2011)。BA は BP の代謝産物でもあるため、BP 分解の際に生じた BA が、PCB 分解能を抑制する可能性が考えられる。

そこで、BA による *bphAa* 遺伝子の転写活性化抑制機構の解明のために、本研究では、RHA1 中のどのタンパク質が本抑制機構に関与するのかを特定することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 高発現用プラスミドの作製

(1) *Rhodococcus* と大腸菌のシャトルベクターであ

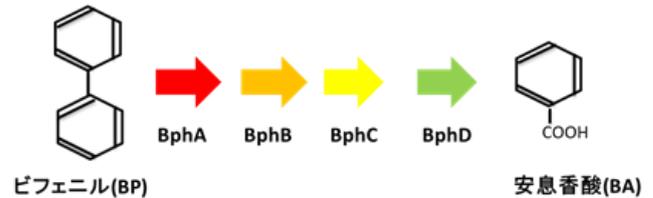


図 1 RHA1 のビフェニル分解経路

る pFAJ2574 に *aphII* プロモーター (P_{aphII}) を In-Fusion Cloning 処理によって挿入し、高発現用プラスミド pFAJP_{*aphII*} を作製した。

(2) 高発現したい遺伝子を PCR で増幅し、pFAJP_{*aphII*} の P_{aphII} 下流に挿入した。作製したプラスミドは pFAJP_{*aphII*}_遺伝子名と命名した。

(3) (2) で作製したプラスミドを RHA1 および RHA1_87LuxF に導入して、ルシフェラーゼ活性 (Lux 活性) の測定を行った。

2.2 ルシフェラーゼ活性の測定

(1) 前培養した菌体を 1/5LB 培地、1/5LB+BP、1/5LB+BP+BA に植菌した。

(2) 3 時間ごとに発光量と菌液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した。

(3) 発光量を濁度で割った値を Lux 活性とした。

3. 実験結果

3.1 pFAJP_{*aphII*} の構築

pFAJ2574 に構成的プロモーターである P_{aphII} を挿入して、pFAJP_{*aphII*} を作製した。pFAJP_{*aphII*} の *aphII* プロモーターの下流には XbaI 部位があり、そこに高発現させたい遺伝子を挿入する。遺伝子が実

キーワード: 微生物 遺伝子構造 PCB

連絡先: 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 宮内啓介研究室

際に高発現するかを調べるために、pFAJP_{aphII}と P_{aphII} をもたない pFAJ2574 にそれぞれルシフェラーゼ(*luxAB*)遺伝子を挿入し、RHA1 に導入して、発光量の違いを観察した。pFAJP_{aphII}*luxAB* をもつ RHA1 は pFAJ2574_{luxAB} をもつ RHA1 と比較して約 3000 倍の高い発光値を示した。よって pFAJP_{aphII} は高発現用プラスミドとして用いることが出来ることが示された。

表 1 高発現用プラスミド pFAJP_{aphII} の確認

	clone no.	Lux(平均)	OD600	Lux/OD600
pFAJP _{aph II} <i>luxAB</i>	1	1426531	0.457	3121512
	2	1174618	0.323	3636588
	3	2373737	0.940	2525252
	4	1139477	0.580	1964616
	5	1110033	0.360	3083425
	6	991278	0.275	3604647
pFAJ2574 _{luxAB}	1	1514	0.930	1628
	2	695	0.636	1093
	3	2865	1.370	2091
	4	1478	0.937	1577
	5	1179	0.874	1349
	6	2481	1.106	2243

3.2 ビフェニル分解遺伝子の転写抑制に関わる候補遺伝子を高発現させたときの *bphAa* プロモーターの転写活性化の評価

crec(catabolite repression control)遺伝子と相同性を持つ ro00291、ro03883、ro02178、ro06240 の 4 つの遺伝子と ro03605 を候補遺伝子として選定し、pFAJP_{aphII} にそれぞれ挿入した。*crec* 遺伝子は他の菌で芳香族化合物分解遺伝子の発現抑制に関与することが報告されている(Moreno ら、2008、Milojevic ら、2013)。ro03605 は脱リン酸化酵素と相同性を示し、その転写がビフェニル存在時よりもビフェニルと安息香酸が共に存在するときのほうがより活性化されることが明らかとなっている。

選定した候補遺伝子を高発現させるプラスミドを、*bphAa* プロモーター+*luxAB* の DNA 断片をもつ RHA1_87LuxF に導入し、候補遺伝子高発現下での *bphAa* プロモーターの転写活性の変化をルシフェラーゼ活性によって観察した。培養条件は、1/5LB 培地のみ、1/5LB+BP、1/5LB+BP+BA である。

そのうち、コントロールである pFAJP_{aphII} の結果を図 2 に示した。BP 存在下では *bphAa* プロモーターからの転写が活性化され、さらに BA を加えると

転写活性化は抑制された。P_{aphII}*crec* を導入した場合は、コントロールである P_{aphII} に比べ、転写活性化が低くなる傾向があった。これらの結果から、*crec* 遺伝子はビフェニル分解の転写抑制に関与することが示唆された。また、pFAJP_{aphII}*ro03605* を導入したときの結果はコントロールとほぼ同様であったことから、ro03605 はビフェニル分解遺伝子の転写抑制に関与していないことが示唆された。

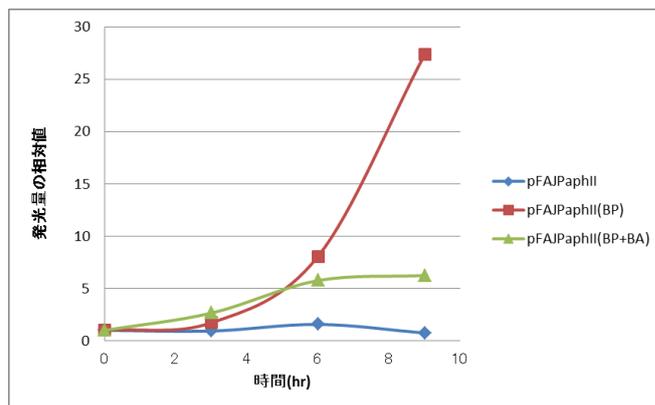


図 2 RHA1_87LuxF(pFAJP_{aphII})の *bphAa* 転写活性

4. 結論

高発現用プラスミド pFAJP_{aphII} を用いて RHA1 中で遺伝子を高発現させる方法を確認し、簡便に遺伝子高発現用のプラスミドの作製が可能となった。これを用いた実験で、*crec* 遺伝子がビフェニル分解の転写活性化が抑制に関与することが示唆された。

参考文献

- 福田雅夫, 宮内啓介, 政井英司, 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 1541-1547 (2005)
- Moreno R, Rojo F, J. Bacteriol., **190**, 1539-1545 (2008)
- Milojevic T, Grishkovskaya I, Sonnleitner E, Djinovic-Carugo K, Bläsi U., PLoS One, **23**, e64609 (2013)
- 伊藤拓, 荒木直人, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介, 土木学会論文集 G(環境), **67**, III_485-III_493
- Takeda H, Shimodaira J, Yukawa K, Hara N, Kasai D, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M., J. Bacteriol., **192**, 4741-4751 (2010)