

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における安息香酸分解遺伝子群の転写制御機構

東北学院大学	工学部	学生会員	○水澤	秀太
東北学院大学	工学部	非会員	千田	拓矢
中部大学	応用生物学部	非会員	福田	雅夫
東北学院大学	工学部	正会員	宮内	啓介

1. 序論

ポリ塩化ビフェニル(PCB)は、分子中の塩素の数、位置の違いにより理論上 209 種類の異性体が存在し、環境汚染物質として、製造・輸入・使用・破棄が規制されている。

PCB 汚染を浄化することを目標として、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(福田ら,2005)(図 1)。RHA1 はビフェニル以外にもベンゼン、トリクロロエチレンなどの環境汚染物質を分解することができ、その分解機構や分解遺伝子群の転写制御に興味をもたれる。安息香酸(BA)はビフェニル分解の中間代謝産物であり、その分解遺伝子群は図 2 のように明らかとなっているが、分解遺伝子群の転写制御については不明である。

そこで本研究では、RHA1 の安息香酸分解遺伝子群の転写制御について明らかにすることを目的とした。

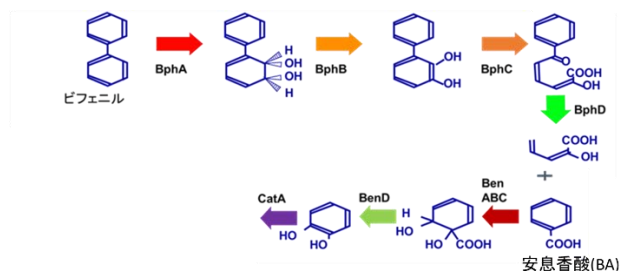
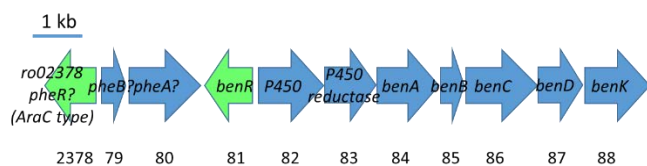


図 1 RHA1 におけるビフェニル分解経路

図 2 *benA* 及びその周辺の遺伝子地図

2. 実験方法

2.1 培地・菌株

RHA1 株及びその破壊株は、LB 培地を用いて培養し、必要に応じてカナマイシン(Km)を加えた。

プラスミド DNA は、electroporation を用いて RHA1 株及びその破壊株に導入した。

2.2 ルシフェラーゼ(Lux)活性測定

(1)培養した菌液 1 ml を 10 ml の LB+Km 培地に加え、5 ml ずつ試験管に分けた。一方に 10 mM になるように BA を加え、30℃で培養した。

(2)発光値と OD₆₀₀ を 0 h、2 h、4 h 後に測定した。測定は、サンプルあたり 3 回行った。

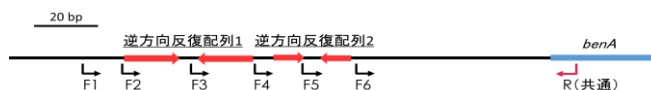
(3)発光値の平均を OD₆₀₀ で割ったものを Lux 活性とした。

2.3 *benA* プロモーター領域の特定

(1)図 3 に示す F1~F6 プライマーと R プライマーの組み合わせで PCR を行った。

(2)得られた PCR 産物をレポータープラスミド pKLA1 のルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入した。

(3)作製したレポータープラスミドを RHA1 に導入し、Lux 活性測定を行った。

図 3 *benA* 上流領域

3. 実験結果

3.1 BA による *benA* の転写誘導の確認

RHA1 株における *benA* 遺伝子の転写誘導を観察す

キーワード：ポリ塩化ビフェニル(PCB) バイオレメディエーション 転写制御

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

るため、*benA* の上流約 500 bp をルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したレポータープラスミドを RHA1 に導入し、BA 存在・非存在下での Lux 活性を測定した。結果を図 3 に示す。野生株においては、BA 存在下で *benA* の転写が誘導されることが確認された。

3.2 *benA* 転写誘導における *benR* および ro02378 の関与

RHA1 の *benA* 上流には、他の菌における *ben* 遺伝子群の転写制御因子と相同性をもつ遺伝子(*benR* と命名されている)が存在する(図 2)。

benR の機能を確認するために *benR* 破壊株を作製し、3.1 と同様の実験を行ったが、*benA* の転写誘導は野生株と変わらなかった(データは示さない)。さらに上流にも、*benR* と相同性をもつ遺伝子(ro02378)が存在した(図 2)ため、その破壊株、及び *benR* と ro02378 の二重破壊株を作製し、同様の実験を行ったが、これらの結果も野生株と同様であった(図 4)。

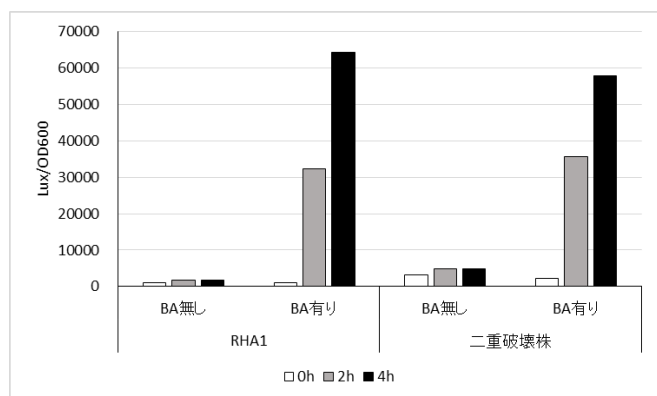


図 4 レポータープラスミドを導入した RHA1 及び二重破壊株の Lux 活性

3.3 *benA* プロモーター領域の特定

過去の報告では、*benA* の転写を制御するタンパク質が結合する領域は、*benA* 上流の逆方向反復配列 1(ATGCGTACGCCGAGGC...GCCTCGGCGTACGCAT)であると考えられていた(Patrauchan ら、2005)(図 3)。それを確認するために、様々な長さの *benA* 上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したプラスミドを 2.3 に従って作製し、3.1 と同様の実験を行った。結

果を図 5 に示す。逆方向反復配列 1 を含む F1~F3、含まない F4 において、*benA* の BA による転写誘導が観察された。また、F5、F6 では転写誘導が観察されなかった(図 5)。F4 から F5 で失われる領域を調べたところ、逆方向反復配列 2(CTAGTCA...TGCCTAG)が存在することが明らかとなった。

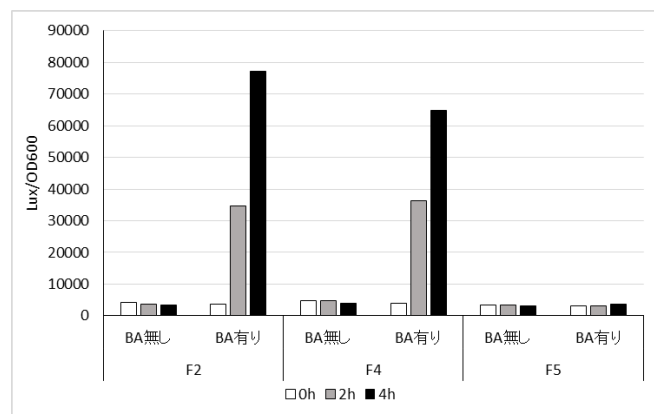


図 5 *benA* プロモーター領域を含むレポータープラスミドを導入した RHA1 の Lux 活性

4 考察

今回の研究で、*ben* 遺伝子群の転写を制御するタンパク質が逆方向反復配列 2(CTAGTCA...TGCCTAG)を含む領域に結合することが示唆された。

しかし、転写制御タンパク質については、*benR* と ro02378 の二重破壊株における *benA* の転写誘導が野生株と同様であったことから、*benA* の転写制御は、BenR、ro02378 以外の未知のタンパク質が行っている、または、未知のタンパク質が、BenR、ro02378 と共に作用している可能性が考えられる。

5 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, 1541-1547 (2005)
- ・Patrauchan ら, Catabolism of Benzoate and Phthalate in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1: Redundancies and Convergence, J. Bacteriol., Vol.187, 4050-4063 (2005)