

(19) 相同的組換えを利用したトリクロロエチレン分解のための組換え体の育種およびその機能解析

Development of a genetically engineered microorganism for trichloroethylene degradation by homologous recombination and analysis of its gene expression

中村 寛治*・石田 浩昭*

Kanji NAKAMURA*, Hiroaki ISHIDA*

ABSTRACT; *Pseudomonas putida* KN1 is a phenol-utilizing bacterium, of which phenol hydroxylase (PH) capable of decomposing TCE is produced inducibly by phenol. After determining a region necessary for PH production, an insertion of the *tac* promoter in front of the PH gene in the chromosome was carried out by using homologous recombination. Although the modified strain, *P. putida* KN1-10A, constitutively degraded TCE, the TCE degradation rate of the modified strain was very low comparing to that of the parent strain. The strength of the native promoter induced by phenol and the *tac* promoter were compared each other by using *luxAB* of *Vibrio harveyi* as a reporter gene. Results showed that the *tac* promoter led a stronger expression than the native promoter. Accordingly it was suggested that more PH was produced in *P. putida* KN1-10A than *P. putida* KN1. Thus other factors affecting TCE degradation rate were shown to be exist. TCE transport can be a rate limiting step on TCE degradation by *P. putida* KN1-10A. **KEYWORDS;** Trichloroethylene, *Pseudomonas putida*, Phenol hydroxylase, Homologous recombination

1. はじめに

トリクロロエチレン(TCE)は地下水を汚染している有機塩素化合物の中でも、数多くの汚染事例が報告されている物質の一つであるが、発がん性の疑いがあるため、処理方法の早期確立が望まれている。

TCEはコメタボリズムにより微生物分解されるが、これまでにメタン酸化細菌、トルエン酸化細菌、フェノール酸化細菌、およびアンモニア酸化細菌などがTCE分解能を有することが知られており、それぞれ、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)¹⁾、トルエンオキシゲナーゼ(TO)²⁾³⁾、フェノールヒドロキシラーゼ(PH)⁴⁾⁵⁾、アンモニアモノオキシゲナーゼ(AMO)⁶⁾が分解に係わる酵素であることが明らかになっている。

また、近年、遺伝子組換えの技術を利用し、自然微生物よりも高いTCE分解能を持った細菌を開発しようとする研究が盛んに進められており、これまでにMMO⁷⁾、TO²⁾⁸⁾、PH⁴⁾⁵⁾の遺伝子を利用した組換え体が作製されている。さらに、ピフェニル分解遺伝子とTO遺伝子とのハイブリッド遺伝子が極めて高いTCE分解能を有することが、古川らの研究⁹⁾によって示され、組換え体開発のための新たな手法として注目されている。

このように、より分解能力の高い組換え体の開発に向けた研究開発は、着実に成果を上げてきており、バイオレメディエーションへの組換え体の利用には大きな期待が寄せられている。一方、このような分解能力の増強に加えて、組換え体を利用する際の分解遺伝子の安定性も重要な因子であることが、最近になって認識され始めてきた。これまでの組換え体開発では、主に遺伝子のキャリアーとしてプラスミドが利用されてきた。しかしながら、宿主にTCE分解遺伝子を挿入したプラスミドを安定して保持させるには、抗生物質などの選択圧が必要となる。それゆえ、組換え体を利用するには、抗生物質などの添加が必要となり、経済的に大きな負担となる。

我々は、組換え体の安定性を確保する手段として、相同的組換えによる染色体を対象とした遺伝子操作を試みた。ここでは相同的組換えを利用したTCE分解能を構成的に発現する組換え体の作製、およびそのTCE分解能の解析に関して報告する。

*栗田工業（株）総合研究所（Kurita Water Industries Ltd., Kurita Central Laboratories）

2. 実験方法および材料

(菌株およびプラスミド) 本研究で使用された細菌の菌株およびプラスミドを Table 1 に示す。プラスミドの構築の際に使用する宿主は、*Escherichia coli* DH5 あるいは *E. coli* DH5 α を利用した。また、相同的組換えの際のプラスミドの供与菌は、*E. coli* S17-1¹⁰⁾を利用した。相同的組換えの対象とした菌株は、フェノール資化細菌 *P. putida* KN1 であり、フェノールによって誘導される PH が TCE 分解能を有することが分かっており、その遺伝子もクローニングされている⁴⁾。染色体上の PH 遺伝子等の発現には、ファルマシア製の *tac* Promoter GenBlock を利用した。

(相同的組換えのための接合) 相同的組換えを行う際には、供与菌の *E. coli* S17-1 に相同的組換え用のプラスミドを導入後、適当な抗生物質を含む Luria-Bertani (LB) 培地 (NaCl 濃度は通常 10 g/l であるがここでは 5 g/l とした) にて、37℃ で一晚培養した。同時に受容菌である *P. putida* KN1 を 30℃、LB 培地で一晚培養し、各々の培養液 0.5 ml から菌体を遠心分離 (10,000 xg) で集菌した。これらの菌体は、Basal Salt Medium (BSM)¹⁴⁾ 1 ml で懸濁、混合した上で、再び遠心分離で集菌、上澄みを捨て、BSM 1 ml で

洗浄した。この洗浄操作を再び繰り返し、沈殿させた後、混合菌体は、50 μ l の BSM に懸濁させ、LB 寒天培地上の直径 25 mm、孔径 0.22 μ m の滅菌ミリポアフィルター上に滴下させ、30℃ で 10 時間接合させた。その後、フィルター上の菌体を 1 ml の生理食塩水 (0.8 % NaCl) に懸濁させ、希釈液をフルクトース 20 mM および適当な抗生物質を含む BSM 寒天培地に塗布し、30℃ で 3~4 日間培養し、目的とする Transconjugant を選出した。

(その他の分子生物学的手法) サウザンハイブリダイゼーションには Amersham 製の ECL 検出キットを使用した。その他の分子生物学的手法は、Molecular Cloning の第二版¹⁵⁾に従った。

(発光試験) 培養菌体あるいはコロニーから取得した菌体を 200 μ l の LB 培地に希釈、懸濁させ、これに 10 μ l の 10 % n-decyl aldehyde (エタノール中) を添加、Turner 社製のルミノメーター Model 20e で、Delay time 5 秒、Integrate time 10 秒の条件で発光測定を行った。

(TCE 分解試験) TCE 分解試験の方法は、以前報告した通りである⁴⁾。対象菌を LB 培地に 30℃ で培養後、遠心分離で集菌、BSM で 2 回洗浄し、調製した菌懸濁液 (600 nm での吸光度: A_{600} が 2.0) 10 ml をジエールサイエンス社製の 125 ml 容のバイアルビンに入れ、TCE を 10 mg/l (すべて液に溶解した場合の濃度で、本文図中の TCE 濃度は全てこの濃度で表示されている) の濃度になるよう添加し、テフロンコートブチルゴム栓をした後アルミキャップでシールした。バイアルビンは 30℃、200 rpm で振とう培養し、定期的に気相ガス 100 μ l をガスタイトシリンジでサンプリングした。TCE の分析は島津製作所製ガスクロマトグラフ 9 A により行い、充填剤は Silicone DC-550 を用い、カラム温度は 100℃ に設定、FID 検出器で測定した。

3. 実験結果

3. 1 相同的組換え用のプラスミド pMOC80 の作製

相同的組換えの際に、プラスミド供与菌として利用する *E. coli* S17-1 で維持され、受容菌である *P. putida*

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strains	Reference or source	
<i>Escherichia coli</i> DH5	Toyobo Co. Ltd	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Toyobo Co. Ltd	
<i>Escherichia coli</i> S17-1	10)	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1	4)	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1-10A	This study	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1-LX	This study	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1-10A-LX	This study	
<i>Vibrio harveyi</i> B392	11)	
Plasmids	Relevant markers	
pTrc99A	Ap	Pharmacia Biotech
pKT240	Ap, Km	12)
pSTV28	Cm	Takara Shuzo Co. Ltd.
pMOC80	Cm	This study
pMOK180	Km	This study
pNEM201	Cm	13)
pCH110	Ap	Pharmacia Biotech
pUK4K	Ap, Km	Pharmacia Biotech

Ap: Ampicillin, Km: Kanamycin, Cm: Chloramphenicol

KN1で維持されないプラスミドとするため、pBR322由来の *ori* 遺伝子を使用し、可動化に必要な遺伝子は、pKT240の *mobA*, *mobB*, *oriT*⁽²⁾を使用することとした。

具体的には、pMOC80はFig.1に示す手順で作製した。まず、pTrc99Aを *Bsp*HII消化して得られる *ori*を含む3.2 kb DNA断片を脱リン酸化およびT4 DNAポリメラーゼで平滑化処理し、これに、pSTV28から *Bst*BIと *Bsa*AIで切り出し、同様に平滑化処理したクロラムフェニコール耐性(Cm^R)遺伝子をT4リガーゼにより結合した。このプラスミドpKNC99から、*lacF*と *trc*プロモーターの部分を *Nsi*Iと *Nco*Iを使って取り除き、脱リン酸化後、T4 DNAポリメラーゼで平滑化処理した。また、pKT240を *Sac*Iと *Eco*O109Iで消化して得られる、可動化のために必要な遺伝子、*mobA*, *mobB*, *oriT*を含む2.7 kbの断片も同様に平滑化処理し、前述のpKNC99由来の断片とT4リガーゼにより結合し、pMOC80を作製した。

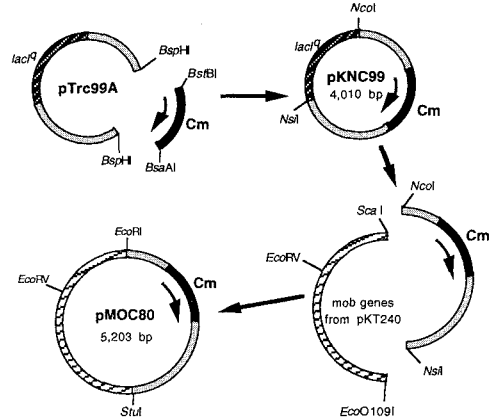


Fig. 1 Construction of pMOC80

3. 2 相長的組換えによる組換え体の作製

相長的組換えに使用した *P. putida* KN1 染色体中のDNA断片をFig.2の中央部に示す。DNA断片の中央にある *Stu*Iサイトから *Sal*Iサイトの間にPH遺伝子の開始点が存在し、図の上部に示すように右方向に読まれる。相同部分として利用した、1.75 kbの *Stu*I-*Sal*I断片の中央の *Stu*Iサイトに *tac*プロモーターとpBR322のテトラサイクリン耐性(Tc^R)遺伝子をFig. 2に示すように挿入した。

この相長的組換えのためのコンストラクトの作製手順は以下に示すとおりである。まず、*tac*プロモーター（上流側は *Hind*IIIで、下流側は *Bam*HIで切断されている）の *Hind*IIIサイトをKlenow Fragmentで平滑化処理した後、*Sal*Iリンカー(pGGTCGACC)を結合し、*Sal*Iにて消化した。そして、この *tac*プロモーターをpTrc99Aのマルチクローニングサイト(MCS)の *Bam*HIから *Sal*Iサイトの間に挿入した。次にこのプラスミドを *Sal*I消化し、脱リン酸化およびKlenow Fragment処理した後、この部分にpBR322から *Eco*RIおよび *Ava*Iによって切り出し、T4 DNAポリメラーゼで平滑化処理したTc^R遺伝子を *tac*プロモーターと逆方向に挿入した。これらの挿入遺伝子全てを含むDNA断片を、*Kpn*Iと *Pst*Iによって切り出し、T4 DNAポリメラーゼで平滑化処理した。

相同部分である1.75 kbの *Stu*I-*Sal*I断片は、あらかじめ、pTrc99AのMCSの *Sma*Iから *Sal*Iサイトの間に組み込み、次に、中央の *Stu*Iサイトに前述の平滑化処理した *tac*プロモーターとTc^R遺伝子を含む断片を挿入した。この相同部分を含むコンストラクト全体は、*Eco*RIおよび *Hind*IIIで切り出し、Fig.2に示すよう

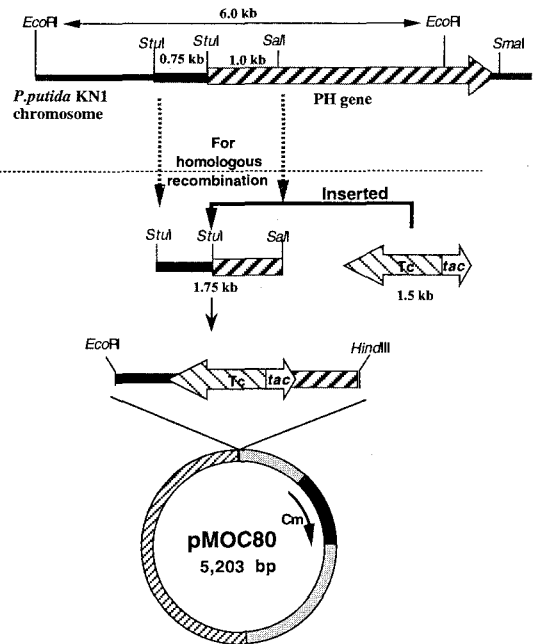


Fig. 2 Plasmid and DNA fragment used for homologous recombination

に pMOC80 の MCS の *Eco*RI から *Hind*III サイトの間に導入した。このプラスミドは、*E. coli* S17-1 に導入後、*P. putida*KN1 とフィルター上で 30℃ にて 10 時間接合し、フルクトースを含む BSM 寒天培地 (Tc=10 μ g/ml) で *P. putida*KN1 の Transconjugant を分離した。得られた Transconjugant のコロニーに、0.1 M のカテコールをスプレーをしたところ、約半分のコロニーは何の変化も見られなかったが、残りの半分のコロニーは色が黄変した。2 種類の Transconjugant をそれぞれ TypeI、TypeII とした。

3. 3 相等的組換えによって得られた Transconjugant の解析

相等的組換えによって得られた上述の TypeI、TypeII の Transconjugant の染色体 DNA を抽出し、*Eco*RI で消化、アガロースゲルで電気泳動を行った後、DNA をナイロン膜上に転写させた。そして、Fig.2 の最上部に示す、相同な部分として用いられた DNA 領域を含む 6.0 kb の *Eco*RI 断片をプローブにサウザンハイブリダイゼーションを行った。結果を Fig.3A に示す。Lane 1 は親株の *P. putida*KN1 の染色体であり、Lane 2 は TypeI の Transconjugant から得られた染色体である。この図から分かるように、Lane 2 の Transconjugant では 2 つのバンドが見られるが、親株では 1 つしか見られていない。同様に、TypeII の Transconjugant から得られた染色体を Lane 3 に示す。Lane 2 と同様に 2 つのバンドが見られたが、そのパターンは異なった。

親株の *P. putida*KN1 の染色体を *Eco*RI で消化し、6.0 kb の *Eco*RI 断片をプローブにすると、Lane 1 に示すように、6.0 kb の大きさのバンドが得られる。Fig.2 に示したように、この *Eco*RI 断片の *Stu*I サイトに *tac* プロモーターと Tc^R 遺伝子の 1.5 kb の断片のみが挿入されれば、この 1.5 kb 断片中には *Eco*RI サイトが存在しないため、その分だけ大きくなり、7.5 kb のバンドとなって観察できるはずである。しかしながら、2 つのバンドが見られたことから、Fig.3B に示すように、一方の相同部分のみが組換えを起こし、プラスミド全体が組み込まれ、TypeI、TypeII の Transconjugant ができたと考えられる。プラスミド全体の大きさは 8.5 kb であり、すべてが 6.0 kb の *Eco*RI 断片中に取り込まれたとすると、14.5 kb の断片がプローブと反応し、シグナルとして検出されることになる。しかしながら、プラスミド中には 1 つの *Eco*RI サイトが存在するため、この部分が切断されて、2 つのバンドが観察されることになる。この仮定通り組換えが起きたとすると、プラスミド中の *Eco*RI サイトの位置から計算して、一方の相同部分が組換えを起こ

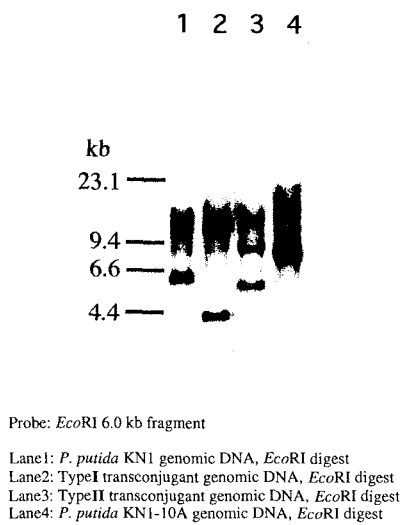


Fig. 3A Result of Southern hybridization

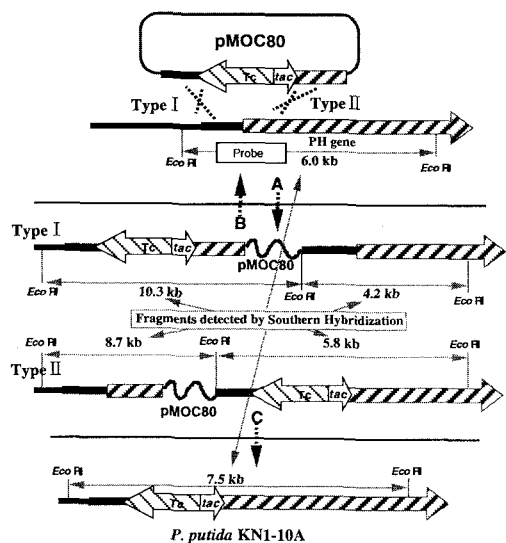


Fig. 3B Scheme of homologous recombination between plasmid and chromosome DNA

した場合 (TypeI) は 10.3 kb と 4.2 kb のバンドが検出され、他方の場合 (TypeII) は 8.7 kb と 5.8 kb のバンドが検出されることになる。Fig.3A の Lane2 および Lane3 に示した結果は、これと対応しており、Fig.3B に示した反応が実際に起きたことが確認できた。本実験では、15 株の Tc^R の Transconjugant を分離し、上記のようなサウザンハイブリダイゼーションによる解析を行ったが、全ての株において、このように 2ヶ所の相同な部分の内、1ヶ所のみが相同的組換えによって交叉 (シングルクロスオーバー) を起こして、プラスミドすべてが組み込まれていた。

また、カテコールスプレーにより黄変した TypeII の Transconjugant は、*tac* プロモーターが PH 遺伝子のすぐ上流に組み込まれているため、これによって、PH 遺伝子の下流にあるカテコール 2,3 ジオキシゲナーゼ (C23O) 遺伝子が読まれたものと考えられる。これに対してカテコールスプレーによって黄変しなかった TypeI の Transconjugant は *tac* プロモーターが PH 遺伝子からかなり離れて組み込まれ、C23O 遺伝子を発現するには至らなかったものと考えられる。

3. 4 第2の相同的組換えによるプラスミド部分の削除

上記のようにプラスミド全体が組み込まれても相同な部分が2つ存在するため、Fig.3B の矢印 B, C に示すように第2の相同的組換えが生じ、元の染色体に戻る相同的組換え (矢印 B) と目的の遺伝子のみが残る相同的組換え (矢印 C) の両方が起きる。前者は、第1の相同的組換えで交叉した部分が再び交叉する場合に起こり、後者は、もう一つの相同な部分が交叉する (ダブルクロスオーバー) ことによって生じる。そこで、カテコールスプレーで黄変しない TypeI の Transconjugant の場合は Fig.3B の最下部に示すように、ダブルクロスオーバーが起これば *tac* プロモーターが染色体上に残り、PH 遺伝子群のすぐ上流に移動するため、C23O 遺伝子が読まれ、カテコールスプレーで黄変するようになると考えた。TypeI の Transconjugant を一晩 LB 液体培地 ($Tc=10 \mu g/ml$) で培養し、希釈液を LB 寒天培地 ($Tc=10 \mu g/ml$) に塗布した。30℃ で約2日間培養した後、3つのプレートに合計 2,600 のコロニーが得られ、その内、2つのコロニーがカテコールスプレーによって黄変した。

このようにして得られた菌株を *P. putida* KN1-10A とし、染色体を抽出した後、*EcoRI* で消化、前述したように相同な部分を含む 6.0 kb の *EcoRI* 断片をプローブにしてサウザンハイブリダイゼーションを行い、Fig.3A の Lane4 に示す結果を得た。Lane4 では 7.5 kb あたりに1本のバンドが見られ、*tac* プロモーターと Tc^R 遺伝子のみが染色体に残ったことが確認できた。このように、第2の相同的組換えではダブルクロスオーバーが起き、目的とする DNA 部分のみが染色体上に残存することが明らかとなった。

3. 5 *P. putida* KN1-10A の TCE 分解能および安定性

LB 培地で培養し、対数増殖期に収穫した *P. putida* KN1-10A による TCE 分解試験の結果を Fig.4 に示す。また、RSF1010 由来のプラスミドであり、コピー数が 15~20 と思われる pRCT200¹³⁾ に PH 遺伝子を組み込み、*trc* プロモーター (機能的には *tac* プロモーターと同じ) によって構成発現するプラスミド pNEM201 を導入した *P. putida* KN1 (pNEM201) による TCE 分解試験の結果¹³⁾も比較のために図中に示した。*P. putida* KN1-10A はゆっくりではあるが、構成的に TCE を分解した。*P. putida* KN1-10A による初期 TCE 分解速度 (最大分解速度) は $0.07 \text{ mgTCE/l} \cdot \text{hr} \cdot A_{600}$ で、*P. putida* KN1 (pNEM201) の最大分解速度、 $0.31 \text{ mgTCE/l} \cdot \text{hr} \cdot A_{600}$ に比較すると、約 1/4 となった。このように、プラスミドを利用し

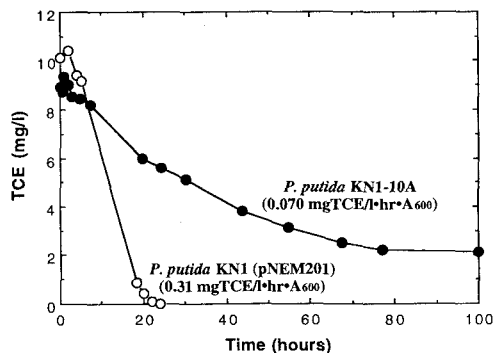


Fig. 4 Degradation of TCE by *P. putida* KN1-10A and *P. putida* KN1 (pNEM201)

た場合に比べて分解速度は、遅くなった。

Fig.5 に示すように、両組換え体の形質の安定性を LB 培地中での培養によって検討した場合、pNEM201 のような PH 遺伝子を構成発現するプラスミドは抗生物質添加によって選択圧をかけないと容易にプラスミドが宿主から脱落してしまうことが明らかとなった。しかしながら、*P. putida* KN1-10A のように染色体上で構成的に発現する場合は、抗生物質を加えなくても挿入された遺伝子は 80 世代にわたって安定していた。このように、相長的組換えによる染色体への遺伝子の挿入は、組換え体の形質の安定性を確保する上で、非常に有効な手段であることが確認できた。

3. 6 相長的組換え用ベクターの改良

前項の結果から、pMOC80 を利用した目的遺伝子の染色体への挿入を行う場合、第 1 段階では、相同部分を含むプラスミド全体が染色体に組み込まれ、第 2 段階でプラスミド部分が抜け落ちることが明らかとなった。前述の実験では、C230 遺伝子の発現を利用してダブルクロスオーバー株を取得することができたが、通常は、ダブルクロスオーバー株の取得にはプラスミド中の耐性遺伝子の脱落を検出するネガティブセクションを行う必要があり、非常に手間がかかる。そこでダブルクロスオーバー株の取得を効率的に進めるために、プラスミド中へのインディケーター遺伝子としての *lacZ* の導入を検討した。

作製した pMOK180 を Fig.6 の上部に示す。pMOK180 は、pMOC80 の *Stu*I サイト (Fig. 1) に pCH110 由来の *gpt* プロモーターおよび *lacZ* を含む 3.7 kb の *Hind*III-*Bam*HI 断片を Klenow Fragment で平滑化処理し、挿入した。加えて、*Cm*^R 遺伝子の代わりに、pUK4K 由来のカナマイシン耐性(*Km*^R)遺伝子を含む 1.2 kb の *Pst*I-*Stu*I 断片を、T4 DNA ポリメラーゼで平滑化処理し、導入したものである。*Cm*^R 遺伝子は、*P. putida* KN1 の染色体上で 1 コピーしか存在しない場合、耐性をほとんど示さず、*Cm*^R 遺伝子を持っていない野生株との区別できなかったため、区別が可能な *Km*^R 遺伝子に変更した。

この pMOK180 を使用すると、Fig.6 に示すように、コロニーの色による目的の菌株の選出が容易にできる。まず、第 1 段階では、プラスミド全体が組み込まれるため、*Km*、5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside (X-gal) を含む LB 寒天培地上で青いコロニーが観察できる。次に、青いコロニーを単離して LB 培地で培養し、X-gal を含む LB 寒天培地に塗布すると、野生株に戻ったものと、目的の遺伝子が挿入された菌株が白いコロニーを形成しプラスミドが抜け落ちてない菌株の青いコロニーと容易に区別できる。野生株と目的の遺伝子が挿入された菌株の区別は、目的の遺伝子が表現形質を持っていればそれによって行うことが

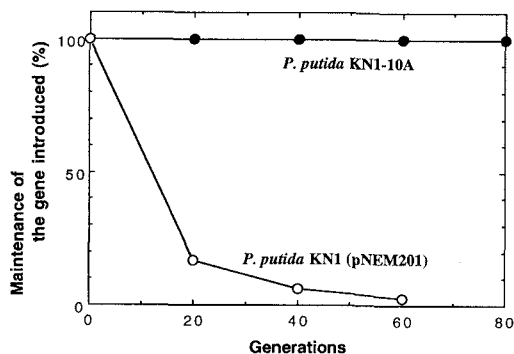


Fig. 5 Stability of GEMs, *P. putida* KN1 (pNEM201) and *P. putida* KN1-10A (cultivated in LB medium without antibiotics)

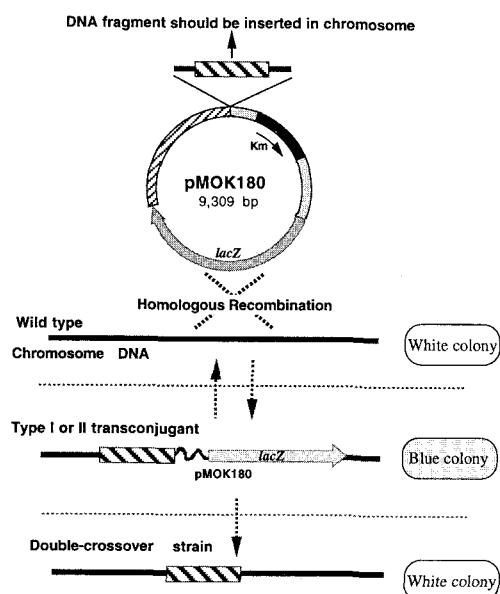


Fig. 6 Development of pMOK180 for easy screening of double-crossover strain

できるが、たとえ持ってなくても、PCR やサウザンハイブリダイゼーションによって区別は容易にできる。

3. 7 プロモーター解析のためのレポーター遺伝子の挿入

相同的組換えによって PH 遺伝子上流に *tac* プロモーターを挿入した *P. putida* KN1-10A の初期 TCE 分解速度は、前述したように、 $0.07 \text{ mgTCE/l} \cdot \text{hr} \cdot \text{A}_{600}$ であり、これを以前に測定した野生株 *P. putida* KN1 をフェノール誘導した場合の初期 TCE 分解速度 $0.72 \text{ mgTCE/l} \cdot \text{hr} \cdot \text{A}_{600}$ と比較すると約 1/10 である。そこで、*tac* プロモーターと野生株のフェノール誘導プロモーターの強さを評価することによって、TCE 分解速度の差が、プロモーターの強さによるものか否かを検討する。プロモーターの評価には、*Vibrio harveyi* B392 の *luxAB* (*SaII*-*PvuII* 断片)¹¹⁾ をレポーター遺伝子として使用した。この、*luxAB* の *PvuII* サイトは、*SaII* リンカーにより、*SaII* サイトに変換した。

レポーター遺伝子 *luxAB* を *P. putida* KN1 の染色体挿入するため、前項で作製した pMOK180 を使用した。相同的組換えのために利用した DNA 断片は、Fig.7A に示す PH 遺伝子の一部、および C23O 遺伝子を含む約 5.0 kb の *SaII* 断片である。この断片の中央部の *EcoRI* サイトを消化、脱リン酸化後、Klenow Fragment によって平滑化処理して *XhoI* リンカー (pCCTCGAGG) を挿入し、再び *XhoI* で消化、脱リン酸化後、*SaII* サイトを両端に持つ *luxAB* 断片を挿入した。このコンストラクト全体を、Fig.7A に示すように pMOK180 に挿入した。この組換えプラスミドを *E. coli* S17-1 に導入後、*P. putida* KN1 および *P. putida* KN1-10A とそれぞれフィルター上で 30℃にて 10 時間接合し、フルクトースを含む BSM 寒天培地 ($\text{Km}=100 \mu \text{g/ml}$) で Transconjugant を分離した。*P. putida* KN1 および *P. putida* KN1-10A の Transconjugant は、それぞれ X-gal を含む LB 寒天培地上で青色のコロニーを形成し、予想通りプラスミド全体が染色体に挿入されていることが明らかとなった。これら 2 種類の菌株から得られた Transconjugant は、それぞれ LB 培地で一晩、30℃にて培養し、希釈液を X-gal を含む LB 寒天培地に塗布し、青いコロニーに混じって観察された白いコロニー (全菌数の約 7%) を単離した。このコロニーをつま楊枝で少量取り、ルミノメーターで発光の有無を調べ、発光が検出された菌株を Fig.7A の下部に示すようにダブルクロスオーバーによって染色体上に *luxAB* が挿入された菌株と判断し、それぞれ、*P. putida* KN1-LX、*P. putida* KN1-10A-LX とした。

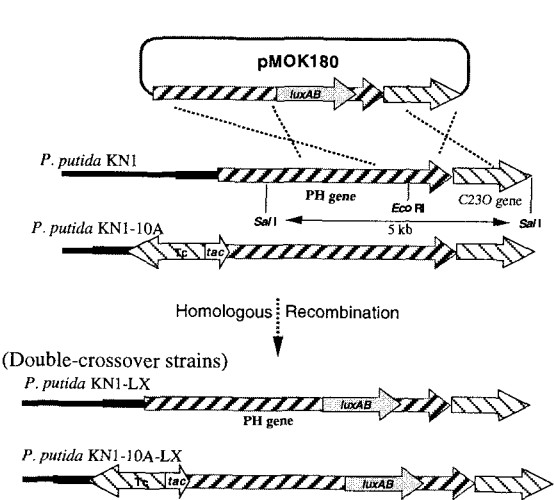


Fig. 7A Insertion of *luxAB* at *EcoRI* site in PH gene of *P. putida* KN1 and *P. putida* KN1-10A

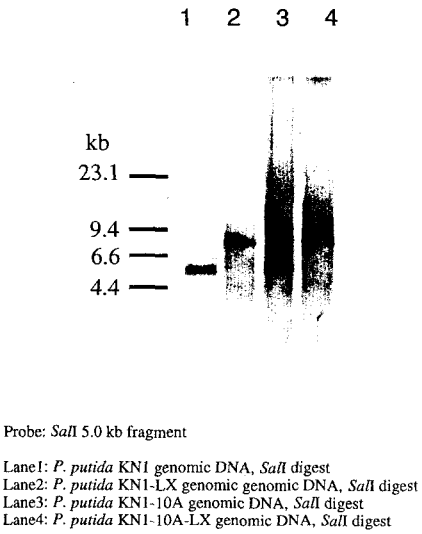


Fig. 7B Result of Southern hybridization

これらの菌株の染色体DNAを抽出、*Sa*IIで切断した後、アガロース電気泳動を行い、DNAをメンブランにトランスファーした後、相同部分として使用した5 kbの*Sa*II断片をプローブにサウザンハイブリダイゼーションを行った。Fig.7Aを見て分かるように、*P. putida* KN1 および *P. putida* KN1-10A の場合、プローブとして使用した5 kbの大きさのシグナルが得られる。一方、*P. putida* KN1-LX および *P. putida* KN1-10A-LXでは2.4 kbの*luxAB*が組み込まれるため、得られるシグナルは、7.4 kbと大きくなるはずである。

サウザンハイブリダイゼーションの結果をFig.7Bに示す。予想通り、*P. putida* KN1 および *P. putida* KN1-10A の場合、5 kbの大きさのシグナルが得られ、*P. putida* KN1-LX および *P. putida* KN1-10A-LXではシグナルは7.4 kbの大きさとなった。これによって、*luxAB*が染色体上に正しく導入されたことが明らかとなった。

3. 8 発光試験によるプロモーターの強さの解析

LB 培地により 30℃で一晩培養した *P. putida* KN1-LX に、200 mg/l のフェノールを添加した場合の発光量の経時変化をFig.8に示す。*P. putida* KN1-LXでは*luxAB*がPH遺伝子部分に挿入されているため、PH 遺伝子は機能せず、添加されたフェノールは全く分解されなかった。発光量はフェノール添加後約4時間で上昇し始め、8時間後に2,000 LU/A₆₀₀に達した。一方、*P. putida* KN1-10A-LXはLB培地で培養した場合、対数増殖期で7,700 LU/A₆₀₀、一晩培養した定常期では5,900 LU/A₆₀₀となった。これらの発光量の比較から、発光量の値の大きな *P. putida* KN1-10A-LXで働いている*tac*プロモーターの方が、フェノール誘導によって働く元来のプロモーターより強い転写を引き起こしていることが示された。

前項で述べたとおり、既報の研究で、*P. putida* KN1をフェノール誘導した場合のTCE分解速度は得られている⁴⁾。しかしながら、その培養条件が、上記の発光試験の場合とは異なるため、培養条件を合わせて、再度TCE分解試験を行った。

P. putida KN1を、*P. putida* KN1-LXと同様に、LB培地で一晩培養後200 mg/lのフェノールを添加し、8時間後に収穫、TCE分解試験に使用した。この際、*P. putida* KN1-LXでの実験とは異なり、添加されたフェノールは、*P. putida* KN1によって分解されるため、濃度が低下するが、濃度変化をモニタリングし、減少分を添加することによって、誘導期間中のフェノール濃度は100~200 mg/lの範囲に維持した。TCE分解試験は、実験方法のところで述べたとおり行い、Fig.9に示す結果が得られた。*P. putida* KN1-10AによるTCE分解は、3. 5の項で得られた結果である。予想通り、*P. putida* KN1のTCE分解速度は、*P. putida* KN1-10Aの約10倍となり、プロモータ活性を評価した発光試験の結果とは全く逆（発光量は約1/4）の結果となった。

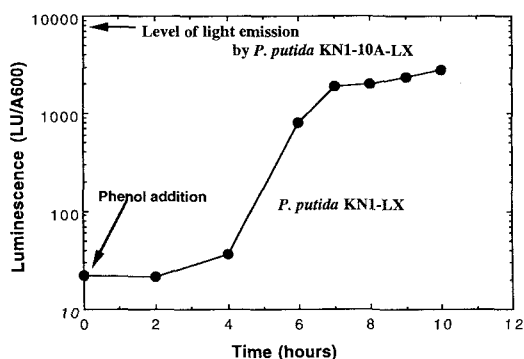


Fig. 8 Changes of light emission by *P. putida* KN1-LX after phenol addition

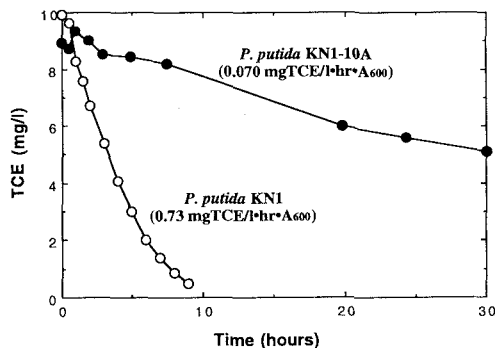


Fig. 9 Degradation of TCE by *P. putida* KN1-10A and *P. putida* KN1

4. 考察

相同的組換えを利用した *tac* プロモータの挿入によって、フェノール誘導なしに、構成的に PH 遺伝子を発現させることができる組換え体 *P. putida* KN1-10A を作製することができた。

このように、相同的組換えによって染色体に遺伝子操作を施す場合、作製された組換え体は、その導入された形質を安定して維持することができることが Fig.5 に示す結果から明らかである。一般的に、組換え体を作製する場合、プラスミドを導入する遺伝子のキャリアーとして利用するが、このプラスミドを宿主内に保持するために、抗生物質添加などの選択圧をかける必要があり、これがないと Fig.5 に示す例のように、宿主からプラスミドは容易に脱落してしまう。一方、相同的組換えによって染色体に遺伝子操作を施し作製された組換え体の形質は、きわめて安定しており、抗生物質などの選択圧の必要がない。今後、バイオレメディエーションなどの分野で実際に組換え体を利用するケースが出てきた場合、対象となる汚染土壌に選択圧として抗生物質等を加えることは事実上不可能であり、プラスミドを利用した形質が不安定な組換え体より、相同的組換えによって作製された安定性のある組換え体の利用が有効と考えられる。

本研究で相同的組換えによって作製された *P. putida* KN1-10A は、PH 遺伝子の上流に *tac* プロモーターを導入したものであり、これが PH 遺伝子の構成的な発現を引き起こしている。しかしながら、その TCE 分解速度は、野生株である *P. putida* KN1 をフェノール誘導した場合に観察された TCE 分解速度と比べて著しく低かった。*tac* プロモーターは *E. coli* の強いプロモーターとして知られているが、*E. coli* のみでなく、*P. putida* でも強く働くことが報告されている¹²⁾。そこで、*P. putida* KN1-10A の低い TCE 分解速度が、*tac* プロモーターによる転写の弱さによるものか否かを *Vibrio* *hervyi* B392 の *luxAB* をレポーター遺伝子として利用した解析により検討した。その結果、*tac* プロモーターの方がフェノール誘導のプロモーターよりも強い転写を引き起こしていることが示唆された。

それゆえ、これらの結果から、TCE 分解速度と、発光試験から予測されるプロモーター活性とは全く矛盾することが明らかとなった。つまり、測定された発光量が、プロモーター活性、さらに生産される PH の量を正しく反映していると仮定すれば、*tac* プロモーターは *P. putida* KN1-10A 内で強い転写を引き起こし、元来の約 4 倍の PH が菌体内で生産されていることになり、*P. putida* KN1-10A の低 TCE 分解速度は、菌体内の PH の量が原因ではないことになる。

このような場合、以下のような 3 つの理由が候補として考えられる。

① PH がフェノールそのものによって活性化される。② PH の活性を上昇させる活性化遺伝子が他に存在する。③ TCE の細胞膜透過が律速になっている。

これまでの他の PH 遺伝子の研究において、①のように PH がフェノールによって活性化されるという報告はない。また、②のような活性化遺伝子の存在も報告されていない。そこで、③を前提に、唯一報告されているトルエンの透過に關与する遺伝子¹⁶⁾に着目した。TO 遺伝子と PH 遺伝子は、その遺伝子配列¹⁷⁾、調節機構¹⁸⁾が極めて似ている近縁の酵素である。それゆえ、フェノールの透過に關与する遺伝子も存在することを仮定して、以下のように仮説を立てた。

「*P. putida* KN1 をフェノール誘導した場合には、フェノールの輸送系が形成され、これを TCE が利用でき、高い TCE 分解能へとつながっている。一方、*P. putida* KN1-10A ではこのような輸送に係わる遺伝子が発現されないため、菌体内に多量の PH が生産されても透過が律速となり TCE 分解能の向上に結びついていない。」この、概念図を Fig. 10 に示す。

TCE のような疎水性の物質は、細胞膜を容易に透

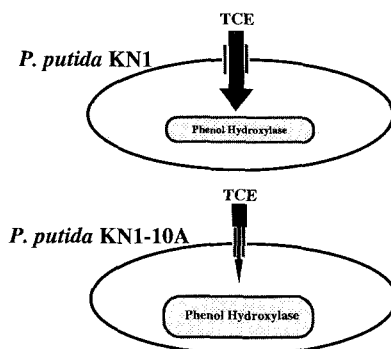


Fig. 10 Possible scheme on TCE degradation by *P. putida* KN1 and *P. putida* KN1-10A

過することが予想され、これまで透過律速の可能性は問題にされていなかった。しかしながら、Wangらは、*P. putida* F1のトルエン遺伝子群の中で、トルエンの輸送に関与していると思われる *todX* の存在を報告しており¹⁶⁾、TCE同様に疎水性の高いトルエンに関しても輸送系の存在が示唆されている。また、Selifonovaらも *lux* 遺伝子を利用したイソプロピルベンゼン誘導プロモーターの解析において、*E. coli* 内での発光応答の速度が遅いことから、疎水性物質がグラム陰性細菌の細胞を透過する際に、外膜が透過を律速しているのではないかと考察している¹⁹⁾。それゆえ、フェノール分解遺伝子群の中に、フェノールの輸送に関与する遺伝子が存在し、*P. putida* KNI-10Aではその遺伝子が発現できていないためTCE分解速度が低いという解釈も十分に可能性はあると思われる。

しかしながら、これらの仮説および解釈の正当性に関しては、さらに実験による検証が必要である。具体的には、*luxAB*由来の発光量から推定している菌体内での酵素量が、実際に正しいか否かをウエスタンブロットによって確認し、かつPH遺伝子の周辺の遺伝子群のクローニングおよびそれら遺伝子のTCE透過への係わりの解析等が必要である。

今後は、これらの項目を検討していくことによって、*P. putida* KNI-10AのTCE分解能を低く抑えている因子を特定し、分解能を向上させるための具体的な改良方法を明らかにしていきたい。

なお、本研究の一部は、通商産業省によって企画された「平成7年度バイオインダストリー安全確保対策（自然環境下における組換え体の利用の際の安全対策調査）」の調査研究として行われた。

(参考文献)

- 1) Tsien, H.C., G.A. Brusseau, R.S. Hanson, and L.P. Wackett. (1989) "Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, pp3155-3161.
- 2) Winter, R.B., K.-M. Yen, and B.D. Ensley. (1989) "Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*." *Bio/Technology*, Vol. 7, pp282-285.
- 3) Wackett, L.P., and D.T. Gibson. (1988) "Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54, pp1703-1708.
- 4) 中村寛治, 宮地有正 (1992) "Phenol Hydroxylase 遺伝子を導入した組換え微生物によるトリクロロエチレンの分解", *環境工学研究論文集*, Vol. 29, pp17-27.
- 5) 藤田正憲, 池 道彦 (1993) 遺伝子組換え菌によりトリクロロエチレンの分解, 平成5年度 日本生物工学会シンポジウム講演要旨集, pp24-25.
- 6) Arciero, D., T. Vannelli, M. Logan, and A.B. Hooper. (1989) "Degradation of trichloroethylene by the ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutrophs*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 159, pp640-643.
- 7) Jahng, D. and T. K. Wood. (1994) "Trichloroethylene and chloroform degradation by a recombinant pseudomonad expressing soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 60, pp2473-2482
- 8) Zylstra, G.J., L.P. Wackett, and D.T. Gibson. (1989) "Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase genes.", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, pp3162-3166.
- 9) Furukawa, K., K. Hirose, S. Hayashida, and K. Nakamura. (1994) "Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase.", *J. Bacteriol.*, Vol. 176, pp2121-2123.
- 10) Simon, R. U. Priefer, and A. Puhler. (1983) "A broad host range mobilization system in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria." *Bio/Technology*, Vol. 1, pp784-790.
- 11) Meighen, E. A. (1991) "Molecular biology of bacterial bioluminescence." *Micobiol. Rev.*, Vol. 55, pp123-142.
- 12) Bagdasarian, M., E. Amann, R. Lurz, B. Ruckert, and M. Bagdasarian. (1983) "Activity of the hybrid *trp-lac(tac)* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors." *Gene*, Vol. 26, pp273-282.
- 13) 中村寛治 (1993) "遺伝子組換え微生物によるトリクロロエチレンの分解", *水環境学会誌*, Vol. 16, pp775-779.
- 14) Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Duodoff. (1966) "The aerobic pseudomonads: a taxonomic study."

- J.Gen.Microbiol., Vol.43, pp159-271.
- 15) Sambrook J., E.F.Fritsh, and T.Maniatis. (1989) "Molecular cloning, a laboratory manual."
 - 16) Wang, Y, M. Rawlings, D. T. Gibson, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, P. C. K. Lau. (1995) "Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1." Mol.Gen.Genet. Vol. 246, pp570-579.
 - 17) Yen, K.-M., M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset; H. S. Lu, A. A. Harcourt, and K. K. Chen. (1991) "Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase.", Vol. 173, pp5315-5327.
 - 18) Fernandes, S., V. Shingler, and V. D. Lorenzo. (1994) "Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests that transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes.", Vol. 176, pp5052-5058.
 - 19) Selifonova, O. V. and R. W. Eaton. (1996) "Use of an *ipb-lux* fusion to study regulation of the isopropylbenzene catabolism operon of *Pseudomonas putida* RE204 and to detect hydrophobic pollutants in the environment.", Appl.Environ.Microbiol., Vol.62, pp778-783.