

(6) ルシフェラーゼ遺伝子を利用したトリクロロエチレン分解能を有する
遺伝子組換え体のモニタリング

Monitoring of a Genetically Engineered Microorganism Able to Degrade
Trichloroethylene by Using Luciferase Genes

石田浩昭^{*}・中村寛治^{*}

Hiroaki ISHIDA^{*}, Kanji NAKAMURA^{*}

ABSTRACT; The luciferase genes (*luxAB*) from *Vibrio harveyi* B392 were used as a marker to trace a genetically engineered microorganism (GEM), *Pseudomonas putida* KN1-10A, that can degrade trichloroethylene (TCE) by constitutively expressed phenol hydroxylase (PH) genes. The genes of *luxAB* were inserted downstream of the PH genes in the chromosomal DNA of *P. putida* KN1-10A to make a new GEM, *P. putida* KN1-L100, by homologous recombination. Insertion of *luxAB* did not reduce the TCE degradation rate per cell. The bioluminescence was nearly proportional to the cell density in the exponential growth phase. However, it was difficult to determine concentrations of *P. putida* KN1-L100 in unknown samples by measuring the bioluminescence because the light intensity per cell depended on the growth phase. The soil column reactor inoculated with *P. putida* KN1-L100 could continue to degrade TCE for 163 hrs. The number of the *P. putida* KN1-L100 in effluent of the reactor could be determined by counting number of the colonies having bioluminescence on an agar medium. Although the GEM also had the tetracycline resistance gene and the catechol 2,3-dioxygenase gene, which could be used as reporters, *luxAB* was most effective for detecting the GEM among the three genes.

KEYWORDS; Trichloroethylene, Phenol hydroxylase, Luciferase, *Pseudomonas putida*, Tetracycline resistance gene

1. はじめに

土壌や地下水の汚染物質として問題となっているトリクロロエチレン (TCE) を唯一の炭素源として利用できる微生物は現在の所報告されていない。しかし、メタン酸化菌¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾やトルエン酸化菌⁶⁾⁷⁾⁸⁾の一部は共酸化反応によってTCEを酸化分解できることが知られている。メタン酸化菌やトルエン酸化菌以外にも、フェノール酸化菌⁹⁾¹⁰⁾、プロパン酸化菌¹¹⁾やアンモニア酸化菌¹²⁾¹³⁾の一部に同じ能力があることが報告されている。共酸化反応を利用してTCEを好氣的に生物分解する場合、TCE分解微生物の増殖源及び酸化酵素の誘導基質としてメタンやトルエンをリアクター、または *in situ* 処理の場合は土壌や地下水に供給しなければならない。しかし、共酸化による TCE 処理では、分解酵素にとっての本来の基質であるメタンやトルエンなどの誘導物質が TCE 分解に対して拮抗阻害物質として働くため、添加が不可欠でありながら、一方では処理効率を低下させる原因となっている¹⁴⁾。このため、誘導基質をバルスで添加したり¹⁵⁾、酵素誘導槽とTCE処理槽を分ける¹⁶⁾などの対応策が考えられているが、処理効率を大幅に向上させることは難しい。このジレンマの解決策の1つとして、遺伝子組換え体の利用がある。これは、誘導基質が存在しなくてもTCE分解酵素が発現する遺伝子組換え体を作成し、利用するものであり、このような組換え体はすでに数例報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。

遺伝子組換え体を使ったTCE処理を実用化するためには、リアクターや環境中での組換え体の挙動を把握し、処理に最適なシステムを構築することが重要である。そのためには、環境中の組換え体の濃度を正確に定量できる簡便で迅速な手法が必要である。組換え体をモニタリングする際には、一般に抗生物質耐性遺伝子や特定の酵素遺伝子をマーカー遺伝子として対象とする組換え体に導入する手法が採られる。中でも近年優れた

^{*}栗田工業 (株) (Kurita Water Industries Ltd.)

マーカー遺伝子として注目されているのが海洋性の発光細菌が持つルシフェラーゼ遺伝子である²²⁾。この遺伝子を導入した組換え体はある条件下で光を放出するため、容易に他の微生物や非生物と区別することができ、フォトマルと呼ばれる発光検出器を使うことによって非常に高感度で対象とする組換え体を検出することが可能である²³⁾。

Pseudomonas putida KN1 は低濃度フェノールを連続通水している実験室内の生物処理装置より単離されたフェノール資化菌である⁹⁾。この菌が持つフェノールヒドロキシラーゼ (PH) 遺伝子は、フェノール誘導によって発現し、TCE を分解することができる。中村らは *P. putida* KN1 の染色体上の PH 遺伝子の upstream に *lac* プロモーターを挿入することによって、フェノール誘導なしに PH 遺伝子が発現し、TCE を分解することができる組換え体 *P. putida* KN1-10A を作成した²⁴⁾。本研究では、*P. putida* KN1-10A の染色体上の PH 遺伝子の後方に *Vibrio harveyi* のルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*) を相同的組換えによって挿入し、この組換え体の *luxAB* を利用したモニタリングについて純粋培養液や土壌カラムを対象に検討した。また、この組換え体は *luxAB* 以外にもマーカー遺伝子として利用できるテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子とカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ (C23O) 遺伝子を持つので、これらの遺伝子を利用したモニタリングについても検討した。

2. 実験材料及び方法

2. 1 *P. putida* KN1-10A への *luxAB* の挿入

本研究で使用した菌株及びプラスミドを Table 1 に示す。相同的組換えによって *luxAB* を *P. putida* KN1-10A の染色体に挿入する際に相同部分として利用するため、*P. putida* KN1 の PH 遺伝子中⁹⁾の *KpnI* サイトから C23O 遺伝子下流の *SacI* サイトまでの 3.1 kb 断片 (Fig.1) を切り出し、プラスミド pKNA82 のマルチクローニングサイトの *KpnI*~*SacI* の部分に挿入した。pKNA82 はプラスミド pTrc99A (ファルマシア製) の *lac*^R と *trc* プロモーター部分を *EcoT22I* と *NcoI* で切断、削除した後、末端を T4DNA ポリメラーゼで平滑化処理し、*PacI* リンカーを挿入、加えてマルチクローニングサイトの *HindIII* サイトを切断、平滑化処理後、別の *PacI* リンカーを挿入したものである。3.1 kb *KpnI*-*SacI* 断片内の PH 遺伝子と C23O 遺伝子の間に存在する *EcoT22I* サイトを切断、T4DNA ポリメラーゼで平滑化処理した後、両端に平滑末端を持つ大きさ 2.1 kb の *luxAB* 断片を挿入した。この *luxAB* 断片は、*Vibrio harveyi* B392 の細胞懸濁液をテンプレートに PCR によって合成したものをプライマー中の制限サイト *KpnI* および *SacI* で切断後、T4DNA ポリメラーゼで平滑化処理したものを用いた。PCR の際のプライマーペア、PCR 反応液の組成及び反応条件を Fig.2 に示す。次に、相同部分及び *luxAB* を含む断片を *PacI* で切り出し、Fig.1 に示すように相同的組換え用のプラスミドベクター pMOK180²⁴⁾ の *PacI* サイトに挿入した。

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains	Reference or source	
<i>Escherichia coli</i> S17-1	25)	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1	9)	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1-10A	24)	
<i>Pseudomonas putida</i> KN1-L100	This study	
Plasmids	Relevant markers	Reference or source
pTrc99A	Ap	Pharmacia Biotech
pKNA82	Ap	This study
pMOK180	Km	24)
Ap: Ampicillin Km: Kanamycin		

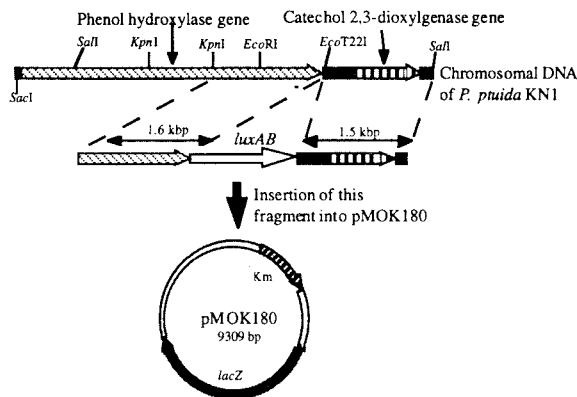


Fig.1 Plasmid and DNA fragments used for homologous recombination

この組換えプラスミドをエレクトロポレーションによって *E. coli* S17-1 に導入した後、*P. putida* KN1-10A とフィルター上で接合させ、シングルクロスオーバーによって *luxAB* を含むベクター全体が *P. putida* KN1-10A 染色体上に挿入された株を取得した。次に、ランダムに選出した1株のシングルクロスオーバー株を Luria-Bertani (LB) 培地 (NaCl 濃度を 5 g/L とした)²⁶⁾で一晩、30℃で培養した後、5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside (X-gal) を含む LB 寒天培地に塗布し、*lacZ* を含むフラグメントが抜け落ちた白色のコロニーの中から発光の有無によってダブルクロスオーバー株を選出した。PCR によって調べた結果、この株は PH 遺伝子の後方の *Eco*T221 に *luxAB* が挿入されていることが確認された。この株を *Pseudomonas putida* KN1-L100 とした。本研究で行った接合及びシングルクロスオーバー株、ダブルクロスオーバー株の選出は筆者らが以前報告した手法²⁴⁾に従った。

2. 2 TCE 分解試験

試験する菌体のコロニーを 5 mL LB 培地に植菌し、30℃で一晩培養した。培養液 100 μ L を再び 100 mL LB 培地に添加し、一晩培養した後、菌体を収穫し、無機培地で 3 回遠沈洗浄した。無機培地は、Basal Salt Medium²⁷⁾を 1/50 に希釈したものを使用した。ただし、TCE 分解に伴う pH の低下を抑えるため、リン酸塩のみは通常の BSM と同じく 40 mM となるように調製した。これを 1/50 BSM とした。菌体洗浄終了後、菌体濃度が波長 600 nm の吸光度 (OD₆₀₀) で 2.0 になるように 125 mL 容ガラスバイアル中の 10 mL 1/50 BSM に懸濁した。TCE を添加した後、テフロンコートブチルゴムセパタムとアルミシールを使って密閉し、バイアルを 20℃で振とう培養した。その後、経時的にヘッドスペースガス 100 μ L 中の TCE 濃度を測定した。TCE の分析には島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-9A (カラム充填剤: Silicone DC-550、検出器: FID) を使用した。本文で示す TCE 濃度は、バイアルビン中の TCE が全部液に溶けているとした場合の濃度であり、これは測定したガス中の TCE 濃度をもとに、20℃における TCE のヘンリ一定数²⁸⁾、液容積及びガス容積から計算で求めた値である。

2. 3 発光強度の測定

組換え体を含むサンプルに対し、LB 培地を 1:4 (試料:LB 培地) の割合で添加し、30℃で振とうした。5 分間後、菌体懸濁液 200 μ L に 10% (V/V - エタノール) *n*-デシルアルデヒド溶液 10 μ L をルミノメーターキューベット内で添加し、直ちに発光強度を測定した。ルミノメーターは TURNER DESIGNS 社製 Model 20 を使用し、10 秒間の発光量

(Primers)	
Upper Primer: 5'-gggtaccA ACAAATAAGGAAATGTTATG-3'	
<i>KpnI</i>	
Lower Primer: 5'-gggagctcACGTTACGAGTGGTATTGAC-3'	
<i>SacI</i>	
(Reaction mixture)	
<i>Pfu</i> Polymerase (5 U/ μ L)	1 μ L
10X Buffer	5 μ L
dNTP (2.5 mM)	4 μ L
Upper Primer (100 pmol/ μ L)	0.1 μ L
Lower Primer (100 pmol/ μ L)	0.1 μ L
DMSO	10 μ L
dH ₂ O	27.8 μ L
<i>V. harveyi</i> (overnight culture)	2 μ L
Total	50 μ L
(Reaction condition)	
Pre 98°C 2 min	
1 94°C 20 sec $\leftarrow$	
2 52°C 30 sec $\rightarrow$ 30 cycles	
3 72°C 3 min $\rightarrow$	
Post 72°C 7 min	

Fig.2 PCR condition for amplification of *luxAB*

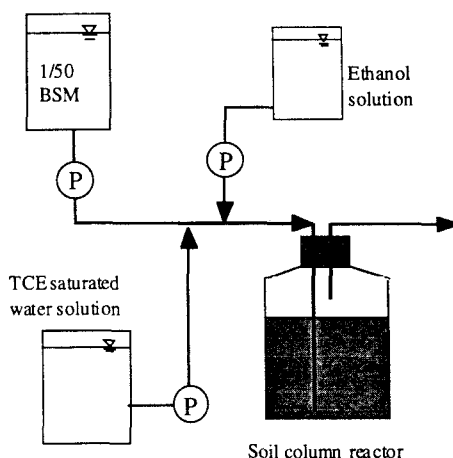


Fig.3 Schematic diagram of soil column reactor

の積分値をサンプルの発光強度とした。ここで示す発光強度は、このルミノメーター固有の発光単位 light unit (LU) での数値であり、0.000~9999 のレンジで表示される。

2. 4 生菌数の測定

菌体サンプルを数段階希釈し、LB 寒天培地に 100 μ L 塗布した。必要な場合は、培地にテトラサイクリン (Tc) 濃度が 10 μ g/mL となるように添加した。30 $^{\circ}$ C で 7 days 培養後、生育したコロニーをカウントすることによって生菌数を求めた。

2. 5 コロニーの C23O 活性の測定

C23O はカテコールを酸化することによって、黄色を呈する物質 (2-hydroxymuconic semialdehyde) を生成する。コロニーの C23O 活性を調べる場合、寒天培地上のコロニーに 100 mM カテコールをスプレーし、5 分間以内に黄変したコロニーを C23O 活性+と判断した。

2. 6 コロニーのルシフェラーゼ活性の測定

直径 9 cm のシャーレのふたの中心に容量 1.5 mL エッペンドルフチューブのキャップ (直径約 9 mm) を置き、その中に *n*-デシルアルデヒド原液を 100 μ L 添加した。その上に測定するプレート逆さにかぶせ、CCD カメラ (浜松エレクトロニクス製 VIM カメラ C2400-40) を備え付けた暗箱の中に挿入した。カメラの焦点を合わせた後、コロニーから放出される光を 3 分間取り込み、画像解析ソフト ARGUS 50 によって解析した。その結果、発光が確認されたコロニーをルシフェラーゼ活性+とした。

2. 7 土カラムによる連続 TCE 分解実験

使用した実験装置の概観を Fig.3 に、運転条件を Table 2 に示す。ガラス製の 500 mL 容茶褐色ネジロビンに、内側をテフロンコートしたキャップを被せたものをカラムとして使用した。このキャップにはテフロン製のバルブが 2 つ付いており、ここから液の通水を行った。カラムには川砂 (真密度 2.69 g/cm³、空隙率 42%、渡良瀬川産) を見かけ容積 500 mL 充填した。土カラムは全く同じものを 2 つ用意し、1 つに組換え体を添加し、他は組換え体を添加せず、コントロールとして運転した。組換え体添加用カラムには、*P. putida* KN1-L100 を LB 培地で一晚培養後、1/50 BSM 中で遠沈洗浄し、再び 1/50 BSM に懸濁したもの (35 mL、菌体濃度 OD₆₀₀=67.5) を添加した。菌体を充填材に捕捉させるため、植菌後 24 hrs ポンプを使ってカラム内の液を循環させ、その後 TCE の通水を開始した。組換え体をカラム内で増殖させ、TCE 分解を長期間継続させるため、原水に 5 mg/L のエタノール (*P. putida* KN1-L100 はエタノールを唯一の炭素源として利用し、増殖することができる) を添加した。また、原水は純酸素で曝気することによって DO が 30~40 mg/L となるように調製した。定期的にカラム原水、処理水の TCE 濃度を測定すると共に、カラムから流出する組換え体の濃度をモニタリングした。

3. 実験結果

3. 1 *P. putida* KN1-L100 の TCE 分解能

相同的組換えによって *luxAB* を PH 遺伝子の後方に挿入した組換え体 *P. putida* KN1-L100 と *luxAB* を挿入する前の組換え体 *P. putida* KN1-10A による TCE の分解を Fig.4 に示す。両組換え体とも初期濃度 54 mg/L の TCE を 165 hrs で約 15

Table 2 Experimental condition of soil column reactor

Parameters	Values
TCE	400-500 μ g/L
Ethanol	5 mg/ L
DO	30-40 mg/L
Feeding solution	1/50 BSM
Temperature	20 $^{\circ}$ C
Flow rate	25 mL/hr
HRT	8.4 hr

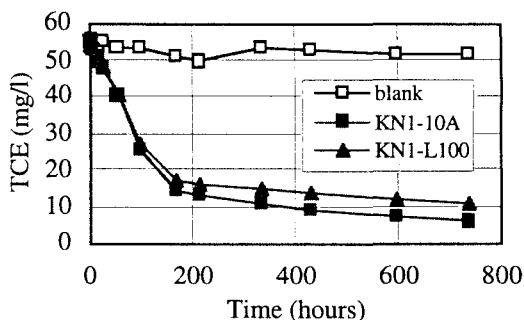


Fig.4 TCE degradation by *P. putida* KN1-10A and *P. putida* KN1-L100

mg/L まで分解した。その後、TCE の分解速度は両組換え体とも急速に低下した。初期 (0-165 hrs) の TCE 分解速度を計算すると、*P. putida* KN1-10A、*P. putida* KN1-L100、それぞれ 0.12 mg/L・OD・hr、0.11 mg/L・OD・hr となり、*luxAB* を挿入したことによる組換え体の TCE 分解能へ負の影響は認められなかった。

P. putida KN1-10A の場合、初期 TCE 濃度 10 mg/L での TCE 分解初速度²⁴⁾は初期濃度 54 mg/L での値とほぼ同程度であり、Fig.4 で見られた急激な分解速度の低下は TCE 濃度の低下に伴う反応速度の低下ではなかった。酸化酵素による TCE 分解では、代謝産物による反応阻害²⁹⁾³⁰⁾や酸化に必要な NADH の枯渇³¹⁾によって時間経過に伴う分解速度の低下が起こることが報告されている。両組換え体の TCE 分解速度が 165 hrs 以降、急速に低下したのも同様の理由によると考えられる。

3. 2 発光強度による組換え体の定量

発光細菌のルシフェラーゼによる発光の仕組みを Fig.5 に模式的に示す³²⁾。フラビンヌクレオチド (FMN) が NADH-FMN 還元酵素によって FMNH₂ に還元され、ルシフェラーゼ (E₁) と結合し、分子状酸素と反応するとルシフェラーゼ+FMNHOOH 複合体 (E₁+ FMNHOOH) を形成する。この時アルデヒドが存在すると、E₁+FMNHOOH とアルデヒドが反応し励起中間体 [E₁+FMNHOH] *が生じる。この [E₁+FMNHOH] *が基底状態に戻るときのエネルギーが光として放出される。

in vitro で発光を行わせるためには、反応に必要な基質をルシフェラーゼに添加しなければならないが、*luxAB* を導入した組換え体の場合、有機源を添加し好気状態にすれば必要な基質は細胞内で合成され、数分間で E₁+FMNHOOH が形成されるため、後はアルデヒドをのみを添加すれば直ちに発光が開始される。Blouin らは *luxAB* を含むプラスミド RTB7 を導入した組換え体 *Caulobacter crescentus* CB2A/RTB7 を用いた実験において、ペプトン・酵母エキス培地 (PYE) 中で 5 分間培養すれば、緩衝液中で NADH と FMN を添加した場合と同程度の発光強度がデシルアルデヒド添加後に得られたと報告している³²⁾。この結果を参考に *P. putida* KN1-L100 の菌体濃度と培養液の発光強度の関係を調べるため、サンプルを LB 培地中で 5 分間培養後、デシルアルデヒドを添加した時の発光強度を測定した。Fig.6 は、対数増殖期に収穫した *P. putida* KN1-L100 (OD₆₀₀=0.175) を滅菌水で数段階に希釈した時の発光強度と菌体濃度 (OD₆₀₀) の関係である。OD₆₀₀=0.0002~0.2 では、発光強度と菌体濃度の関係は両対数紙上でほぼ直線となり、この範囲では発光強度の測定によって菌体濃度の定量が可能であることが分かった。菌数に換算すると検出限界は約 10⁵ CFU/mL であった。

3. 3 培養時間と発光強度の関係

P. putida KN1-L100 を LB 培地にて長期間培養 (20 ℃) し、その間の生菌数と発光強度の経時変化を調べた。結果を Fig.7 に示す。組換え体が LB 培地中で増殖することによって生菌数、発光強度とも急激に増加し、培養開始から 50 hrs 前後で最大値に達した。その後 LB 培地中の有機源を消費尽くした後は、各値とも徐々に低下した。

Fig.8 は、単位生菌数当たりの発光強度を Fig.7 の結果から計算したものである。単位生菌数当たりの発光強度は培養時間によって大きく変化した。生菌数が最大 (1.5 X 10⁹ CFU/mL) となった 67 hrs 後と、その後生菌

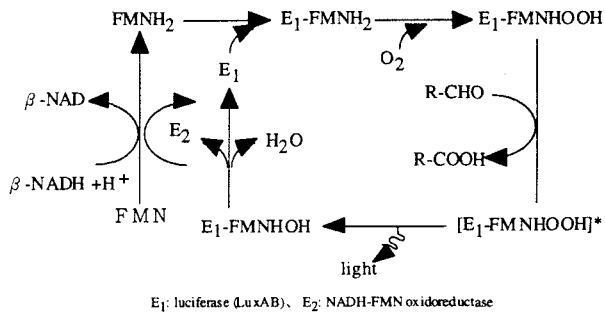


Fig.5 Schematic diagram of the biochemical mechanism causing light emission from the LuxAB system³²⁾

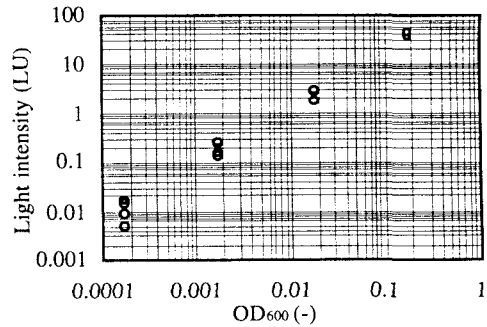


Fig.6 Relationship between cell density of *P. putida* KN1-L100 harvested in the exponential phase and light intensity

数が低下した (1.0×10^7 CFU/mL) 185 hrs 後との単位生菌数当たりの発光強度を比較すると、後者の方が54倍高い値を示した。185 hr 後と 616 hrs 後では後者の単位生菌数当たりの発光強度の方が4倍程度高かったが、185 hrs 以前の急激な増加と比べて、185 hrs 以降はほぼ安定した値を示していた。

今回の測定条件では、菌体サンプルに新鮮な LB 培地を添加、5 分間のインキュベーション後にデシルアルデヒドを添加し、発光強度を測定した。定常期や死滅期の菌体の場合、対数増殖期の菌体に比べて発光に必要な基質の合成に時間がかかり、LB 培地添加後 5 分間のみのインキュベーションでは、ルシフェラーゼ + FMNHOH 複合体が十分に形成できないことが危惧されたが、LB 培地添加後のインキュベーション時間を延ばしても培養後期 (616 hrs) に収穫したサンプルの発光強度は増加せず、その影響は認められなかった (Fig.9)。

以上の結果から、培養時間によって単位生菌数当たりの発光強度が大きく変化するため、未知のサンプル中の組換え体の菌数を発光強度から求めることは困難であると結論した。

3. 4 土カラム処理水中の組換え体のモニタリング

TCE を連続通水している土カラムに *P. putida* KN1-L100 を添加し、TCE を連続処理すると共に処理水中に含まれる組換え体の定量を行った。Fig.10 に土カラム原水と処理水の TCE 濃度の経時変化を示す。コントロールカラムでは、実験期間中を通じて原水と処理水の濃度はほぼ等しく、この実験系では TCE の揮散や充填材への吸着は無視できた。組換え体を添加したカラムでは連続通水開始後 19 hrs 経過した時の処理水の TCE 濃度は $110 \mu\text{g/L}$ であり、原水よりも $270 \mu\text{g/L}$ 低かった。その後、原水 TCE 濃度と処理水 TCE 濃度の差は徐々に小さくなり、163 hrs 後 $41 \mu\text{g/L}$ の差が認められたのを最後に、それ以降原水濃度と処理水濃度はほぼ等しくなった。160 hrs 程度で TCE 分解能がほとんど消失する現象は回分実験の結果と同じであった (Fig.4)。詳細については後で述べるが、カラム処理水中の *P. putida* KN1-L100 の菌数から計算すると、植菌した組換え体の 8.9% は通水開始後 20 hrs 以内にカラムから流出したが、その後流出する菌は激減し、24 hrs 以降実験終了時までの流出量は植菌量の 1.3% 以下であった。したがって、実験期間中、植菌した組換え体の 90% はカラム内に保持されていたことになる。しかし、カラムに保持された菌体量と回分実験で求めた菌体当たりの分解速度から 160 hrs に分解される TCE 量を計算した結果、実際にカラムで分解された TCE の量は計算値の 7% 程度であった。これはカラムの TCE 濃度が回分実験の時よりも低かったこと、土に含まれる成分や共存する他の微生物による TCE

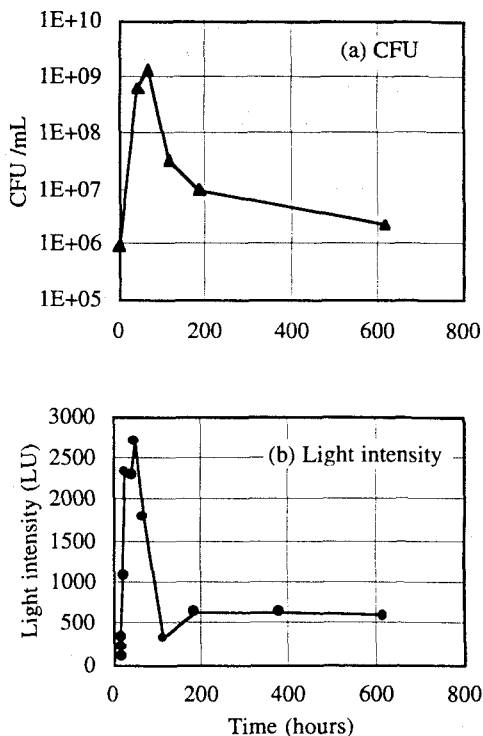


Fig.7 Time course of light intensity during growth of *P.putida* KN1-L100 in LB medium

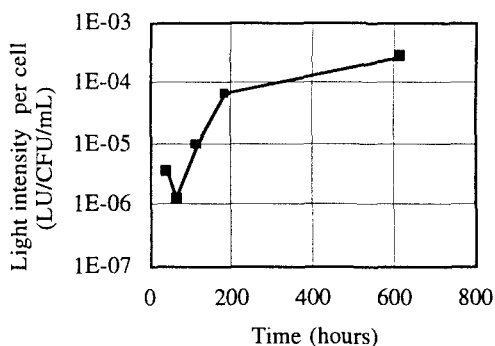


Fig.8 Effects of incubation time on light intensity per cell (*P.putida* KN1-L100)

については後で述べるが、カラム処理水中の *P. putida* KN1-L100 の菌数から計算すると、植菌した組換え体の 8.9% は通水開始後 20 hrs 以内にカラムから流出したが、その後流出する菌は激減し、24 hrs 以降実験終了時までの流出量は植菌量の 1.3% 以下であった。したがって、実験期間中、植菌した組換え体の 90% はカラム内に保持されていたことになる。しかし、カラムに保持された菌体量と回分実験で求めた菌体当たりの分解速度から 160 hrs に分解される TCE 量を計算した結果、実際にカラムで分解された TCE の量は計算値の 7% 程度であった。これはカラムの TCE 濃度が回分実験の時よりも低かったこと、土に含まれる成分や共存する他の微生物による TCE

分解に対する阻害及びカラム内に保持された組換え体と TCE との接触効率が悪かった点などが考えられるが、詳細は不明であり、今後の検討課題である。また *P. putida* KN1-L100 をカラム内で増殖させ、TCE 分解能を継続させるために原水濃度が 5 mg/l になるようにエタノールを添加したが、TCE 分解能の継続時間は回分実験とはほぼ同じであり、効果はなかった。運転期間中、処理水からエタノールが検出されることはなく、カラム内で完全に分解されていた。添加したエタノールは *P. putida* KN1-L100 ではなく、他の微生物によって消費されたと考えられる。

前項で述べた通り、液の発光強度から組換え体の菌数を求めることは困難であったため、一度 LB 寒天培地上でコロニーを形成させ、その中のルシフェラーゼ活性を示すコロニーの数から土カラム処理水中の *P. putida* KN1-L100 の菌数を測定した。処理水の生菌数と *P. putida* KN1-L100 の菌数の経時変化を Fig.11 に示す。通水開始初期は 10^8 CFU/mL 以上の *P. putida* KN1-L100 がカラム処理水から検出されたが、その数は減少し続け、660 hrs 後には 10 CFU/mL になった。通水開始初期は、培地に生育したコロニーのほぼ 100 % が *P. putida* KN1-L100 であったが、時間の経過と共に *P. putida* KN1-L100 の割合は低下し、125 hrs 後 50 %、333 hrs 後 9 % 及び 669 hrs で 0.6 % となった。

コロニーのルシフェラーゼ活性の判定は、全コロニー数に対する組み換え体の割合が数%以下であっても、CCD カメラによって明瞭な発光のシグナルが得られたため容易であった。Fig.12 にその一例を示す。この写真は希釈した土カラム処理水を LB 寒天培地に植菌、培養後、生育したコロニーを CCD カメラで撮影したものであり、上部から光を与えて全コロニーを写した写真

(Fig.12a) と、暗条件下で発光するコロニーを撮影した写真 (Fig.12b) である。特定のコロニー (*P. putida* KN1-L100) のみが発光している様子が明確に確認できた。今回の実験では、1 枚のプレートに生育した 181 個のコロニー中に存在する 1 個の組換え体のコロニーを検出することができた。また、コントロールカラムの処理水の生菌数は $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL であったが、ルシフェラーゼ活性を示す菌は全く検出されなかった。

同様に、LB 培地に $10 \mu\text{g/mL}$ の Tc を添加した培地を使って土カラム処理水の全生菌数及び *P. putida* KN1-L100 の菌数を測定した結果を Fig.11 に示す。ルシフェラーゼ活性を示すコロニーの数から計算した *P. putida* KN1-L100 の菌数は、Tc 無添加の LB 培地の結果とはほぼ等しかった。両培地の全生菌数を比較すると、組換え体の割合が 100 % に近かった期間 (0~125 hrs) の値は等しかったが、その後組換え体の菌数が 10^4 CFU/mL 以下に減少し、処理水中に存在するその他の菌の割合が相対的に増加した以降の全生菌数は、Tc を含む LB 培

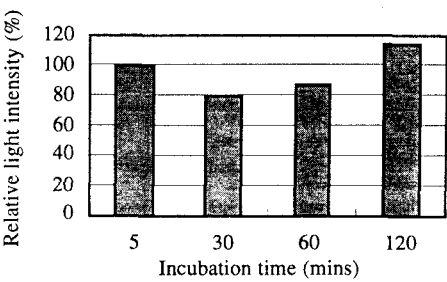


Fig.9 Effects of incubation time on light intensity of the bacterial culture harvested at 616 hrs (The data were shown as a percentage of the light intensity to that of 5 minutes' incubation after adding LB medium)

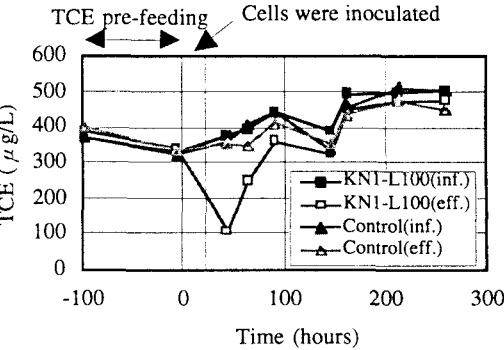


Fig.10 TCE influent and effluent concentrations of soil column reactor

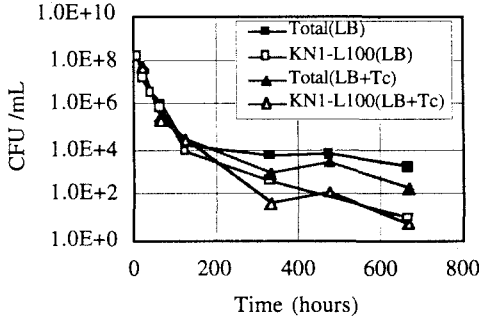


Fig.11 Total CFU and CFU of *P. putida* KN1-L100 in effluents of the soil column reactor

地の方が1桁程度低かった。しかし、Tcを含むLB培地に生育したコロニー中の*P. putida* KN1-L100の割合は330 hrs以降3~5%であり、処理水中にはTc耐性を示す自然菌が $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL存在した。組換え体を植菌していないコントロールカラムの処理水からも同様に $10^2 \sim 10^3$ CFU/mLのTc耐性菌が検出された。したがって、Tc耐性のみを利用して*P. putida* KN1-L100を検出することは不可能であった。

P. putida KN1-L100はC23O活性を持つので、ルシフェラーゼ活性の測定終了後、プレートにカテコールをスプレーし、各コロニーのC23O活性の有無を調べた。しかし、色の変化が微妙であり、組換え体の黄変したコロニーと他の黄色のコロニーを区別することはできなかった。

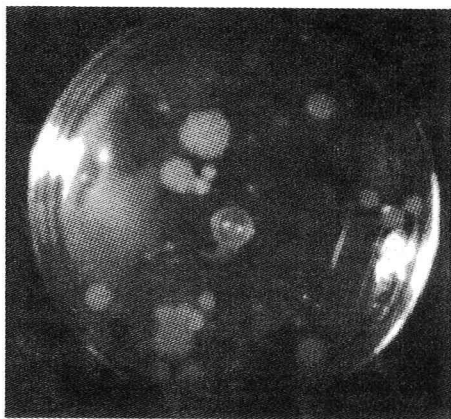
4. 考察

対数増殖期に収穫した場合、液の発光強度と*P. putida* KN1-L100の菌数はほぼ比例したため、発光強度の測定による組換え体菌数の定量が可能であった。しかし、組換え体の単位生菌数当たりの発光強度は培養時間によって数十倍変化するため、この方法は未知のサンプル中の組換え体の定量には適さなかった。当初、単位生菌数当たりの発光強度は、対数増殖期がもっとも高く、定常期、死滅期になるにつれ低下するのではと予想していたが、逆に培養後期の方が高い値を示した。*P. putida* KN1-L100に挿入した*luxAB*は*tac*プロモーターによって構成的に発現されているため、この酵素が常に生産され、細胞内での蓄積量が対数期よりも定常期以降の方が多くなり、その結果単位生菌数当たりの発光強度が高くなった可能性がある。また、定常期から死滅期の培養液の場合、LB寒天培地上でコロニーを形成する能力は失っているが、ルシフェラーゼ活性は失っていない菌体が数多く存在したことも考えられる。サンプルの発光強度の測定による*luxAB*を含む組換え体の定量はこのような問題を持つが、操作が簡便であり、5分で測定結果が得られるため、予備的な測定や定常状態が維持されている系の管理などには有効な手段である。

P. putida KN1-L100を植菌した土カラムから流出してくる組換え体の生菌数はLB寒天培地上に生育した発光するコロニーをカウントすることによって定量することができた。この組換え体は*luxAB*の他にもTc耐性遺伝子とC23O遺伝子を持つが、前者は組換え体以外の耐性菌が数多く検出されたため、後者は活性の判定が困難であったため、マーカー遺伝子としては適さなかった。抗生物質耐性遺伝子としては、他にも多くの種類があるが、予備的に検討した結果では、アンピシリン耐性遺伝子やクロラムフェニコール耐性遺伝子を利用した場合でも、自然界に存在する耐性菌の影響無視できず、マーカー遺伝子として有効では無かった。

今回の実験では、発光するコロニーをカウントする際、寒天培地上に生育する他の菌の影響を調べるため、植菌後7日後に測定行ったが、コロニーの存在が肉眼で僅かに確認できる程度の大きさがあればCCDカメラに

(a)



(b)

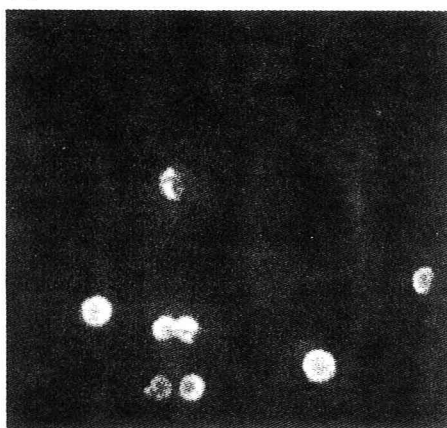


Fig.12 Photographs of colonies grown on LB agar (taken by CCD camera).
A 100 μ L of diluted effluent of the soil column reactor was spread on the agar.
(a) Total colonies (photographed under visible light)
(b) Colonies having bioluminescence (photographed in the dark)

よって発光の有無を確認できるため、*P. putida* KN1-L100 の場合、LB 寒天培地に植種後一晚培養すれば定量することが可能であった。また、この方法を使用する際に問題となるのは、他の微生物が組換え体の菌数よりも数桁以上存在する場合の影響である。耐性遺伝子を併用することによって、寒天培地上に生育する他の微生物の生育を抑えることはできるが、完全ではなく、また抗生物質耐性遺伝子を含む組換え体の環境中への放出を問題視する場合があります、好ましくない。そこで、使用する培地を LB 培地のような複合培地から組換え体が資化できる単一基質を使った最小培地に変更することによって生育する他の菌を減らすことが可能と考えられるので、今後検討していきたい。また、コロニーではなく、single cell 状態で発光する組換え体を CCD カメラを使って検出する手法も報告されており²³⁾、これに関しても今後検討する予定である。

5. 結論

ルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*) を利用した遺伝子組換え体のモニタリングについて、TCE 分解用に開発された組換え体を対象に検討した結果、以下の知見が得られた。

- 1) *luxAB* を染色体に挿入し、*tac* プロモータによって構成的に発現させても宿主の TCE 分解初速度は変化せず、負の影響は認められなかった。
- 2) 対数増殖期に収穫した *P. putida* KN1-L100 (*luxAB* を染色体に挿入した組換え体) の場合、液中の菌体濃度と液の発光強度はほぼ比例し、 10^5 CFU/mL 以上の濃度であれば、液の発光強度を測定することによって組換え体の菌数を定量することができた。しかし、単位生菌数当たりの発光強度は菌の培養時間によって数十倍変化したため、未知のサンプル中の組換え体の生菌数を定量することはできなかった。
- 3) TCE 汚染土壌を模擬した土カラムに *P. putida* KN1-L100 を植菌した結果、TCE 分解が 163 hrs 程度継続した。また、処理水中の CFU を測定し、その中の発光するコロニーをカウントすることによって組換え体の生菌数を定量することが出来た。処理水中には一般の Tc 耐性菌が数多く存在したため、Tc 耐性遺伝子のみを利用して組換え体をモニタリングすることはできなかった。また、カテコールスプレーによるコロニーの色の変化が微妙であるため、C23O 遺伝子もマーカー遺伝子としては適さなかった。

本研究は、通商産業省によって企画された「平成 8 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) Wilson, J.T. and B.H. Wilson (1985) Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 242 - 243.
- 2) Little, C.D., A.V. Palumbo, S.E. Herbes, M.E. Lidstrom, R.L. Tyndall and P.J. Gilmer (1988) Trichloroethylene biodegradation by a methane oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 951-956.
- 3) Henry, S.M. and D. Grbic-Galic (1991) Influence of endogenous and exogenous electron donors and trichloroethylene oxidation toxicity on trichloroethylene oxidation by methanotrophic cultures from a groundwater aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 236-244.
- 4) Oldenhuis, R., J.Y. Oedzes, J.J.v.d. Waarde and D.B. Janssen (1991) Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 7-14.
- 5) Nakajima, T., H. Uchiyama, O. Yagi and T. Nakahara (1992) Novel metabolite of trichloroethylene in a methanotrophic bacterium, *Methylocystis* sp. M, and hypothetical degradation pathway. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 486-489.
- 6) Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, E.J. O'Neill and P.H. Pritchard (1986) Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 383-384.
- 7) Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, W.R. Mahaffey and P.H. Pritchard (1987) Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 949 - 954.
- 8) 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.*, 54, 1703 - 1708.
- 9) 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*, 29, 17-27.
- 10) Fujita, M., M. Ike, J. Hioki, K. Kataoka and M. Takeo (1995) Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. *J. Fement. Bioeng.*, 79, 100-106.

- 11) Wackett, L.P., G.A. Brusseau, S.R. Householder and R.S. Hanson (1989) Survey of microbial oxygenases : trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2960-2964.
- 12) Arciero, D.M., T. Vannelli, M. Logan and A.B. Hooper (1989) Degradation of trichloroethylene by the ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutrophus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 640-643.
- 13) Vannelli, T., M. Logan, D.M. Arciero and A.B. Hooper (1990) Degradation of halogenated aliphatic Compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1169-1171.
- 14) 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*, 16, 775-779.
- 15) Hopkins, G.D. and P.L. McCarty (1995) Field evaluation of *in situ* aerobic cometabolism of trichloroethylene and three dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1628-1637.
- 16) Aziz, C.E., M.W. Fitch, L.K. Linquist, J.G. Pressman, G. Georgiou and G.E.J. Speitel (1995) Methanotrophic biodegradation of trichloroethylene in a hollow fiber membrane bioreactor. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 2574 - 2583.
- 17) Kim, Y., P. Ayoubi and A.R. Harker (1996) Constitutive expression of the cloned phenol hydroxylase gene(s) from *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and concomitant trichloroethylene oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3227-3233.
- 18) Romine, M.F. and F.J. Brockman (1996) Recruitment and expression of toluene/trichloroethylene biodegradation genes in bacteria native to deep-subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2647-2650.
- 19) Shields, M.S. and M.J. Reagin (1992) Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3977-3983.
- 20) Winter, R.B., K.-M. Yen and B.D. Ensley (1989) Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 7, 282-285.
- 21) Furukawa, K., J. Hirose, S. Hayashida and K. Nakamura (1994) Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase. *J. Bacteriol.*, 176, 2121-2123.
- 22) Meighen, E.A. (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, 55, 123-142.
- 23) 増子正行 (1996) 生物化学発光を利用した単一菌体の検出. *生物物理*, 36, 243-244.
- 24) 中村寛治, 石田浩昭 (1996) 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. *環境工学研究論文集*, 33, 165-175.
- 25) 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*, 1, 784-790.
- 26) Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 27) Stanier, R.Y., N.J. Palleroni and M. Duodoroff (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159-271.
- 28) Gossett, J.M. (1987) Measurement of Henry's law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 202 - 208.
- 29) Wackett, L.P. and S.R. Householder (1989) Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2723-2725.
- 30) Alvarez-Cohen, L. and P.L. McCarty (1991) Effects of toxicity, aeration, and reductant supply on trichloroethylene transformation by a mixed methanotrophic culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 228-235.
- 31) Alvarez-Cohen, L. and P.L. McCarty (1991) Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. *Appl Environ Microbiol*, 57, 1031 - 1037.
- 32) Blouin, K., S.G. Walker, J. Smit and R.F.B. Turner (1996) Characterization of *in vivo* reporter systems for gene expression and biosensor application based on *luxAB* luciferase genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2013-2021.