

シュードモナス属細菌 TM15 株の 2,4,6-トリニトロトルエン 生分解遺伝子に関する研究

Study on Genes Involved in Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene in *Pseudomonas* sp. Strain TM15

西河 良諭, 前田 憲成, 尾川 博昭*

YOSHITSUGU NISHIKAWA, TOSHINARI MAEDA and HIROAKI I. OGAWA

九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻 〒808-0196 北九州市若松区ひびきの 2-4

*TEL: 093-695-6059 FAX: 093-695-6012

*E-mail: ogawahi@life.kyutech.ac.jp

Department of Biological Functions and Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu
Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0196, Japan

キーワード: TNT 生分解, プロモータートラップベクター, TNT 応答性プロモーター, バイオセンサー

Key words: TNT biodegradation, promoter-trap vector, TNT responsive promoter, biosensor

(原稿受付 2008 年 10 月 16 日/原稿受理 2008 年 10 月 22 日)

1. はじめに

2,4,6-トリニトロトルエン (以下, TNT と略す) は, 火薬の主原料の一つであり, 20 世紀において, 第二次世界大戦を始めとする軍事産業の活発化に伴い, 大量に製造された。TNT は, 火薬の中でも高い生物毒性を有する化学物質で, 肝臓障害, メトヘモグロビン血症や染色体異常などを引き起こすことが知られている^{10,11,13,14}。また TNT は, 芳香環に電子吸引性の高いニトロ基が 3 つ規則正しく配置しており, その影響で芳香環の π 電子が欠如した状態となり, 生分解が比較的困難な化合物として環境中で挙動する⁹。TNT は, このような生物に対する高い毒性と難分解性という特性から, 環境汚染物質とされ, 特に製造が盛んであったアメリカ合衆国, ドイツやカナダなどでは, TNT による土壤汚染と地下水汚染が深刻化している^{4,12}。

このような背景を受け, 当研究室はバイオレメディエーションによる TNT 浄化を研究目標に, 北九州市の TNT 火薬汚染土壌から, TNT を分解可能な微生物のスクリーニングを行った。その結果, 単体で高濃度 (1 g/L) の TNT を高効率に変換できる, 新規シュードモナス属細菌 TM15 株の分離・同定に成功した^{7,15}。TM15 株は, 他の微生物とは異なり, TNT をほぼ完全に無機化・無毒化し, 自身の栄養源として利用することができる^{8,16}。また, これまでの研究により, TM15 株が約 74 kb のプラスミドを保持しており, それが TNT 代謝に重要な役割を担う可能性が高いことがわかっている。しかしながら, TM15 株において, どのような酵素が TNT 代謝に関わっているかは, 未だ明らかになっていない。

これまでに, TNT を生分解する微生物は多数報告さ

れており, TNT の変換経路も明らかになっている^{3,5,6,9}。しかし, TNT 代謝に関わる機能遺伝子の解析は, 一部の研究者によって行われているものの², 現在のところ明らかとなっているものは, アミノ酸代謝に関わる遺伝子のみであり, TNT に対する直接的な反応機構の解析は, 全く進んでいないといっても過言ではない。もし, TNT 代謝に関わる遺伝子群が同定できれば, それらの遺伝子を工学的に応用することにより, さらに TNT 代謝能力の高い微生物を作ることが可能となる。また, TNT 存在下で遺伝子発現調節に関わる遺伝領域を同定できれば, TNT を用いている地雷を検出する, バイオセンサーの構築も可能であると考えられる。そのため, TM15 株の TNT 代謝に関与する, 機能遺伝子及び遺伝子発現調節領域の同定を目的に研究を行った。

2. TNT 代謝遺伝子と TNT 応答性プロモーター

前述したように, TM15 株は高い TNT 代謝能力を有し, その役割をこの株が保持する約 74 kb のプラスミドが担っている可能性が非常に高い。つまり, TM15 株の保持するプラスミドに, TNT 代謝に関する何らかの機能遺伝子や遺伝子発現制御系などが存在すると考えられる。そこで, このプラスミドを抽出して制限酵素により断片化し, クローニングした後, TNT 代謝に関与する DNA 領域を含むクローンの選別を行った。

クローン選別は, 最初に TNT 応答性プロモーターを探すことから始めた。一般に, 代謝系酵素は反応基質に依存して, 誘導的に発現するケースが多い。もし, TM15 株のプラスミドに TNT 応答性のあるプロモーターが存在するならば, その近傍には TNT 代謝に関与

する遺伝子が存在する可能性は高い。また、TNT 応答性プロモーターそのものは、TNT 認識機構の解明に有効であるといえる。

そのようなプロモーターを含むクローンのみを選択するために、プロモータートラップベクターを用いて、プラスミド断片のクローニングを行った。さらに、多くのプロモーターの中から、TNT 存在下で転写活性が上昇、または TNT 存在下でも高い転写活性を維持するプロモーターの単離を試みた。

3. プロモータースクリーニング

プロモータートラップベクターとして、*lacZ* のプロモーター欠失ベクターを利用した。これは、ベクター上のプロモーターを除き、マルチクローニングサイトの下流に、リボソーム結合部位を含む *lacZ* を組み込んだものである (図 1)。さらに、このベクターは、マルチクローニングサイトの下流に、転写終結領域が組み込まれており、マルチクローニングサイトにプロモーターを含む DNA 断片が挿入されないと、*lacZ* が発現されないトリックになっている。

図 1 のように、TNT 応答性プロモーターのスクリーニングを行った。まず、TNT (100 mg/L) -LB 培地で、16 時間培養した TM15 株からプラスミドを抽出し、それを制限酵素 (*KpnI*, *SphI*, *SalI*, *PstI*) により断片化した。それらをプロモータートラップベクターとライゲーションさせ、大腸菌 DH5 α 株に導入した。形質転換に用いた LB-Amp 培地は、X-gal と TNT (20 mg/L) を含んでおり、TNT 存在下で高い *lacZ* の発現を示す株の単離を目的としている。青色と白色のカラーセレクションにより、プロモーターを含むクローンを保持する大腸菌のみを選別し、各コロニーを 96 穴タイタープレートで培養した。最後に、TNT 有無の LB-Amp-Xgal 寒天培地にそれぞれをスポットし、*lacZ* の発現を比較した。そして、TNT 存在下で *lacZ* の発現が強くなった株を 10 株ほど分離し、再形質転換した後、*lacZ* の発現を再び調べた。

以上の実験により、TNT 培地で特にプロモーター活性の高いクローンを 1 つ得た。これは、プラスミドを *Kpn I* で切断したときに生じる断片であった (以下、このクローンを KpnA6 と記す)。

4. プロモーターの TNT 応答性の確認

単離したクローン KpnA6 を保持する大腸菌の *lacZ* の発現が、TNT 存在下でどれほど活性化されているかを調べるため、ONPG を用いて β -ガラクトシダーゼ活性の定量を行った。

使用したサンプルは 2 つで、プロモータートラップベクターに KpnA6 が組み込まれたプラスミド保持する大腸菌、対照として *sacB* のプロモーター領域が組み込まれたプラスミドを保持する大腸菌を用いた。これらを LB-Amp で前培養した後、4 mL の LB-Amp、及び TNT (40 mg/L) -LB-Amp に、それぞれ植菌し、本培養を行った。培養液の OD₆₀₀ が、0.4 付近になるまで培養した。それらを 1 mL 集菌し、buffer に懸濁後、0.2% SDS とクロロホルムを用いて菌体破碎を行い、30°C で 2 分間

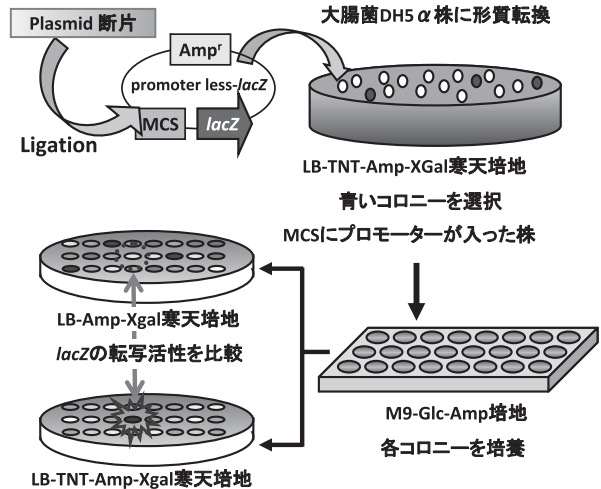


図 1. TNT 応答性プロモーターのスクリーニング: マルチクローニングサイト (MCS) に、TM15 株のプラスミド断片を挿入し、*lacZ* の発現が行われた株を選択した。その後、ライブラリークローンの中から、TNT 応答性を持つクローンを単離した。

インキュベーションした。これを酵素液とし、反応基質である ONPG (4 mg/mL) を 0.4 mL 加え、酵素反応を開始した。液が黄色になったところで、反応終了液である 1 M Na₂CO₃ を 1 mL 加え、遠心した後、上清の OD₄₂₀ を測定した。 β -ガラクトシダーゼ (プロモーター) の活性は、以下の式より算出した。

$$\text{活性値} = \frac{\text{OD}_{420} \times 1000}{\text{OD}_{600} \times \text{反応時間}}$$

その結果、KpnA6 クローンを保持する大腸菌は、TNT 存在下でプロモーター活性が 2.5 倍ほど上昇することがわかった。また、このクローンにおけるプロモーター活性上昇は、TNT 変換産物であるジニトロトルエンと安息香酸存在下では起こらなかった (図 2)。

今回の実験により、TNT 存在下で優位に活性が変動する、プロモーター領域を単離できた。今後は、この TNT 応答性プロモーター領域の配列や機能遺伝子の探索、プロモーターそのものの応答メカニズムなどを明らかにすることが重要であると考えられる。

5. おわりに

TNT は、地雷の火薬として使用されている化学物質である。第二次世界大戦時には、3 億個以上の地雷が使用され、今なお 1 億個以上が、地中に埋没したままといわれている。地雷の撤去作業には、多大なコストと手間がかかり、迅速かつ簡便に地雷を検出できる技術の開発が求められている¹⁾。我々は、微生物によって土壌中の地雷を検出することができれば、安全性の観点から、地雷探索に大変有効なのではないかと考えている。

今回単離したプロモーターは、TNT 応答性という興味深い特性を持っている。この応答メカニズムを明らかにできれば、地雷を検出可能な微生物の構築も期待できる。加えて、TNT 応答性プロモーター周辺の遺伝子群

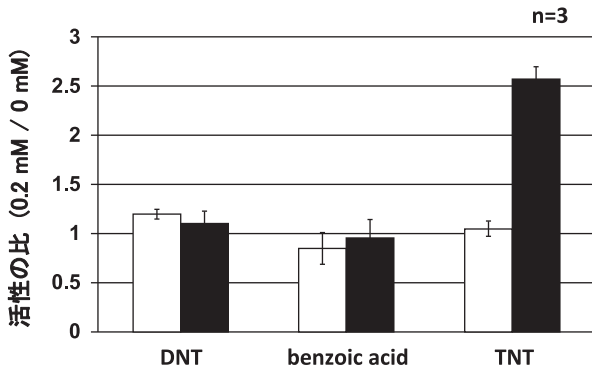


図2. TNT 及び TNT 変換産物存在下における β -ガラクトシダーゼ活性の変化: 縦軸は, それぞれの化合物 0.2 mM 存在下における β -ガラクトシダーゼ活性値を, 非存在下における β -ガラクトシダーゼ活性値で割った値となる。実験は, ジニトロトルエン (DNT), 安息香酸 (benzoic acid), TNT の3つの条件で, それぞれ行った。対照は, *sacB* のプロモーターを利用した。白棒: 対照, 黒棒: KpnA6。

を調べて, バイオレメディエーションへの応用の可能性も探っていきたい。

文 献

- Asakawa, H., T. Maeda, H.I. Ogawa, and T. Haruyama. 2006. A cellular bioassay for TNT detection using engineered *Pseudomonas* sp. strain TM101 for systematic bioremediation. *J. Biol. Phys. Chem.* 6: 119–123.
- Caballero, A., J.J. Lazaro, J.L. Ramos, and A. Esteve-Nunez. 2005. PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ. Microbiol.* 7: 1211–1219.
- Esteve-Nunez, A., A. Caballero, and J.L. Ramos. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 335–352.
- Hawari, J., S. Beaudet, A. Halasz, S. Thiboutot, and G. Ampleman. 2000. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 605–618.
- Maeda, T., N. Nagafuchi, A. Kubota, K. Kadokami, and H.I. Ogawa. 2006. One-step isolation and identification of hydroxylamino-dinitrotoluenes, unstable products from 2,4,6-trinitrotoluene metabolites, with thin-layer chromatography and laser time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatog. Sci.* 44: 96–100.
- Maeda, T., A. Kubota, N. Nagafuchi, K. Kadokami, and H.I. Ogawa. 2006. Crucial problem in rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene and its breakthrough method. *J. Microbiol. Methods.* 66: 568–571.
- Maeda, T., K. Kadokami, and H.I. Ogawa. 2006. Characterization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-metabolizing bacteria isolated from TNT-polluted soils in the Yamada Green Zone, Kitakyushu, Japan. *J. Environ. Biotechnol.* 6: 33–39.
- Maeda, T., R. Nakamura, K. Kadokami, and H.I. Ogawa. 2007. Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 237–241.
- Maeda, T., N. Nagafuchi, A. Kubota, K. Kadokami, and H.I. Ogawa. 2007. Identification of spontaneous conversion products of unstable 2,4,6-trinitrotoluene metabolites, hydroxylamino-dinitrotoluenes, by combination of thin-layer chromatography and laser time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatog. Sci.* 45: 345–349.
- Marozienė, A., R. Kliukiene, J. Sarlauskas, and N. Cenas. 2001. Methemoglobin formation in human erythrocytes by nitroaromatic explosives. *Z. Naturforsch.* 56: 1157–1163.
- Rieger, P.G., V. Sinnwell, A. Preuss, W. Franke, and H.J. Knackmuss. 1999. Hydride-Meisenheimer complex formation and protonation as key reactions of 2,4,6-trinitrophenol biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*. *J. Bacteriol.* 181: 1189–1195.
- Tan, E., C.H. Ho, W.H. Griest, and R.L. Tyndall. 1992. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *J. Toxicol. Environ. Health* 36: 165–172.
- Whong, W.Z., and G.S. Edwards. 1984. Genotoxic activity of nitroaromatic explosives and related compound in *Salmonella thymurium*. *Mutat. Res.* 136: 209–215.
- Won, W.D., L.H. Di Savo, and J. Ng. 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 576–580.
- 前田憲成, 梁 明, 大住幸秀, 草野好司, 門上希和夫, 尾川博昭. 2003. 旧弾薬庫跡地土壌における2,4,6-トリニトロトルエン生分解微生物のスクリーニング. *環境化学.* 13: 695–704.
- 前田憲成, 門上希和夫, 尾川博昭. 2004. シュードモナス属細菌 TM15 株による2,4,6-トリニトロトルエンの生分解に関する研究. *Sci. Tech. Energetic Materials* 65: 94–96.