

相同的組換えによる高トリクロロエチレン分解能を 有する組換え体の開発

Construction of genetically engineered bacteria by homologous recombination for efficient trichloroethylene degradation

中村 寛治*, 石田 浩昭, 飯泉 太郎
KANJI NAKAMURA, HIROAKI ISHIDA and TARO IZUMI

栗田工業 (株) 技術開発センター 〒243-0124 神奈川県厚木市森の里宮7-1

* TEL: 046-270-2120 FAX: 046-270-2159

* E-mail: kanji.nakamura@kurita.co.jp

Corporate Research and Development Center, Kurita Water Industries Ltd., 7-1 Wakamiya,
Morinosato, Atsugi-city, Kanagawa, 243-0124, Japan

(原稿受付 2002年5月2日/原稿受理 2002年6月20日)

Ralstonia sp. strain KN1 is a bacterium capable of decomposing trichloroethylene (TCE) by its phenol hydroxylase (PH) induced with phenol. Homologous recombination was carried out to introduce a constitutive promoter and a terminator into upstream and downstream of PH genes respectively in the chromosome of *Ralstonia* sp. strain KN1. Such a strain constructed is not classified into a "new microorganism" according to the definition of the Toxic Substances Control Act of US EPA, therefore less examination will be required for its use in open area. The genes of *phyZ*, *A*, *B*, *C*, *D*, and *E* are needed for TCE degradation. First the *tac* promoter (P_{tac}) was integrated into upstream of a putative ribosome binding site of *phyZ*. Then a strong terminator, *rrnBT₁T₂* from *Escherichia coli* HB101, was integrated into downstream of *phyE* to stop the strong transcription. The resultant strain, *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT, degraded TCE constitutively at a higher rate comparing to the wild strain induced by phenol. The TCE transformation capacity (Tc) of the strain developed was also high, and the value was 1.13 g-TCE/g-cell. The increased TCE degradability of *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT was stable because it was brought by the modifications in the chromosome DNA. *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT decreased their viable cell number during TCE degradation, possibly because of a toxic intermediate derived from TCE oxidation.

Key words: homologous recombination, trichloroethylene, phenolhydroxylase, *Ralstonia* sp.

キーワード: 相同的組換え, トリクロロエチレン, フェノールヒドロキシラーゼ, *Ralstonia* sp.

1. はじめに

トリクロロエチレン (TCE) は, 過去, 先進工業国で金属部品の脱脂洗浄等に大量に利用された歴史があり, 広く地下水を汚染している。TCE は土壌中に嫌気条件下で存在すると, 脱塩素化により, 徐々にシスジクロロエチレン (cis-DCE) やビニルクロライド (VC) に変換されてしまう。VC は TCE より危険度の高い物質であり, TCE 汚染の放置はこの観点からも望ましくない。それゆえ, TCE を効率的に分解処理するための方法の早期確立が望まれている。

TCE を微生物の分解能力を利用して分解する具体的な手法としては, TCE 分解能を有する酵素, メタン酸化細菌のメタンモノオキシゲナーゼ²²⁾, トルエン酸化細菌のトルエンオキシゲナーゼ^{23,24)}, フェノール酸化細菌

のフェノールヒドロキシラーゼ^{3,15)}などの利用が試みられている。それゆえ, メタン, トルエン, フェノール等を汚染サイトに直接注入し, 土着細菌を増殖させると共に, 酵素を誘導して TCE を分解するバイオスティミュレーションが現場でも検討されている^{6,11,14)}。しかしながら, この様な増殖基質の注入によって出現する分解微生物の中には, TCE 分解に有効でないものも存在するため^{14,16)}, 注入物質が無駄に消費されてしまうという欠点を有している。これに対して, 予めTCE分解能を有することが分かっている菌株を利用するバイオオーグメンテーションは, この様な問題点を回避できる有効な方法であるが, 上記の酵素を有する細菌の利用では, 分解酵素を誘導するために基質の添加が不可欠となる。また, 基質が消費された場合の誘導酵素の活性低下もあり, 実用面でマイナス要因となっている。

この様な問題を克服するため、構成的に TCE 分解酵素を生産する分解菌（以下構成型分解菌）の開発も行われている。これまでに、①変異による構成型分解菌の開発^{18,20)}、②構成的なプロモーター下流に分解遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドの利用¹²⁾、などが試みられているが、前者では偶発的な要素が大きいため計画的開発が難しく、後者では導入されたプラスミドが安定して維持されないなどの問題点を有している。これらの問題に対応するため、我々はフェノール資化性細菌 *Ralstonia* sp. KN1 株を利用して、構成的な発現を行う *tac* プロモーター (P_{tac}) を相同的組換えによってフェノール分解遺伝子の upstream に挿入し、構成的で安定した TCE 分解能を有する組換え体 *Ralstonia* sp. KN1-10A 株の開発を行った¹²⁾。しかしながら、挿入箇所が最適では無かったため、フェノール誘導された野生株の TCE 分解能を上回る組換え体を構築できなかった¹³⁾。そこで、本論文ではこれまでの研究で明らかになっている TCE 分解に必要な遺伝子をコードしているオペロンの最初の遺伝子 *phyZ* の推定リボソーム結合部位 upstream に *Ralstonia* sp. KN1 株内で高発現を導くことが分かっている¹³⁾ P_{tac} を挿入し、野生株の TCE 分解能を上回り、かつ能力が安定した組換え体の構築を試みた。また、これまでマーカーとして共に挿入してきた薬剤耐性遺伝子の利用をやめ、プロモーターとターミネーターのみの染色体遺伝子への挿入を行った。このような菌株は、日本の経済産業省の組換え DNA 技術工業化指針の定義では組換え体となり、指針に従って審査を受ける必要がある。一方、アメリカの US EPA-Toxic Substance Control Act (TSCA) における、Microbial Products of Biotechnology; Final Rule (62 FR 17910) の定義の“New microorganisms” (遺伝子組換えを初め、種々の方法によって作製された新しい微生物) のカテゴリーには入らない。TSCA の定義によれば、属を越えない組換え、あるいは属を越えてもアミノ酸をコードしない良く知られたプロモーターなどの挿入により作製された菌株は“New microorganisms”には分類されない。それゆえ、アメリカでは、このような菌株については、より少ない審査により現場への適用が可能となる。

2. 実験材料および方法

2.1. 細菌およびプラスミド

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* DH5⁹⁾ を利用した。また、相同的組換えの際のプラスミド供与菌は、*E. coli* S17-1²¹⁾ 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 *Ralstonia* sp. KN1 株であり、フェノールによって誘導される *phyZ*, *A*, *B*, *C*, *D*, *E* が TCE 分解能を有することが分かっており、その遺伝子の塩基配列も解析されている (Accession number; AB031996)¹³⁾。染色体に目的の遺伝子を挿入する際に利用する相同組換え用のプラスミドは pMOK180 を使用した。pMOK180 のマルチクローニングサイト (MCS) にはニューイングランドバイオラブ社製 pNEB193 由来の MCS が利用されており、*PacI* サイトを有している。*E. coli* の菌株を利用して遺伝子操作を行う場合、培養には L broth 培地 (Difco 製 tryptone 10 g, Difco 製 yeast extract 5 g, NaCl 5 g を蒸留水 1 L に溶解, pH は 7.0 に調整) を使用した。形質転換体の選出には L broth 培地に 15 g の精製寒天末 (極東製薬工業製) および適当な抗生物質 (Ampicillin 100 µg/mL, Kanamycin 50 µg/mL) を添加した寒天培地を使用した。*Ralstonia* sp. の菌株の培養にも L broth 培地を利用した。培養温度は、*E. coli* の菌株は 37°C, *Ralstonia* sp. の菌株は 30°C とし、相同的組換えの際に共存させて培養する必要がある場合は 30°C に設定した。

2.2. 相同的組換えによる構成発現株の作製

本研究では構成発現株として Fig. 1 に示す *Ralstonia* sp. KN1-TAC 株および *Ralstonia* sp. KN1-TACT 株を作製した。*Ralstonia* sp. KN1-TAC 株は *phyZ* の upstream に P_{tac} を挿入した菌株であり、*Ralstonia* sp. KN1-TACT 株はさらに *phyF* の開始域に 5S rRNA 遺伝子のターミネーターである *rrnBT₁T₂*²⁾ を挿入した菌株である。

これら菌株の作製手順は Fig. 1 に示すとおりである。*Ralstonia* sp. KN1-TAC 株作製の際に利用した *phyZ* upstream の相同領域 F1 は 1.1 kbp であるが、本領域を PCR 増幅するため *Ralstonia* sp. KN1 株の染色体 DNA をテンプレートに、以下のプライマーペアを利用した。

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5	<i>endA1 hsdR supE44 recA thi-1 relA1 gyrA96</i>	(5)
S17-1	<i>thi pro recA hsdR chr::RP4-2(Tc^r::Mu Km^r::Tn7)</i>	(21)
<i>Ralstonia</i> sp.		
Strain KN1	Prototroph	(15)
Strain KN1-TAC	P_{tac} in front of <i>phyZ</i>	This study
Strain KN1-TACT	P_{tac} in front of <i>phyZ</i> , <i>phyF::rrnBT₁T₂</i>	This study
Plasmids		
pKNA82	Cloning vector, Ap ^r	(13)
pMOK170	Homologous recombination vector, Km ^r	This study
pMOK180	Homologous recombination vector, Km ^r	(12)

FIU: 5'-GGG GAA TTC GGG GGA GGG GGT AAG GGG GTG GTG-3', FIL: 5'-GGG CCC GGG AAG AGC GTG CCA GCT GGC GCA AAC-3' (アンダーラインは *EcoRI* サイトおよび *SmaI* サイト)。PCR 反応は, Pre-heating; 94°C, 2分に続き, 第1段階; 94°C, 20秒, 第2段階; 65°C, 30秒, 第3段階; 72°C, 1分を30サイクル繰り返し, Post extension; 72°C, 7分を行った。本反応には, Perkin-Elmer 製 GeneAmp PCR System 2400 を利用した。増幅された DNA 断片を *EcoRI* と *SmaI* で消化し F1 とした。また, 右側の相同領域 F2 は F2U: 5'-GGG GGA TCC CGC AAT AGA GGC CAT ACC GCC CA-3', F2L: 5'-GGC GGT TTC CTC AGG CGG CAA GGC-3' (アンダーラインは *BamHI* サイト)。PCR の条件は F1 の場合と同じであるが, 第3段階は 72°C を 1.5分とした。この時 F2L は *phyA* 内の *SaII* サイトより約200ベース下流域の塩基配列をもとにデザインされたため, 増幅された DNA は *SaII* サイトを含んでいる。

本断片は, *BamHI* と *SaII* で消化し, これを F2 とした。F1 (1.1 kb *EcoRI*-*SmaI* 断片) および F2 (1 kb *BamHI*-*SaII* 断片) は pKNA82¹³⁾ のマルチクローニングサイト (MCS) に順次クローニングしたが, *SmaI* サイトは *HindIII* リンカー (d(pCAAGCTTG)) により *HindIII* サイトに変換した。これは利用した *P_{tac}* (ファルマシア製の *tac* Promoter GenBlock) の両端が *HindIII* と *BamHI* となっているため, この *P_{tac}* を F1 と F2 の間に挿入した。この相同部分を含むコンストラクト全体は, pKNA82 の両端に存在する *PacI* サイトを利用して切り出し, 相同組換え用のプラスミド pMOK180 の *PacI* サイトに挿入した。これを *E. coli* S17-1 に導入し, *Ralstonia* sp. KN1 株の間で既報の論文に示す方法¹²⁾ に従って相同的組換えを行った。本方法により第一段階として, 作製した組換えプラスミド全体が挿入された Single Crossover 株を取得し, その後, Single Crossover 株からプラスミド部分が脱落し, *P_{tac}* のみが挿入された

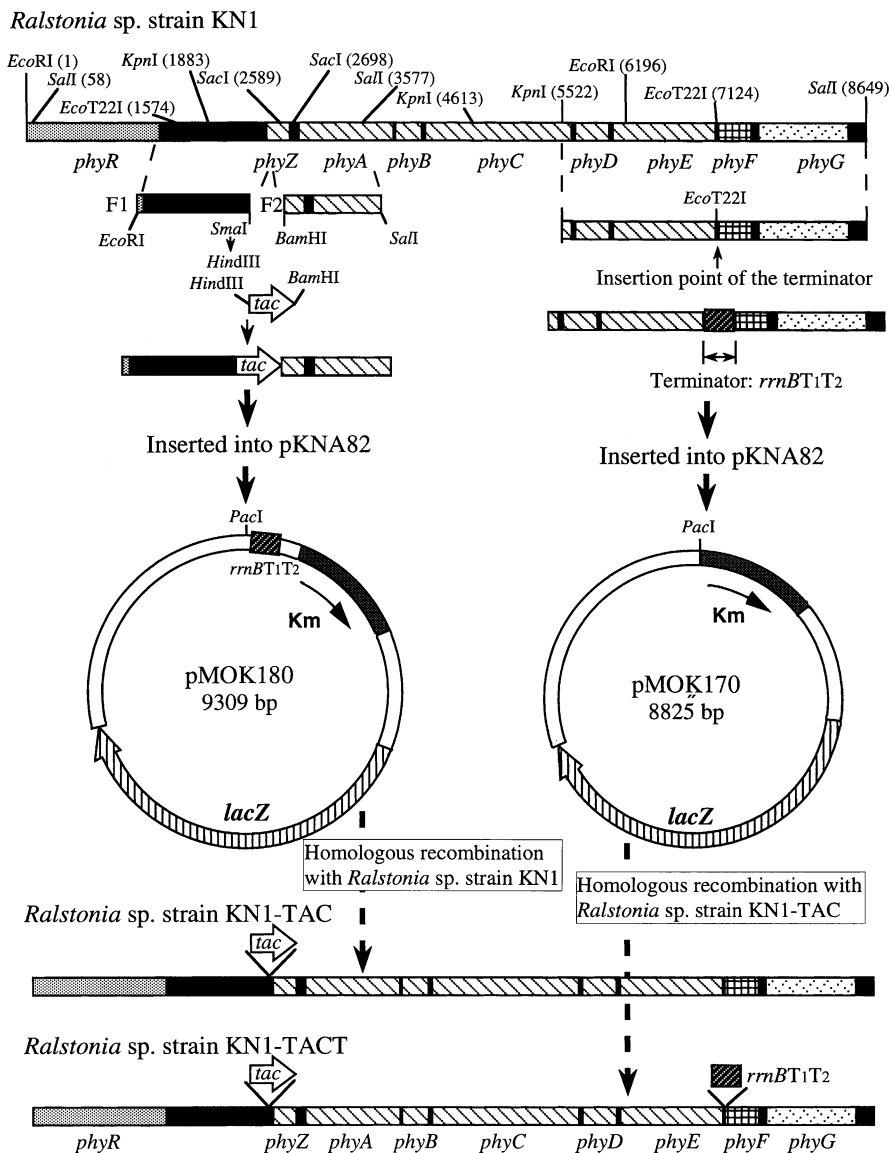


Fig. 1. Steps for construction of *Ralstonia* sp. strain KN1-TAC and strain KN1-TACT by using the homologous recombination. pMOK180 and pMOK170 were used to integrate *P_{tac}* and *rrnBT1T2*, respectively.

Double Crossover 株である *Ralstonia* sp. KN1-TAC 株を取得した。

Ralstonia sp. KN1-TACT 株は *Ralstonia* sp. KN1-TAC 株を基に作製した。Fig. 1 の右側に示すように、*phyC* 中 2 つの *KpnI* サイトの内、*phyD* に近い *KpnI* サイトから、*phyG* の下流の *SalI* サイトまでを利用する 3.1 kb を相同部分とし、本断片を pKNA82 の *KpnI* サイトから *SalI* サイトに挿入した。3.1 kb *KpnI*-*SalI* 断片を組み込んだ pKNA82 は、挿入断片中のほぼ中央部分に存在する *EcoT22I* で消化、脱リン酸化した後、T4 ポリメラーゼで末端を平滑化した。次に、大腸菌の 5SrRNA 遺伝子のターミネーター *rrnBT₁T₂* を PCR 増幅するために、*E. coli* HB101 の染色体をテンプレートにプライマーペア、*rrnU*: 5'-GG AAG CTT TAG GGA ACT GCC AGG CAT C-3', *rrnL*: 5'-GG GCA TGC AAG AGT TTG TAG AAA CGC-3' (アンダーラインはそれぞれ *HindIII* サイトおよび *SphI* サイト) を利用した。増幅された約 250 bp のターミネーター *rrnBT₁T₂* は *HindIII* および *SphI* で消化した後、T4 ポリメラーゼで末端を平滑化した (合成された *rrnBT₁T₂* は本実験に先立ってプラスミドに挿入し、ターミネーターとしての有効性を確認しており、その際 *HindIII* サイトおよび *SphI* サイトが利用された)。これを、上記の T4 ポリメラーゼで平滑化処理した *EcoT22I* サイトに組み込んだ。相同部分および挿入された *rrnBT₁T₂* は pKNA82 の両端に存在する *PacI* サイトを利用して切り出し、pMOK170 の *PacI* サイトに挿入した。作製されたプラスミドは、*E. coli* S17-1 に導入、*Ralstonia* sp. KN1-TAC 株と接合し、前述のように Single Crossover 株を経て Double Crossover 株である *rrnBT₁T₂* が組み込まれた *Ralstonia* sp. KN1-TACT 株を作製した。ここで、pMOK170 とは pMOK180 から *rrnBT₁T₂* を削除したもので、以下の通り作製した。まず、pMOK180 のマルチクロニングサイトの *PstI* サイトから、カナマイシン耐性遺伝子中の *XhoI* サイトまでを切り出し、*rrnBT₁T₂* をカナマイシン耐性遺伝子の一部分と共に切り出した。次に切り出されたカナマイシン耐性遺伝子部分に対応する、pUK4K (ファルマシア製) の *PstI* から *XhoI* の断片を挿入した。

2.3. TCE 分解試験

TCE 分解試験に利用する構成型分解菌の培養方法、および対照として利用した野生株 *Ralstonia* sp. KN1 株のフェノールヒドロキシラーゼを誘導する場合の培養、誘導方法 (フェノール 2 mM を利用) は以前報告した通りである¹³⁾。対象菌を 30°C で培養 (必要によって誘導) 後、遠心分離で集菌、Modified Mineral Salts Basal Medium (MMSB)¹³⁾ で 2 回洗浄し、調製した菌懸濁液 (600 nm での吸光度: A_{600} が 0.1) 10 mL をジューエルサイエンス社製の 155 mL 容積のバイアルビンに入れ、TCE 飽和蒸留水を添加、直ぐに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。TCE 濃度はすべて液相に溶解した場合の濃度として表示した (TCE がすべて液に溶解し 10 mg/L となる場合、TCE の 30°C でのヘンリー定数を $0.0122 \text{ m}^3 \cdot \text{atm}/\text{mol}$ ⁴⁾ と仮定すると、実際の液相濃度は 1.13 mg/L となる)。バイアルビンは 30°C、200 rpm で振とう培養し、定期的に

気相ガス 100 μL 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 9A により行い、充填剤は Silicone DC-550 を用い、カラム温度は 100°C に設定、FID 検出器で測定した。検出下限の TCE 濃度は液相に全て溶解したと仮定して 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ であった。測定は 2 度行い、平均値を採用した。また、細菌数の測定が必要な場合は、菌懸濁液 50 μL をシリンジで採取、適宜希釈して KPY 寒天培地 (BBL 製 trypticase peptone 1 g, Difco 製 yeast extract 0.3 g を蒸留水 1 L に溶解、pH は 7.0 に調製し極東製薬工業製精製寒天末 15 g を加えた) に塗布、30°C で 1 週間培養した後コロニー数を測定した。

3. 結 果

3.1. *Ralstonia* sp. KN1-TAC 株および KN1-TACT 株による TCE の分解

Ralstonia sp. KN1-TAC 株および KN1-TACT 株による TCE 分解試験の結果を Fig. 2 に示す。比較のため、フェノール誘導を行った *Ralstonia* sp. KN1 株 (野生株) の TCE 分解試験も行った。また、Control としてフェノール誘導を行わない KN1 株を添加した場合の TCE 濃度変化も測定した。すべてのバイアルビン内の細菌濃度は $A_{600}=0.1$ に調整されたが、30 mg-cell/L に相当する。フェノール誘導した野生株では 5 日間で、52.9 mg/L の TCE が 44.3 mg/L まで低下、8.6 mg/L の濃度低下が観察された。一方、KN1-TAC 株では同期間に、34.7 mg/L の濃度低下が、KN1-TACT 株では 34.5 mg/L の濃度低下が見られた。両組換え体の TCE 分解容量 (T_c) は、Control での濃度低下を差し引いて、1.13 g-TCE/g-cell と極めて高く、野生株の 0.26 g-TCE/g-cell の約 4 倍となった。ここには示していないが 10 mg/L の TCE により分解試験を行った場合は KN1-TAC 株、KN1-TACT 株共に完全分解 (検出下限の 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以下) し、低濃度域の TCE が分解されずに残るようなことは

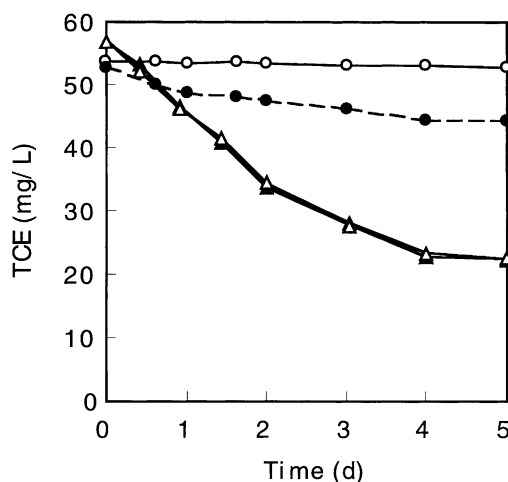


Fig. 2. TCE degradation by *Ralstonia* sp. strain KN1 not induced with phenol (○), *Ralstonia* sp. strain KN1 induced with phenol (●), *Ralstonia* sp. strain KN1-TAC (△), and *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT (▲). The cell concentrations (A_{600}) were adjusted to 0.1.

なかった。また、Fig. 2 に示すとおり初期 TCE 分解速度も KN1-TAC 株と KN1-TACT 株の方が野生株と比較して高く、約 3 倍となった。このように、 P_{tac} を *phy* 遺伝子群の上流に挿入することによって、野生株と比較して極めて高い TCE 分解能力を有する組換え体を開発することができた。一方、KN1-TAC 株と KN1-TACT 株では分解能にほとんど差がないことから、*phyF* 以降の遺伝子の読みを抑え、余分なタンパク合成を停止させても、分解能力にはほとんど影響はないと判断できる。

3.2. TCE 分解に伴う生細菌数の挙動

Ralstonia sp. KN1-TAC 株および KN1-TACT 株による TCE 分解では、上述のように約 5 日で分解反応がほとんど停止する。そこで、KN1-TACT 株を利用して、TCE 分解時の生菌数変化を把握し、TCE 分解速度低下が死滅によるものか否かを調査した。また、野生株である *Ralstonia* sp. KN1 株を、同様に TCE 存在下で培養し（フェノール誘導は行っていないため TCE は分解されない）、TCE そのものが生残性に影響を与えるか否かも検討した。

バイアルビン中の TCE 濃度の経時変化を Fig. 3A に示す。KN1-TACT 株を植種したバイアルビンでは、2 日間で約 30 mg/L の TCE が分解された。分解速度は、その後急激に低下したが、最終的には、約 40 mg/L の TCE が分解された。一方、野生株を植種したバイアルビンでは、TCE 濃度の変化はほとんど見られなかった。

次に同時に測定されたバイアルビン中の生菌数の経時変化を Fig. 3B に示す。図中には、KN1-TACT 株および野生株に、TCE を添加しなかった場合の生菌数の変化も示してある。KN1-TACT 株による TCE 分解が生じたバイアルビン中では、TCE 濃度の低下に伴う生菌数の低下が観察され、TCE 分解によって細菌の死滅が起きることが明らかとなった。TCE 分解時には、分解

によって酵素活性を阻害する物質ができることが知られており^{10,17}、KN1-TACT 株もそのような物質の生産によって死滅したものと考えられる。

また、野生株である *Ralstonia* sp. KN1 株の TCE 添加および無添加の系を比較すると、どちらも初期の微増加（飢餓状態移行期での細菌の分裂による）の後は細菌数は一定であり、TCE そのものは、野生株の生残性を低下させていないことが明らかとなった。それゆえ、KN1-TACT 株も添加された TCE 自体による影響は受けていないと推測できる。加えて、TCE 無添加の場合の KN1-TACT 株および野生株の生残性は全く差がないことから、強発現プロモーターである P_{tac} を挿入しても、野生株の持つ元来の生残性を低下させていないことが明らかとなった。

3.3. 生残菌株の解析

Ralstonia sp. KN1-TACT 株は KPY 寒天培地上にコロニーを形成すると、コロニーの色は茶褐色となる。一方、野生株である *Ralstonia* sp. KN1 株はコロニーの色は白色である。このことから、KN1-TACT 株は構成的に発現するフェノールヒドロキシラーゼの働きによって培地中に含まれるフェノールと似た構造を有する成分が変化し、着色成分が生成されるものと予想できるが、成分の特定はできていない。

先の TCE 分解試験で KN1-TACT 株は TCE の分解と共に死滅することが明らかとなった。しかしながら、生菌数の低下は 10 日目以降ほとんど停止し、分解試験最終日の 30 日目においても 2.3×10^6 CFU/mL の生菌が存在した。この時生育したコロニーを観察すると、10%のコロニーは通常通り茶褐色を示したが、残りの 90%は野生株と同じ白色を示した。このことから、白色のコロニーはフェノールヒドロキシラーゼ活性を失っていると予想できる。そこで、確認のため、茶色のコロニーを 2

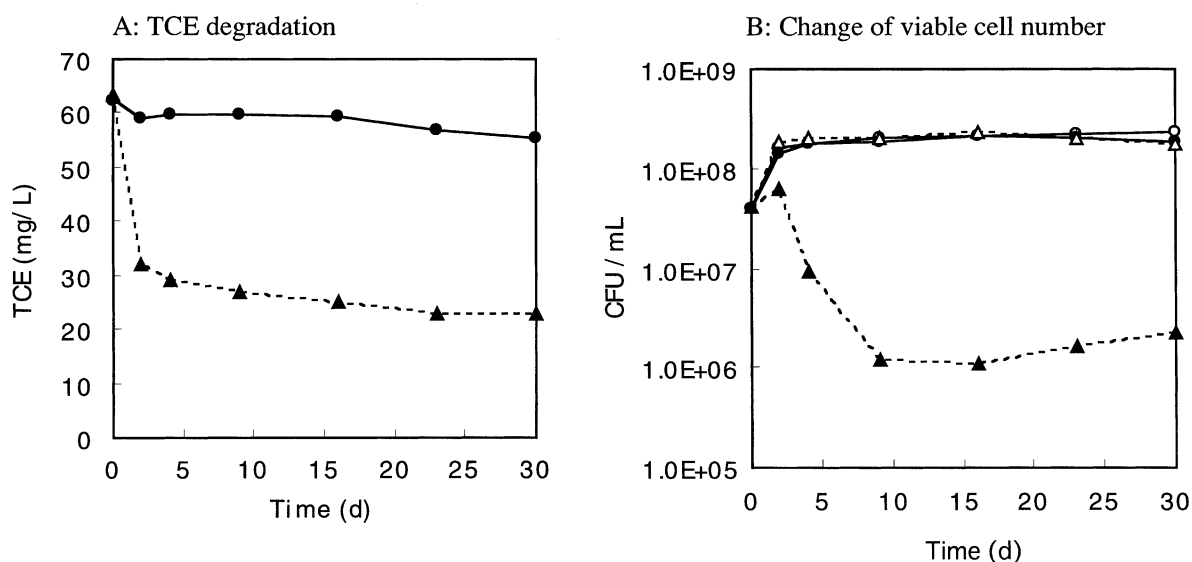


Fig. 3. A: TCE degradation by *Ralstonia* sp. strain KN1 not induced with phenol (●) and *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT (▲). The cell concentrations (A_{600}) were adjusted to 0.1. B: Changes of viable cell number during TCE degradation by *Ralstonia* sp. strain KN1 (●) and *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT (▲). Changes of viable cell number of *Ralstonia* sp. strain KN1 (○) and *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT (△) was also measured without TCE.

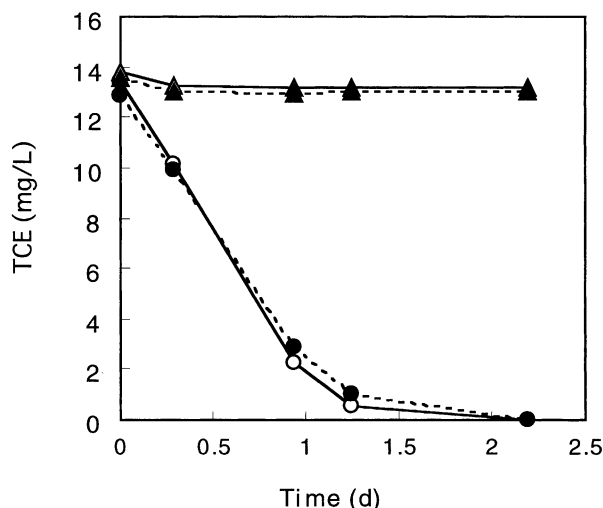


Fig. 4. TCE degradation by *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT-B1 (○), KN1-TACT-B2 (●), KN1-TACT-W1 (△), and KN1-TACT-W2 (▲). These strains were isolated from the culture of *Ralstonia* sp. strain KN1-TACT with TCE on 30th day (Fig. 3). The cell concentrations (A_{600}) were adjusted to 0.1.

株 (*Ralstonia* sp. strain KN1-TACT-B1, KN1-TACT-B2), 白色のコロニーを2株 (*Ralstonia* sp. strain KN1-TACT-W1, KN1-TACT-W2) 単離し, その TCE 分解能を測定した。結果を Fig. 4 に示す。KN1-TACT-B1 株および KN1-TACT-B2 株は KN1-TACT 株と同等の分解能を示したが, KN1-TACT-W1 株および KN1-TACT-W2 株は TCE 分解能を失っていた。さらに, KN1-TACT 株および分解試験を行った KN1-TACT-B1, B2, W1, W2 株の4株をテンプレートに, P_{tac} 挿入部位をプライマーペア PhyRZU(5'-CCG CCA CCC GGC GCG GCT TTT CAT CAT T-3')/PhyRZL(5'-GGC TTC AAA CAA GGG GAC CGA CTG GTT G-3') で, ターミネーター挿入部位をプライマーペア PhyEFU(5'-ATT CAT CTC GGC CGG CGA CGC ACA GAA CAG-3')/PhyEFL(5'-AAG GTC TTG CAG GCG AGC ACA AAC CCA CTC-3') で, また, P_{tac} とターミネーターに挟まれた *phyZ*, *A*, *B*, *C*, *D*, *E* 全体をプライマーペア PhyRZU/PhyEFL で PCR 増幅した。PCR 反応は, Pre-heating; 94°C, 2 分に続き, 第1段階; 94°C, 20秒, 第2段階; 65°C, 30秒, 第3段階; 72°C, 1分 (PhyRZU/PhyEFL のみ 5分) を30サイクル繰り返し, Post extension; 72°C, 7分を行った。その結果, 3種類の増幅産物の大きさ (それぞれ, 0.34, 0.57, 5.4 kbp) は全く同じであり, 欠損などの明らかな変異は観察できなかった。それゆえ, KN1-TACT-W1 株, KN1-TACT-W2 株では P_{tac} あるいは分解遺伝子 *phyZABCDE* のどこかに変異が生じ, TCE 分解能が失われたと推測される。

また, KN1-TACT-B1 株のように残存した TCE 分解能を有する菌株を植え継ぐことによって, TCE 分解の中間生成物に対して耐性を有する菌株の取得を試みたが, そのような菌株は得られなかった。

4. 考 察

Ralstonia sp. KN1 株の TCE 分解能を司るフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子 *phyZ*, *A*, *B*, *C*, *D*, *E* の上流に強力なプロモーターである P_{tac} を, 下流にターミネーター *rrnBT₁T₂* を相同的組換えにより挿入し *Ralstonia* sp. KN1-TACT 株を作製した。作製された KN1-TACT 株は野生株である *Ralstonia* sp. KN1 株と比較して TCE 分解速度および Tc 共に高く, 特に Tc は約 4 倍の 1.13 g-TCE/g-cell と著しい増加が見られた。ターミネーターが挿入されていない *Ralstonia* sp. KN1-TAC 株も KN1-TACT 株と同じ分解能を示し, ターミネーターの挿入による TCE 分解能の向上は見られなかった。しかしながら, 既知の遺伝子領域のみを発現させる KN1-TACT 株の方が, 合成タンパクが解析済みのものに限られ, 未知のタンパクを生成させていないという点では望ましいと考えられる。

これまでも種々の TCE 分解能を有する細菌の研究がなされており, Tc に関しても整理, 比較されている¹⁹⁾。その報告によると, 混合培養系ではフェノールを基質とした場合に Tc が高く, 0.24 g-TCE/g-cell となっている⁷⁾。単離菌ではこれまで最も研究例が多いトルエン資化性細菌 *Burkholderia* (旧名 *Pseudomonas*) *cepacia* G4 が 0.027-0.152 g-TCE/g-biomass⁸⁾, プロパン資化性細菌 *Xanthobacter* sp. Py2 が 0.03-0.34 g-TCE/g-biomass となっている¹⁹⁾。さらには, 糸状のフェノール資化性細菌が休止菌体で 0.31-0.51 g-TCE/g-volatile suspended solid (VSS)¹⁾, そしてその培養液から得られた *Actinomyces* enrichment はフェノール存在下で 1.0 g-TCE/g-VSS⁹⁾ と非常に高い Tc を持つことが報告されている (ここで, cell と biomass は同じで, VSS はこれらの90%程度と考えられる)。*Ralstonia* sp. KN1-TACT 株の Tc=1.13 g-TCE/g-cell はこれらの報告と比べても高い。また, 従来高い Tc が報告されている菌株は全て野生株のため, 誘導基質の一時的あるいは連続的な供給が必要である。一方, KN1-TACT 株は構成型分解菌であり, 培養に際しては, どのような基質でも増殖すれば利用可能であり (例えば安価なエタノール), Tc も安定している。それゆえ, 培養菌体を直接汚染サイトに注入するバイオオーグメンテーションには最適である。

構成型分解菌の作製に関しては, これまで, トランスポゾン²⁰⁾ や突然変異¹⁸⁾ を利用した報告例はいくつかあるが, その開発過程は偶発的な要素が多く, 計画的な開発が難しい。また, どの部分の変異によって, どの様に構成発現しているのか, 不明な部分が多いのは, 利用する上で望ましい状況ではない。それゆえ, 本研究のように, 相同的組換えによって強いプロモーターを TCE 分解遺伝子の上流に挿入する手法は明解であり, 構成的発現で, かつ高い分解能力を持つ組換え体の開発をより確実に進めることができる。また, US EPA の TSCA では属を越えた遺伝子の導入によってできた菌株は “New microorganisms” として定義され, 利用に際して様々な審査をクリアする必要があるが出てくる。一方, 本研究の P_{tac} および *rrnBT₁T₂* のように, 属を越えた由来であっても, 良く知られた機能を有するアミノ酸をコードしない DNA 断片を染色体上に挿入することによって得られた

菌株は“New microorganisms”の定義には入らない。その意味で、実用化により近い組換え体と位置づけることができ、将来的な利用が期待される。

また、本研究でも明らかにされた TCE 分解の際に生成される中間代謝物質の特定およびその毒性への対応は今後の課題である。この問題に関しては、これまでも酵素レベルで詳細な研究はなされているものの^{10,17)}、根本的な対応策の確立は進んでいない。一方、糸状のフェノール資化性細菌は TCE 分解において中間代謝物の影響は全く受けなかった¹⁾という報告もあり、宿主の選択によっては問題を回避できる可能性が示されている。それゆえ、今後は中間代謝物の詳細な解析に加え、耐性を有する細菌の利用にも焦点を当てて研究する必要がある。

文 献

- 1) Bielefeldt, A.R., H.D. Stensel, and S.E. Strand. 1995. Cometabolic degradation of TCE and DCE without intermediate toxicity. *J. Environ. Eng.* 121: 791-797.
- 2) Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter, and H.F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148: 107-127.
- 3) Fujita, M., M. Ike, J. Hioki, K. Kataoka, and M. Takeo. 1995. Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. *J. Ferment. Bioeng.* 79: 100-106.
- 4) Gosset, J.M. 1987. Measurement of Henry's law constants for C₁ and C₂ chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 21: 202-208.
- 5) Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*, pp. 109-135. In Grover, D.M.(ed.), DNA cloning. A practical approach, vol. 1. IRL Press, Oxford, England.
- 6) 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.
- 7) Hopkins, G.D., J. Munakata, L. Semprini, and P.L. McCarty. 1993. Effects on pilot field-scale *in-situ* groundwater bioremediation by phenol-oxidizing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2542-2547.
- 8) Landa, A.S., E.M. Sipkema, J. Weijma, A.A.C.M. Beenackers, J. Doling and D.B. Janssen. 1994. Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in a chemostat with toluene as the primary substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3368-3374.
- 9) Lee, S-B., S.E. Strand, and H.D. Stensel. 2000. Sustained degradation of trichloroethylene in a suspended growth gas treatment reactor by an Actinomycetes enrichment. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3261-3268.
- 10) Li, S. and L.P. Wackett. 1992. Trichloroethylene oxidation by toluene dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 443-451.
- 11) McCarty, P.L., M.N. Goltz, G.D. Hopkins, M.E. Dolan, J.P. Allan, B.T. Kawakami, and T.J. Carrothers. 1998. Full-scale evaluation of *in situ* cometabolic degradation of trichloroethylene in groundwater through toluene injection. *Environ. Sci. Technol.* 32: 88-100.
- 12) 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.
- 13) Nakamura, K., H. Ishida, and T. Iizumi. 2000. Constitutive trichloroethylene degradation led by *tac* promoter chromosomally integrated upstream of phenol hydroxylase genes of *Ralstonia* sp. KN1 and its nucleotide sequence analysis. *J. Ferment. Bioeng.* 89: 47-54.
- 14) 中村寛治, 石田浩昭, 飯泉太郎, 鈴木義彦. 2001. バイオステミュレーションのプロセス管理を目的とした 16S rRNA 遺伝子による微生物群集構造の解析. *環境工学研究論文集*. 38: 175-186.
- 15) 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.
- 16) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭. 1999. フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析. *環境工学研究論文集*. 36: 1-10.
- 17) Newman, L.M. and L.P. Wackett. 1997. Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, and turnover-dependent inactivation. *J. Bacteriol.* 179: 90-96.
- 18) Phelps, P.A., S.K. Agarwal, G.E. Speitel, Jr., and G. Georgiou. 1992. *Methylosinus trichosporium* OB3b mutants having constitutive expression of soluble methane monooxygenase in the presence of high levels of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3701-3708.
- 19) Reij, M.W., J. Kieboom, J.A.M. de Bont, and S. Hartmans. 1995. Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. Py2 during growth on propene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2936-2942.
- 20) Shield, 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.
- 21) Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*. 1: 748-791.
- 22) Tsien, H.C., G.A. Brusseau, R.S. Hanson, and L.P. Wackett. 1989. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3155-3161.
- 23) 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.
- 24) 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.