

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：31302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656333

研究課題名(和文) 貧栄養細菌による環境中の極微量汚染物質分解技術の開発

研究課題名(英文) Degradation of low concentration contaminants by oligotrophic bacteria

研究代表者

中村 寛治 (Nakamura, Kanji)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：90382655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：貧栄養細菌のフェノール資化細菌 *Cupriavidus* sp. TW2株は、フェノール誘導されるフェノールヒドロキシラーゼ(PH)によってトリクロロエチレン(TCE)を分解する。高分解能を常時発現させるため、PH遺伝子群の上流にtacプロモーターを相同的組換えによって導入した。作製された組換え体TW2-P株はTCE分解能を構成的に発現し、フェノール誘導されたTW2株より高い分解能を示した。

研究成果の概要(英文)：Oligotrophic phenol-utilizing bacterium, *Cupriavidus* sp. TW2, is able to degrade Trichloroethene (TCE) by phenol hydroxylase (PH) induced by phenol. Homologous recombination was carried out to insert the tac promoter (Ptac) upstream of PH genes for constitutive expression. The resultant strain, TW2-P, showed the higher TCE degradability without the phenol induction.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：貧栄養細菌 フェノールヒドロキシラーゼ トリクロロエチレン

### 1. 研究開始当初の背景

物質が微生物による分解を受ける際、一般的に数 mg/L つまり ppm レベルでは効率よく分解される (Monod 式での飽和定数:Ks が ppm レベル) ことが知られている。

一方、微生物はさらに低濃度域である極微量 ppb レベルの分解も効率的に行う (Ks が ppb レベル) ことが、多くの研究によって示されている。しかしながら、その様な能力を有する微生物、貧栄養細菌、の現状での利用はほとんど無い。一方、現在、様々な微量の化学物質が環境中に放出されており人の健康に大きな影響を及ぼしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、低濃度の汚染物質がどのような微生物によって、どのレベルまで分解されるかについて、現象を把握すると共に、貧栄養細菌の利用技術の開発を目指す。

具体的には、貧栄養細菌の中で、フェノール酸化細菌を対象とした。フェノール分解細菌は、そのフェノール分解に係わる酵素、フェノールヒドロキシラーゼ (PH) を有している。本酵素は、トリクロロエチレン (TCE) をも分解できることが知られている。TCE は地下水汚染物質で、発がん性の疑いがあり、早期の処理が望まれる。

そこで、低濃度フェノールを分解できる細菌が、低濃度の TCE をも分解できるか否かを検討する。また、将来的には、細菌が環境中に放出されることを前提とした研究に利用されることを考慮し、その挙動解析のため、Cell レベルでの標識技術についても検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 方法の概略

具体的には、相同的組換えにより、フェノール酸化細菌の PH 遺伝子群上流に構成的な発現を行うプロモーターを挿入し、常時発現する TCE 分解能を付与する。加えて、PH 遺伝子群の下流に緑色の蛍光タンパク質をコードする Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子を導入し、生きたままの Cell レベルの可視化を検討する。

作製される組換え体が、元来の分解能を維持しつつ、生きた状態で、Cell レベルの観察ができれば、様々な実験での挙動解析が可能となる。例えば、土壌カラム等を使って実験する場合、分解反応を停止させることなく、他の土着細菌と容易に区別できる。また、原生動物による捕食が起きても、その細胞内に取り込まれた状況を、蛍光顕微鏡により随時確認できる。

それゆえ、このようなラベル化技術は、今後、環境浄化細菌の挙動を解析する上で、基盤的な要素技術になると考えられ、本研究ではその実現性を検討する。

#### (2) 利用細菌およびプラスミド

組換えプラスミド構築の際には、タカラバイオ製の Competent Cell *Escherichia coli* JM109 株を宿主とした。また、接合による相同的組換えの宿主 (プラスミド供与菌) には、*E. coli* S17-1 を利用した。

相同的組換えの対象とした菌株は、フェノール酸化細菌 *Cupriavidus* sp. TW2 株である。*Cupriavidus* sp. TW2 株は、神奈川県内の土壌から単離された菌株であり、フェノール誘導で発現する PH 遺伝子群 (phyZ, A, B, C, D, E 遺伝子) の働きによって TCE を分解することができる。

*E. coli* の菌株の培養には LB 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。寒天培地の場合は、これに 15 g/L の精製寒天末を添加した。また、形質転換体の選出や、その培養には LB 培地に適当な抗生物質を添加したものを使用した。*Cupriavidus* sp. TW2 株および本株由来の組換え体の培養にも LB 培地を利用した。培養温度は、*E. coli* の菌株は 37℃、*Cupriavidus* sp. の菌株は 30℃ とし、相同的組換えのため共存させて培養する必要がある場合は 30℃ に設定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 相同的組換えによる TCE 分解細菌の作製

フェノール酸化細菌 *Cupriavidus* sp. TW2 株は、フェノール誘導されるフェノールヒドロキシラーゼ (PH) によってトリクロロエチレン (TCE) を分解する。本菌株の分解能を常時発現させるため、PH 遺伝子群の上流に tac プロモーター (Ptac) を相同的組換えによって導入した。作製された組換え体 *Cupriavidus* sp. TW2-P 株は TCE 分解能を構成的に発現し、高い分解能を示した。正確に相同的組換えが行われたか否かを確認するために、組換え部分の DNA は PCR 増幅し、その塩基配列を決定し、確認した。相同的組換えは、計画通り、正確に行われた。

#### (2) 緑色蛍光タンパク質による標識

相同的組換えによって作成された前項の *Cupriavidus* sp. TW2-P 株を使って、*Cupriavidus* sp. TW2-PGF 株を、同様に相同的組換えによって作製した。本菌株は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子を PH 遺伝子群下流に挿入したものである。

蛍光顕微鏡観察によって、挿入遺伝子の効果を確認した。その結果を、図-1 に示す。上段の A の写真は、LB 寒天培地上に 30℃ で 2 日間生育させた場合のコロニーの写真で、蛍光を放っていることがわかる。また、下段の B の写真は LB 液体培地にて 30℃ で 1 日間培養した場合の写真で、Cell レベルでも観察が可能であることがわかった。

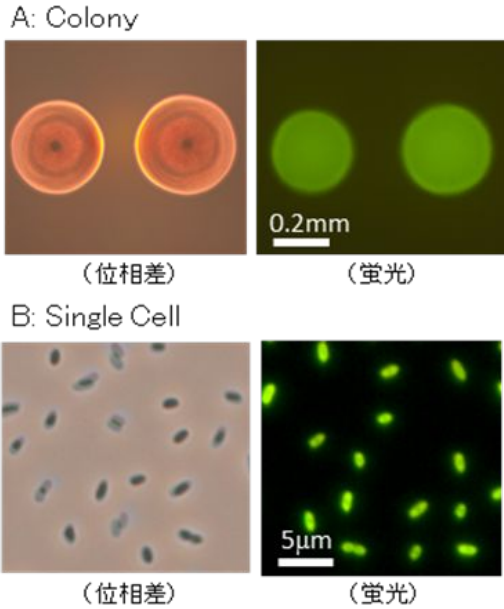


図-1 *Cupriavidus* sp. TW2-GFP 株の顕微鏡写真

本結果から、PH 遺伝子群上流に挿入された Ptac によって引き起こされる GFP 遺伝子の発現は、Cell レベルでの観察が十分可能な緑色蛍光タンパク質を生産できることが明らかとなった。また、*Cupriavidus* sp. TW2-PGF 株を LB 培地で培養後、無機培地で洗浄、懸濁させ、4 にて 10 日間静置保存したが、顕微鏡観察での蛍光に変化は見られず安定していた。

### (3) トリクロロエチレン分解試験

*Cupriavidus* sp. TW2 株は、PH 遺伝子群の発現によって TCE を分解することができる。それゆえ、その上流に構成的な発現のために Ptac を挿入した *Cupriavidus* sp. TW2-P 株は TCE 分解能を有する。また、その下流に GFP 遺伝子を挿入した *Cupriavidus* sp. TW2-PGF 株も同様に TCE 分解能を発現すると考えられるが、GFP 遺伝子の挿入が分解能に与える影響は明らかでない。

そこで、TCE 分解能と GFP 遺伝子挿入の影響を調査するため、*Cupriavidus* sp. TW2-P 株および *Cupriavidus* sp. TW2-PGF 株を培養、収穫し、TCE 分解試験を行った。また、野生株との比較のため、フェノール誘導した *Cupriavidus* sp. TW2 株と誘導しない *Cupriavidus* sp. TW2 株についても TCE 分解試験を行った。細菌濃度は OD<sub>600nm</sub> で 0.2 (=  $1.1 \times 10^9$  cells/mL)、温度は 30 とした。結果を図-2 に示す。

分解試験を行ったバイアルビン(容積は 70 mL)中には気相(65mL)、液相(5mL)の 2 相が存在する。分解反応は液相で進み、液相の TCE 濃度が低下するにつれて、気相の TCE が液相へと移動し、平衡状態が保たれる。

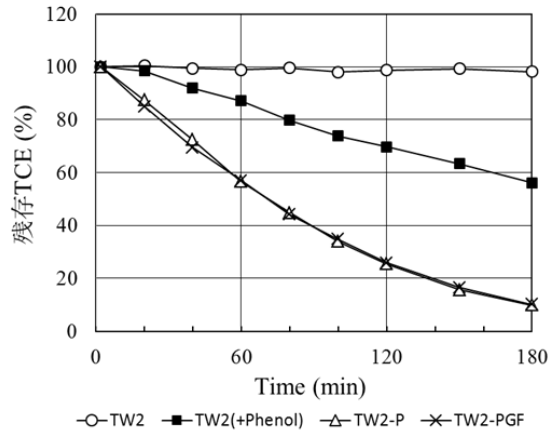


図-2 作製された組換え体による TCE 分解試験

結果はバイアルビン中に残存する TCE (%) の経時変化として示した。添加 TCE (10 µg) は全てが液相 (5mL) に存在した場合 2 mg/L となるが、実際には TCE 添加直後に大部分がバイアルビン中の気相に移動し、ヘンリー定数を基に計算すると 0.25 mg/L が初期の液相濃度となる。それゆえ、分解反応は TCE の排出基準 (環境省; 水質汚濁防止法 - 一律排出基準) の 0.3 mg/L 以下の濃度範囲で起きたことになる。

フェノール誘導を行っていない *Cupriavidus* sp. TW2 (○) では、残存 TCE はほぼ一定であり、TCE 分解は起きなかったと判断できる。一方、フェノール誘導した *Cupriavidus* sp. TW2+Phenol (■) は 180 分で添加 TCE の 50% 弱を分解した。また、Ptac による構成的な発現を行う *Cupriavidus* sp. TW2-P (△) および *Cupriavidus* sp. TW2-PGF (×) は、より速い分解を示し、約 90% の添加 TCE を分解した。両菌株の分解過程には、ほとんど差がなく、GFP 遺伝子の挿入が分解反応に与える影響は観察されなかった。

さらに、これら 2 つの系では、180 分後に残存 TCE が約 10% となり、この時点での液相 TCE 濃度はヘンリー定数から約 0.025 mg/L と計算できる。これは地下水環境基準 (環境省; 水質汚濁防止法 - 地下水の水質汚濁に係る環境基準) の 0.03 mg/L より低い。また、分解実験終了時に *Cupriavidus* sp. TW2 -PGF 株の蛍光顕微鏡による観察を行ったが、蛍光は初期と比較してほとんど変化は無く、安定していた。この様に、本研究によって、高い TCE 分解能を有し、Cell レベルで追跡可能な組換え体を育種することができた。

### (4) 考察

ここでは、相同的組換えを利用して、フェノールヒドロキシラーゼ(PH)の構成的な発現を引き起こし、TCE 分解を可能にする組換え

体を作製すると共に、GFP 遺伝子による Cell レベルでのラベル化を検討した。

相同的組換えの実験では、相同 DNA 部分を、全て約 0.6 kbp になるように設定したが、本 DNA 長で、目的とする相同的組換えを引き起こすことができた。また、作製された組換え体の導入 DNA 部分を PCR 合成して、塩基配列を確認した結果、配列の変異は無く、理論通りの正確な組換えが起きたことが確認できた。

遺伝子組換えを行う際、より一般的に用いられる手法はプラスミドを利用した組換え体の作製であるが、プラスミドを目的とする宿主に保持させるためには、通常、選択圧として抗生物質の添加が必要となり、環境への放出を前提とした実験への適用は難しい。また、全ての対象細菌がプラスミドの宿主として利用できるか否かは不明である。一方、本手法のように相同的組換えにより染色体 DNA を対象に組換えを行う場合は、抗生物質が無い状態で、獲得された形質は安定して維持され、抗生物質を添加しない系での分解実験に利用できる。ここで作製された組換え体の形質も、抗生物質が無い条件下で安定しており、染色体 DNA を対象とする相同的組換えの有効性が確認できた。

本研究で作製された、PH 遺伝子群上流に Ptac を挿入し構成的な TCE 分解能を持たせた *Cupriavidus* sp. TW2-P 株と、そこからさらに PH 遺伝子群下流に GFP 遺伝子を挿入した *Cupriavidus* sp. TW2-PGF 株の TCE 分解能は、ほとんど差は見られなかった。このことから、GFP 遺伝子発現が宿主の分解能に与える影響は極めて小さいと判断でき、GFP 遺伝子の導入・発現が、対象細菌に負担をかけないラベル化技術であることを示している。

また、作製された *Cupriavidus* sp. TW2-P 株および *Cupriavidus* sp. TW2-PGF 株の TCE 分解速度は、フェノール誘導を行った野生株の *Cupriavidus* sp. TW2 株より高いことが分解試験結果から明らかとなった。さらに、分解開始から 180 分後の液相の TCE 濃度は地下水環境基準の 0.03 mg/L を下回る約 0.025 mg/L (ヘンリー定数からの計算値) となり、実用的な低濃度領域の分解能力を有していることも明らかとなった。

この様に、本研究によって、低濃度域での高い TCE 分解能を有し、Cell レベルで追跡可能な組換え体を育種することができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

中村寛治, 渡辺健幸: 緑色蛍光タンパク質によるトリクロロエチレン分解細菌のラベル化, 土木学会論文集 G (環境), 査読あり, Vol. 70, 11-17 (2014)

[学会発表](計 2 件)

渡辺健幸・中村寛治: トリクロロエチレン分解能を有する細菌への蛍光遺伝子の導入および検出, 平成 24 年度 土木学会 東北支部 技術研究発表会, 2012. 3. 9, 東北大学 川内キャンパス

中村寛治, 宮内啓介: 環境中に放出された細菌を捕食する原生動物の解析および捕食回避の検討, 環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会, 2013. 5. 30, 北九州国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

[その他] ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 寛治 (NAKAMURA KANJI)

東北学院大学・工学部・環境建設工学科

研究者番号: 90382655