

## 助成年度：平成5年度

[所属] 東京工業大学 生命理工学部

[役職] 助教授

[氏名] 碓山 義人 (小島 英理)

[課題]

### 難分解性有機化合物を選択的に認識する発光微生物の分子育種と 環境モニタリングデバイスの開発

[内容]

現在、我々の経済活動に伴って環境中に多様な物質が放出されている。その中でも土壌中に長期にわたって残存する難分解性化合物を、検出あるいは分解除去することは環境保全や環境浄化のために極めて重要な課題である。微生物の有するハロゲン化合物や炭化水素などの汚染物質の浄化作用を利用して難分解性化合物を環境から除去しようとする試みは既に着手されている。ところで、環境汚染物質のモニタリングは環境破壊を予防、低減化するという観点から極めて重要であるが、有効な方法はほとんどないのが実情である。そこで、ある種の細菌が芳香族化合物などの完全分解系を司る遺伝子を有することに着目し、この遺伝子とマーカー酵素遺伝子の融合を行うと、環境中の芳香族化合物の量に対応してマーカー酵素の活性化が起こるものと考えた。本研究では、化学工業で大量に使用されるベンゼン(B)、トルエン(T)、そしてキシレン(X)およびこれらの誘導体を分解する役割を担っている染色体外遺伝子、TOL プラスミドに着目し、これら化合物のモニタリングデバイスを構築することにした

一般に微生物が分解し難い物質をある種のシュードモナス属の細菌は分解し、代謝経路に取り込むことが知られている。一連の *P. putida* から数多くの分解プラスミドが得られている。これらの分解プラスミドにおいては、分解系遺伝子の発現を制御する調節遺伝子もプラスミド上に存在する。この TOL プラスミド上の分解系遺伝子の発現調節については次のようなことが明らかにされている。調節遺伝子 *xyI R* の産物蛋白質は、*p*-キシレンや *m*-メチルベンジルアルコール存在下で *xyI CAB* オペロンを活性化する。一方、*xyI S* の産物蛋白質は、*m*-トルイル酸存在下で *xyI DLGF* オペロンを活性化する。したがって、これらの制御遺伝子を用いることで、ベンゼン誘導体を検出できる新しい微生物を育種できると考えられる。例えば、*m*-キシレンなどの有機化合物を特異的に認識する蛋白質 *xyI R* をコードする *xyI R* 領域と *xyI R* により活性化される *Ps* プロモーター領域、そして指標とする酵素の遺伝子を同一プラスミドに構築すると、トルエン(T)、キシレン(X)およびその誘導体のモニタリングが可能になるものと考えられる。モニタリングの指標として、計測が極めて容易となるホタルの発光反応に着目した。ホタルの発光反応を司るルシフェラーゼは、ATP、酵素、 $Mg^{2+}$  の存在下でルシフェリンを酸化することで、ルネッセンスを極めて優れた量子収率で発生する。

そこで、被測定物質感受性のプロモーター配列下にルシフェラーゼ遺伝子をクローニングした、新規プラスミドを作製することにした。すなわち、TOL プラスミドの制御領域を再構築したベクター系としてプラスミド *pTS301* を用い、このプラスミドの *kpn I* 切断末端に Multi Cloning Site (MCS) を導入し、ついで MCS 部位内の *Bam HI* サイトに、ホタルルシフェラーゼ(1.9 kb)を導入することで目的とするプラスミド(*pTSN316*)を構築した。

対数増殖期まで培養した大腸菌をキレート剤で処理した後、それぞれの化合物を含む培地中で、ルシフェリンを添加した。一連のベンゼン誘導体のルシフェリン添加後の発光強度を比較したところ各化合物のルシフェラーゼ誘導活性が異なることが示唆された。すなわち *m* 位に置換基がある場合に最も誘導活性が大きいことがわかった。そこで水溶性の *m*-メチルベンジルアルコールに対して発光量とルミネッセンスとの関係を

調べると、濃度と発光量との間に直線関係が得られた。BTX 類では濃度 (ppm レベル) に応じて発光量も増大することが明らかとなった。さらに、それぞれの芳香族化合物の濃度が 0.8~0.9mM では、発光量が m-キシレン、p-キシレン、トルエン、ベンゼンの順に小さくなることが明らかとなった。すなわち、誘導物質の種類によって発光量に相違が生じることが分かり、発光量がベンゼン誘導体の構造、とりわけ、官能基の種類、位置に依存することが示された。さらに最近では、キレート剤で処理しなくても、酸性 pH でルシエリンを添加すると菌の中に取り込まれ、同じ程度のルミネッセンスが発生することが見い出されている。

光ファイバーの先端に大腸菌を固定化したデバイスを m-キシレンが溶けこんでいる液中に浸した後、ルシフェリンを加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。この場合にも芳香族化合物の濃度に応じて発光量も増大するという結果が得られた。発光量は時間に比例して直接的に増大した。なお、このときの検出限界は数 ppm であった。

本法は光ファイバーを情報伝達の媒体として用いているため、リモート・モニタリングが可能である。加えて、司る固定化微生物デバイスを取り替える方式にすると、芳香族化合物の簡便かつ高感度な測定が可能であり、工学的観点から好都合である。今後数 ppb まで計測可能とするために制御機構の検討、そして環境適応能力の強い微生物の形態転換などを検討している。