

F-7 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究

(1) 遺伝子組換え微生物の微生物多様性への影響評価手法の開発に関する研究

① マーカー遺伝子を導入した組換え微生物の検出法の開発

独立行政法人産業技術総合研究所

生物資源情報基盤研究グループ

〈研究協力者〉

鎌形洋一・木村信忠・花田 智

諸野祐樹

平成15～17年度合計予算額 23,869千円

(うち、平成17年度予算額 7,866千円)

※上記の予算額には、間接経費 5,509千円を含む

〔要旨〕国内において現在までに実用化されている組換えDNA技術として、酵素、医薬品の生産などの閉鎖系において利用されている例が数多くあるが、環境中などの開放系利用においては実用化されている例は未だに存在しないのが現状である。一方、研究段階では環境浄化を目的とする組換え微生物が現段階で創製されており、実用化が期待されている。しかしながら、環境中に解放した微生物の生存性や浄化活性を長期間に渡ってモニタリングする手法はまだ確立しておらず、環境中に存在する多種多様な微生物の中から導入した微生物のみを検出、定量することは極めて困難である。そこで、汚染物質を分解する性質を付与した組換え微生物に、標識（マーカー）となるような特徴的な配列、及び遺伝子を導入し、環境中、特に類似の微生物や遺伝子が存在する状況においても特異的検出、及びその動態の追跡が可能となる手法の確立を目指した。

まず、大腸菌を用いて微生物の16S rRNA遺伝子にオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質遺伝子(*gfp*)を相同組換えによって導入する手法を開発した。続いてトリクロロエチレンを分解する性質が知られているトルエン-2-モノオキシゲナーゼ遺伝子を対象に、同義置換によって野生型遺伝子と区別可能な配列（マーカー配列）を挿入する技術を開発、導入を行った。このマーカー配列はPCRによって野生型の存在下でも特異的に検出可能であった。一方、プラスミドには造礁サンゴ由来の赤色蛍光タンパク質遺伝子(*dsred*)を挿入することによってプラスミドの有無を検出可能とした。これらの技術を応用し、TCE分解微生物として*Pseudomonas putida* KT2440株を宿主とした組換え体を作成した。この組換え体は、宿主を緑色蛍光、プラスミドを赤色蛍光で検出可能であった。また、機能遺伝子はマーカー配列によって類似遺伝子の中でも定量PCR等を用いて特異的に検出、定量が可能であった。加えて*gfp*、*dsred*の各遺伝子を定量する系についても合わせて作成し、環境中へ導入した組換え体の複合的かつ特異的検出、定量手法を開発することができた。

〔キーワード〕環境浄化、微生物の検出定量、蛍光タンパク質遺伝子、16S rRNA遺伝子、組み換え微生物の管理

1. はじめに

昨今、加速度的に蓄積が進む様々な生物のゲノム情報を背景に、生物機能を高度に活用した産業創出に対する期待が高まっている。微生物を用いた生産、分解プロセスは、優れた反応特異性や省エネルギーといった特長を有していることから、環境と調和した循環型の産業システムの実現に向けて、工業や環境関連分野への応用が期待されている。このような背景の中、様々な用途を想定した遺伝子組換え微生物が創出されてきた一方で、総合科学技術会議により決定された分野別推進戦略によれば、ライフサイエンス分野における重点領域として「遺伝子組換え体及びその利用に関する安全性の確保」が不可欠とされており、新規な遺伝子組換え体を環境修復や工業プロセスなどの産業利用に結びつけるには、安全性及び有効性を迅速かつ合理的に把握する技術開発が必要との認識が示されている。

これまで日本において、開放系で利用された組換え微生物は存在しない。しかし今後、さらなる高度化、効率化したバイオプロセスを構築するために、大規模な遺伝子改変の施された組換え微生物の開発、及び組換え体利用の多様化が進むことは想像に難くない。これまでに組換えトリクロロエチレン分解菌、水銀化合物浄化菌、石油分解菌等の環境浄化を目的とする組換え微生物が創製されており、化学物質や重金属を分解・除去する環境浄化微生物などの実用化が期待されている。そのような組換え微生物の利用法の一つとして、環境中の汚染物質除去を行うために組換え微生物を環境中へ添加して環境浄化を促進するいわゆる“bioaugmentation”が注目されている。このような新規組換え体の利用は、2004年2月に施行された「遺伝子組換え生物等の使用等に規制による生物の多様性の確保に関する法律」いわゆるカルタヘナ法の下で行うことになる。しかしながら、汚染物質を分解する組換え微生物を環境中へ添加して利用するためには組換え体利用のガイドラインに従って、その挙動を追跡する必要があるが、環境中に添加した微生物の生残性や浄化活性を長期間に渡ってモニタリングする手法はまだ確立していない。すなわち、土壌などの環境中における微生物の特異的モニタリング手法が確立されていない現状の中で、閉鎖系、野外を問わず、組み換え微生物利用の安全性確保に必要不可欠な生物多様性への影響評価や安全性評価を行うことは容易でない。

2. 研究目的

汚染物質を分解する組換え微生物を環境中へ添加して利用するためには、その挙動を追跡する必要があるが、環境中に添加した微生物の生残性や浄化活性をモニタリングする手法はまだ確立していない。そこで本研究では環境汚染物質を分解する微生物をモデルケースとして、組換え微生物を特異的に検出し、追跡可能にする手法の確立を目指す。

3. 研究方法

(1) 大腸菌染色体上に存在するリボソームオペロン内への*gfp*遺伝子の導入、及びその蛍光検出

① *gfp*遺伝子を含むプラスミドベクター

*gfp*遺伝子を有するプラスミドベクター pGreenTIR⁽¹⁾ は国立遺伝研究所より入手した。本研究で使用した*gfp* 遺伝子は野生型のGFP protein のアミノ酸配列Ser⁶⁵ をThr に置換し、励起極大波長490 nm により野生型の45〜100倍の蛍光強度の510nm緑色蛍光を発するものである⁽²⁾。

② プラスミドベクターの構築

微生物の染色体に *gfp* 遺伝子を相同組み換えで導入するために、プラスミドベクター pK18*mobsacB*-*rrn*::*gfp*::Trp^r を構築した (図1)。方法としては、微生物よりPCR を利用して16S rDNA遺伝子をクローニングし、遺伝子の中間領域に存在する制限酵素サイトへ改良型 *gfp* 遺伝子を導入し、さらに改良型 *gfp* 遺伝子の下流にトリメトプリム (Trimethoprim) 薬剤耐性遺伝子 Trp^r 遺伝子を導入した。

③ *gfp* 遺伝子を導入した大腸菌の構築

K12 株のゲノムから 7種類存在する16S rDNAのうちの *rrnE* 遺伝子をPCR クローニングし、その遺伝子の中間領域に存在する制限酵素サイト BglIIへ改良型 *gfp* 遺伝子およびTrp^r 遺伝子を導入し、プラスミドベクターpK18*mobsacB*⁽³⁾へ連結したプラスミド pE0324 を構築した。構築したプラスミドをHanahan 法によりK12 株由来JM101株へ導入し、10% sucroseと500g/ml トリメトプリムを含む Luria-Bertani (LB) プレートで生育する形質転換体を得た。

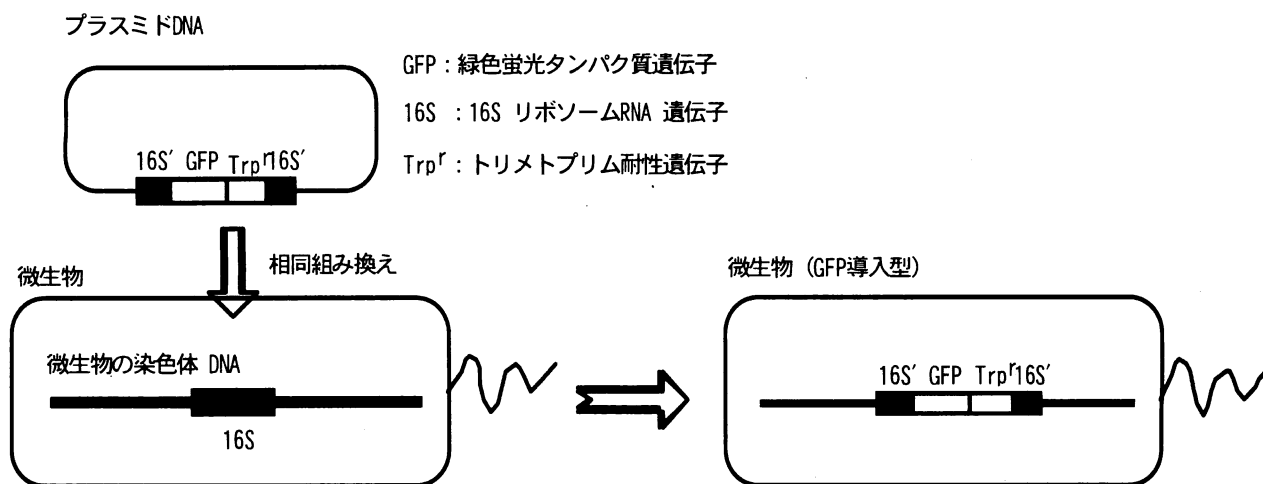


図1 大腸菌の16S ribosomal 遺伝子 (*rrn* 遺伝子) への GFP 遺伝子の導入

(2) toluene-2-monooxygenase遺伝子へのマーカー配列導入とその特異的検出

① 菌株

マーキング対象の遺伝子は、高いTCE分解能力が報告⁽⁴⁾されている *Burkholderia cepacia* G4株 (以下G4株) の toluene-2-monooxygenase (Tom) 遺伝子群 (*tom*オペロン) の中で *tomA3*を用いることとした。G4株は豊橋技術科学大学より入手した。

② *tom*オペロンのクローニング

*tom*オペロンは約108kbのTOMプラスミド上に存在することが知られている⁽⁵⁾。G4株より抽出した全ゲノムDNAに対して、*tomA3*の配列情報を元に作成したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行い、シグナルが見られた部分をサブクローニングすることによって *tom*オペロン全体を含むプラスミドを作成した。

③ マーカー配列の設計及びその導入、検出

マーカー配列としては、コドンの縮退を利用したアミノ酸の一次構造を保存する同義置換の

導入を行った。一般的にコドンは三塩基目のみの縮退であることが多く、一塩基の置換しか行うことができないが、セリンとアルギニンについては二～三塩基の置換が可能であるため、セリン、アルギニンに富む部分をマーキング箇所として選定しマーキングポイントの設計を行った。導入したマーカーの検出に当たっては、それぞれに特異的なプライマーを作成し、PCRによる検出を試みた。

④ マーカー導入によるTom活性への影響評価

マーカー配列の導入によって及ぼされるTom活性への影響評価をFastBlueBを用いた簡易アッセイ（ナフタレン／ナフトールアッセイ）によって行った。ナフタレンはTomにより1-ナフトールに変換される。ここへFastBlueBを作用させることによって茶色～紫色の呈色反応が起こり、活性を評価することができる。野生型／マーカー導入型tomオペロンを有するプラスミドを導入した形質転換体を気相ナフタレン存在下、150 μ g/mlアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。培養終了後、プレート上に1% FastBlueB-エタノール溶液を吹きつけた。

(3) *Pseudomonas putida* KT2440染色体への緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) の導入

① 相同組換えによる16S rRNA遺伝子への*gfp*遺伝子の導入

KT2440株の染色体に*gfp* 遺伝子を相同組み換えで導入するために、PCR によって*P. putida* IAM1236Tの16S rRNA遺伝子をクローニングし、pT7Blue-16S (Pp1236T) を作成した。これによってクローニングされた16S rRNA 遺伝子へpGreenTIRから取得した*gfp*遺伝子を挿入し、pK18*mobsacB* ベクターへ導入することによってpK18*mobsacB*:16S (Pp1236T)::*gfp* を作成した。構築したプラスミドをHanahan法により*E. coli* S17-1株へ導入し、KT2440との接合によってプラスミドの伝達を行った後、50 μ g/ml カナマイシンを含む LBプレートで生育するsingle crossover形質転換体を得た。得られた形質転換体を抗生物質等を含まないLB 液体培地にて継代培養した後、10% Sucroseと50 μ g/mlカナマイシンを含む寒天培地上でセレクションを行うことによって、double crossover形質転換体を取得した。得られた菌株について、*gfp* 遺伝子、および、KT2440株の持つ7つの16S rRNA遺伝子コピーそれぞれの周辺領域に特異的なプライマーを設計し、PCRを行い*gfp*遺伝子が挿入された箇所の特定を行った。

② トランスポゾンベクターを用いた*gfp*遺伝子の導入

pUTminiTn5*gfp*を*E. coli* S17-1に導入し、接合によってKT2440株に導入した後、20 μ g/mlテトラサイクリンを含むLBプレートで生育する形質転換体を得た。染色体中にランダムな*gfp*の挿入が起こっている50株の形質転換体を取得し、LB液体培地、30℃で各形質転換体の増殖速度を測定した。

(4) マーカー導入TCE分解関連遺伝子 (*tom*) および赤色蛍光タンパク質遺伝子 (*dsred*) の広宿主域ベクターへの導入

① 広宿主域ベクター、及び*dsred*遺伝子を含むプラスミドベクター

*P. putida*へのプラスミド導入に当たっては、広宿主域ベクターであるpBBR122を国立遺伝学研究所から入手して用いた。このベクターは伝達性を持たないことから、接合によるプラスミド水平伝達等が起こる可能性の低いものである。

*dsred*遺伝子を有するプラスミドベクターpDsRed-expressはタカラバイオ株式会社より購入

した。

② *lac*プロモーター、ターミネーターの導入

*tom*遺伝子群の高発現を目指し、遺伝子の上流にpKK223-3から得た*lac*プロモーターを挿入した。*lac*プロモーターは大腸菌由来の*trp*プロモーターと、*lac*プロモーターを融合した高発現プロモーターである。同様にpKK223-3から大腸菌由来の*rrnBT1T2*ターミネーターを取得し、これを*tomA5*遺伝子の下流に挿入することで目的遺伝子のみを高発現するようなプラスミドを構築した。

(5) モデル組換え微生物の作成、及び組換え微生物の挙動を特異的に定性、定量追跡する手法についての検討

これまでに作成したモデル宿主微生物であるKTTG39株へpBBTDTTを導入することによって、複合検出可能なTCE分解性指標微生物としてモデル菌株を構築した。pBBTDTTプラスミドをKTTG39株にエレクトロポレーションを用いて導入し、10 μ g/mlカナマイシンを含むLBプレートで生育する形質転換体を得た。

宿主微生物、プラスミド、プラスミド上の機能遺伝子のそれぞれについてリアルタイムPCRによる定量を可能とするため、*gfp*、*dsred*、および*tomA3*に導入したマーカー配列を対象としてQProbe PCR法による定量系の構築を行った。この方法では、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーセットに加えて、末端のシトシン塩基を蛍光修飾した、増幅される産物の一部に相補的なプローブ（QProbe）を作成する。このQProbeが標的遺伝子に結合することで蛍光色素とグアニン塩基が相互作用し、その結果、色素の蛍光が消光し、この蛍光消光から標的遺伝子を検出・定量することが可能となる⁽⁶⁾。

4. 結果・考察

(1) 大腸菌染色体上に存在するリボソームオペロン内への *gfp* 遺伝子の導入、及びその蛍光検出

環境中に放出した微生物の生残性や浄化活性を長期間に渡ってモニタリングする場合、その微生物株固有の遺伝子を用いて定量検出するのが望ましい。しかし、対象となる微生物株のどの遺伝子が他の微生物にはない固有の遺伝子であるか検索することは事実上不可能である。すなわち、多種多様な微生物の存在している環境サンプル中に対象となる微生物株の有する遺伝子がバックグラウンドとして存在しているか否かを判断することは多くの時間と労力を必要とする。そこで、対象微生物にあらかじめ、微生物には通常認められないマーカー遺伝子（あるいは配列）を付与しておくことが対象微生物を追跡するために最も現実的な方法となる。

TCE分解微生物を追跡することを可能にする手法の確立を念頭に置いて、モデルケースとして大腸菌に*gfp*遺伝子を導入した微生物の構築を行った。GFPとはクラゲ*Aequorea aequorea*より分離したGreen fluorescence proteinの略称で、標識マーカーとして注目されている。特徴としては蛍光を発するためにはコファクターや基質を要しないため、開放系で長期間のモニタリングが可能である。また測定のために固定処理や破壊処理が必要なく、生体の状態で観察が可能であり、蛍光顕微鏡などで簡便に観察が可能である。さらに発光時間が長く（約24時間）、観察が容易である。さらに海洋中から分離された遺伝子であるために陸上環境でのバックグラウンドが少ない

ため、GFPを発現している菌を培養・分離することなく、検出することができる。

そこで大腸菌のゲノム上に存在するrRNAをコードする *rrn* オペロン内に *gfp* 遺伝子を挿入する手法を確立した。*rrn* オペロンは5S, 16S, 23SのrRNAをコードしているが、*gfp*遺伝子の導入部位として16S rDNAを選んだ。理由としては、1) 16S rDNA遺伝子配列の情報が豊富にあり、マーカー遺伝子の導入が容易である。2) 16S rDNA遺伝子はゲノム上において安定に存在し、導入したマーカー遺伝子の転移や欠失が起こる可能性が極めて低い。3) *gfp*遺伝子の導入位置などが容易に特定できるため、微生物機能への影響や安全性が確認できる。4) 微生物には *rrn*オペロンが複数存在することから、1つの *rrn* オペロンへマーカー遺伝子を導入することにより、微生物の生育に影響は与えないことが明らかになっているなどが理由として挙げられる⁽⁷⁻⁹⁾。

本研究で使用了 *gfp* 遺伝子は野生型のGFP protein のアミノ酸配列Ser⁶⁵をThrに置換し、励起極大波長490 nmにより野生型の45～100倍の蛍光強度の510 nm緑色蛍光を発する^(1,2)。プラスミドベクター pGreenTIR 上の *gfp* 遺伝子は誘導型の *lac* プロモーターにより発現が制御されており、誘導基質の添加が必要になる。そこではじめに微生物に導入した際に *gfp* 遺伝子を恒常的に発現させるために、トランスポゾン Tn5由来の *neo* プロモーターを *gfp* 遺伝子上流に導入した改良型 *gfp* 遺伝子を構築した。この遺伝子は誘導基質なしに微生物のプラスミド、染色体上で *gfp* 遺伝子を発現する。また様々な微生物種 (*Escherichia coli*, *Pseudomona*, *Rhodococcus*など) で発現可能であり、TCE 分解する幅広い微生物種において利用が可能である。

次に微生物の染色体に *gfp* 遺伝子を相同組み換えで導入するために、プラスミドベクター pK18*mobsacB-rrn::gfp::Trp^r* を構築した(図1)。方法としては、微生物よりPCRを利用して16S rDNA遺伝子をクローニングし、遺伝子の中間領域に存在する制限酵素サイトへ改良型 *gfp* 遺伝子を導入し、さらに改良型 *gfp* 遺伝子の下流にトリメトプリム(Trimethoprim)薬剤耐性遺伝子 *Trp^r* 遺伝子を導入した。構築に利用したプラスミドベクター pK18*mobsacB* は幅広い微生物種に対して接合伝達能力を有しており、*sacB* (Sucrose 存在下において微生物に対して致死活性を示す) 遺伝子を利用したcounter selection が行えるために、マーカー遺伝子の導入が簡便に行えるものである⁽³⁾。これを利用することにより、幅広い微生物種に対して利用できるマーカー遺伝子の導入手法の構築ができた。

さらに上記の手法を利用して、*gfp* 遺伝子を導入した大腸菌の構築を試みた。K12 株のゲノムから7種類存在する16S rDNAのうちの *rrnE* 遺伝子をPCR クローニングし、その遺伝子の中間領域に存在する制限酵素サイト BglIIへ改良型 *gfp* 遺伝子および *Trp^r* 遺伝子を導入し、プラスミドベクター pK18*mobsacB*へ連結したプラスミド pE0324 を構築した。構築したプラスミドをHanahan 法によりK12 株由来JM101株へ導入し、10% sucroseと50 μg/ml トリメトプリムを含むLBプレートで生育する形質転換体を得た。さらにsucrose およびトリメトプリムを含むLB 液体培地にて継代培養を行い、トリメトプリム耐性およびsucrose非感受性株を取得した。得られた菌株は相同組み換えにより *gfp* 遺伝子および *Trp^r* 遺伝子がゲノム上に挿入していた。*gfp* 遺伝子はdouble crossover によって導入しており、遺伝子を安定的に保持した。また得られた菌株はGFPの発現により蛍光顕微鏡下で菌を検出できるとともに、肉眼によっても菌体が緑色に着色していることを確認でき、他の菌株と区別することが容易にできる(図2)。また挿入した *gfp* や *Trp^r* の遺伝子配列から定量的PCR等などのプライマーを設計することによって追跡可能となった。

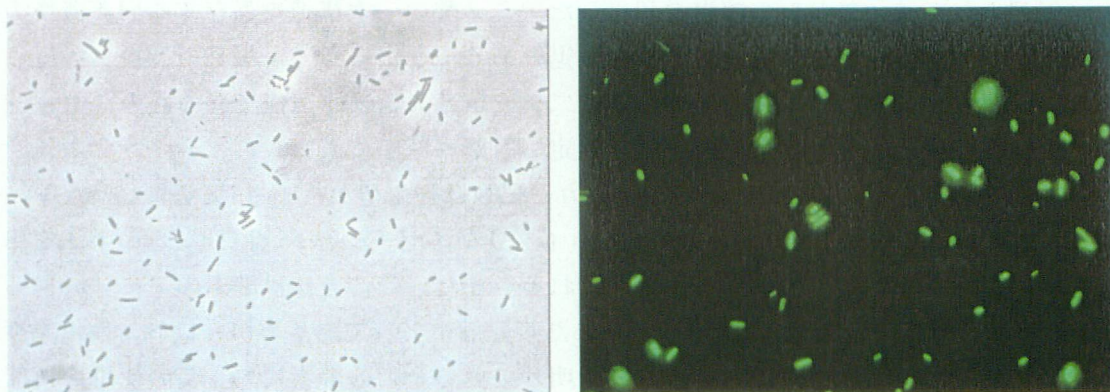


図2 GFP 遺伝子を16S rRNA 遺伝子 (*rrn* 遺伝子) へ導入した大腸菌の蛍光顕微鏡写真

(2) toluene-2-monooxygenase遺伝子へのマーカー配列導入とその特異的検出

TCE分解活性に関わる遺伝子の特異的検出を目指して、マーカー配列を導入した遺伝子の作成を行った。マーキング対象の遺伝子は、高いTCE分解能力が報告⁽⁴⁾されている*Burkholderia cepacia* G4株(以下G4株)のtoluene-2-monooxygenase(Tom)遺伝子群(*tom*オペロン)の中で*tomA3*を用いることとした。その理由としては1) 大腸菌においてTomを発現させTCEを分解した例が報告されている⁽¹⁰⁾こと、2) *tom*オペロン(*tomA0A1A2A3A4A5*)の中で、*tomA3*が活性中心、基質結合に関わる α サブユニットをコードしていること、3) Tomを始めとして、類似の酵素遺伝子に関する知見が豊富に存在すること⁽¹¹⁾、等が挙げられる。

*tom*オペロンを有するG4株は豊橋技術科学大学の二又裕之助手より入手した。*tom*オペロンは約108kbのTOMプラスミド上に存在することが知られている⁽⁵⁾。G4株より抽出した全ゲノムDNAに対していくつかの制限酵素で消化を行い、*tomA0A1*、*tomA3*の配列情報を元に作成したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。シグナルが見られた部分をサブクローニングし、*tom*オペロンの部分配列を有するpBStomSalI-1、pBStomSalI-2、pBStomSacI-1を得た。続いてこの3つのプラスミドを組み合わせることによって*tom*オペロン全長を含むプラスミド、pBStomXS2KS(図3)を得た。このプラスミドは*tom*オペロン上流にlacプロモーターを有しており、大腸菌においてTomを発現可能であり、マーカー配列の導入による影響を調べることができる。

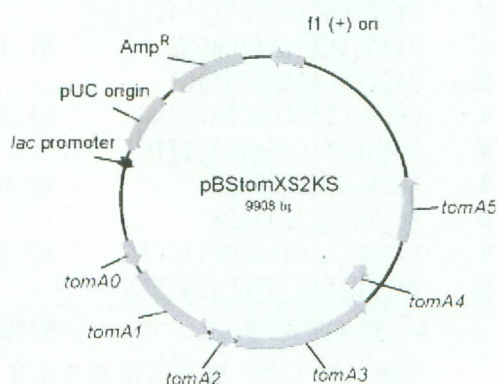


図3 : pBStomXS2KS のプラスミド地図

マーカー配列としては、コドンの縮退を利用したアミノ酸の一次構造を保存する同義置換の導入を行った。一般的にコドンは三塩基目のみの縮退であることが多く、一塩基の置換しか行うことが出来ないが、セリンとアルギニンについては二～三塩基の置換が可能であるため、セリン、アルギニンに富む部分をマーキング箇所として選定しPTR1～PTR7（表1）のマーキングポイントを決め、マーカー配列を設計した。これらのマーカー配列は野生型から9～14塩基異なった配列を持っており、塩基対合を基礎とするPCRやサザンハイブリダイゼーション、FISHなどの手法を用いて特異的な検出を行うことが可能であると考えられる。また、この方法は酵素のアミノ酸構造に全く変化を与えず、置換するコドンも1マーカーあたり5～8コドンであることからコドン使用頻度にも大きな影響を及ぼさない。従って塩基配列が判明している全ての酵素に対しての使用が可能であり、広範な応用が可能なマーキング法であると言える。マーキングはPCR反応を基礎とするMetaPCR⁽¹²⁾を応用した方法（特許欄参照）によって行い（図4）、数段階のPCR反応を経てPTR1～PTR7の7マーカーを有する *tomA3m7* 遺伝子を作成、サブクローニングを行うことによってpBStomXS2KSm7プラスミドを作成した。

各マーキングポイントを検出するため、それぞれに特異的なプライマーを作成した。プライマーの設計に当たっては、共通となるフォワードプライマーを1種類、それぞれのマーカーに特異的なプライマーを7種類、そして野生型、マーカー双方に対して結合可能なプライマー1種類の計9種、8組のプライマーセットを作成し、それぞれについてPCRを行った。その結果、各マーキングポイントについて野生型をテンプレートとした場合には増幅産物が見られず、特異的な検出が可能であることが示された（図5）。加えて、野生型、マーカー導入型双方に対して結合可能なプライマーによる増幅産物も確認できた。以上の検出法を用いることにより、野生型、マーカー導入型双方が混在している環境において、PCR反応自体の検定を行いながらマーカー配列を検出する方法を確立した。

表1：導入した同義置換マーカーと野生型からの置換率

サイト	塩基配列	置換率 (%)
PTR1	W: CAGTTGAGCATTTCCGACGCGCA	58.3 (14/24)
	M: CA <u>ACTTT</u> CAATCAGTGATGCTAGG	
PTR2	W: CAGTCCATCGACGAGCTGCGT	52.3 (11/21)
	M: CAAAGTATAGATGAATTAAGA	
PTR3	W: TTTCTTACCGCGGTGAGCTTTTCG	54.1 (13/24)
	M: TTCTTGACAGCTGTTCATT <u>CAGT</u>	
PTR4	W: CAAAGTGACGAATCGCGC	61.1 (11/18)
	M: CAGTCGGATGAGAGTAGA	
PTR5	W: CGCGGCTATCGGCTGTTGAGC	61.9 (13/21)
	M: AGAGGATACAGATTACTTTCA	
PTR6	W: AGCTGGCGCGAGAGC	60.0 (9/15)
	M: TCATGGAGAGAAATCA	
PTR7	W: TATCGCGAGTCGGCCTACCTC	52.3 (11/21)
	M: TACAGAGAAAGTGCATATTA	

W: 野生型配列、M: マーカー配列

下線は野生型と異なる塩基を示す

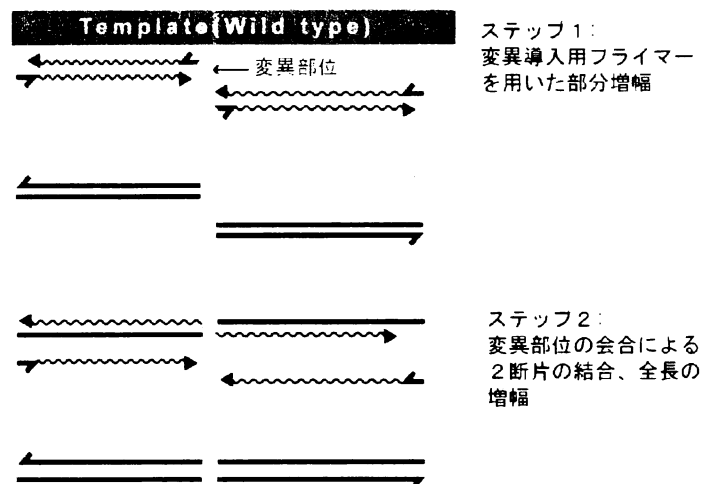


図 4：マーカー配列導入方法



図 5：PCR によるマーカー配列の検出

1～7：それぞれ PTR1-PTR7 特異的プライマーによる増幅

R：野生型、マーカー導入型共通プライマーによる増幅

さらに、マーカー配列の導入によって及ぼされるTom活性への影響評価をFastBlueBを用いた簡易アッセイ（ナフトレン／ナフトールアッセイ）によって行った。ナフトレンはTomにより1-ナフトールに変換される。ここへFastBlueBを作用させることによって茶色～紫色の呈色反応が起こり、活性を評価することができる。図 6 に示すように、野生型、7 マーカー導入型において、上記活性評価法を用いて判別可能な活性の差は見られず、マーカー導入による酵素活性への影響は軽微であることが推測された。

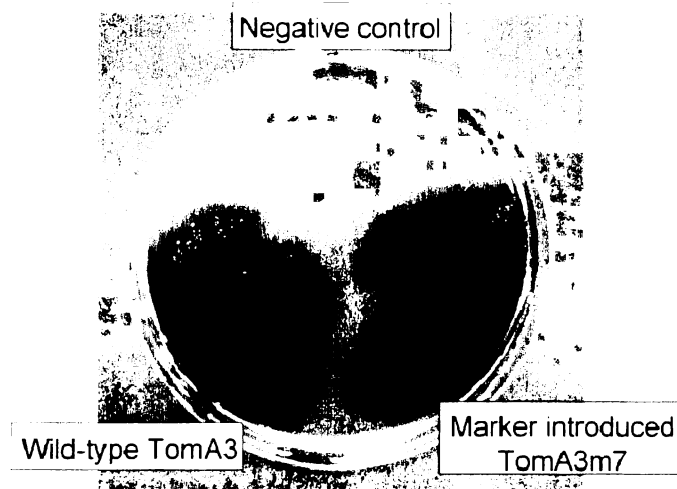


図6：マーカー導入によるTom活性への影響評価

(3) *Pseudomonas putida* KT2440染色体への緑色蛍光タンパク質遺伝子(*gfp*)の導入

これまでに構築した手法を用いてTCE分解性組換え微生物を作成するため、新たなモデル宿主微生物の選定を行った。(1)において検討した大腸菌は、遺伝子工学的な知見が豊富である一方、環境における分布は極めて限定的であり、環境中へ放出されたとしても生残性に疑問がある。従って、宿主微生物のモデルとして活性汚泥、土壌などの幅広い環境における分布が知られている⁽¹³⁾ *Pseudomonas*属の細菌で、全ゲノム配列が明らかとなっている*P. putida* KT2440株を新たに選択し、*gfp*遺伝子を染色体に導入することを試みた。

KT2440株の染色体に緑色蛍光タンパク質である*gfp*遺伝子を挿入するため、15年度に確立した16S rRNA遺伝子への導入手法を用いた挿入を行った。KT2440株の染色体に*gfp*遺伝子を相同組み換えで導入するために、PCRによって*P. putida* IAM1236Tの16S rRNA遺伝子をクローニングし、pT7Blue-16S (Pp1236T)を作成した。これによってクローニングされた16S rRNA遺伝子のApaIサイトへpGreenTIRから取得した*gfp*遺伝子を挿入し、pK18*mobsacB*ベクターへ導入することによってpK18*mobsacB*:16S (Pp1236T)::*gfp*を作成した。構築したプラスミドをHanahan法により*E. coli* S17-1株へ導入し、KT2440との接合によってプラスミドの伝達を行った後、50 μ g/ml カナマイシンを含むLBプレートで生育するsingle crossover形質転換体を得た。得られた形質転換体を抗生物質等を含まないLB液体培地にて継代培養した後、10% sucroseと50 μ g/mlカナマイシンを含む寒天培地上でセレクションを行うことによって、double crossover形質転換体を取得した。得られた菌株について、PCRによって、*gfp*遺伝子が挿入された箇所の特定を行った。*gfp*遺伝子、および、KT2440株の持つ7つの16S rRNA遺伝子コピーそれぞれの周辺領域に特異的なプライマーを設計し、PCRを行ったところ、挿入位置は*rrsF*であることが判明した。得られた菌株はGFPが高発現しており、肉眼によっても菌体が緑色に着色していることが確認できるほどであったが、継続的に培養(50世代以上)を行うと、GFP蛍光を持たないコロニーの出現が観察された。非蛍光性の派生株では*gfp*遺伝子が欠落しており、高レベルのGFP発現、および、高濃度のGFPの存在が共にホストの負担、ないしは悪影響の原因となり、脱落株の方が生存に有利となっていたことが考えられる。

次に、トランスポゾンを用い、ランダムな染色体への*gfp*遺伝子導入を試みた。導入に際しては

Matthysse⁽¹⁴⁾によって報告されているpUTminiTn5gfpプラスミド(図7)を用いた。このプラスミドには*gfp*遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子がIS領域に挟まれて存在しており、同じくプラスミド上の別領域に存在するトランスポザゼ遺伝子*tnpA*によってIS領域で挟まれた部分(トランスポゾン)が染色体に導入される。また、このプラスミドはKT2440株では保持されないことから、テトラサイクリン培地で選択することによってトランスポゾンが染色体に導入された形質転換体を選抜することができる。pUTminiTn5gfpを*E. coli* S17-1に導入し、接合によってKT2440株に導入した後、20 µg/mlテトラサイクリンを含むLBプレートで生育する形質転換体を得た。染色体中にランダムな*gfp*の挿入が起こっている50株の形質転換体から、増殖速度が野生型とほぼ同じで明るいGFP蛍光を持つ株を選抜した。その結果、他の菌株と区別可能なGFP蛍光を持ち、増殖速度が野生型とほぼ同等のKTTG31株を得た。このKTTG31株は*gfp*遺伝子を安定的に保持することから、以後の実験ではKTTG31株を組み換え宿主として用いることとした。

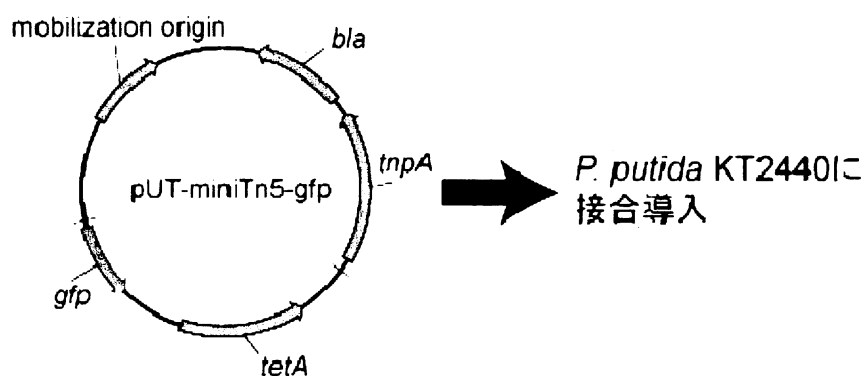


図7 : pUTminiTn5gfp ベクター

(4) マーカー導入TCE分解関連遺伝子(*tom*) および赤色蛍光タンパク質遺伝子(*dsred*)の広宿主域ベクターへの導入

*P. putida*へプラスミドを導入するため、広宿主域ベクターであるpBBR122を国立遺伝学研究所から入手した。このベクターは伝達性を持たないことから、接合によるプラスミド水平伝達等が起こる可能性の低いものである。

*tom*遺伝子群の高発現を目指し、遺伝子上流にpKK223-3から得た*tac*プロモーターを挿入した。*tac*プロモーターは大腸菌由来の*trp*プロモーターと、*lac*プロモーターを融合した高発現プロモーターである。PCRによって増幅した*tac*プロモーター断片と*tom*遺伝子上流部(*tomA0*)をPCRによって結合した。同様にpKK223-3から大腸菌由来の*rrnBT1T2*ターミネーターを含むDNA断片をPCRによって取得し、これを*tomA5*遺伝子の下流と結合することで目的遺伝子群のみを高発現するようなプラスミドpBSptacT4を構築した。

*dsred*遺伝子を有するプラスミドベクターpDsRed-expressはタカラバイオ株式会社より購入した。DsRed-expressは珊瑚礁に生息するカイメンの一種(学名*Discosoma*)に由来する赤色蛍光タンパク質を遺伝子組み換え技術により改変したものであり、赤色蛍光を発する四量体構造をとるまでの時間が野生型に比べて約10~15倍早くなっている。このベクター中にある*dsred*遺伝子を制限酵素によって切り出し、他のベクターに挿入したところ、発現レベルが安定せず、良好な蛍光

が得られなかった。この原因として、pDsRed-express中の*dsred*遺伝子が*lacZ*遺伝子との融合遺伝子の形で存在していること、そして、*dsred*遺伝子上流に真核生物用の翻訳開始サイト等が存在していること等を考え、*dsred*遺伝子のみをPCRによって取得し、ベクターにクローニングしたところ、安定的な蛍光が得られるようになった。上記のようにして取得した*dsred*遺伝子をpBSptacT4の*tac*プロモーターと*tomA0*遺伝子の間に挿入し、pBSptacT4FDを作成した。このプラスミドを大腸菌JM109株へ導入したところ、蛍光灯の下で赤い蛍光色が確認できるほどの蛍光を呈するコロニーが観察された。

16年度の成果であるマーカー配列を導入したtoluene-2-monooxygenase (*tom*) 遺伝子群 (*tom*オペロン) をpBSptacT4FDプラスミドへ導入し、pBSptacT4FDm7プラスミドを得た。このプラスミドを制限酵素ApaI、XhoIで消化することで*tac*プロモーター-*dsred*遺伝子-*tom*オペロン-*rrnBT1T2*ターミネーターを含むDNA断片を生成し、広宿主域ベクターpBBR122に導入することによってpBBTDTTm7を作成した (図8)。

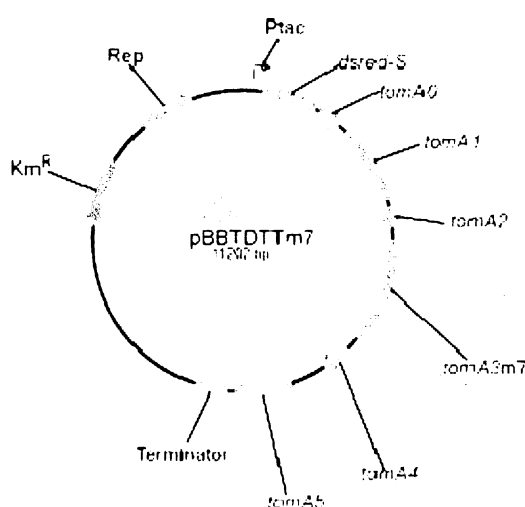


図8：pBBTDTTm7 プラスミド、PTR1-7はマーカー導入サイトを示す

(5) モデル組換え微生物の作成、及び組換え微生物の挙動を特異的に定性、定量追跡する手法についての検討

これまでに作成したモデル宿主微生物であるKTTG39株へpBBTDTTを導入することによって、複合検出可能なTCE分解性指標微生物として、宿主、プラスミド、プラスミド上の機能遺伝子に示す三因子 (図9) に対してそれぞれに独立検出可能なマーカーを導入したモデル菌株を構築した。pBBTDTTプラスミドをKTTG31株にエレクトロポレーションを用いて導入し、10 µg/mlカナマイシンを含むLBプレートで生育する形質転換体を得た。この形質転換体は、既に導入した*gfp*と、プラスミド上の*dsred*により、緑色および赤色の蛍光を発し、宿主微生物の特異的観察のみならず、プラスミドの存在の有無が視覚的に認識可能となった (図10)。*gfp*、*dsred*、およびマーカー導入*tomA3*遺伝子それぞれにおいて定量PCR (Qprobe PCR) を用いた特異的定量系の構築も行い、それぞれ約 $10^3 \sim 10^6$ copy/PCR-tubeの範囲で特異的な遺伝子定量が可能となった。特にマーカー導入*tom*遺伝子の場合、野生型遺伝子がマーカー導入*tomA3*遺伝子の $10 \sim 10^5$ 倍存在しても (一律 10^7 copy/PCR-tubeで混合)、ほぼ正確な定量が可能であった。

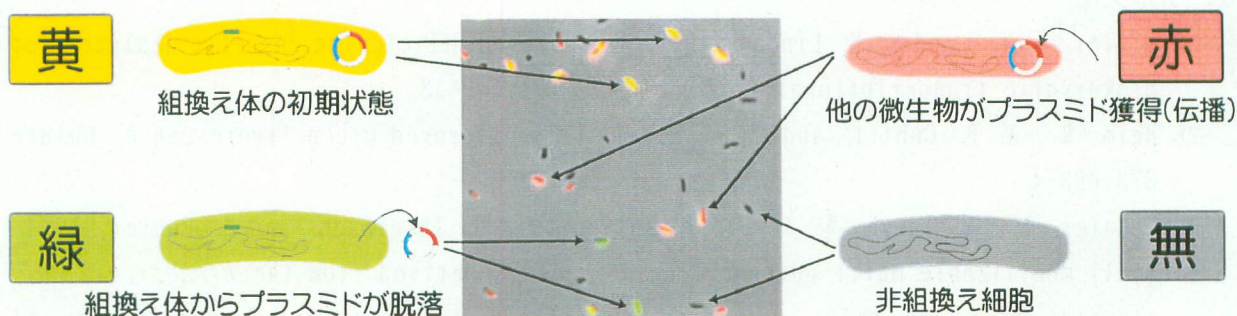


図9：蛍光色変化による組換え微生物の状態把握 (模擬混合系によるイメージ)

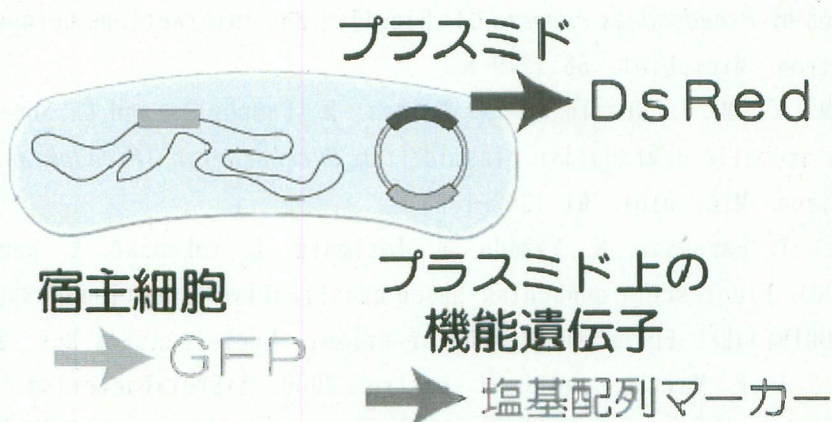


図10：マーカー導入微生物の模式図

5. 本研究により得られた成果

大腸菌ゲノム上の *rrn* オペロン内の16S rRNAを標的にして、その配列内に *gfp* 遺伝子を挿入する技術を確認した。また、TCE分解活性に関わる組換え遺伝子について、その野生型とも区別可能な特異的検出を目指して、同義置換を基礎としたマーカー配列の設計、及び導入手法の確立、およびその導入を行った。このマーカー配列は野生型配列の存在下でもPCRなどを用いて特異的に検出することが可能であり、リアルタイムPCRを行うことによって特異的定量も可能となった。一方でマーカー配列導入によって観察しうる酵素活性の低下等の影響は見られなかった。プラスミドの検出を可能とするため、マーカーを導入した機能遺伝子を含むプラスミドに *dsred* 遺伝子を導入し、プラスミドの有無を蛍光色の変化によって観察可能な系を構築した。以上を総合して、TCEを分解する性質を付与した組換え体として、toluene-2-monooxygenaseを保持する *Pseudomonas putida* KTTG39株を作成した。宿主の染色体には *gfp* 遺伝子、マーカーを導入した機能遺伝子 (*tom*) を含むプラスミドには *dsred* 遺伝子を導入することによって、宿主、およびそのプラスミドの保持/非保持は、蛍光色の変化で識別が可能となった。さらに *gfp*、*dsred* についてもリアルタイムPCRを用いた特異的定量系を構築し、蛍光検出、分子遺伝学的検出の併用により精度の高い解析が可能となる組換え体を構築することができた。

6. 引用文献

- 1) Miller, W. G., and S. E. Lindow. 1997. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 191:149-53.
- 2) Heim, R., A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-4.
- 3) Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- 4) Folsom, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1279-85.
- 5) Shields, M. S., M. J. Reagin, R. R. Gerger, R. Campbell, and C. Somerville. 1995. TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1352-1356.
- 6) Kurata, S., T. Kanagawa, K. Yamada, M. Torimura, T. Yokomaku, Y. Kamagata, and R. Kurane. 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res.* 29:E34.
- 7) Amador, E., J. F. Martin, and J. M. Castro. 2000. A *Brevibacterium lactofermentum* 16S rRNA gene used as target site for homologous recombination. *FEMS Microbiol Lett* 185:199-204.
- 8) Asai, T., C. Condon, J. Voulgaris, D. Zaporozets, B. Shen, M. Al-Omar, C. Squires, and C. L. Squires. 1999. Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rRNA operons. *J. Bacteriol* 181:3803-9.
- 9) Condon, C., D. Liveris, C. Squires, I. Schwartz, and C. L. Squires. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bacteriol.* 177:4152-6.
- 10) 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.
- 11) Leahy, J. G., P. J. Batchelor, and S. M. Morcomb. 2003. Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:449-79.
- 12) Wallace, A. J., C. L. Wu, and R. G. Elles. 1999. Meta-PCR: A novel method for creating chimeric DNA molecules and increasing the of productivity mutation scanning techniques. *Genetic Testing* 3:173-183.
- 13) Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, dos S. V. A. Martins, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouiri, I. Hance, L. P. Chris, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback,

- M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummeler, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4:799-808.
- 14) Matthyse, A. G., S. Stretton, C. Dandie, N. C. McClure, and A. E. Goodman. 1996. Construction of GFP vectors for use in gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 145:87-94.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

〈論文（査読あり）〉

1. Lee, T.H., S. Kurata, C.H. Nakatsu, and Y. Kamagata : Molecular analysis of bacterial community based on 16S rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) under different cultural conditions. *Microbial Ecol.*, 49: 151-162 (2005).
2. Kimura, N., W. Kitagawa, T. Mori, N. Nakashima, T. Tamura, Y. Kamagata : Genetic and biochemical characterization of the dihydroxyphenylacetate dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* SA0101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press (2006).

〈その他誌上発表（査読なし）〉

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会）

1. 組み換え体微生物を追跡する手法の開発とその意義」，鎌形洋一、北川航、諸野祐樹、木村信忠、中村和憲，日本微生物生態学会第20回大会シンポジウム，仙台，2004.11.22
2. 「TCE分解酵素遺伝子のマーキングとその特異的検出」，諸野祐樹、北川航、木村信忠、花田智、鎌形洋一、日本農芸化学会大会 札幌，2005.3.30
3. 「複合マーキング組換え微生物の構築とその追跡手法の開発」，諸野祐樹、北川航、木村信忠、花田智、鎌形洋一、日本微生物生態学会第21回大会 福岡，2005.11.02
4. 「Direct labeling of functional genes for specific detection in the environment」，諸野祐樹、北川航、木村信忠、花田智、鎌形洋一、環太平洋国際化学会議 (Pacifichem)，ハワイ、ホノルル，2005.12.18

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

- (5) マスコミ等への公表・報道等
特に記載すべき事項はない

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

近年、環境浄化を目的として、環境中へ有用な微生物を導入することが期待されている。しかしながら、環境中には多種多様な微生物が存在しており、導入した微生物のみを検出、定量することは極めて困難であった。本研究によって構築されたモデル微生物は、宿主、プラスミド、およびプラスミド上の機能遺伝子の3因子をそれぞれ独立に検出することが可能である。この3因子をマーキングすることによって、環境中に放出された組換え微生物の挙動を視覚的、遺伝学的に追跡することが可能となり、精度の高い研究が可能となる。このようなモデル菌株を利用した解析を通じ、これまで解明が非常に困難であった環境中での微生物挙動に対する重要な知見が得られる可能性は高い。本研究により開発した技術は環境浄化などに用いられる多くの種類の微生物に利用可能であり、病原菌の解析や遺伝子組み換え微生物の管理などに役立つ可能性がある。将来的には遺伝子組み換え微生物の検出手法の標準化につながってゆく研究であると同時に、カルタヘナ法における組換え体の第1種利用による環境浄化手法に対して適切なリスク管理手法を提示できる研究である。