

環境汚染物質分解菌の遺伝子解析

機能材料工学専攻 天田 啓

1. Introduction

本プロジェクトでは、数種類の環境汚染物質の微生物による分解を検討している。今回は、芳香族塩素化合物の微生物分解のモデル化合物として使われている 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を分解する土壌細菌に着目した。

これまで 2,4-D 分解菌は、様々な環境中から分離され、クラス分けされている¹⁾。初めて分離された 2,4-D 分解菌はクラス I に属する細菌であり、それ以降クラス I に属する細菌を用いて 2,4-D 分解に関する様々な研究が行われた。*Ralstonia* sp. JMP134 株を用いた 2,4-D 代謝経路の解明、分解酵素遺伝子 (*tfd* 遺伝子) 群の塩基配列の決定²⁾など、詳しい研究成果が報告された。その後、クラス I の分解菌とは系統的に離れている分解菌が分離され、それぞれクラス II および III に分類された。クラス III に属する *Bradyrhizobium* sp. HW13 株は 2,4-D 分解酵素遺伝子として、*tfd* 遺伝子群とは異なる *cad* 遺伝子群をもっていることがわかったが³⁾、これらの遺伝子産物による 2,4-D 分解の詳細な分子機構は解明されていない。また、クラス II の 2,4-D 分解機構に関しては、2,4-D 分解における初発酵素遺伝子の部分配列の解析⁴⁾以外、ほとんど知見がない。そこで、本年度はクラス II に属する *Sphingomonas* 属細菌に着目し、環境中から分離した 2,4-D 分解菌の遺伝子の塩基配列を決定し、解析することにより、クラス II の 2,4-D 分解菌を同定および分類することを目的とした。

2. Materials and Methods

2-1. 2,4-D 分解菌の分離

2,4-D を唯一の炭素源とする培養液で集積培養を行い、2,4-D 分解菌を分離した。

2-2. コロニー-PCR

プレート上に生えてきたコロニーを爪楊枝で一つずつかきとり、PCR 反応液に加えた。サーマルサイクラーにて反応を行い、1%アガロースゲルを用いた電気泳動にて分離・確認後、増幅した DNA 断片を精製した。

2-3. 塩基配列の決定および解析

ゲルから精製した DNA 断片にシーケンス用反応液を加え、サーマルサイクラーにて反応を行った。生成物を精製後、DNA シーケンサにて分離し、付属ソフトにて解析を行い、塩基配列を決定した。その後、インターネット上に構築された DDBJ (DNA data bank of JAPAN) の BLAST や Clustal W などのプログラムを使い、決定した塩基配列を解析した。

3. Results

本年度、新たに 58 ヶ所から採取した土壌試料を用いて 2,4-D 分解実験を行ったところ、49 サンプルで 2,4-D 分解が見られた。分解が見られたサンプルから、2,4-D を唯一の炭素源とする無機培地を用いた集積培養にて、新たに 28 種類の 2,4-D 分解菌を分離することができた。前年度までに分離できた 2,4-D 分解菌とあわせて、39 種類の 2,4-D 分解菌を解析のために準備することが出来た。これらの細菌の以下に示す 3 つ

の遺伝子について解析を行った。

3-1. *cadA* 遺伝子

cadA 遺伝子は 2, 4-D 分解の初発酵素である 2, 4-D モノオキシゲナーゼをコードしている。*cadA* 遺伝子には保存性の高い領域が存在しており、PCR にて部分 DNA を増幅することが可能である。そこで、増幅した DNA 断片を電気泳動にて確認することで、*cadA* 遺伝子の有無を解析した。コロニーPCR 後、1%アガロースゲルで電気泳動を行ったところ、14 サンプルで DNA の増幅が見られた。これら 14 サンプルの細菌をクラス II の候補とした。さらに、*cadA* 遺伝子の解析と *tfdA* 遺伝子の解析をあわせた結果から、クラス I に含まれると思われる分解菌が 17 種類、クラス III に含まれると思われる分解菌が 8 種類と分類された。

3-2. 16S rRNA 遺伝子

16S rRNA 遺伝子の塩基配列は種間で保存されており、また塩基の置換率を用いることで、原核生物の系統をより正確に、かつ定量的に解析することが可能であるため、現在までに分子系統解析でもっとも利用されている遺伝子である。

ここでは、コロニーPCR にて *cadA* 遺伝子の部分配列が増幅した菌について、分子系統的な解析を行ったところ、全て *Sphingomonas* 属(クラス II の 2, 4-D 分解菌)に含まれる細菌であった。現在、*Sphingomonas* 属は 4 つのクラスター (*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis*, *Novosphingobium*) に分けられるとされているが、本研究で分離された 2, 4-D 分解菌の多くは *Sphingobium* 属に分

類される菌が多かった。*Sphingopyxis* 属に含まれる 2, 4-D 分解菌もいたが、多くの *Sphingobium* 属細菌とは明らかに異なる増殖および 2, 4-D 分解が観察された。*cadA* 遺伝子の増幅結果と 16S rRNA 遺伝子の解析結果から、14 種のクラス II に含まれる 2, 4-D 分解菌が分離できたことが確認された。

3-3. *tfdB* 遺伝子

tfdB 遺伝子は 2, 4-ジクロロフェノールに水酸基を付加する酵素、クロロフェノールヒドロキシラーゼをコードしている。本遺伝子は最近 *cadA* と同様に、保存性が高い領域が確認され、PCR にて遺伝子の部分配列を増幅することが可能である。分離した 2, 4-D 分解菌から増幅された *tfdB* 遺伝子断片はお互い非常に類似しており、データベース上の既知の遺伝子と比較したところ *Sphingomonas herbicidovorans* や *S. sp. I602* の *tfdA* の部分配列と高い相同性を示した。しかしながら、島根大のチームがベトナムで分離した 2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸も分解できる 2, 4-D 分解菌⁴⁾の *tfdB* とは違うクラスターを形成した。

Reference

1. Kamagata Y. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2266-2272 (1997).
2. Fulthorpe R.R. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3274-3281 (1995).
3. Itou K *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3449-3454 (2002).
4. Nguyen L.H. *et al. Microbes Environ.* **22**, 243-256 (2007)