

氏名	池野慎也
生年月日	
本籍	愛知県
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第574号
学位授与の日付	2003年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ベンゼン系化合物の生物学的簡易測定システムの構築に関する研究
論文審査委員(主査)	清水宣明(自然計測応用研究センター・教授)
論文審査委員(副査)	林良茂(工学部・教授) 木津良一(研究科・助教授) 中村嘉利(工学部・助教授) 長谷川浩(工学部・助教授)

## 学位論文要旨

### Abstract

TOL pathway from pWW0 plasmid of *P. putida* mt-2 encodes a series of enzymes for the degradation of benzene derivatives. The expression of the enzymes is controlled by the regulating protein XylR and *Ps* promoter in the presence of benzene derivatives. In the present study, to detect of benzene derivatives, pTS301-GFP has been developed by fusing a gene encoding a green fluorescent protein into the downstream of the *Ps* promoter. In the plasmid, green fluorescent protein as a reporter protein is transcribed by controlling the promoter's activation by XylR and benzene derivatives. A recombinant *Escherichia coli* transformed with this plasmid was applied to the environmental sensing of benzene derivatives in water.

The optimal culture condition for expression of fluorescence in transformant was investigated to change of the transcription activity by variety of culture medium and ATP addition into medium. The optimal culture medium composition was NZM medium without casamino acid and transcription activity in presence of low concentration effectors was inhibited with an excess of casamino acids. Furthermore, it was useful for detection of fluorescence of transformants that was exposed to low concentration of benzene derivatives for 4 hr in the optimal culture medium with addition 200  $\mu$ M of ATP. In this system, benzene derivatives having CH<sub>3</sub>- or Cl- or both in the side chain of the benzene ring showed particularly high fluorescence intensity.

## 1. 緒言

微量有害物質による水質汚染が深刻な問題となっている。それに伴い重金属類、有機化合物質、環境ホルモンなどの監視すべき水質項目が急激に増加している。実際に、多くの石油化学製品が世に搬出され暮らしが豊かになる一方、その廃棄物による汚染は深刻な問題として取り上げられている。なかでも、不燃物として長年地中に埋め立てることは、廃棄物からの溶解物質排出を招く原因となっている。溶解物質の主な成分は石油系化学物質であり、その主成分である芳香族化合物は環境排水基準にも定められており、その大半は大気中に揮発するが水中にもわずかではあるが溶け込み、地下水や土壌を汚染、そして最終的には魚介類に吸収・濃縮されて、毒性を発揮すると考えられる。また、これらの芳香族化合物は、ダイオキシンに代表される環境ホルモンの原料となるものも多く含んでいる。このように石油製品の恩恵の裏側に、生態系へ深刻なダメージを与えているのである。この状況を早急に感知する為にも、生体への環境汚染物質が及ぼす影響を把握することができ、迅速かつ簡便で、薬品などを使用しないセンサーの開発が必要である。

現在までの有害化学物質の検出法は多くの機器を必要とする欠点を持ち、そのコストは多大であることが知られている。例えば、ダイオキシンの検出には微量が故にかなりのコストや時間がかかるのは良く知られている。更に、これらの評価は生物学的な意味を持ってはいなかった。そのため、生体への環境汚染物質が及ぼす影響を把握できるバイオセンサーは、多方面から注目されている。

## 2. 遺伝子組換え大腸菌を用いたベンゼン系化合物の検出

本研究では *Pseudomonas putida* mt-2 のキシレン分解能に着目し、その微生物由来の TOL plasmid pWW0 に存在する *Ps* プロモーターおよび調節タンパク質 XylR を用いた有機化学物質の検出を行った。*Ps* プロモーターはベンゼン系化学物質に感受性を持つ XylR によって制御されるプロモーターであり、XylR は 566 アミノ酸からなる発現調整タンパク質であり、単独では *Ps* プロモーターを活性化しないが、ベンゼン系化合物と結合することで、*Ps* プロモーターを活性化し、その下流のタンパク質の発現を促進する。この機能性を利用してレポータータンパク質 GFP を発現させる。そこで *Ps* プロモーターを 2 つ有するプラスミド (pTS301) を用い、ひとつの下流には *xylR* 遺伝子が、もうひとつの下流にはレポーター遺伝子として *gfp* 遺伝子を組み込んだ。発現した XylR はベンゼン系化合物と結合し活性型 XylR となり、2 つの *Ps* プロモーターを活性化する (Fig.1)。一方の系は XylR の発現、他方は GFP の発現を増幅する。発現した GFP の蛍光強度を測ることでベンゼン系化合物の検出を行った。

*m*-xylene 誘導による GFP の発現を蛍光顕微鏡および蛍光測定機で確認でき、最適培養温度 27 °C、*m*-xylene の検出感度 0.1 mM の結果を得た。また、水中における各ベンゼン系化合物の検出を確認し、ベンゼン環にメチル基およびクロロ基を有するものを特異的に検出できるバイオアッセイであることが確認できた。しかし、その感度において、*xylene* の環境排出基準である 0.4 ppm (約 4 μM) まで検出できる感度に至らず、更なる研究が必要である。

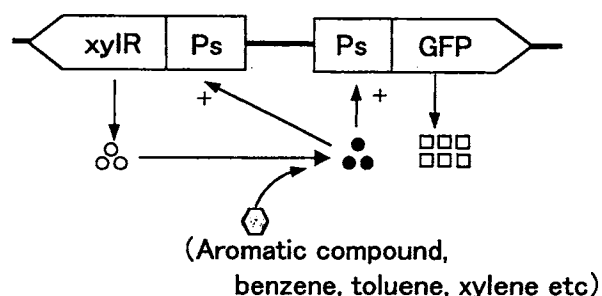


Fig.1 Gene expression system for GFP

### 3. 組換え大腸菌を用いたベンゼン系化合物検出における培地成分の影響

構築したバイオアッセイ系の更なる感度向上および簡便化を目指すため、そのベンゼン系化合物検出における培地成分の影響に関して検討した。ベンゼン系化合物誘導による GFP の発現に最適な培地は NZM 培地であった。その NZM 培地成分に関して、低濃度のベンゼン系化合物誘導において、casamino acids による *Ps*-*XylR* の相互作用の阻害が見られたため、NZM 培地に casamino acids を添加しない NZM 培地が最適であることが分かった。また、培養液中に ATP を添加することで低濃度のベンゼン系化合物による GFP 誘導が効果的に現れ、その最適 ATP 濃度は 200 μM であった。得られた最適培地 (NZM (no casamino acids)) と ATP 添加の条件で *m*-xylene の検出限界は 0.01mM であった。*m*-xylene においては、LB 培地を用いた時の結果である 0.1 mM と比較すると検出限界が 10 倍向上した。しかしながら *xylene* の環境排出基準である 0.4 ppm (約 4 μM) を検出するにはさらなる検討が必要である。

### 4. 本検出システムの応用

発現された GFP はその自己発光を電気シグナルとして信号数値化により評価してきた。センサーとしての数値化した信号は制御しやすい利点があるが、一般的に普及するにはその蛍光を目視で確認することもより重要である。また、この微生物センサーにおける *Ps*-*XylR* の相互作用を生体外 (*in vitro*) においても同じ作用を示すことが確認できれば、それらの素子のみを利用したセンサーの構築が可能となり、培養時間や微生物を制御する手間を省く事ができるため、より迅速なセンサーに成り得る可能性を秘めている。そこで、*in vivo* における *XylR*、*Ps* プロモーターを用いた大腸菌センサーの研究の応用として、24 穴プレートを用いたベンゼン系化合物の簡易測定法の確立を検討

し、またその生体内で起こる XylR - *Ps* の結合性を応用し、SPR シグナルを用いた *in vitro* におけるセンサーの構築を試みた。

*in vivo* における 24 穴プレートを用いたベンゼン系化合物の簡易測定法の確立に関して、ベンゼン系化合物に *m*-xylene を用い、その培養条件と ATP 添加の影響を検討した。その結果、本培養開始時における菌体の添加割合は 2.5% が最適であり、ATP 添加により、GFP 蛍光の増加がイメージにより確認できた。また、各濃度の *m*-xylene 誘導による GFP イメージを観察することができ、簡易にそして多サンプルにベンゼン系化合物を測定できるバイオアッセイの礎となった。

*in vitro* センサーへの応用として、発現調節タンパク質である XylR、および *Ps* プロモーターを用い、相互作用による *m*-xylene の検出を SPR センサーで確認した。リガンドとして *Ps* プロモーター領域の DNA を固定化し、アナライトとして 277nM 濃度の XylR を添加したとき、*m*-xylene の有無により、その SPR シグナルは有意な差が見られ、SPR シグナルによる *Ps*-XylR の結合が確認できた。しかし、*m*-xylene の濃度変化による検出までには至らなかった。この *in vitro* センサーにおける検出法は測定時間も 5 分程度であり迅速である。*In vitro* における結果は、現時点ではベンゼン系化合物を確実に定量出来るレベルには至っていないが、迅速性及び定量性に関して有用なアッセイ系へと発展する可能性があると考えられる。

## 5. 結言

本研究において、*pseudomonas* 属由来 *Ps* プロモーター、XylR を利用したベンゼン系化合物に応答して GFP を発現させるベクターを作製し、その形質転換大腸菌を用いたベンゼン系化合物に特異的に感受性を持つバイオアッセイ系の構築を行った。また、その培養特性を検討することにより感度を向上させることができた。そして、その応用として 24 穴プレートを用いた簡易測定法の確立と *Ps* プロモーター、XylR を生体機能性素子として用い、SPR センサーによる *in vitro* センサーへの適応を試みた。しかし、その感度は、実用化できるレベルまでに至らなかった。今後の問題として、感度向上させるためには遺伝子 XylR の変異体について検討の必要があると考えられる。転写調節タンパク質である XylR を DNA シャッフリングや点変異をかけ、様々なライブラリーを作成し、高感度で特異的に活性化する XylR の変異体を詮索し、それらを用いたバイオアッセイ系を構築すれば飛躍的に感度を向上させることが期待できる。

## 学位論文審査結果の要旨

本学位申請論文に関し、平成15年1月28日に第1回審査委員会を開催し、審査方針を決定すると共に、論文の内容について検討した。さらに、1月29日に行われた口頭発表の後に2回の審査委員会を開催し、慎重に審議した結果、以下の様に判定した。

本研究はキシレン分解能を有する *Pseudomonas putida* に着目し、細胞内で起こるキシレン分解反応の遺伝子レベルでの解析からその生体機能性素子 (DNA, タンパク質) を同定した。これより、ベンゼン系化合物を特異的に認識してレポータータンパク質 GFP を発現する遺伝子組換え大腸菌によるバイオアッセイ系を構築し、このアッセイ系がベンゼン環にメチル基及びクロロ基を有する化合物を特異的に検知できることを明らかにした。また、その培養特性の検討により検知感度を大きく向上させ、この組換え微生物を用いた有機系化学物質の評価・検討を行い環境モニタリングにおける生物学的測定的重要性を示した。さらに受容体・ベンゼン系化合物相互作用を SPR センサで解析し、バイオアフィニティーセンサ構築のための基礎データを集積した。

以上の研究成果は、環境モニタリングを可能とするレポーター微生物の創製及びその計測技術の開発に大きく貢献するものであり、工学的価値が大きいと認められることから、本審査委員会は本論文が博士 (工学) に値すると判断した。