

広島大学学位請求論文

有機溶媒耐性細菌 *Rhodococcus opacus*  
B4 株のゲノム加工技術の開発と  
その基礎研究、応用研究への適用

( Development of Genomic Modification  
System in Solvent-Tolerant *Rhodococcus*  
*opacus* Strain B4 and Its Application to  
Basic Researches and Molecular Breeding )

2009 年

広島大学大学院先端物質科学研究科  
分子生命機能科学専攻

喜多 晃久

# 目次

## 1. 主論文

有機溶媒耐性細菌 *Rhodococcus opacus* B4 株のゲノム加工技術の開発とその基礎研究、応用研究への適用

( Development of Genomic Modification System in Solvent-Tolerant *Rhodococcus opacus* Strain B4 and Its Application to Basic Researches and Molecular Breeding)

喜多 晃久

## 2. 公表論文

- (1) Development of Unmarked Gene Modification System in Organic Solvent-Tolerant *Rhodococcus opacus* Strain B4  
AKIHISA KITA, NOBORU TAKIGUCHI, and JUNICHI KATO  
*Journal of Environmental Biotechnology*, 9, 25-29, (2009).
- (2) Cloning and Characterization of *sigA* and *sigB* Genes from *Rhodococcus opacus* Strain B4: Involvement of *sigB* in Organic Solvent Tolerance  
AKIHISA KITA, NOBORU TAKIGUCHI, and JUNICHI KATO  
*Journal of Environmental Biotechnology*, 9, 43-50, (2009).

# 主論文

## 目次

第 1 章 序論	1
第 1 節 背景	1
第 2 節 本論文の概要	4
第 2 章 <i>R. opacus</i> B4 株におけるノンマーカ－遺伝子組換え技術の確立	6
第 1 節 緒言	6
第 2 節 実験材料および方法	7
2.2.1 使用菌株およびプラスミド	7
2.2.2 使用プライマーおよび PCR	9
2.2.3 遺伝子操作	9
2.2.4 <i>R. opacus</i> B4 株からの染色体抽出	9
2.2.5 プラスミドの構築	10
2.2.5.1 pG19-0.2～pG19-2.0 の構築	10
2.2.5.2 pG19-dbnz の構築	10
2.2.5.3 pG19-Pkm-bnz の構築	10
2.2.6 B4 株のエレクトロポレーションによる形質転換	11
2.2.7 ノンマーカ－遺伝子組換え	11
2.2.8 相同組換えによる染色体への挿入組み込み効率	11
2.2.9 2 回目の相同組換えの効率	11
2.2.10 遺伝子組換え株の確認	11
2.2.11 リアルタイム-RT-PCR による <i>bnzA</i> 転写量の確認	12
第 3 節 結果と考察	12
2.3.1 ノンマーカ－遺伝子組換え技術の原理	12
2.3.2 相同組換えによる染色体への挿入組換え効率	13
2.3.3 ノンマーカ－遺伝子組換えによる遺伝子破壊	14
2.3.4 ノンマーカ－遺伝子組換えによる外来遺伝子の位置特異的挿入	17
第 4 節 要約	21
第 3 章 <i>R. opacus</i> B4 株における有機溶媒耐性機構の解明	22
第 1 節 緒言	22
第 2 節 実験材料および方法	22
3.2.1 使用菌株およびプラスミド	22
3.2.2 使用プライマーおよび PCR	24
3.2.3 遺伝子操作	28
3.2.4 <i>R. opacus</i> B4 株からの染色体抽出	28
3.2.5 プラスミドの構築	28
3.2.5.1 pG19-dsigB の構築	28
3.2.5.2 pKNR-sigB の構築	28
3.2.5.3 pKNR-bnzCB の構築	28

3.2.5.4	pKNR-ep21、pKNR-ep24 の構築	29
3.2.6	エレクトロポレーション	29
3.2.7	リアルタイム-RT-PCR	29
3.2.8	エタノール、熱、トルエン、ストレス条件下での培養	29
3.2.9	有機溶媒ストレス条件下での培養	29
3.2.10	<i>sigB</i> 破壊株およびその派生株の構築	30
3.2.11	<i>dsigB</i> 株のストレス耐性試験	30
3.2.12	有機溶媒耐性試験	30
第3節	結果と考察	31
3.3.1	<i>sigA</i> および <i>sigB</i> の転写解析	31
3.3.2	<i>sigB</i> 破壊株の構築とストレス耐性	33
3.3.3	<i>dsigB</i> 株の有機溶媒耐性	36
3.3.4	有機溶媒耐性に関与する遺伝子の探索	38
3.3.4.1	ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子	38
3.3.4.2	efflux pump	40
3.3.4.3	分子シャペロン	44
3.3.4.4	その他のシグマファクター	46
第4節	要約	48
第4章	<i>R. opacus</i> B4 株を用いたトルエンからのクレゾール生産	50
第1節	緒言	50
第2節	実験材料および方法	50
4.2.1	使用菌株およびプラスミド	50
4.2.2	仕様プライマーおよび PCR	52
4.2.3	遺伝子操作	53
4.2.4	<i>R. opacus</i> B4 株からの染色体抽出	53
4.2.5	プラスミドの構築	53
4.2.5.1	<i>bnzA</i> 発現ベクターの構築	53
4.2.5.2	pG19-dph1 の構築	53
4.2.5.3	pG19-dbnz2 の構築	53
4.2.5.4	pG19-dph12 の構築	54
4.2.6	エレクトロポレーションによる形質転換	54
4.2.7	二層培養システム	54
4.2.8	HPLC による分析	54
4.2.9	ノンマーカージェノ型組換え	54
4.2.10	有機溶媒資化テスト	55
4.2.11	リアルタイム-RT-PCR	55
第3節	結果と考察	55
4.3.1	B4 組換え株によるトルエンからのクレゾール生産	55
4.3.2	<i>phl</i> オペロンの破壊	59
4.3.3	フェノールヒドロキシラーゼ遺伝子の探索と破壊	61

4.3.4 dPCZ-P2 株を用いたクレゾール生産	68
第4節 要約	69
第5章 総括	70
引用文献	72
謝辞	77

# 第1章

## 序論

### 第1節 背景

現在、疎水性ケミカルの生産は化学合成法が主流であるが、高温・高圧・多段階のプロセスを必要とするため、石油を原料としてだけでなく、エネルギーとしても多量に消費しており、コスト・環境面での負荷が大きい。例えば、重要な化学物質であるフェノールの生産にはクメン法が用いられている。クメン法ではベンゼンとプロピレンを200~300℃で反応させてクメンを得て、それを90~130℃で酸化してクメンヒドロパーオキシドとし、さらに硫酸で分解してフェノールとアセトンを得る (Fig.1-1.)。また、クレゾールを生産するためには、フェノールをさらに300~360℃で反応させる必要がある。一方、生体触媒を用いたバイオプロセスによる物質生産では、常温・常圧・一段階での反応が可能であり、さらに、高い反応特異性・立体選択性を伴った反応が可能である[1,2]。そこで、石油化学プロセスの一部に生体触媒を用いたバイオプロセスを導入できれば、生産プロセスの環境適合性を大幅に向上させることが出来ると期待される[3]。

これまで、生体触媒を用いた物質生産はアミノ酸発酵[4-6]など親水性のバイオプロセスにおいて大成功を収めてきた。しかしながら、バルク化学品の工業的生産に成功した例はニトリルヒドラターゼを用いたアクリロニトリルからのアクリルアミドの生産しかない[7]。環境調和型のバイオプロセスにおいて最も重要な反応は酸化還元反応であるといわれている。そのうち、酸化反応に用いる生体触媒には水酸基を付加するオキシゲナーゼやヒドロキシラーゼなどが考えられるが[8,9]、現在のところ、石油炭化水素の酸化反応に関してバイオプロセスを導入し、成功した例はまだ無い。その大きな理由の一つは、疎水性の原料および生産物が有する強い生物毒性が大きな問題となるためである[8,9]。

しかし、1989年に Inoue らがトルエンに耐性を持つ *Pseudomonas putida* IH-200 を取得[10]して以来、様々な有機溶媒耐性細菌が分離されてきた。例えば、有機溶媒に安定なリパーゼを生産する *Staphylococcus saprophyticus* M36 株は25%の疎水性有機溶媒（ベンゼン、トルエン、キシレン、*n*-ヘキサン）に対して耐性を持つと報告されている[11]。Drijber らによって分離されたグラム陽性細菌 *Staphylococcus haemolyticus* は高度な有機溶媒耐性を示し、平板重層法において100%のトルエン、ベンゼン、*p*-キシレンに耐性を持っていた[12]。このほかにも様々な有機溶媒耐性細菌が報告されており[13-15]、

本研究室においても有機溶媒耐性を持つ *P. putida* T-57 株 [16]、*Rhodococcus opacus* B4、B9、B10 株 [17,18] が土壌より分離された。*P. putida* T-57 はテトラデカン、オレイルアルコール、*n*-デカン、*n*-オクタン、*n*-ヘキサン、プロピルベンゼン、フタル酸ジエチル、シクロヘキサン、*o,m,p*-キシレン、エチルベンゼン、スチレン、トルエンに対する耐性を有していた。しかしながら、耐性と資化性を同時に有する有機溶媒は、テトラデカン、エチルベンゼン、トルエンのみであり、有機溶媒耐性と有機溶媒の資化性は必ずしも一致していなかった。一方、*R. opacus* B4 株は *n*-デカン、*n*-オクタン、プロピルベンゼン、*n*-ヘキサン、フタル酸ジエチル、シクロヘキサン、エチルベンゼン、*o,m,p*-キシレン、スチレン、トルエン、ベンゼンに耐性と資化性を有していた。

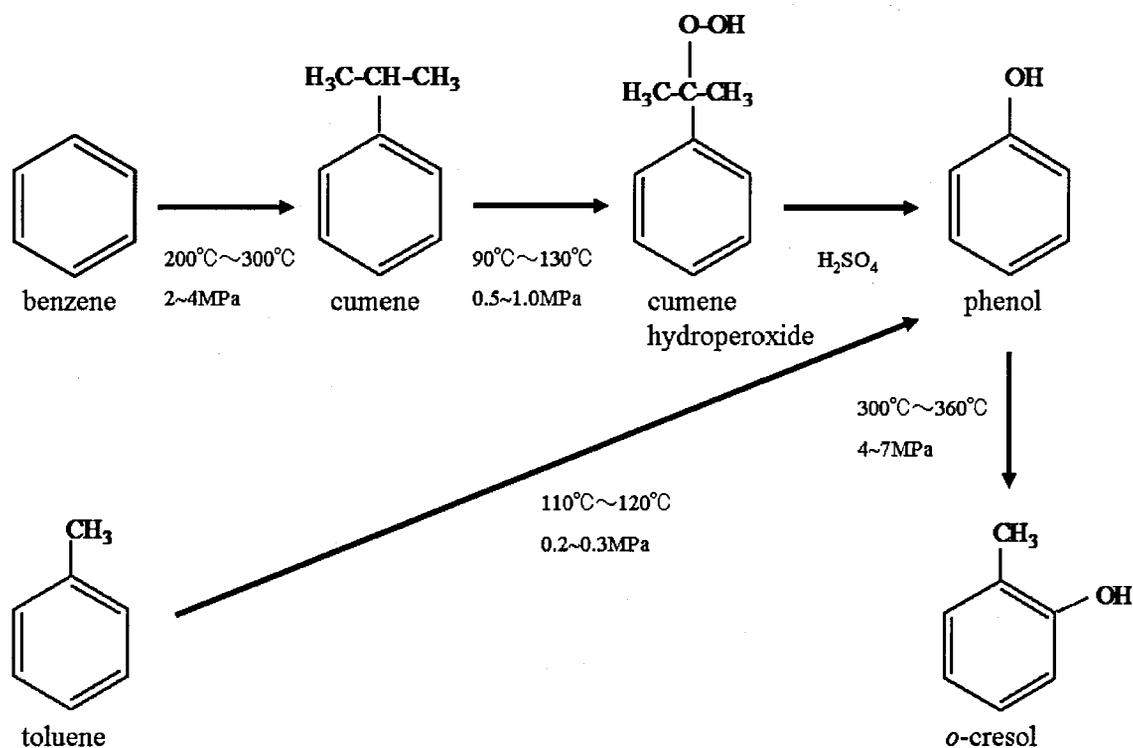


Fig.1-1 石油化学プロセスによる benzene/toluene からの phenol/cresol 生産

有機溶媒存在下での微生物による物質変換の例も、数多く報告されている。Aonoらは *Pseudomonas* sp. ST-200 株を用いて、ジフェニルメタン中でのコレステロールの酸化反応を報告している[19]。また、Doukyuらは高濃度インドールからインジゴを高生産することにも成功している[20]。Parkらは *Pseudomonas* sp. VLB120DeltaC 株を用いた、二相系培養システムによるスチレンのエポキシ化反応について報告している。グルコースを炭素源としたバイオ変換により、有機溶媒相で最大 83mM のスチレンオキシドを生産した[21]。興味深い研究としては、再生可能資源からの芳香族化合物の生産として、Wierckx らの研究が挙げられる。*P. putida* S12 株を用いてグルコースからチロシンまたはフェニルアラニンの合成経路経由でフェノールの生産を試み、フェノールの蓄積に成功しているが、実用化には課題が多いようである[22,23]。本研究室においても Fizal らにより、*P. putida* T-57 株のトルエンジオキシゲナーゼ経路 (Fig.1-2) を利用して、トルエンからの *o*-クレゾール[16]、3-メチルカテコール[23]の生産に成功している。Fizal らはトルエンジオキシゲナーゼオペロンの *TodD* 破壊株を構築し、二相系培養システムを用いて 72 時間でトルエンから 11.4g/l の *o*-クレゾールを生産した。二相系培養システムとは培養液に有機溶媒を重層し、培地相と有機溶媒相の境界面で物質変換を行い、有機溶媒相で疎水性生産物を回収するという方法である。Fizal らは有機溶媒相にオレイルアルコールを用いた。また、*TodE* 破壊株を構築して、同じく二相系培養システムの有機溶媒相にオレイルアルコールを用いて、最大で約 24mM の 3-メチルカテコールを生産した。

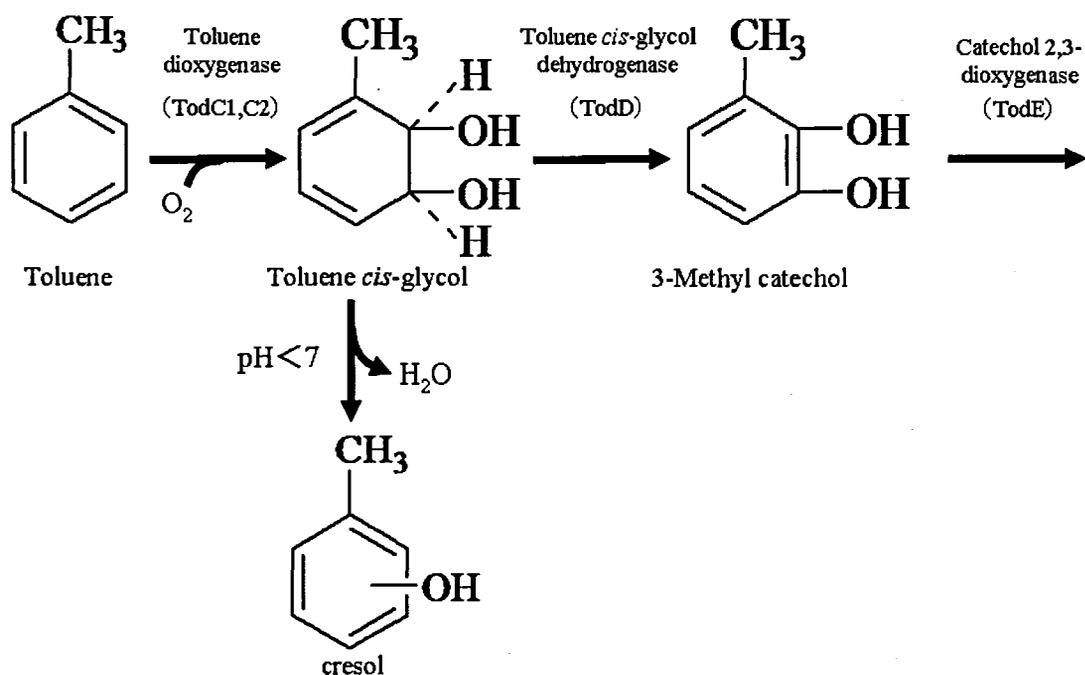


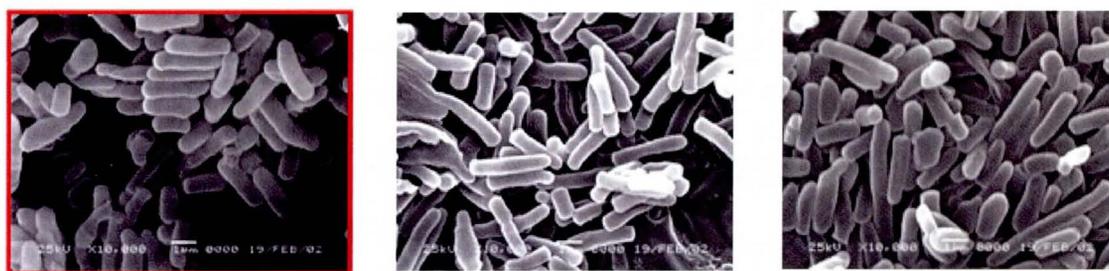
Fig.1-2. *P. putida* T-57 株のトルエン代謝経路

有機溶媒耐性細菌における有機溶媒耐性機構の解明も疎水性バイオプロセス構築のためには必須の研究課題であり、非常に興味深い。グラム陰性菌における有機溶媒耐性機構に関する研究はこれまでに多数報告されており、特に大腸菌や *Pseudomonas* 属の細菌における報告が多い。現在までに解明されている耐性機構としては、efflux pump による有機溶媒排出機構[24-28] や膜の形態変化[29-34]、分子シャペロンの誘導などが報告されている[35-37]。一方、グラム陽性細菌における有機溶媒耐性機構はグラム陰性菌に比べると進んでいないが、*Bacillus* 属細菌などではストレスレギュロンである RNA ポリメラーゼシグマ因子の関与が予測されている[38-40]。

今後、これらの研究がさらに進むことにより、石油化学プロセスの一部にバイオプロセスを導入することが出来れば、地球環境にもやさしい物質生産が実現できると期待される。

## 第2節 本論文の概要

本研究の最終的な目標は、石油化学プロセスに疎水性バイオプロセスを導入し、その環境適合性を大幅に向上させることである。疎水性バイオプロセス、ことに酸化還元プロセスでは生体触媒として菌体を用い、細胞内で代謝エネルギーを供給しつつ目的の反応を行わせるのが有利であるが、その際に、疎水性の原料および生産物が有する強い生物毒性が大きな問題となる。しかしながら、本研究においては前任者の研究において様々な有機溶媒に耐性・資化性を持つ *R. opacus* B4 株、B9 株、B10 株の取得に成功しており (Fig.1-3) [17]、*R. opacus*-*E. coli* シャトルベクターの構築、エレクトロポレーションによる遺伝子導入技術にも成功している[41]。そこで、本研究は、まずバイオプロダクションに有利な *R. opacus* B4 株の安定な遺伝子の欠失や挿入を可能とする染色体加工技術の構築を行った。ついで、その技術を用いて B4 株における有機溶媒耐性機構の解明、そして B4 株を用いたトルエンからのクレゾール生産を目指した。



*R. opacus* B4

*R. opacus* B9

*R. opacus* B10

Fig.1-3 有機溶媒知性細菌 *R. opacus* B4,B9,B10 株

本稿は次の内容で構成されている。

### 第 1 章：序論

### 第 2 章：*R. opacus* B4 株におけるノンマーカ―遺伝子組替え技術の確立

B4 株におけるこれまでの遺伝子組換え技術としては、ダブルクロスオーバーの相同組換えを利用した遺伝子置換が用いられてきた。しかし、この方法では遺伝子修飾の可能な回数が置換マーカ―（すなわち抗生物質耐性置換マーカ―）の数により制限されてしまう。そこで、グラム陰性菌で一般的に用いられているスクロース感受性を付与する遺伝子 *sacB* を利用したノンマーカ―遺伝子組換え技術の確立を目指した。また、B4 株のベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子 *bnzA1A2A3A4* のプロモーターをカナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) のプロモーターと置換し、ベンゼン・トルエン誘導性の *bnz* オペロンの発現を構成的に発現させることを試みた。

### 第 3 章：*R. opacus* B4 株における有機溶媒耐性機構の解明

第 3 章では *sigB* 破壊株の構築と、*sigB* 破壊株におけるストレス耐性、有機溶媒耐性について報告する。*R. opacus* B4 株を初め、グラム陽性細菌は有機溶媒耐性を持つ株が多数報告されているが、その有機溶媒耐性機構に関してはほとんど解明されていない。そこで、本章では B4 株の有機溶媒耐性機構の解明を目指した。

### 第 4 章：*R. opacus* B4 株を用いたトルエンからクレゾールの生産

*R. opacus* B4 株は *bnz* オペロンにコードされたトルエン代謝経路を有している。そこで、本章では B4 株を用いた疎水性バイオプロセスのモデル系として、トルエン代謝経路を利用したトルエンからのクレゾールを目指した。

## 第2章

# *R. opacus* B4株における ノンマーカ―遺伝子組換え技術の確立

### 第1節 緒言

*R. opacus* B4株は様々な有機溶媒に耐性を持つため (Table2-1) [17]、疎水性バイオプロセスにおける宿主として有望である。本研究室ではこれまでに B4株と大腸菌におけるシャトルベクター pKNR01.1 を構築し、エレクトロポレーションによる遺伝子導入技術を確認してきた [41]。しかし、B4株を次世代宿主として工業的に活用するためには、安定に遺伝子改変変異形質を保持させるために染色体加工技術が必須となる。これまで、*Rhodococcus* 属における染色体加工技術としては、ダブルクロスオーバーの相同組み換えと抗生物質耐性マーカ―を利用した遺伝子置換や、トランスポゾンを利用した遺伝子のランダム破壊またはランダム挿入が主流であった [42]。しかしながら、これらの方法では破壊または挿入できる遺伝子数が使用できる抗生物質耐性マーカ―の数によって制限されてしまうため、多数の遺伝子の組換えには向いていない。

そこで本研究では、B4株における *sacB* を利用したノンマーカ―遺伝子組換え技術の確立を目指した。そして、ノンマーカ―遺伝子組換え技術を利用して、*bnz* オペロン (*bnzA1A2A3A4,C,B*) のノンマーカ―破壊と、*bnzA* プロモーターをカナマイシン耐性遺伝子のプロモーターに置換することで確立した技術の有効性を検証した。

**Table2-1** *R. opacus* B4 株の有機溶媒に対する耐性と資化性  
 有機溶媒は log P<sub>ow</sub> (octanol-water 分配係数の対数) の順に表示。

	log P <sub>ow</sub>	Solvent	Utilization	Tolerance
Hydrophobic	5.6	<i>n</i> -Decane	+	+
	4.6	<i>n</i> -Heptane	+	+
	4.5	<i>n</i> -Octane	+	+
	3.6	Propylbenzene	+	+
	3.5	<i>n</i> -Hexane	+	+
	3.3	Diethylphthalate	+	+
	3.2	Cyclohexane	+	+
	3.2	Ethylbenzene	+	+
	3.2	<i>m</i> -Xylene	+	+
	3.2	<i>p</i> -Xylene	+	+
	3.1	<i>o</i> -Xylene	+	+
	3.0	Styrene	+	+
	2.5	Toluene	+	+
	2.4	<i>n</i> -Heptanol	-	-
Toxic	2.3	Dimethylphthalate	+	+
	2.0	Benzene	+	+
	2.0	Chloroform	-	-
	0.8	<i>n</i> -Butanol	-	-

## 第2節 実験材料および方法

### 2.2.1 使用菌株およびプラスミド

使用菌株およびプラスミドは Table2-2 に示した。*R. opacus* B4 株および派生株は TSB 培地 (Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) を用い、28°C で振とう培養した。トルエンを唯一炭素源として培養する際は、MSB 培地 (4.3 g of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.4 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.34 g of MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.001 g of MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.006 g of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.026 g of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 mg of Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01 mg of ZnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 mg of CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 mg of CuSO<sub>4</sub>, 0.001 mg of NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 0.001 mg of Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> per liter of deionized water) [18] を用いた。寒天培地の調製では、寒天を 15g/l 添加し、スクロース感受性株のスクリーニングでスクロースを入れる際は、50g/l、100g/l、150g/l、200g/l となるように加えた。*Escherichia coli* MV1184[43] はプラスミド構築および遺伝子操作のために使用した。MV1184 は Luria Bertani (LB) 培地[45] を用いて、

37°Cで振とう培養した。LB寒天培地の調整には寒天を15g/l加え、スクロースを入れる際は50g/lとなるように加えた。必要に応じてB4株には5mg/l、大腸菌には10mg/lのゲンタマイシンを加えた。

**Table 2-2 使用菌株およびプラスミド**

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<b><i>E. coli</i></b>		
MV1184	<i>ara</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) Δ( <i>srl-recA</i> )306:: <i>Tn10</i> (Tc <sup>r</sup> ) F' <i>[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ</i> ΔM15]	[43]
<b><i>R. opacus</i></b>		
B4	有機溶媒耐性細菌。	[17]
dbnz	B4派生株, <i>bnzA1A2A3A4CB</i> ノンマーカ破壊株。	This study
B4Pkm-bnz	B4派生株, <i>bnz promoter-kan promoter</i> ノンマーカ置換株。	This study
<b>Plasmids</b>		
pUC4K	1.3-kb カナマイシン耐性遺伝子( <i>kan</i> )を持つ pUC8 ;Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> 。	[43]
pG19II	ノンマーカ遺伝子組換え用プラスミド。ポジティブマーカとして Gm 耐性遺伝子、カウンターセレクションマーカとして <i>sacB</i> を持つ。	[44]
pG19-0.2	pG19II のマルチクローニングサイト(MCS)に <i>bnzA1</i> 上流 0.2kb を挿入。	This study
pG19-0.5	pG19II の MCS に <i>bnzA1</i> 上流 0.5kb を挿入。	This study
pG19-1.0	pG19II の MCS に <i>bnzA1</i> 上流 1.0kb を挿入。	This study
pG19-1.5	pG19II の MCS に <i>bnzA1</i> 上流 1.5kb を挿入。	This study
pG19-2.0	pG19II の MCS に <i>bnzA1</i> 上流 2.0kb を挿入。	This study
pG19-dbnz	<i>bnz</i> オペロン破壊用プラスミド。 <i>bnzA1</i> 上流および <i>bnzB</i> 下流領域を含む。	This study
pG19-Pkm-bnz	<i>kan</i> プロモーター挿入用プラスミド。 <i>bnzA1</i> 上流および <i>bnzA1A2</i> 内部領域、 <i>kan</i> プロモーターを含む。	This study

Ap:ampicillin, Km:kanamycin, Gm:gentamycin

### 2.2.2 使用プライマーおよび PCR

本研究で使用したプライマーは Table 2-3 に示した。PCR には KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) を用い、メーカーの指定する使用法に従って行った。

Table 2-3 使用プライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
bnzA-200-F	TGGAAGCTTAGCCGTTGGTATCGAACC
bnzA-500-F	TGGAAGCTTCCATCGCTGGAAGTACC
bnzA-1000-F	TGGAAGCTTCGTAGTCGTGGTCAAGTC
bnzA-1500-F	TGGAAGCTTAGTGACAACCTCGACCAGG
bnzA-2000-F	TGGAAGCTTATCCGACCCAACACCTG
bnzA-H-R1	ACGTTTAAACAACCAATATGGTCGTGATCG
bnzA1500-R	GTGGTTCGGATTGGCATG
bnzA0-2R	AGAAGACTGCAGCCTTACGGCAACCAATATGGTC
bnzS0-2F	AGAAGACTGCAGAACAACAGCGAACGACACCAGG
bnzS0-2R	AGAAGATCTAGATCGCGTTTCCTCCATCGCTATC
bnzA-kp-F12	ACGAAGCTTGGTCATCAATCCGATCATTGC
bnzA-kp-R12	ACTGGTACCATGCAGGTGATGGCGTG
bnzA-kp-F2	ACGTCTAGACACTAACGACCGTACAAGTG
bnzA-kp-R2	ACGTTTAAAGTTCTGTTTCAGGTGGAGAC
pk-F	ACTGGTACCTGTGGAATTGTGAGCGGATACC
pk-R	ACGTCTAGAGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAG
bnzA-RT-F	TGTACGAACAGGAACTGGAG
bnzA-RT-R	ATCCTCGCCCATGTAGTTC
gyrB-RT-F	GTCTACAGCTTCGAGACG
gyrB-RT-R	TGACGACCTCTTCGGTG

### 2.2.3 遺伝子操作

大腸菌プラスミド DNA の抽出、制限酵素処理、ライゲーション、大腸菌の形質転換、アガロースゲル電気泳動は標準的な方法に従って行った[45]。PCR 産物のゲル抽出は 1%アガロースゲル電気泳動を行った後、GeneCleanII kit (Bio101, Carlsbad, CA, USA) を用いて精製した。

### 2.2.4 *R. opacus* B4 株からの染色体抽出[18]

B4 株を TSB 液体培地で 24~36 時間振とう培養(28°C)した。培養液 1.5ml を 1.5ml 遠心チューブにとり、20400×g で 2 分間遠心し集菌した。遠心上清を、ピペットマンを用いて完全に除去した。Lysozyme 10g/l を含む GTE540μl を加えて菌体を懸濁し、37°C で 1 時間以上保温した。10mg/ml Proteinase K を 5μl 添加・混合し、さらに 10%SDS を 60μl 添

加した後、50°C で 30 分以上保温した。溶菌後、氷中に静置し、冷却した。TE で飽和したフェノール/クロロホルムを 600 $\mu$ l 加え、10 分間混合した後、20400 $\times$ g で 5 分間遠心分離した。遠心上清を新しいチューブに移し、TE で飽和したフェノール/クロロホルムを 600 $\mu$ l 加え、10 分間混合した。20400 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、遠心上清を新しいチューブに移した。20400 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、混合していた白色沈殿をチューブの底に沈殿させた。白色沈殿を吸わないように気をつけ、400 $\mu$ l を新しいチューブに移した。3M CH<sub>3</sub>COONa(pH7.0)を 40 $\mu$ l 加えて混合した。さらに 99.5%エタノールを 1ml 添加して混合した。この段階で、DNA と RNA は白いもやもやした物質として観察された。5 分間氷中で静置した後、20400 $\times$ g で 5 分間遠心した。遠心上清を捨てた後、70%エタノールでペレットを洗浄した。20400 $\times$ g で 5 秒間遠心し、チューブの壁についた液を完全にチューブの底に集めた。ピペットマンを用いて、液を完全に取り除き、滅菌水 100 $\mu$ l に沈殿を懸濁した。

## 2.2.5 プラスミドの構築

### 2.2.5.1 pG19-0.2~pG19-2.0 の構築

B4 株の染色体 DNA を鋳型にして、プライマー *bnzA*-200-F/*bnzA*-H-R1、*bnzA*-500-F/*bnzA*-H-R1、*bnzA*-1000-F/*bnzA*-H-R1、*bnzA*-1500-F/*bnzA*-H-R1、*bnzA*-2000-F/*bnzA*-H-R1 を用いて PCR を行い、それぞれ *bnzA1* 上流 0.2kbp、0.5kbp、1.0kbp、1.5kbp、2.0kbp の PCR 産物を得た。PCR 産物をゲル抽出した後、*Sma*I で処理した pG19II に挿入し、pG19-0.2、pG19-0.5、pG19-1.0、pG19-1.5、pG19-2.0 を構築した。

### 2.2.5.2 pG19-dbnz の構築

B4 株の染色体 DNA を鋳型にして、プライマー *bnzA*1500-F/*bnzA*0-2R、*bnzS*0-2F/*bnzS*0-2R を用いて *bnzA* 上流および *bnzB* 下流領域を PCR 増幅した。それぞれ、*Hind*III/*Pst*I、*Pst*I/*Xba*I で処理した後、*Hind*III/*Xba*I で処理した pG19II に挿入して、*bnz* オペロン破壊用プラスミド pG19-dbnz を構築した。

### 2.2.5.3 pG19-Pkm-bnz の構築

B4 株の染色体 DNA を鋳型にして、プライマー *bnzA*-kp-F12/*bnzA*-kp-R12、*bnzA*-kp-F2/*bnzA*-kp-R2 を用いて *bnzA1* 上流および *bnzA1A2* 内部領域を PCR 増幅した。また、プライマー *pk*-F/*pk*-R を用いて、pUC4K のカナマイシン耐性遺伝子プロモーター領域を PCR 増幅した。それぞれ、*Hind*III/*Kpn*I、*Xba*I/*Dra*I、*Kpn*I/*Xba*I で処理した後、*Hind*III/*Sma*I で処理した pG19II に挿入して、*kan* プロモーター挿入用プラスミド pG19-Pkm-bnz を構築した。

### 2.2.6 B4株のエレクトロポレーションによる形質転換

B4株におけるエレクトロポレーション法は、Electro Cell Manipulator 620 (BTX Inc., San Diego, CA, USA)を使用し、Naらが確立した方法に従って行った[41]。ただし、pG19IIはスクロース感受性を付与する*sacB*を含むため、pG19派生プラスミドを導入する際は、スクロースを含まないHG buffer (0.3M glycerol、7mM HEPES [pH7.0 by KOH])を用いた。まず、5 g/l グリシンを含むTSB液体培地で*R.opacus* B4株をOD<sub>600</sub>=0.5~1.0まで28°Cで振とう培養した。培養液を氷中で冷却し、遠心分離(4°C、91000×g、5分)した。上清を捨て、氷冷したHG bufferで3回洗浄し、1 ml~3mlのHG bufferに懸濁した。菌体懸濁液380 μlにプラスミド溶液20 μlを混合し、1.3kV、50 μF、725 Ωの設定でエレクトロポレーションを行った。ただちにTSB液体培地4 mlに全量を添加し、28°Cで振とう培養した。約24時間培養した後、抗生物質を含むTSB寒天培地に100~200 μlずつプレーティングした。

### 2.2.7 ノンマーカ―遺伝子組換え

ノンマーカ―遺伝子組換えは、遺伝子破壊にpG19-dbnz、遺伝子挿入にpG19-Pkm-bnzを用いて行った。各プラスミドをエレクトロポレーションによりB4株に導入して、TSB+ゲンタマイシン(5g/l)寒天培地で選択した後、TSB+ゲンタマイシン+スクロース20%寒天培地で生えてこない株を選択し、1回目のシングルクロスオーバー相同組換えを起こした株を得た。次に、1回目の相同組換え株をTSB液体培地で6時間培養し、TSB+スクロース20%培地でスクロース耐性株を選択することにより、2回目の相同組換え株を得た。遺伝子組換え株の確認はPCRにより行った。

### 2.2.8 相同組換えによる染色体への挿入組み込み効率

pG19-0.2~pG19-2.0をエレクトロポレーションによりB4株に導入し、得られたゲンタマイシン耐性株の数をカウントし、プラスミドDNA1 μgあたりの形質転換体出現率を出した。

### 2.2.9 2回目の相同組換えの効率

pG19-dbnzを導入して得られた1回目の相同組換え株をTSB液体培地で培養し、経時的にTSB培地およびTSB+スクロース20%培地に塗布した。TSB+スクロース培地で得られたコロニー数をTSB培地で得られたコロニー数で割ることにより2回目の相同組換え効率を求めた。

### 2.2.10 遺伝子組換え株の確認

遺伝子組換え株はPCRによって確認した。*bnz*オペロン破壊株(dbnz)の確認はプライマーbnzA-2000F/bnzS0-2RおよびbnzA-RT-F/bnzA-RT-Rを用いた。*kan*プロモーター挿入株(B4Pkm-bnz)の確認はプライマーpk-F/bnzA1500-Rを用いた。

## 2.2.11 リアルタイム逆転写 PCR (RT-PCR) による *bnzA1* 転写量の確認

B4 株および B4KP 株を TSB 寒天培地および TSB 寒天培地を密閉容器 (タッパー) に入れてトルエン蒸気を供給し、約 48 時間 28°C で培養した。プレートから菌体を少量かきとり、RNAprotect bacteria reagent (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) を用いて RNA 安定化を行った。総 RNA の抽出は RNeasy kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) を使用し、メーカーの指定する使用方法に従った。リアルタイム-RT-PCR は LightCycler system (Roche diagnostics) を用いて行い、試薬は One Step SYBR®PrimeScript® RT-PCR Kit (TaKaRa Bio) を使用し、メーカーの指定する使用方法に従って行った。内部標準には DNA ジャイレース遺伝子 *gyrB* (プライマー *gyrB*-RT-F/*gyrB*-RT-R) を用いた。*bnzA* 測定用のプライマーは *bnzA*-RT-F/*bnzA*-RT-R を用いた。

## 第3節 結果と考察

### 2.3.1 ノンマーカ―遺伝子組換え技術の原理

pG19II は *Pseudomonas aeruginosa* の位置特異的遺伝子破壊のために構築されたプラスミドで、ポジティブマーカ―としてゲンタマイシン耐性遺伝子、カウンターセレクトションマーカ―としてスクロース感受性を付与する *sacB* 遺伝子、マルチクローニングサイト (MCS)、トランスファーオリジン *oriT* および大腸菌の複製開始点 *oriV* を有している [44]。ノンマーカ―遺伝子組換え技術の原理は Fig.2-1 に示す。まず、削除の対象となる遺伝子上流および下流の DNA 配列を連結して挿入した pG19II derivative を作製する。B4 株に作製したプラスミドを導入し、ゲンタマイシン耐性株を選択することで第 1 回目のシングルクロスオーバーの相同組換えが起こった株を選択する。この株はゲンタマイシン耐性、スクロース感受性を示す。次に、この株をゲンタマイシンおよびスクロースを含まない培地で培養する。その後、スクロースを含んだ培地で 2 回目の相同組み換えを起こした株 (ゲンタマイシン感受性、スクロース耐性) を選択する。2 回目の相同組み換えを起こした株は理論的には 50% の確率で遺伝子欠損を起こす。

また、Fig.2-1. はノンマーカ―遺伝子破壊のスキームであるが、特定の部位の上流配列と下流配列の間に、挿入したい配列を挟んで pG19II にクローニングし、そのプラスミドを用いて Fig.2-1. と同じ操作をすれば、位置特異的に特定の DNA 配列をノンマーカ―で挿入することもできる。

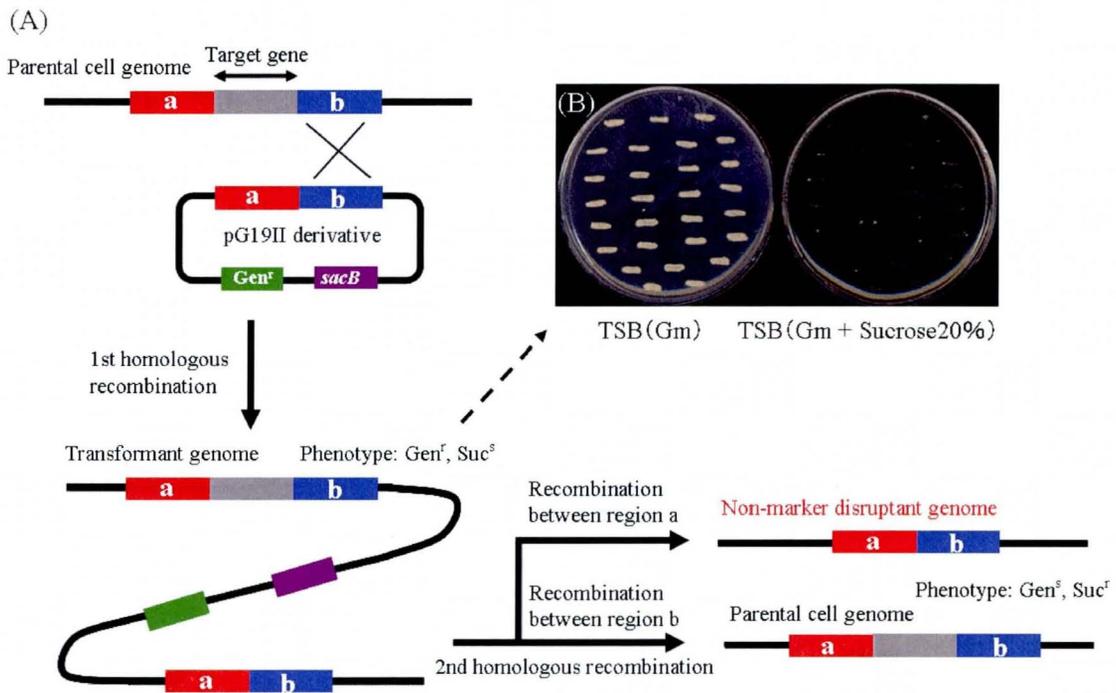


Fig.2-1 ノンマーカ遺伝子組換えの原理

(A)ノンマーカ遺伝子組換えの原理。(B)1回目の相同組換え株は Gm 耐性を示したが、スクロース 20%には感受性を示した。

Gm : gentamycin, Suc : sucrose

### 2.3.2 相同組換えによる染色体への挿入組み込み効率

pG19II はカウンターセクションマーカーとして用いることが出来る *sacB* 遺伝子を搭載している。そこで、まず初めに *sacB* を持つ B4 株の形質転換株をカウンターセレクトするためのスクロース濃度について検討した。pG19-1.5 をエレクトロポレーションにより B4 株に導入し、得られたゲンタマイシン耐性形質転換株を 0~20%のスクロースと 5mg/l ゲンタマイシンを含む TSB 寒天培地に植菌して 28°C で培養した。0~10%のスクロースは形質転換株のコロニー形成に影響を及ぼさなかった。15%スクロースの添加で形質転換株の増殖阻害が観察され、20%スクロース添加で形質転換株の増殖は強く阻害された (data not shown)。親株は 20%スクロースを含む TSB 寒天培地で正常な増殖を示した。このことから、カウンターセクションのためのスクロース添加濃度は 20%とすることにした。

次に、相同組換えによる染色体への挿入組み込みの効率に及ぼす挿入断片のサイズの影響について検討した。トルエン代謝経路の酵素をコードする *bnzA1A2A3A4CB* オペロンの上流部分を PCR で増幅した 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0kb の断片を pG19II にクローニングし、pG19-0.2、pG19-0.5、pG19-1.0、pG19-1.5、および pG19-2.0 を構築した(Fig.2-2)。そして、これらのプラスミドをエレクトロポレーションで B4 株に導

入し、エレクトロポレーション処理細胞を TSB 培地で 24 時間振とう培養した後に、ゲンタマイシンを含んだ TSB 寒天培地に塗布し、形質転換効率を求めた。その結果、0.5~2.0kb の挿入断片を持つ pG19-0.5~pG19-2.0 では 15~20 transformants /  $\mu$ g plasmid DNA、0.2kb の挿入断片を持つ pG19-0.2 では約 5 transformants /  $\mu$ g plasmid DNA の効率を得られた。そこで、ノンマーカ-遺伝子組換えの際の挿入相同断片の長さは、1.0~2.0kb とすることにした。

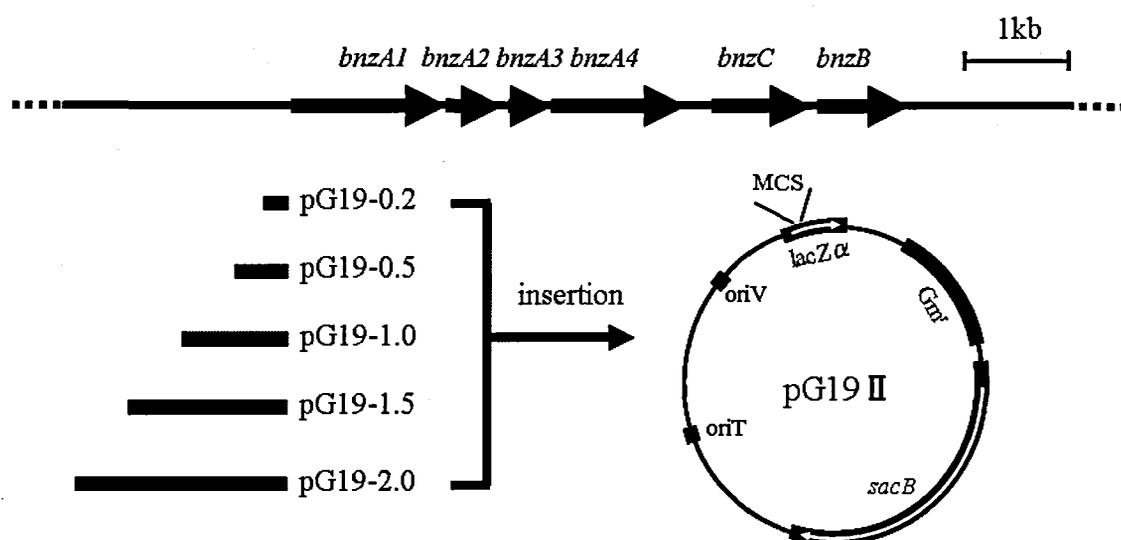


Fig.2-2 B4 株における *bnz* オペロンの遺伝子地図と pG19II 派生プラスミド構築に用いた領域

PCR で増幅した各領域を *Hind*III/*Dra*I で処理し、pG19II の *Hind*III/*Sma*I サイトに挿入し、pG19-0.2~pG19-2.0 を構築した。

### 2.3.3 ノンマーカ-遺伝子組換えによる遺伝子破壊

次に、2 回目の相同組み換えを起こした株を得るのに十分な培養時間を設定するために、1 回目の相同組換え株（ゲンタマイシン耐性、スクロース感受性）を TSB 培地で培養した時に出現する 2 回目の相同組換え株（ゲンタマイシン感受性、スクロース耐性）の割合を調べた。まず、*bnz* オペロン全体を削除するためのプラスミド pG19-dbnz (Fig.2-3) を作製して B4 株を形質転換し、1 回目の相同組換え株（ゲンタマイシン耐性、スクロース感受性）を得た。そして、その形質転換株を TSB 培地で振とう培養し、経時的にスクロース耐性株の出現頻度を測定した。その結果、6 時間の培養で十分な数のスクロース耐性株を得られることがわかった (Fig.2-4)。以上のことから、2 回目の相同組換えを起こさせるための培養時間は 6 時間にすることにした。

また、ここで得られたスクロース耐性株は Fig.2-1 に示すように理論

的には 50%の確率で遺伝子欠失を起こし、残る 50%は親株に復帰するはずである。そこで、スクロース耐性株 100 株を無機塩寒天培地 (MSB 培地) に植菌し、トルエンを蒸気で供給して培養した。その結果、予想通り約半数の株が増殖し、残りの株はコロニーを形成しなかった。

さらに、2 回目の組換え株がノンマーカ―遺伝子欠失をおこしているか PCR により確認した (Fig.2-5)。*bnz* オペロン上流および下流に設計したプライマーを用い、スクロース耐性株のゲノム DNA を鋳型にして PCR をしたところ、親株に復帰した株は 9.3kb の断片が増幅され、欠失を起こした株は予想されるサイズが減少した約 4kb の断片が増幅された。また、*bnzC* の内部に設計したプライマーを用いて同様に PCR を行ったところ、親株に復帰した株は約 120bp のバンドが確認されたが、欠失を起こした株ではバンドが増幅されなかった。以上のことより、ノンマーカ―遺伝子破壊が確かに起こっていることが確認された。

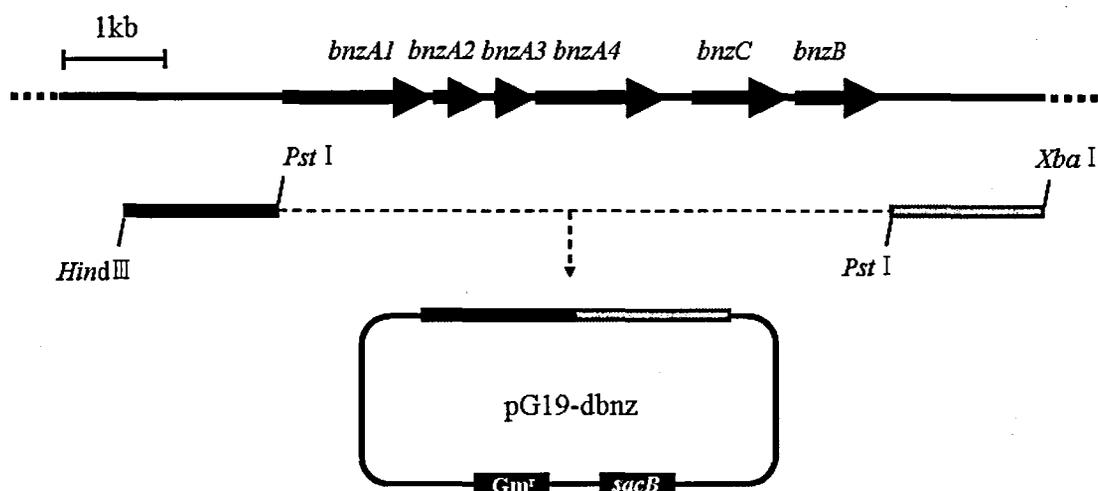
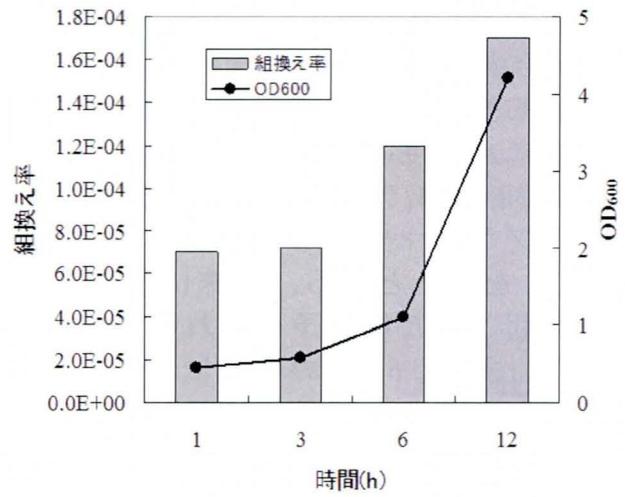
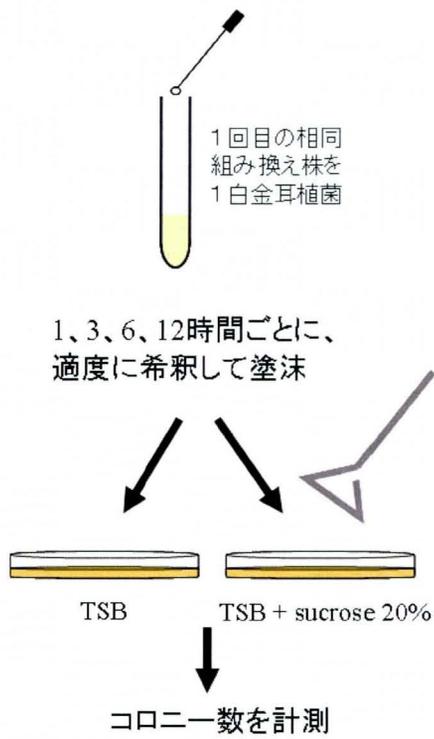


Fig.2-3 pG19-dbnz の構築

B4 株の染色体 DNA を鋳型にして、プライマー *bnzA1500-F* / *bnzA0-2R*、*bnzS0-2F* / *bnzS0-2R* を用いて *bnzA* 上流および *bnzB* 下流領域を PCR 増幅した。それぞれ、*HindIII* / *PstI*、*PstI* / *XbaI* で処理した後、*HindIII* / *XbaI* で処理した pG19II に挿入した。



時間(h)	Su <sup>r</sup> colonies/ml
1	2600
3	3500
6	8000
12	45000

Fig.2-4 2回目の相同組換え効率

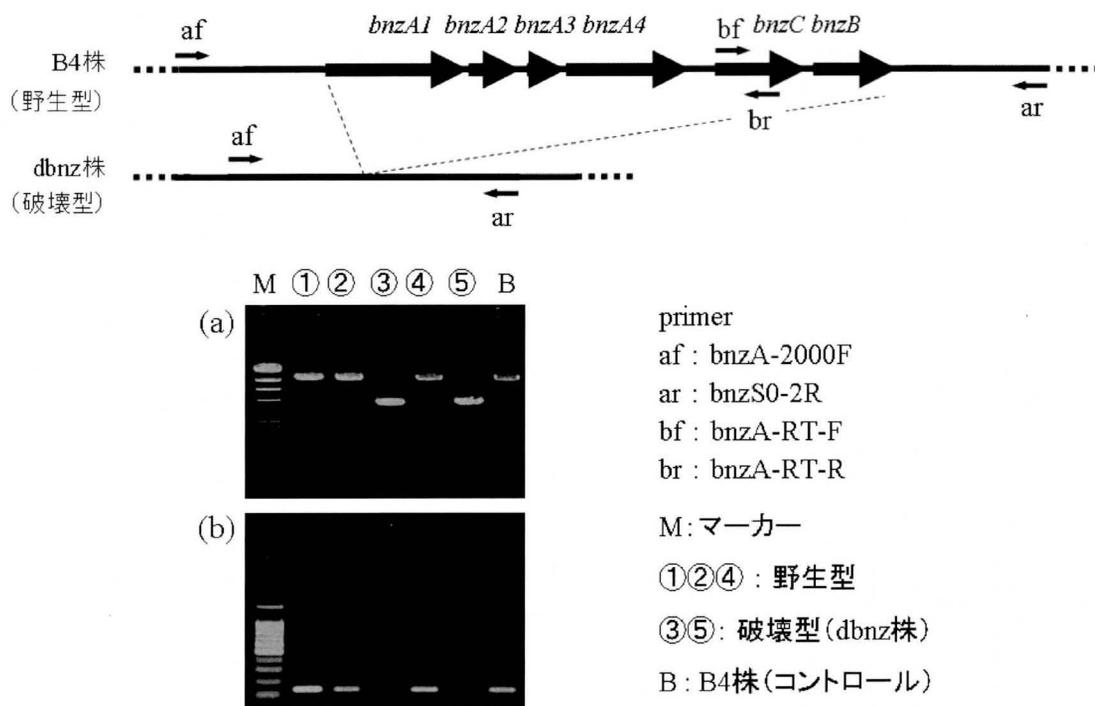


Fig.2-5 PCR による *bnz* オペロン破壊株の確認

プライマー af/ar を用いて PCR すると、B4 株では約 9.3kb の断片が増幅され、*bnz* オペロン破壊株では約 4kb の断片が増幅される (a)。プライマー bf/br を用いて PCR すると、B4 株では約 120bp の断片が増幅されるが、*bnz* オペロン破壊株では *bnz* オペロンが欠損しているため断片は増幅されない (b)。従って、レーン ①②④ の株は野生型に復帰した株であり、レーン ③⑤ の株は *bnz* オペロン破壊株であると確認された。

#### 2.3.4 ノンマーカー遺伝子組換えによる外来遺伝子の位置特異的挿入

2.3.3 ではノンマーカー遺伝子組換え技術を用いた遺伝子破壊に成功した。そこで、ノンマーカー遺伝子組換え技術を用いて、外来遺伝子を位置特異的に挿入することが可能であることを確認した。B4 株の *bnz* オペロンの発現は誘導性であり、ベンゼン、キシレン、トルエンで誘導される [41]。そこで *bnz* オペロンのプロモーター領域を pUC4K のカナマイシン耐性遺伝子のプロモーターと置換し、構成的に *bnz* オペロンが発現する株の構築を試みた (Fig.2-6)。まず、*bnz* オペロンのプロモーターの上流部分 1.5kb、カナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) プロモーター領域、*bnz* オペロンプロモーター下流 1.5kb を連結して pG19II にクローニングし、pG19-Pkm-*bnz* を作製した。この際、*bnzA* のプロモーター領域を欠失されるため、*bnz* オペロンプロモーターを含む約 500bp を除いておいた。そして、Fig.2-1 に示したスキームと同様な操作を施し、スクロース耐性株を取得した。カナマイシン耐性遺伝子プロモーター上流部分および *bnzA* 内部のプライマーを用いて PCR した

ところ、親株に復帰した株では断片が増幅されなかったが、*kan* プロモーターが挿入された株では約 1.8kb の断片が増幅された(Fig2.7)。この *kan* プロモーター挿入株を B4Pkm-bnz 株と命名した。

次に、B4Pkm-bnz 株の *kan* プロモーターが機能しているか調べるため、*bnzA* の発現量をリアルタイム-RT-PCR により測定した(Fig2.8)。まず、B4 株と B4Pkm-bnz 株を TSB 寒天培地または TSB 寒天培地+トルエン蒸気供給で培養し、総 RNA を抽出した。その総 RNA を用いてリアルタイム-RT-PCR を行った結果、B4 株の *bnzA* は TSB 寒天培地で培養した時にはほとんど発現しておらず、トルエン供給下で培養すると、*bnzA* の発現が確認できた。一方、B4Pkm-bnz 株では TSB 寒天培地で培養した場合でも、トルエンを供給した場合でも発現量はほとんど同じであり、その発現量は *bnz* プロモーターによる発現量よりも顕著に多かった。このことから、*kan* プロモーターは B4 株において構成的に機能する強力なプロモーターであることが確認できた。以上のことから、*sacB* を用いたノンマーカークロニカル遺伝子組換え技術により、確かに外来遺伝子を位置特異的にノンマーカークロニカルで挿入することが可能であることがわかった。

また、本章では B4 株の 200kb 線状プラスミド上に存在する *bnz* オペロンの遺伝子組換えについて報告したが、第 3 章、第 4 章において、200kb の線状プラスミド上の遺伝子組換えだけでなく、約 7.9kb の線状染色体上の遺伝子組換えも可能であることを示した。

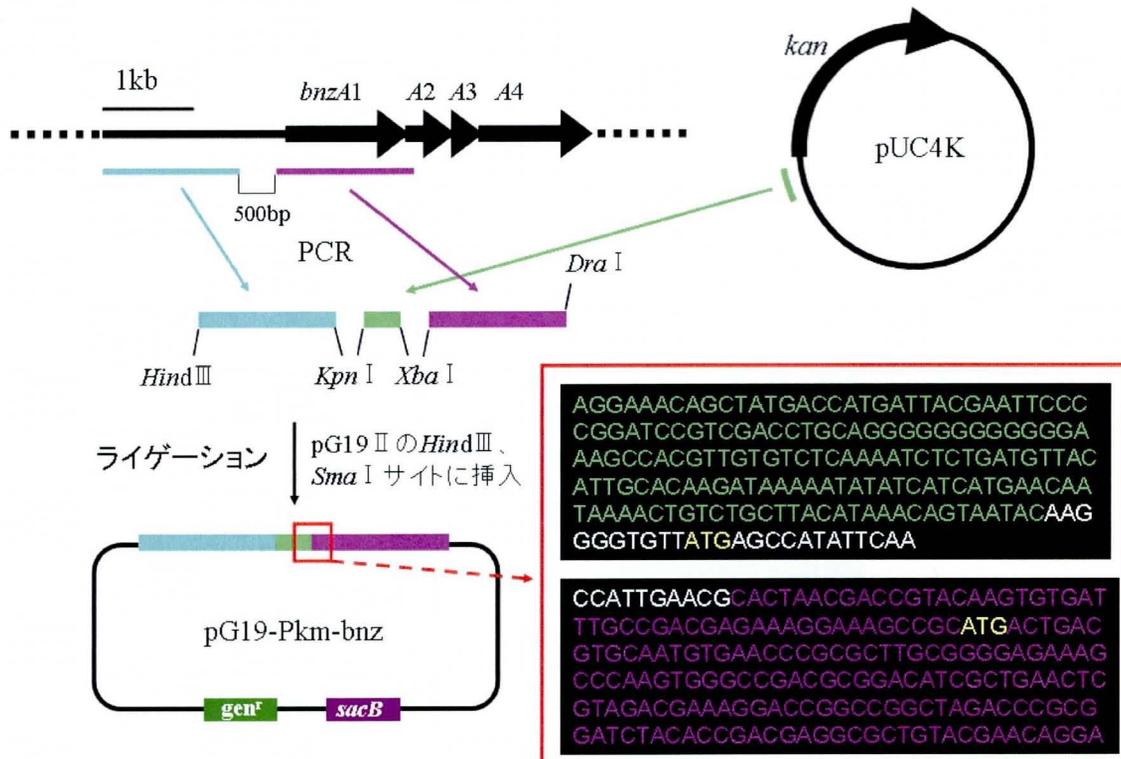


Fig2.6 pG19-kp-bnzA 構築のスキーム

*bnzA* プロモーター領域を除いた *bnzA* 上流および *bnzA* 領域、そして pUC4K の *kan* プロモーター領域を PCR し、pG19II に挿入した。*kan* プロモーターと *bnzA* の接合部分の配列は赤枠内に示した。黄緑で示した配列は pUC4K 由来の配列で、ピンクで示した配列は *bnzA* 由来の配列を示している。黄色で示した ATG が開始コドンである。*bnzA* の開始コドンから上流約 50bp までの間に SD 配列が含まれている。

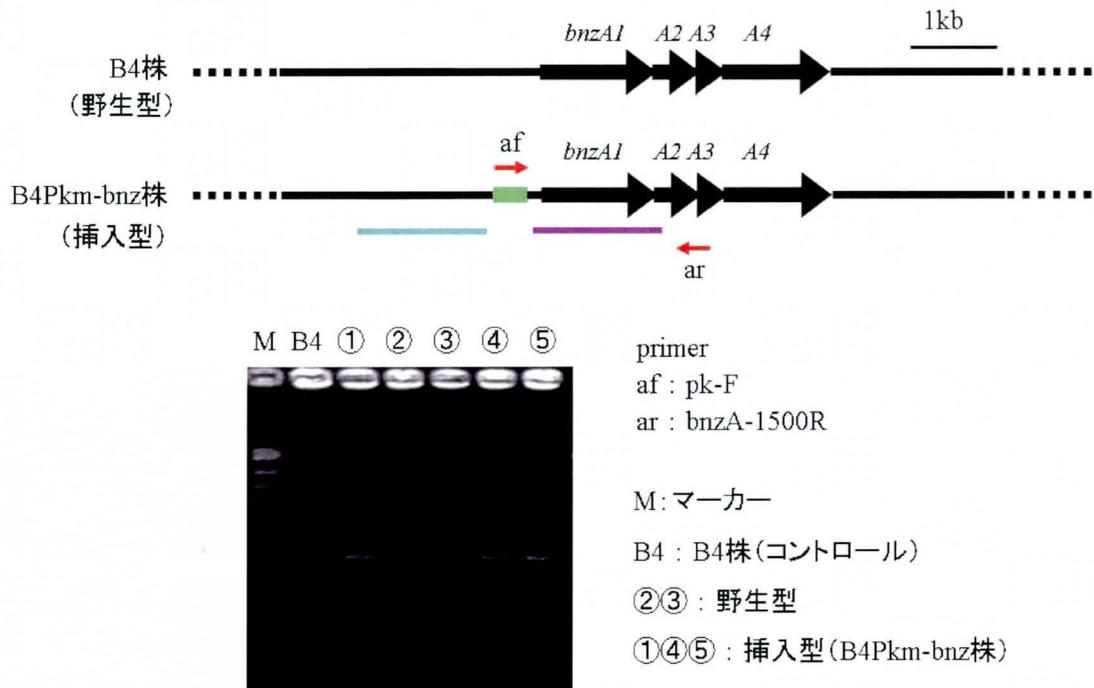


Fig2.7 PCRによる *kan* プロモーター挿入株の確認

水色およびピンクで示した領域は pG19-kp-bnzA 構築のために用いた領域である。af は *kan* プロモーター由来のプライマーである。プライマー ar は pG19-kp-bnzA 構築のために用いた領域よりも外側の配列を元に設計した。プライマー af/ar で PCR すると、B4 株では断片が増幅されなかったが、*kan* プロモーター挿入株では約 1.8kb の断片が増幅された。

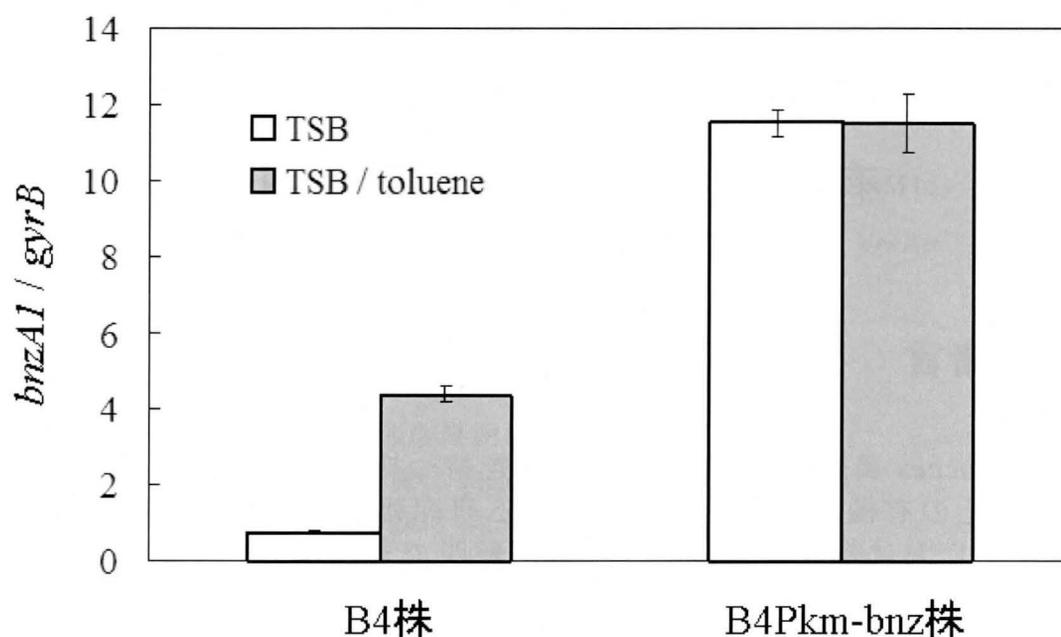


Fig2.8 リアルタイム-RT-PCRによる *bnzA1* 転写量の比較  
*bnzA1* の転写量は *gyrB* の転写量で標準化した。B4 株ではトルエン供給下で *bnzA1* の発現が誘導されたが、B4Pkm-bnz 株では TSB 培地でもトルエン供給下でも同程度の発現量だった。

## 第4節 要約

*R. opacus* B4 株を疎水性バイオプロセスの宿主として活用するためには、染色体加工技術の確立が必要だった。そこで、*sacB* を用いたノンマーカ―遺伝子組換え技術の確立を試みた。

ノンマーカ―遺伝子組換えには、ポジティブマーカ―としてゲンタマイシン耐性遺伝子、カウンターセレクトションマーカ―としてスクロース感受性を付与する *sacB* 遺伝子 pG19II を用いた。*sacB* を持つ B4 株の形質転換株をカウンターセレクトするためのスクロース濃度は 20%とした。ノンマーカ―遺伝子組換えの際の挿入断片の長さは、1.0~2.0kb とすることにした。2 回目の相同組換えを起こさせるための培養時間は 6 時間で十分であった。

ノンマーカ―遺伝子組換え技術を用いて *bnz* オペロン破壊株の構築に成功した。また、*bnz* オペロンの上流に *kan* プロモーターを挿入することに成功した。*kan* プロモーター挿入株では、*bnzA1* が構成的に転写されていた。

## 第3章

# *R. opacus* B4株における 有機溶媒耐性機構の解明

### 第1節 緒言

*Rhodococcus* 属細菌は、有機溶媒耐性を持つ株が多数報告されているが[17]、その有機溶媒耐性機構に関する研究報告はほとんどない。もし、B4株における有機溶媒耐性機構が解明できれば、その機構を応用して、より有機溶媒耐性の強い組換え株を取得できるかもしれない。そこで本研究では、B4株の有機溶媒耐性機構を解明すると共に、B4株における有機溶媒耐性の改良を目指した。

### 第2節 実験材料および方法

#### 3.2.1 使用菌株およびプラスミド

使用菌株およびプラスミドは Table 3-1 に示した。*R. opacus* B4株および B4 派生株は Tryptic Soy Broth(Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)または MSB 培地(2.2.1 参照)を用いて、28°C で振とう培養した。MSB 培地を用いる際は、炭素源としてグルコースを 2g/l 加えた。寒天培地の調製では寒天を 15g/l 添加し、スクロースを加える際は 200g/l となるように加えた。抗生物質は必要に応じて 30mg/l クロラムフェニコール(Cm)、5mg/l ゲンタマイシン(Gm)を加えた。*E. coli* MV1184 はプラスミド構築のために使用した。MV1184 は Luria Bertani(LB)培地[45]を用いて、37°C で振とう培養した。LB 寒天培地の調整には寒天を 15g/l 加え、スクロースを入れる際は 50g/l となるように加えた。必要に応じて、30mg/l の Cm、10mg/l の Gm を加えた。

Table3-1 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<b><i>E. coli</i></b>		
MV1184	<i>ara</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) $\Delta$ ( <i>srl-recA</i> )306:: <i>Tn10</i> (Tc <sup>r</sup> ) F'[ <i>traD36 proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	[43]
<b><i>R. opacus</i></b>		
B4	有機溶媒耐性細菌。	[17]
B4-ep21	B4 株に pKNR-ep21 を導入。Cm <sup>r</sup> 。	This study
B4-ep24	B4 株に pKNR-ep24 を導入。Cm <sup>r</sup> 。	This study
dbnz	B4 株の <i>bnzACB</i> を破壊。	This study
dsigB	B4 株の <i>sigB</i> 破壊株。	This study
dsigB-psB	dsigB 株に pKNR- <i>sigB</i> を導入。Cm <sup>r</sup> 。	This study
dsigB-pkA	dsigB 株の <i>bnzA</i> プロモーターを <i>kan</i> プロモーターと置換。	This study
dsigB-bnz	dsigB-kpA 株に pKNR- <i>bnzCB</i> を導入。	This study
dsigB-ep21	dsigB 株に pKNR-ep21 を導入。	This study
dsigB-ep24	dsigB 株に pKNR-ep24 を導入。	This study
<b>Plasmids</b>		
pKNR01.1	<i>R.opacus-E. coli</i> シャトルベクター。	[41]
pG19II	ノンマーカ-遺伝子組換え用プラスミド。 ポジティブマーカ-として Gm 耐性遺伝子、 カウンターセレクションマーカ-として <i>sacB</i> を持つ。	[44]
pG19-dsigB	<i>sigB</i> ノンマーカ-破壊用プラスミド。	This study
pG19-Pkm-bnz	カナマイシン耐性遺伝子プロモーター挿入 用プラスミド。 <i>bnzA1</i> 上流および <i>bnzA1A2</i> 領域、 <i>kan</i> プロモーターを含む。	第 2 章
pKNR- <i>sigB</i>	<i>sigB</i> 発現ベクター。pKNR01.1 に <i>sigB</i> を挿入。	This study
pKNR- <i>bnzCB</i>	<i>bnzCB</i> 発現ベクター。pKNR01.1 に <i>kan</i> プロモーター+ <i>bnzCB</i> を挿入。	This study
pKNR-ep21	<i>efp21</i> 発現ベクター。pKNR01.1 に <i>kan</i> プロモーター+ <i>efp21</i> を挿入。	This study
pKNR-ep24	<i>efp24</i> 発現ベクター。pKNR01.1 に <i>kan</i> プロモーター+ <i>efp24</i> を挿入。	This study

Ap:ampicillin, Km:kanamycin, Gm:gentamycin

### 3.2.2 使用プライマーおよび PCR

本研究で使用したプライマーは Table 3-2 に示した。PCR には KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) を用い、メーカーの指定する使用法に従って行った。

Table 3-2 使用プライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
sigB-NM-F1	ACTGAAGCTTGACCTGCTGCAGTACTG
sigB-NM-R1	ACTGGAATTCTCTCCCTCCGCATCAG
sigB-NM-F2	ACTGGAATTCTCCTCATCGGTGGTGTCTC
sigB-NM-R2	ACTGTCTAGATACGACACGGACACCCTG
sigB-ex-F	TCAGAATTCACTGATCGAACTTCTCGCTG
sigB-ex-R	TCGAAGCTTCGTGACCTCGTACAG
bnzCB-ex-F	GTA CTCTAGAGCAAATCACACTCCAAGAAGG
bnzCB-ex-R	GTCGTTTAAACGACGAGGGTTAGCTTC
pk-F	ACTGGTACCTGTGGAATTGTGAGCGGATAACC
pk-R	ACGTCTAGAGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAG
Ep21-ex-F	AGGTCTAGATCTCGTTACTTCCACGGAG
Ep21-ex-R	AGAGAATTCATCACTACCCCTTGATCTG
Ep24-ex-F	AGGTCTAGAAACACATCGAAGGAGGTG
Ep24-ex-R	AGAGAATTCAGTACCGTTCGCTCCTC
gyrB-RT-F	GTCTACAGCTTCGAGACG
gyrB-RT-R	TGACGACCTCTTCGGTG
bnzA-RT-F	TGTACGAACAGGA ACTGGAG
bnzA-RT-R	ATCCTCGCCCATGTAGTTC
bnzC-RT-F	GACCGTCGGATGACATCTC
bnzC-RT-R	TGTTGTCACCTCGATTCCATGC
sigA-RT-F	GACATGGACGACATCGAC
sigA-RT-R	CTTGTCCTTCTCGGACG
sigB-RT-F	CACCACTACTCGCATTCG
sigB-RT-R	ACAGTTCCACCTCGTCTG
sigE-RT-F	TCCAGACGAGAGA ACCAC
sigE-RT-R	ACGAGTTCGTCCCACGAC
sigH-RT-F	TGCAGGAACATGACCGTC
sigH-RT-R	GTCATCCTCAGAGCAGC
sigF1-RT-F	GGTACCCACGATCATGG
sigF1-RT-R	AGTTCCTGCGACAGTTCG
sigF2-RT-F	GATGAAGGAACTGCACCTC
sigF2-RT-R	CACCTCTTCTGTTCAG

sigF3-RT-F	GAGCTTCGTGTCCTACG
sigF3-RT-R	TGGTGAGTTCGGTTGTCTG
sigG1-RT-F	CACTGCTATCGCATGCTC
sigG1-RT-R	TCGCAACGGTGTACAGC
sigG2-RT-F	AGACCAGATGCAGGAGAC
sigG2-RT-R	TCGACCTGTTCTGCAACG
sigJ-RT-F	CGTAGGGAACAGTATGTCTG
sigJ-RT-R	TGTCGAGCACGATCAGC
sigK-RT-F	TCAGCGACTTCTACGAACG
sigK-RT-R	TTGCTCCAGACCTGCAG
sigK2-RT-F	GAACTCTACGACACCATGG
sigK2-RT-R	TCGTCTCCTCCGCATAC
sigL1-RT-F	CCTGTACGAGGAACATGC
sigL1-RT-R	TCGAGCACGTTCCGATG
sigL2-RT-F	TGGCTGTATGCCATCTGC
sigL2-RT-R	ACCAGCAGCTGTTCCAG
Ep1-RT-F	AGGAAGCTGCTGCTGAC
Ep1-RT-R	AGCTCAGGAACAGGCAC
Ep2-RT-F	CACATGCTGATCCTGATCG
Ep2-RT-R	TGAGGTAGATCCACTTCAGG
Ep3-RT-F	CACATGCTGATCCTGATCG
Ep3-RT-R	TGAGGTAGATCCACTTCAGG
Ep4-RT-F	TCTCACCATCGGTGTCTG
Ep4-RT-R	CGACAACAGGTAAGCAGTC
Ep5-RT-F	TCAGGAAGAGCAGCAGC
Ep5-RT-R	ATCCTCGAGGTCGAAGG
Ep6-RT-F	GTGCTTCAGGGATGTTCC
Ep6-RT-R	TGGAAGGCACCGAAGATC
Ep7-RT-F	TGTCGATGACCACGATGC
Ep7-RT-R	TCCTGCATCGACTTCTGC
Ep8-RT-F	TGCAGAACACGGTGACG
Ep8-RT-R	ACACTGGTGACGACGAG
Ep9-RT-F	TCTCCAATCTCACCAACCTC
Ep9-RT-R	GAACAGGATCAGTTCGACG
Ep10-RT-F	ACTTCTCATCGCTCTCGAC
Ep10-RT-R	CGAGGAGATTGCTCTTGC
Ep11-RT-F	TGACCGTCACGGTGATC
Ep11-RT-R	TCGTAGAGGCTGTTTCATCC
Ep12-RT-F	CATGACGATCATGACCAAGG
Ep12-RT-R	AAGATCCAGTGCCAGCTC

Ep13-RT-F	TCAACATCTTCACCGACGTG
Ep13-RT-R	AGTGCCAGCTGAAGTGC
Ep14-RT-F	CTCCTTGATGAACGTGTCG
Ep14-RT-R	GATCAGGATGAACGCTGC
Ep15-RT-F	CAGCAGTCCAATCTGGTG
Ep15-RT-R	ACAGCGTCGAGCAGGTC
Ep16-RT-F	TGTTCCCTCGTGACGCTTC
Ep16-RT-R	ACACGACGGAGATGATGC
Ep17-RT-F	AGTTCCTGATGACGTTGGAC
Ep17-RT-R	ATGACGAGCGTGTACAGC
Ep18-RT-F	ATCGTCAGCGACTGGTG
Ep18-RT-R	TGAACGCTCCGATCACG
Ep19-RT-F	TCGACGTCGATGTACATGC
Ep19-RT-R	AAGTAGCCCTGGTACTTGG
Ep20-RT-F	TGATGCTGACGACGTCG
Ep20-RT-R	GTAGATCGGTACCGACAC
Ep21-RT-F	ATCTGGATGCTCACGGTC
Ep21-RT-R	ACGATCCACGTCAGCTG
Ep22-RT-F	GATCGAGATGAACCTGATCG
Ep22-RT-R	AGCGTCACCAGGTTCG
Ep23-RT-F	TCATCGCACTGTTCCCTGC
Ep23-RT-R	ACGAGACCCAGATCAGC
Ep24-RT-F	CCATCATCCTCTACGAGG
Ep24-RT-R	CACGACGATCAGAATGAACG
Ep25-RT-F	GATCATGAACGACCTGCAC
Ep25-RT-R	CGATCAGGTAGATGTTCTTGG
Ep26-RT-F	CTGATGGTGAGTGTCTACAC
Ep26-RT-R	ATCCGCAGAGTGAATGAGG
Ep27-RT-F	CTACTTCTACCTCGTCGAC
Ep27-RT-R	TCACCACGATCGACGTC
Ep28-RT-F	GTTCCGTTTCGTCATCTACG
Ep28-RT-R	AGCGTCATGGTGGCAC
Ep29-RT-F	TCCTCATCACTGCACGAC
Ep29-RT-R	ATCATCATGATGCTGAAGAGC
Ep30-RT-F	GACAACCTGGTGATGACC
Ep30-RT-R	ACAGCGTCAGCATCAAGG
Ep31-RT-F	GTGATGATGCACGAACTCG
Ep31-RT-R	CGAACATGAGCTTCTTGTGG
Ep32-RT-F	ACGACATGCACGTCGAG
Ep32-RT-R	CATGATCGGTGTTGCGAC

C1-RT-F	TGGTGAGACCGTCGAG
C1-RT-R	TCCTCACCCACGTATCC
C2-RT-F	CAACAAGCTGTTTCGAGGAG
C2-RT-R	ATCAGCGAGGTGAACGAG
C3-RT-F	GACGACATCGCGAACAAG
C3-RT-R	ACTCGGCGAACTGCATC
C4-RT-F	GAACTGGTGCTCCTCG
C4-RT-R	GAAACCCATGGCCACG
C5-RT-F	GTCGTGATGGCACAACCTG
C5-RT-R	AGTAGGTGGCGATGGTC
C6-RT-F	AGAGTCGGAGGTCGTC
C6-RT-R	GGAATGCACCTGCATCATC
C7-RT-F	GACACAACCTACATCGGTACG
C7-RT-R	TCCTTGCCCTGGTAACC
C8-RT-F	AGTCGGTGATCTCCCTC
C8-RT-R	CACGATGGTGTGGAGTTC
C9-RT-F	GTGTACTCCAACAAGGACTC
C9-RT-R	TCGACCTCGATCTCGATG
C10-RT-F	CATCGTGCGGTGGTTG
C10-RT-R	AGGGCAGGTTGATCGAG
C11-RT-F	ACTGAGCTCCTCGCAG
C11-RT-R	GTCCAGGAGATCGGAC
C12-RT-F	GAACTCCACCGTTTCACAC
C12-RT-R	GAAGCTGTCCTGTGAGAG
C13-RT-F	TGCTGTCGCAGGACAATC
C13-RT-R	CCACGACTCCATCAGG
C14-RT-F	GAGGGTGGTCTGCTAC
C14-RT-R	TGCGCACGAGTGGTATG
C15-RT-F	ACGGTCAAGGATCTGCTG
C15-RT-R	GGACTTGAAGGTGCCAC
C16-RT-F	AGGTTCTCTCGACGCTC
C16-RT-R	GTCCTTCAGCGTGAGG
C17-RT-F	GATGATCGTCGACCACC
C17-RT-R	ACGGTGACGTACAGATCC
C18-RT-F	GATCTGTACGTCGAGGTG
C18-RT-R	CTCGATGGTGATCTCCTTG
C19-RT-F	GTCAGTGACGGACAGAAG
C19-RT-R	GAGCTCACCGTAACTGAC
C20-RT-F	AGAACGCGAAAGCGTCG
C20-RT-R	AGGATGGTCCGGATCTTC

C21-RT-F	TGTGGCAGACAAGCTCAC
C21-RT-R	GTAGCCCTTTCGCATCAC
C22-RT-F	TCGACAGCTGGACGTG
C22-RT-R	GACGATCCGTTCGACAC
C23-RT-F	AGGACAAGATCCTCGTCC
C23-RT-R	CTCCTTGACGTGCGACC
C24-RT-F	CAGCAGATCTTCGGTACC
C24-RT-R	TGCACTGTCAGGGTGTTT
C25-RT-F	CAGTTCGTGGTCGAGTTG
C25-RT-R	CTGACGGCTGAACACTC
C26-RT-F	ACGGTGAAGATCGCGAC
C26-RT-R	CTCACCGTTCGTCATCTTC
C27-RT-F	AGACGTTGCGCAACTACG
C27-RT-R	GTTCGATGATCCGCTTGATC

---

### 3.2.3 遺伝子操作

第 2 章 2.2.3 参照

### 3.2.4 *R. opacus* B4 株からの染色体抽出

第 2 章 2.2.4 参照

### 3.2.5 プラスミドの構築

#### 3.2.5.1 pG19-dsigB の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー sigB-NM-F1/sigB-NM-R1 および sigB-NM-F2/ sigB-NM-R2 を用いて、それぞれ *sigB* 上流、下流領域を増幅した。*sigB* 上流領域を *Hind*III/*Eco*RI で処理、下流領域を *Eco*RI/*Xba*I で処理し、pG19II の *Hind*III/*Xba*I サイトに挿入した。

#### 3.2.5.2 pKNR-sigB の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー sigB-ex-F/sigB-ex-R を用いて PCR した。増幅断片を *Eco*RI/*Hind*III で処理し、同じく *Eco*RI/*Hind*III で処理した pKNR01.1 に挿入した。

#### 3.2.5.3 pKNR-bnzCB の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー bnzCB-ex-F/bnzCB-ex-R を用いて PCR した。増幅断片を *Xba*I/*Dra*I で処理した。また、プライマー pk-F/pk-R を用いて、pUC4K のカナマイシン耐性遺伝子プロモーター領域を PCR 増幅した後、*Kpn*I/*Xba*I で処理した。各断片を同時に、*Kpn*I/*Evo*RV で処理した pKNR01.1 に挿入した。

#### 3.2.5.4 pKNR-ep21、pKNR-ep24 の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマーEp21-ex-F/Ep21-ex-R および Ep24-ex-F/Ep24-ex-R を用いて PCR した。それぞれの増幅断片を *EcoRI* で処理した後、*EcoRI/EcoRV* で処理した pKNR01.1 に挿入し、pKNR-ep21 および pKNR-ep24 を構築した。

#### 3.2.6 エレクトロポレーション

第 2 章 2.2.6 参照。Buffer は HG buffer (0.3M glycerol、7mM HEPES[pH7.0 by KOH] ) を用いた。

#### 3.2.7 リアルタイム逆転写 PCR (RT-PCR)

通常の条件またはストレス条件下で培養した B4 株および B4 派生株は、RNAprotect bacteria reagent (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)を用いて RNA 安定化を行った。総 RNA の抽出は RNeasy kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)を使用し、メーカーの指定する使用方法に従った。リアルタイム-RT-PCR は LightCycler system (Roche diagnostics)を用いて行い、試薬は One Step SYBR<sup>®</sup>PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (TaKaRa Bio)を使用し、メーカーの指定する使用法に従って行った。内部標準には *gyrB* (プライマー *gyrB*-RT-F /*gyrB*-RT-F) を用いた。

#### 3.2.8 エタノール、熱、トルエンストレス条件下での培養

B4 株を TSB 液体培地で OD<sub>600</sub>=2.0 になるまで培養した。培養液 500 μl 分の菌体の RNA 安定化を行った (0 時間)。残りの培養液を 5ml ずつスクリー管瓶または試験管に分注した。スクリー管瓶には 3 本分注した。1 本目はコントロールとしてそのまま 28°C で培養した。2 本目にはエタノールを 3% となるように加え、3 本目にはトルエンを 200 μl 加えたダークラム管を入れてトルエン蒸気を供給し、28°C で培養した。試験管には 2 本に分注し、1 本は熱ストレスを与えるため 33°C で培養し、残りの 1 本はコントロールとして 28°C で培養した。各培養液は 120rpm で振とう培養した。培養 1 時間、2 時間後に各培養液 500 μl 分の菌体の RNA 安定化を行った後、RNA 抽出を行った。抽出した総 RNA は -80°C で保存した。

#### 3.2.9 有機溶媒ストレス条件下での培養

TSB 寒天培地に B4 株または *dsigB* 株を塗布し、各有機溶媒の入った小瓶とともに密閉容器 (タッパー) に入れて、有機溶媒を蒸気で供給しながら 28°C で培養した。コントロールは、そのまま 28°C で培養した。2 日間培養した後に、1 白金耳の菌体をかき取って RNA の安定化を行った。抽出した総 RNA は -80°C で保存した。

### 3.2.10 *sigB* 破壊株およびその派生株の構築

ノンマーカ―遺伝子組換え技術の原理は第 2 章を参照。*sigB* 破壊株 (*dsigB* 株) を構築するために、B4 株に pG19-*dsigB* を導入し、1 回目の相同組換え株 (ゲンタマイシン耐性、スクロース感受性) を取得した。1 回目の相同組換え株を TSB 液体培地で約 6 時間培養し、TSB+スクロース (20%) 寒天培地に塗布した。最初にコロニーが形成された後、数日間放置して遅れて形成された小さいコロニーを選択した。*sigB* 破壊株の確認はプライマー *sigB*-NM-F1/*sigB*-NM-R2 および *sigB*-RT-F/*sigB*-RT を用いて、PCR により行った。

*dsigB*-pkA は *dsigB* 株に第 2 章で構築した pG19-Pkm-bnz を導入することにより構築した。*dsigB*-bnz 株は *dsigB*-pkA 株に pKNR-bnzCB を導入することにより構築した。

### 3.2.11 *dsigB* 株のストレス耐性試験

B4 株および *dsigB* 株を MSB+グルコース液体培地で一晚培養した。培養液を、ほぼ同じ濃度になるように新しい MSB+グルコース液体培地に分注した (スクリュー管瓶)。コントロールは、そのまま 28°C で培養した。pH ストレスについては MSB 液体培地の pH を HCl で予め 6.0 および 5.0 に調整しておいた。熱ストレスについては、培養時の培養温度を 33°C にした。エタノールストレスについては、エタノールを 3% および 4% となるように添加した。熱+エタノールストレスについては、エタノールを 3% 添加し、33°C で培養した。それぞれ、120rpm で振とう培養し、経時的に OD<sub>600</sub> を測定した。

### 3.2.12 有機溶媒耐性試験

B4 株および *dsigB* 株、またはその他の派生株を TSB 液体培地で培養した。OD<sub>600</sub> の値がほぼ同じになるように培養したが、若干のずれが生じた場合は、同じ菌体濃度になるように TSB 液体培地を用いて調整した。初期濃度を統一した菌体培養液は、TSB 液体培地を用いて 10 倍ずつ 10<sup>-4</sup> 倍まで希釈していった。各希釈段階の培養液を TSB 寒天培地に 5 μl ずつ滴下した。コントロールのプレートはそのまま 28°C で培養した。有機溶媒耐性試験をする際は、タッパーにプレートと各有機溶媒の入った小瓶を入れて密閉し、28°C で培養した。培養 3 日目~6 日目にプレートを取り出し、観察した。

## 第3節 結果と考察

### 3.3.1 *sigA* および *sigB* の転写解析

B4 株の RNA ポリメラーゼシグマ因子の一種である SigB は *Mycobacterium* 属細菌の  $\sigma^B$  タンパク質と高い相同性を示した。 $\sigma^B$  遺伝子の転写は増殖定常期やエタノールなどのストレスにより誘導されると報告されている[46,47]。そこで、B4 株の SigB 遺伝子 (*sigB*) が環境ストレスにより誘導されるか測定した。まず、B4 株を TSB 液体培地で培養し、経時的に吸光濁度 (OD<sub>600</sub>) を測定すると同時に総 RNA を抽出した。リアルタイム-RT-PCR で *sigB* の転写量を測定すると、*sigB* の転写は対数増殖期後期から定常期に誘導されることが分かった (Fig.3-1)。一方、比較として測定した *sigA* は主要シグマ因子であり、増殖する細胞におけるほとんどの RNA 合成に関与するとされている [48]。B4 株においても、*sigA* の転写はほぼ構成的に誘導されていた。

次に、B4 株をエタノール (3%) ストレス (Fig.3-2)、熱 (33°C) ストレス (Fig.3-3)、トルエン蒸気ストレス (Fig.3-4) 条件下で培養し、総 RNA を抽出して *sigA* および *sigB* の転写量を測定した。*sigA* はコントロールにおいても、ストレス条件下においても構成的に転写されていた。一方、*sigB* はストレスを与えて 1 時間後にはその転写量が増加していた。このことから、B4 株の *sigB* も確かにストレスにより誘導されていることが確認された。また、トルエン蒸気ストレスを与えた際にも転写が誘導されていたことから、*sigB* は一般的なストレスの他に有機溶媒ストレスに対しても関与しているのではないかと考え、*sigB* 破壊株の構築を試みた。

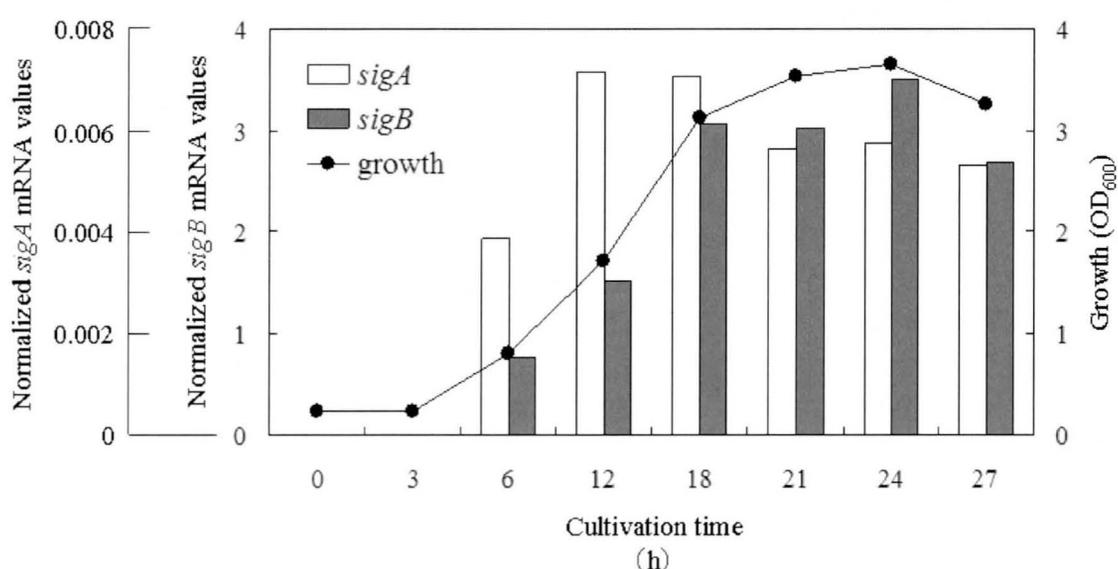


Fig.3-1 各増殖段階における *sigA* および *sigB* 転写量  
*sigA* および *sigB* 転写量は *gyrB* 転写量で標準化した。

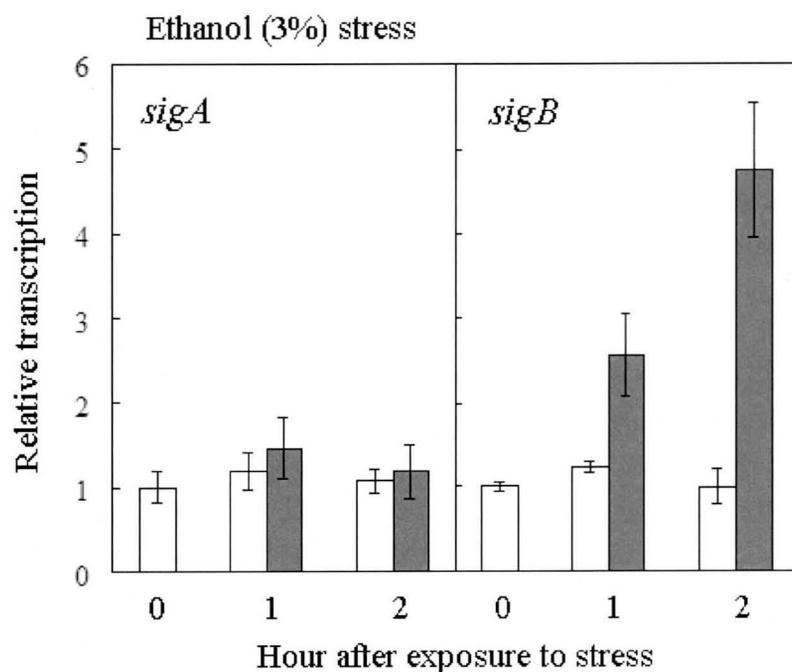


Fig.3-2 エタノールストレス条件下での *sigA* および *sigB* 転写量  
*sigA* および *sigB* の転写量は *gyrB* 転写量で標準化し、さらに 0 時間での転写量で標準化した。

□ : コントロール、■ : エタノールストレス

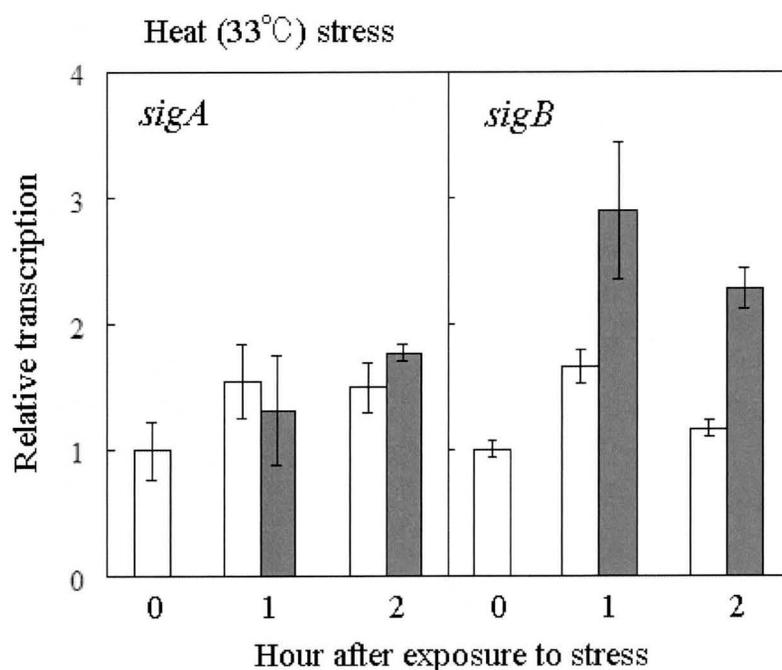


Fig.3-3 熱ストレス条件下での *sigA* および *sigB* 転写量  
*sigA* および *sigB* の転写量は *gyrB* 転写量で標準化し、さらに 0 時間での転写量で標準化した。

□ : コントロール、■ : 熱ストレス

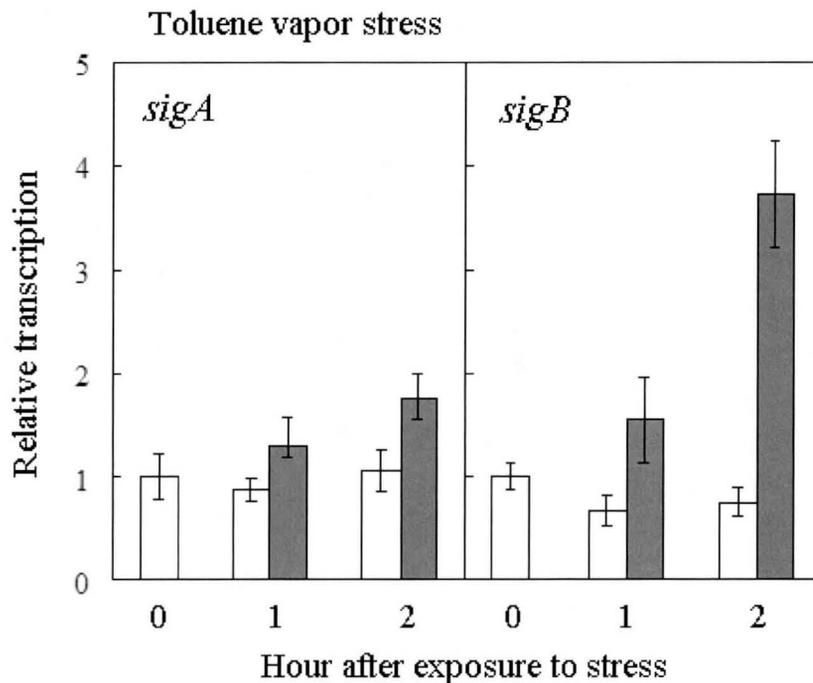


Fig.3-4 トルエン蒸気ストレス条件下での *sigA* および *sigB* 転写量  
*sigA* および *sigB* の転写量は *gyrB* 転写量で標準化し、さらに 0 時間での転写量で標準化した。

□ : コントロール、■ : トルエンストレス

### 3.3.2 *sigB* 破壊株の構築とストレス耐性

*sigB* の破壊はノンマーカークロニカル組換え技術を用いた。*sigB* の上流および下流領域を PCR 増幅し、pG19II に挿入して *sigB* 破壊用プラスミド pG19-d*sigB* を構築した。pG19-d*sigB* を B4 株に導入し、1 回目の相同組換えを取得した。1 回目の組換え株を TSB 培地で 6 時間培養し、TSB+スクロース (20%) 培地に塗布して 2 回目の組換え株を得た。2 回目の組換え株は 50% の確率で遺伝子欠損株になっているはずであるが、PCR によって確認したところ、全て野生型に戻っていた。何度か同じ作業を繰り返した後に、2 回目の組換え株のコロニーが生えてきたプレートを放置していたところ、非常に増殖の遅い小さなコロニーが生えてきた。そのコロニーを調べたところ、全て *sigB* 破壊株 (d*sigB* 株) であることが分かった (Fig.3-5)。*sigB* はストレス条件下で誘導され、ストレス耐性に関与する様々な遺伝子の発現に関与している。したがって、*sigB* を破壊するとスクロース (20%) ストレスに対する耐性が弱くなり、増殖が阻害されたのではないかと思われる。

d*sigB* 株におけるストレス耐性を調べるために、B4 株および d*sigB* 株を MSB+グルコース培地で培養し、pH ストレス (pH6.0、pH5.0)、熱 (33°C) ストレス、エタノール (3% or 4%) ストレス、そして熱 (33°C) +エタノール (3% or 4%) ストレスを与えて培養し、経時的に OD<sub>600</sub>

を測定した。コントロールでは B4 株と *dsigB* 株の増殖速度に差は無かった。pH ストレスに対してもほとんど差がなかった。しかし、熱ストレスおよびエタノールストレスにおいては、*dsigB* の増殖速度の低下が見られた。さらに、熱+エタノールストレスを与えると、その差はさらに顕著なものとなった。

B4 株および *dsigB* 株にエタノールストレスを与えて顕微鏡で観察したところ、エタノールストレス条件下での B4 株の細胞の形態はコントロール (MSB+グルコース) と比べて細胞が細長くなっていた。これは、エタノールストレスに対する応答として、菌体表面と容積の比を低下させることにより、相対的な表面積を低下させて、ダメージを低減させているのかもしれない。一方、*dsigB* 株はコントロールでもエタノールストレス条件下でも細胞が細長くなっていた。これは、*sigB* が常に (野生株では強いストレスを感じない条件下でも) ストレスを感じているためかもしれない。

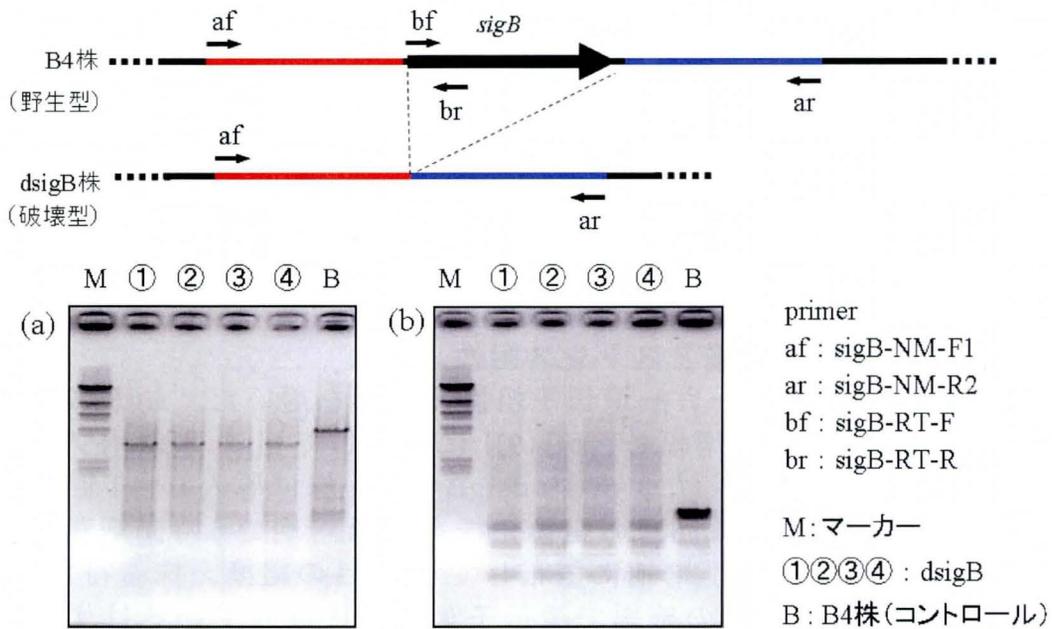


Fig.3-5 *sigB* 破壊株の確認

(a)はプライマーaf/arを用いた PCR 産物の電気泳動写真。(b)はプライマーbf/brを用いた PCR 産物の電気泳動写真。プライマーaf/arを用いた PCR では野生型は約 4.0kb、破壊型は約 3.0kb のバンドが増幅される (a)。プライマーbf/brを用いた PCR では野生型は約 120bp、破壊型は増幅されない (b)。したがって、レーン①②③④全ての株が *dsigB* 株であると確認された。

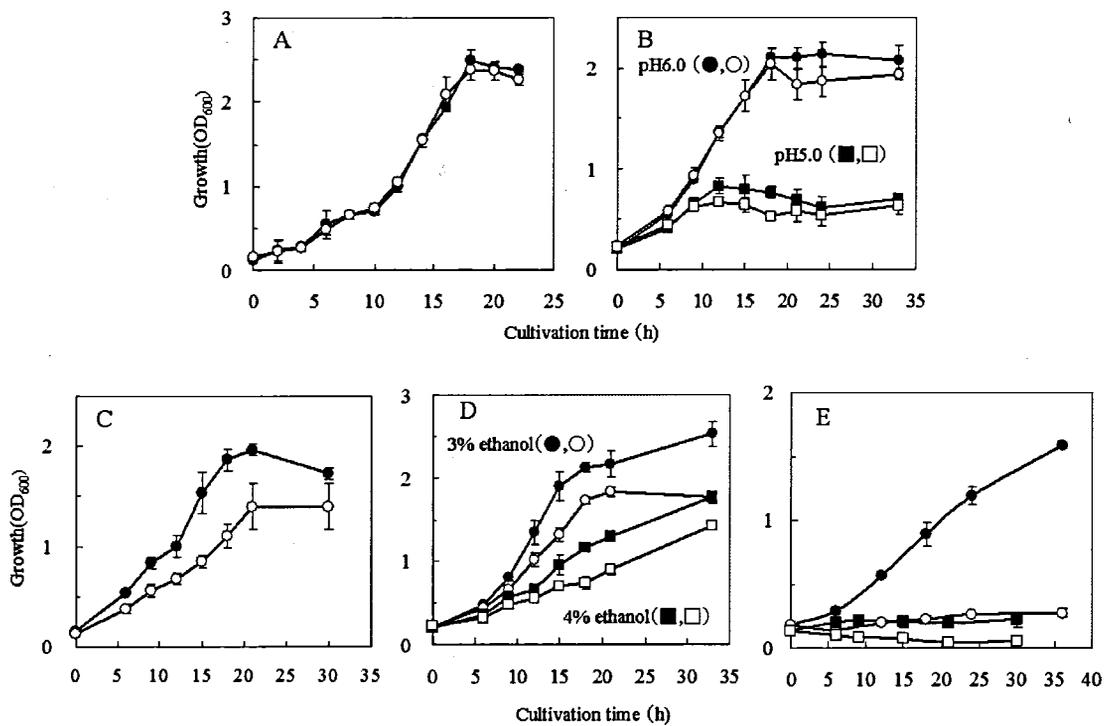


Fig.3-6 B4株および dsigB株ストレス条件下における増殖速度の比較  
 全てのグラフにおいて、●および■は B4 株、○および□は dsigB 株の OD<sub>600</sub>を示している。Aはコントロールとしてストレスを与えずに 28°Cで培養したときの増殖経時変化である。Bは pH ストレスを与えた場合である。Cは熱ストレス (33°C) 条件下で培養した場合であり、dsigB の増殖速度の低下が観察された。Dはエタノール 3%および 4%添加時の増殖経時変化を示している。Eは熱 (33°C) +エタノールストレス条件下での増殖を示しており、●および○は熱 (33°C) +エタノール 3%ストレスの増殖速度を示している。●で示した B4 株は増殖が可能であったが、○で示した dsigB 株は明らかな増殖阻害が確認された。■および□は熱 (33°C) +エタノール 4%ストレス条件下での増殖速度を示している。■で示した B4 株は OD<sub>600</sub>の増加は確認できないものの、菌体濃度は維持しているようであった。□で示した dsigB 株では OD<sub>600</sub>の値が経時的に低下していることから、ストレスに耐え切れず死滅している様子が観察された。

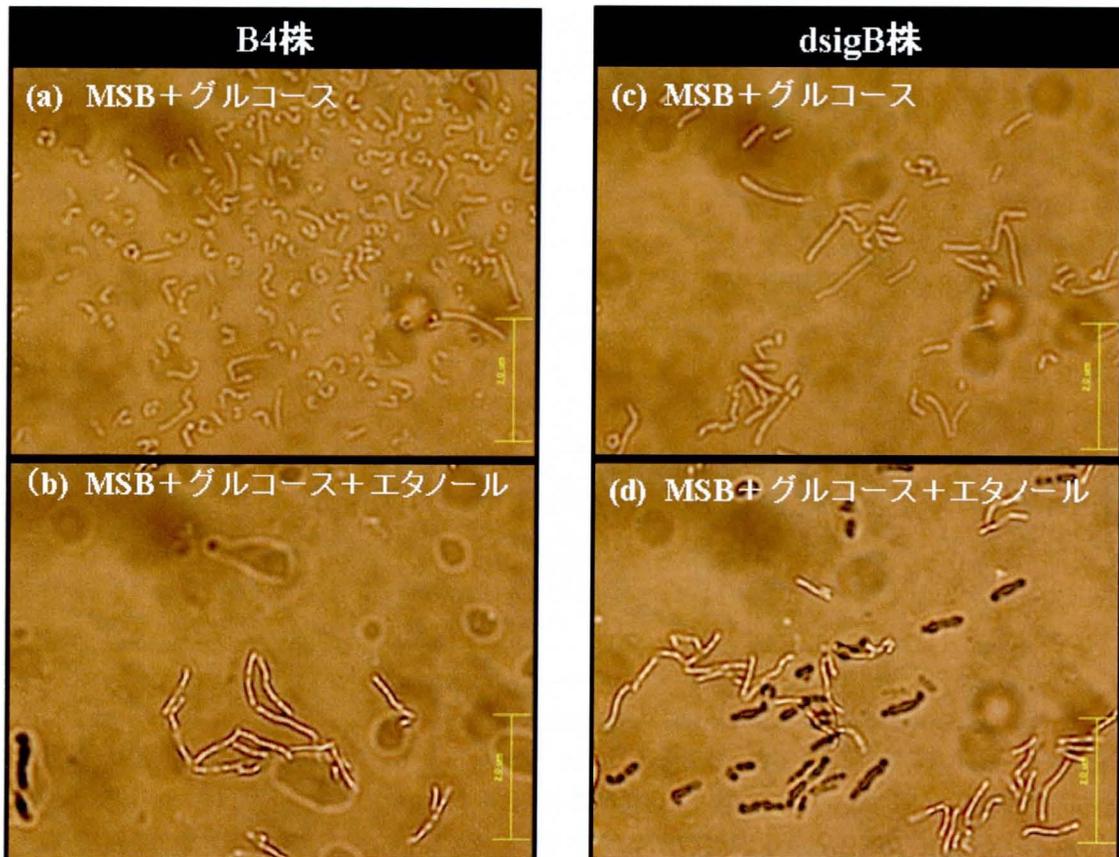


Fig.3-7 B4 株および dsigB 株の顕微鏡写真

### 3.3.3 dsigB 株の有機溶媒耐性

dsigB 株では環境ストレスに対する耐性の低下が確認されたことから、有機溶媒耐性の低下も見られるのではないかと考えた。そこで、B4 株および dsigB 株を TSB 培地で培養し、培養液を 10 倍ずつ希釈しながら TSB 寒天培地にスポットして、プレートを有機溶媒の入った小瓶とともに密閉容器（タッパー）に入れた。すると、*p*-キシレンやエチルベンゼンなどでは増殖に差は見られなかったが、ベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンでは dsigB 株において顕著な増殖阻害が観察された（Fig.3-8）。そこで、*sigB* 発現ベクター pKNR-*sigB* を構築し、dsigB に導入（dsigB-psB 株）したところ、ベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンに対する耐性が復帰した。*sigB* を破壊しても、全ての有機溶媒に対する耐性が低下したわけではないが（Table3-3）、これは B4 株の有機溶媒耐性機構がいかに複雑であることを示唆している。しかし、少なくとも SigB がベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンに対する耐性に関与していることは証明された。SigB は RNA ポリメラーゼを構成するサブユニットである。すなわち、dsigB の有機溶媒耐性が低下した直接の原因は、SigB が破壊されたことにより、SigB に転写制御されている遺伝子の発現が低下したためだと思われる。そこで、SigB に制御されている遺伝子の探索を行った。

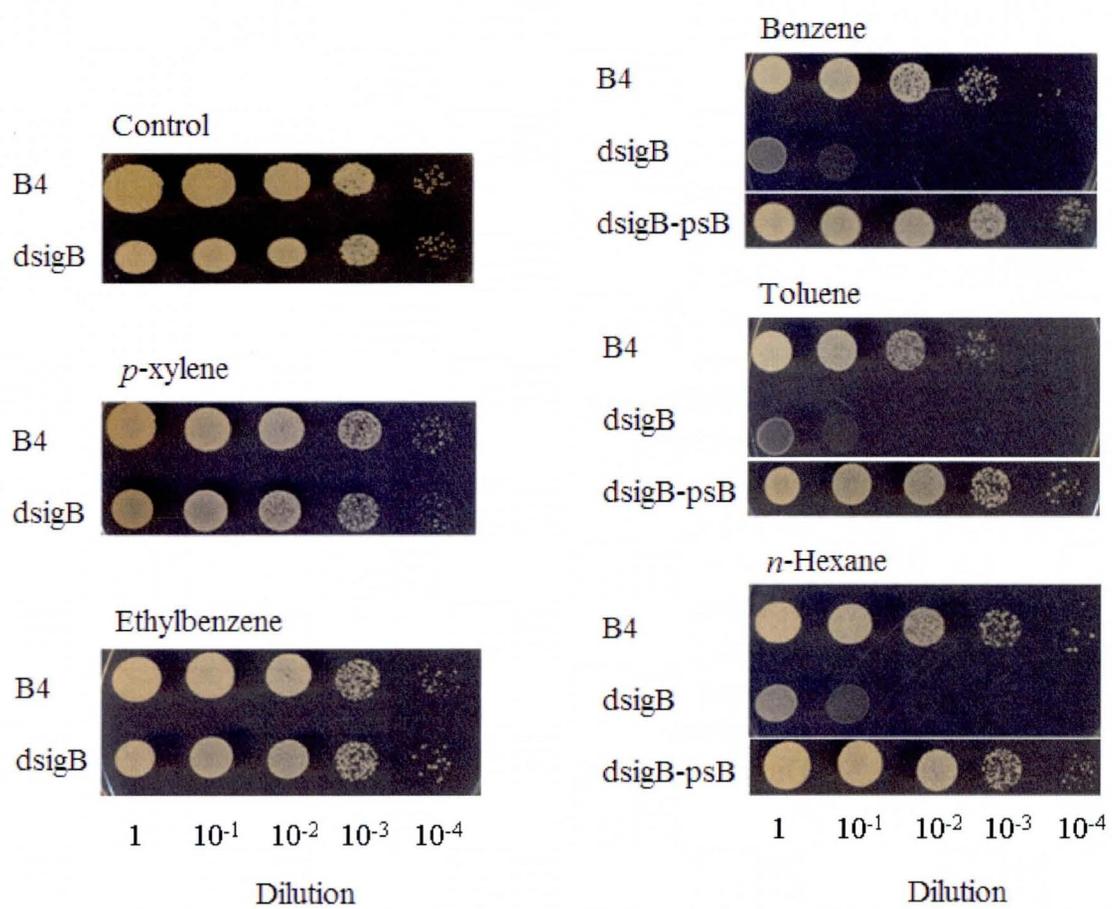


Fig.3-8 B4 株および dsigB 株における有機溶媒耐性試験

Table3-3 *sigB* 破壊株で耐性が低下した有機溶媒

	log P <sub>ow</sub>	Solvent	B4	
			Utilization	Tolerance
Hydrophobic	5.6	<i>n</i> -Decane	+	+
	4.6	<i>n</i> -Heptane	+	+
	4.5	<i>n</i> -Octane	+	+
	3.6	Propylbenzene	+	+
	3.5	<i>n</i> -Hexane	+	+
	3.3	Diethylphthalate	+	+
	3.2	Cyclohexane	+	+
	3.2	Ethylbenzene	+	+
	3.2	<i>m</i> -Xylene	+	+
	3.2	<i>p</i> -Xylene	+	+
	3.1	<i>o</i> -Xylene	+	+
	3.0	Styrene	+	+
	2.5	Toluene	+	+
	2.4	<i>n</i> -Heptanol	-	-
	2.3	Dimethylphthalate	+	+
Toxic	2.0	Benzene	+	+
	2.0	Chloroform	-	-
	0.8	<i>n</i> -Butanol	-	-

B4 株が耐性を持つ有機溶媒（+で表示）について、*dsigB* 株の有機溶媒耐性を調べた。すると、赤枠で囲んだ *n*-ヘキサン、トルエン、ベンゼンでのみ耐性の低下が確認された。その他の有機溶媒に対しては、耐性の低下は観察されなかった。

### 3.3.4 有機溶媒耐性に関与する遺伝子の探索

#### 3.3.4.1 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子

*dsigB* 株のベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子 *bnzA1* の転写量をリアルタイム-RT-PCR により測定したところ、B4 株に比べて転写量が顕著に低下しており、*dsigB* 株に *sigB* 発現ベクター *pKNR-sigB* を導入した *dsigB-psB* 株ではその転写量が復帰していることが確認された (Fig.3-9)。つまり、*sigB* は *bnz* オペロンの転写制御に関与していたことがわかった。*bnz* オペロンはベンゼンやトルエンの代謝に関与しているが、*dsigB* 株ではそれらの有機溶媒に対する耐性が低下していた。もしかすると、ベンゼンやトルエンの代謝、つまり分解が有機溶媒耐性に関与しているのではないかと考え、次のような実験を行った。

まず、*dsigB* 株で *bnz* オペロンが構成的に発現するように、ノンマーカ-遺伝子組換え技術を用いて *bnzA1* プロモーターと *kan* プロモーターを置換し、*dsigB-pkA* 株とした。*dsigB-pkA* 株の *bnzA1* 転写量は構成

的に誘導されていることが、リアルタイム-RT-PCR により確認されたが、*bnzA1A2A3A4* の下流に存在する *bnzC* の転写は構成的ではなかった (Fig.3-10)。そこで、*dsigB-pkA* 株に *bnzCB* 発現ベクター *pKNR-bnzCB* を導入し、*dsigB-bnz* 株とした。*dsigB-bnz* 株の *bnzA1* および *bnzC* は構成的に転写されていることが確認された (Fig.3-10)。そこで、*dsigB-bnz* 株のトルエン耐性テストを行ったが、その耐性は *dsigB* 株よりも低下していた (Fig.3-11)。さらに面白いことに、B4 株の *bnzA1A2A3A4CB* を破壊した *dbnz* 株はトルエン分解経路を破壊しているにもかかわらず、耐性が低下するどころか逆に B4 株よりも耐性が若干増加していた。もしかすると、トルエンの代謝過程で生産される物質が B4 株に対してストレスを付与しているのかもしれない。そのため、*dsigB-bnz* 株ではそのストレスによりトルエン耐性が *dsigB* 株よりもさらに低下し、逆に *dbnz* 株では代謝中間物によるストレスが低減されるために B4 株に比べて増殖速度が速くなるのかもしれない。この推測が正しいか確認するためには、相補性試験として *bnzA1A2A3A4CB* 発現ベクターを構築し、*dbnz* 株に導入した時にトルエン耐性が B4 株と同程度に戻るかを確認する必要がある。しかし、今回の結果から、B4 株において *BnzACB* によるトルエンの分解はトルエン耐性に少なくともプラスには作用しないということが示された。

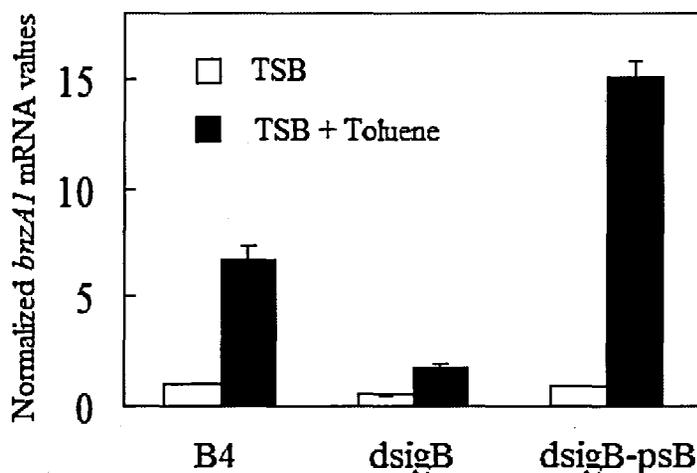


Fig.3-9 B4 株、*dsigB* 株、*dsigB-psB* 株における *bnzA1* 転写量の比較  
*bnzA1* の転写量は *gyrB* の転写量により標準化した。

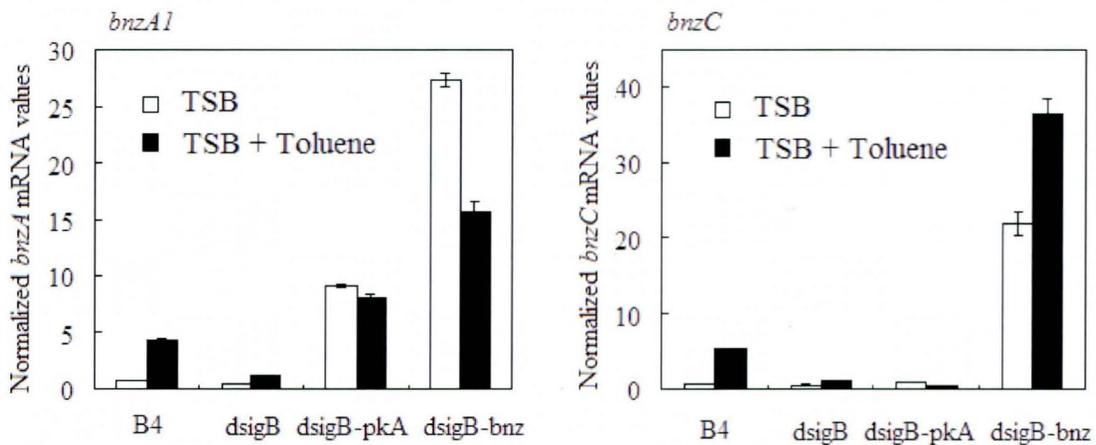


Fig.3-10 *bnzA1* および *bnzC* 転写量の比較  
*bnzA1* および *bnzC* の転写量は *gyrB* の転写量により標準化した。

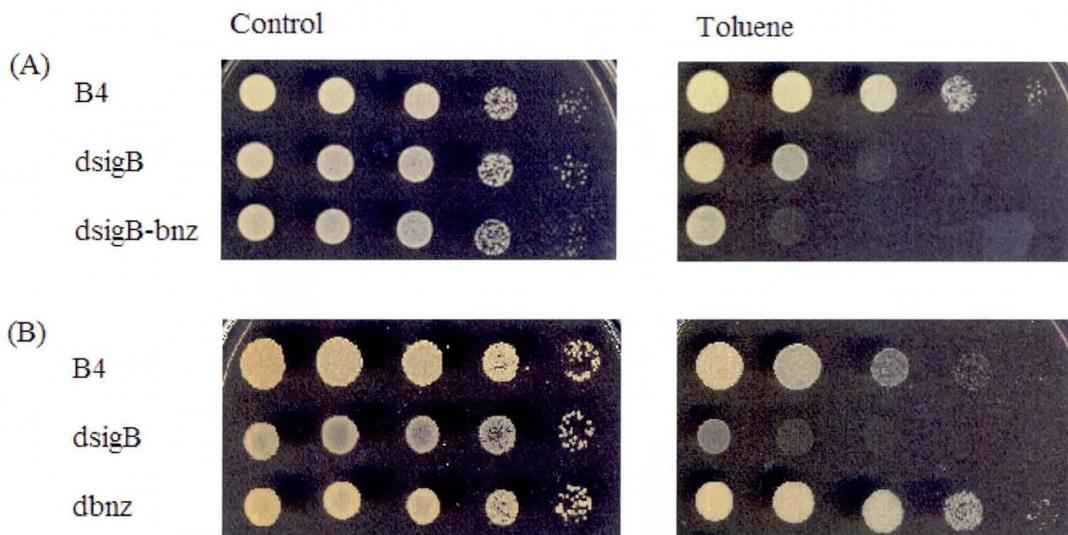


Fig.3-11 B4 株, dsigB 株およびその派生株におけるトルエン耐性テスト

### 3.3.4.2 efflux pump

グラム陰性菌における有機溶媒耐性機構の研究では、efflux pump を用いて有機溶媒を細胞外へ排出することによる耐性機構が報告されている[24-28]。しかしながら、グラム陽性菌においては、有機溶媒耐性と efflux pump を関連付けた報告は無い。そこで、B4 株における efflux pump が有機溶媒耐性に関与しているか調べることにした。

まず、B4 株のゲノム情報を元に、B4 株の“putative efflux pump”と推測されている遺伝子（32 遺伝子）に対するリアルタイム-RT-PCR用のプライマーを設計した。次に、B4 株を TSB、TSB+トルエン、TSB

+*n*-ヘキサン、TSB+*o*-キシレン、TSB+*n*-デカンで培養し、総 RNA を抽出した。リアルタイム-RT-PCR の結果は、TSB 培地で培養時の転写量で標準化した (Fig.3-12)。その結果、トルエンや *n*-ヘキサンを供給した時に 21 番目 (*efp21*) および 24 番目 (*efp24*) の遺伝子の転写量が、TSB 培地で培養したときと比較して約 3~6 倍増加していることが分かった。さらに、B4 株および *dsigB* 株を TSB+トルエンで培養した時の *efp* 転写量を調べたところ、全ての遺伝子の転写量が低下していた (Fig.3-13)。したがって、*efp21* および *efp24* はトルエンやヘキサンの耐性に関与しており、*sigB* 破壊株では *efp21* と *efp24* の転写量が低下することにより、その耐性も低下するのではないかと考えた。

そこで、*efp21* および *efp24* 発現ベクター pKNR-*ep21*、pKNR-*ep24* を構築し、*dsigB* に導入した (*dsigB-ep21* 株、*dsigB-ep24* 株)。pKNR-*ep21* および pKNR-*ep24* は、*dsigB* 株で発現するように、それぞれ *efp21* と *efp24* の SD 配列の上流に *kan* プロモーターを融合させた。*dsigB-ep21* 株、*dsigB-ep24* 株を用いてベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンに対する耐性テストを行った結果、*dsigB-ep24* 株の耐性は復帰しなかったが、*dsigB-ep21* 株は *n*-ヘキサンに対する耐性が若干復帰した (Fig.3-14)。さらに、B4 株に pKNR-*ep21*、pKNR-*ep24* を導入して B4-*ep21* 株および B4-*ep24* 株を構築し、ベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンに対する耐性テストを行った結果、B4-*ep21* 株では若干耐性が増加した。このことから、*efp21* は *n*-ヘキサン耐性に関与している可能性が示された。もし、efflux pump が有機溶媒耐性に関与しているならば、これまでほとんど解明されていないグラム陽性菌の有機溶媒耐性機構に関する研究に対する突破口の一つとなるかもしれない。そこで、今後は B4 株の *efp21* を破壊したときに *n*-ヘキサン感受性を示すかどうかを調べ、もし感受性を示すならば *efp21* 発現ベクターを導入した時に相補性を示すかを調べることにより、*efp21* が確実に *n*-ヘキサン耐性に関与しているかを確認する必要があると思われる。それと同時に、ベンゼンやトルエンまたはその他の有機溶媒に対する耐性に関与する遺伝子の探索も、引き続き行う必要があると思われる。

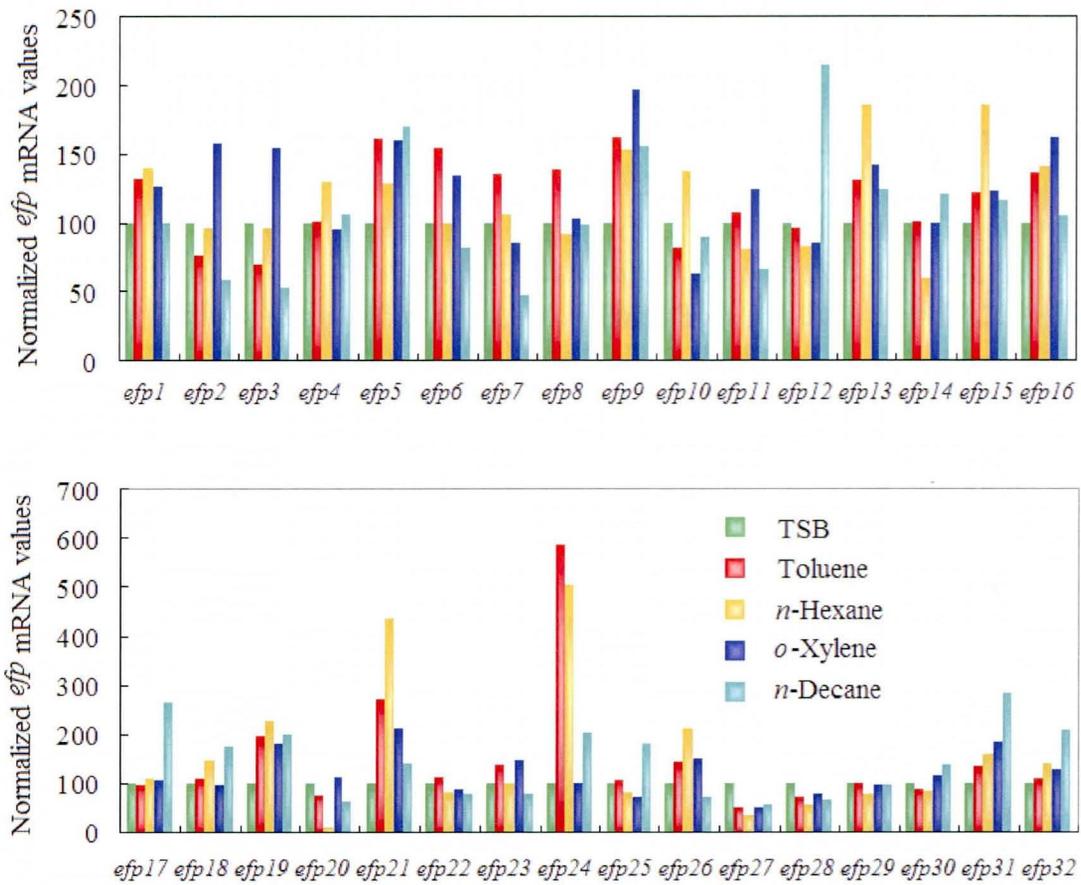


Fig.3-12 efflux pump 遺伝子転写量の比較  
 各遺伝子の転写量は *gyrB* 転写量で標準化し、さらに TSB 培地で培養した際の転写量を 100%として標準化した。

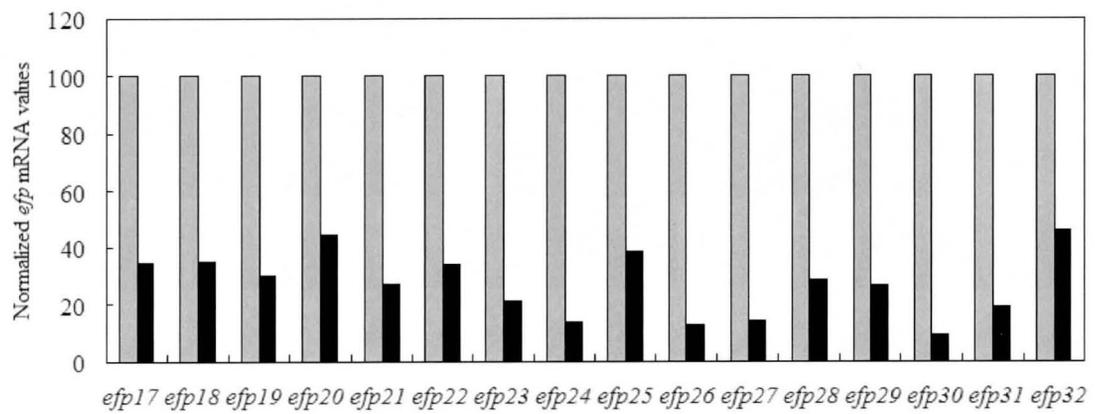
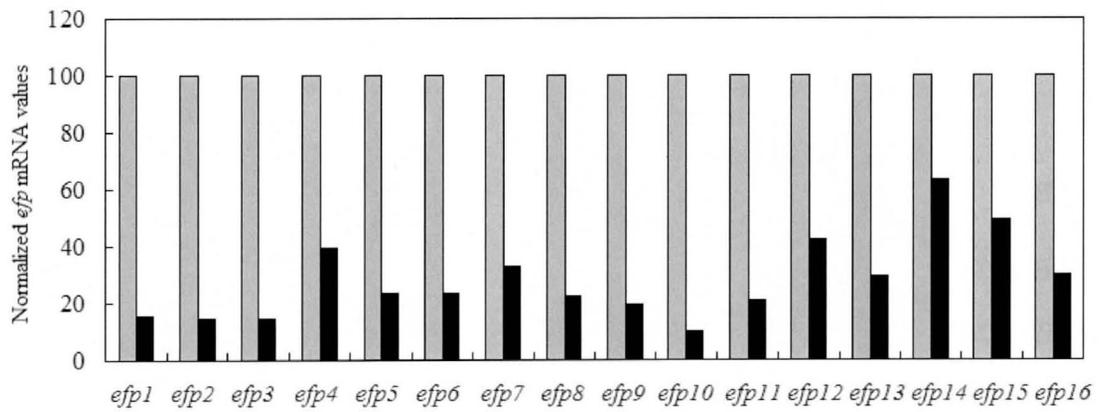


Fig.3-13 efflux pump 遺伝子転写量の比較 (TSB+トルエン培養時)  
 各遺伝子の転写量は *gyrB* 転写量で標準化した後、さらに B4 株における遺伝子転写量を 100%として標準化した。■は B4 株の遺伝子転写量、  
 ■は dsigB 株の遺伝子転写量を示す。

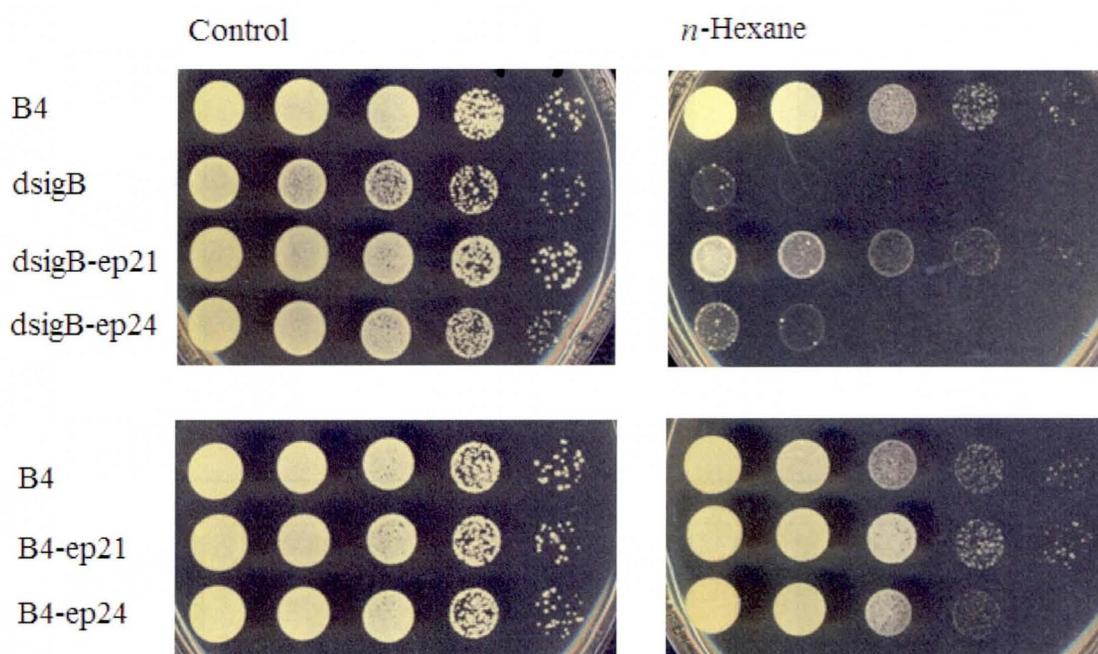


Fig.3-14 B4 株, dsigB 株およびその派生株における *n*-ヘキサン耐性試験

### 3.3.4.3 分子シャペロン

グラム陰性菌における有機溶媒耐性の研究では、分子シャペロンが有機溶媒耐性を付与しているという報告もある[35,36,37]。分子シャペロンによる耐性機構は、細胞内に入ってきた有機溶媒によるタンパク質の変性を低減させることによる。そこで、B4 株においても有機溶媒耐性と分子シャペロンが関与していないか調べることにした。

B4 株のゲノム情報を元に、27 種類の分子シャペロンに対するリアルタイム-RT-PCR 用プライマーを設計した。そして 4.3.3.2 と同様の操作をした。その結果、*efp* の時ほど大きな差は出なかったが、*clpP4*、*clpS*、*hscA-1*、*hscA-3*、*groEL-1*、*groEL-2*、*groES* の転写量が有機溶媒供給下で比較的増加していた (Fig.3-15)。グラム陰性菌における分子シャペロンと有機溶媒耐性に関する研究では、GroELS を過剰発現させることにより、有機溶媒耐性が増加したという報告もある[35]。Fig.3-15 の結果でも *o*-キシレンや *n*-デカン供給時に GroEL、GroES の転写量が増加している。しかし、トルエンや *n*-ヘキサン供給時には増加量が大きくなかった。もしかすると、B4 株にとって比較的毒性が低い有機溶媒に対しては GroELS による耐性機構が働いているのかもしれない。また、トルエン供給時の *clpP4*、*clpS*、*hscA-1*、*hscA-3*、*groEL-1*、*groEL-2*、*groES* の転写量を B4 株と dsigB 株で比較してみた (Fig.3-16)。すると、dsigB 株では *groEL-1* および *groEL-2* の転写量の増加が観察されたが、その他の遺伝子では発現量が低下していた。

今後はこれらの遺伝子が有機溶媒耐性に関与しているかを調べる必

要がある。しかし、分子シャペロンは細胞の増殖にとって必須であることが多く、破壊できないことも多い。そこで、B4株または *dsigB* 株内で分子シャペロンを過剰発現させ、有機溶媒耐性との関係性を調べる必要があると思われる。

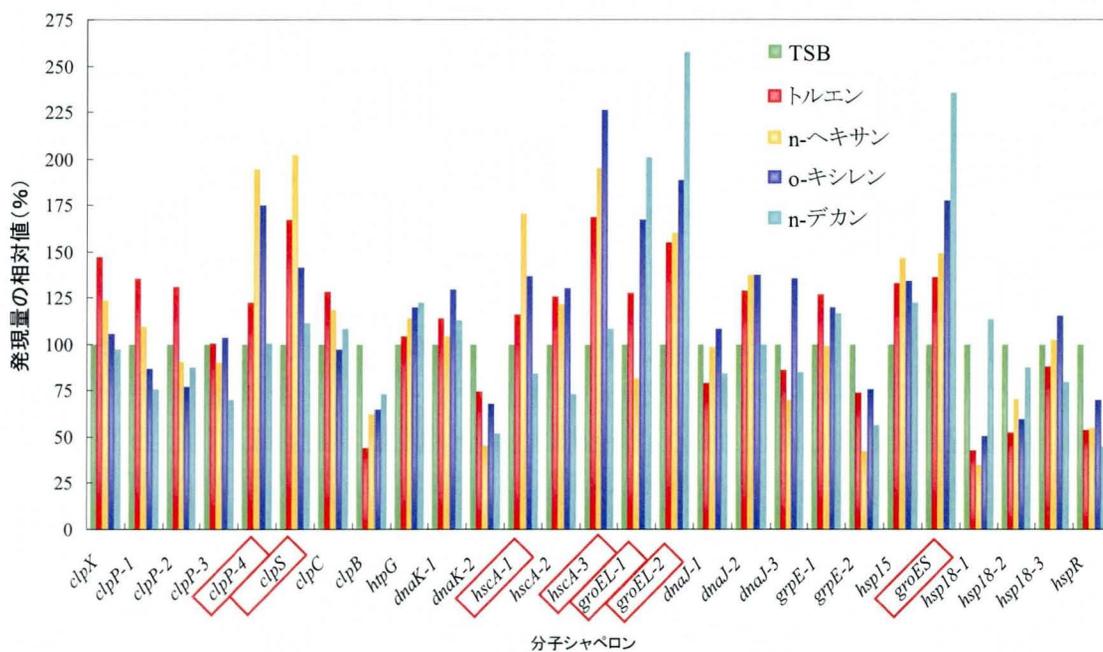


Fig.3-15 B4株における分子シャペロン転写量の比較

各遺伝子の転写量は *gyrB* 転写量で標準化した後、さらに TSB 培養時の各遺伝子の転写量で標準化した。有機溶媒供給下での転写量の増加が比較的大きかった遺伝子は赤枠で囲った。

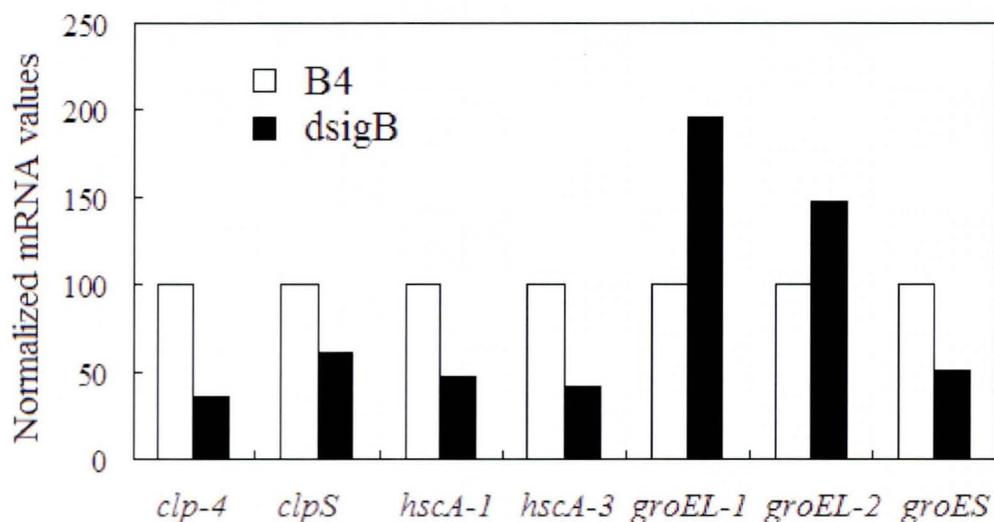


Fig.3-16 B4株と *dsigB* 株の分子シャペロン転写量の比較

各遺伝子の転写量は *gyrB* 転写量で標準化した後、B4株における各遺伝子の転写量によって標準化した。

#### 3.3.4.4 その他のシグマファクター

これまでの研究で B4 株において *sigB* が有機溶媒耐性に大きく関与していることが分かった。そこで、その他のシグマファクターについても調べることにした。まず、B4 株と *dsigB* 株でトルエン供給時のその他のシグマファクター遺伝子の転写量を比較した (Fig.3-17)。その結果、*dsigB* 株の *sigH* 転写量が B4 株と比べて 7 倍以上増加していた。これは、*sigB* が機能しなくなったことにより *sigH* がその機能を代替しているためであるかもしれない。また、*dsigB* 株では *sigF-1*、*sigF-2*、*sigF-3*、*sigL-1*、*sigL-2* の転写量の低下が見られた。

次に、B4 株を TSB 培地で培養し、経時的に OD<sub>600</sub> を測定するとともに、総 RNA を抽出した。各増殖段階における *sigF-1*、*sigF-2*、*sigF-3* の転写量を測定したところ、*sigB* と同様に増殖段階の後期から、その転写量が急激に増加することがはっきりと示された (Fig.3-18)。このことから、*sigF* も *sigB* と同様にストレス条件下において発現が誘導されるシグマ因子である可能性が示唆された。また、*sigB* 破壊株では *sigF* の転写量が低下しているため、*sigB* は *sigF* 発現に関与している可能性もある。今後は、*sigF* 破壊株を構築し、そのストレス耐性や有機溶媒耐性についても検討していく必要がある。

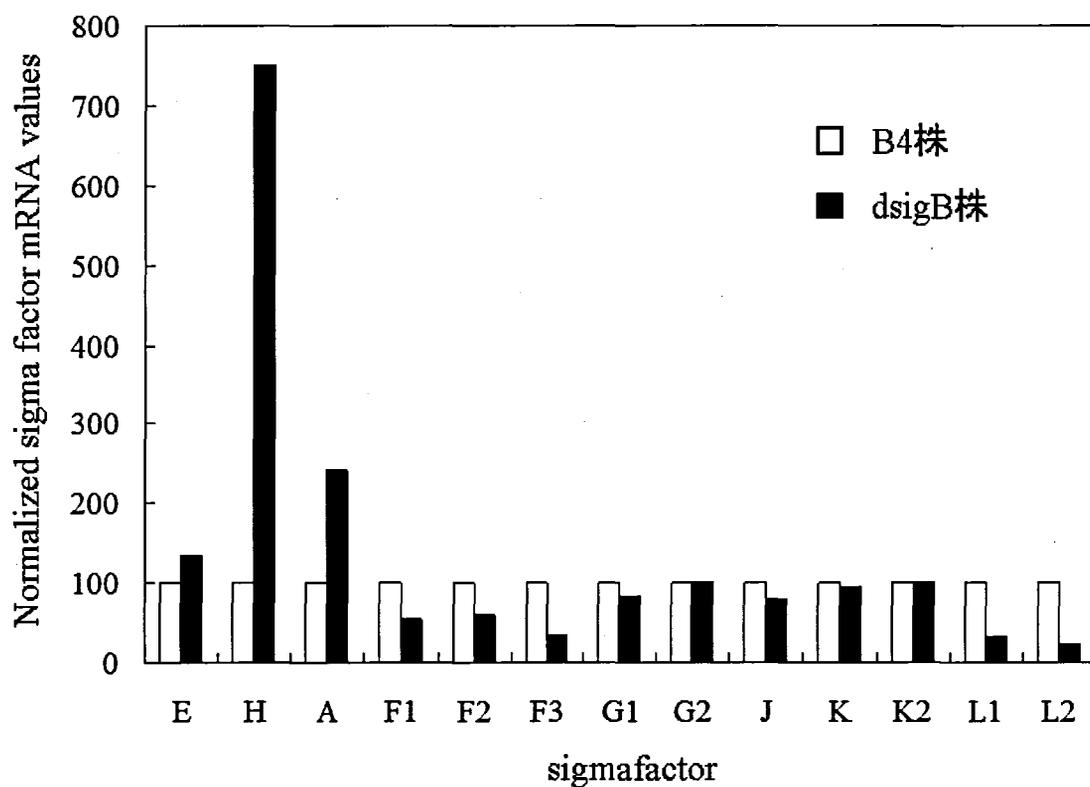


Fig.3-17 B4 株および dsigB 株におけるシグマ因子遺伝子転写量の比較  
 各遺伝子の転写量は *gyrB* 転写量で標準化した後、B4 株における転写量を 100%として、再標準化した。

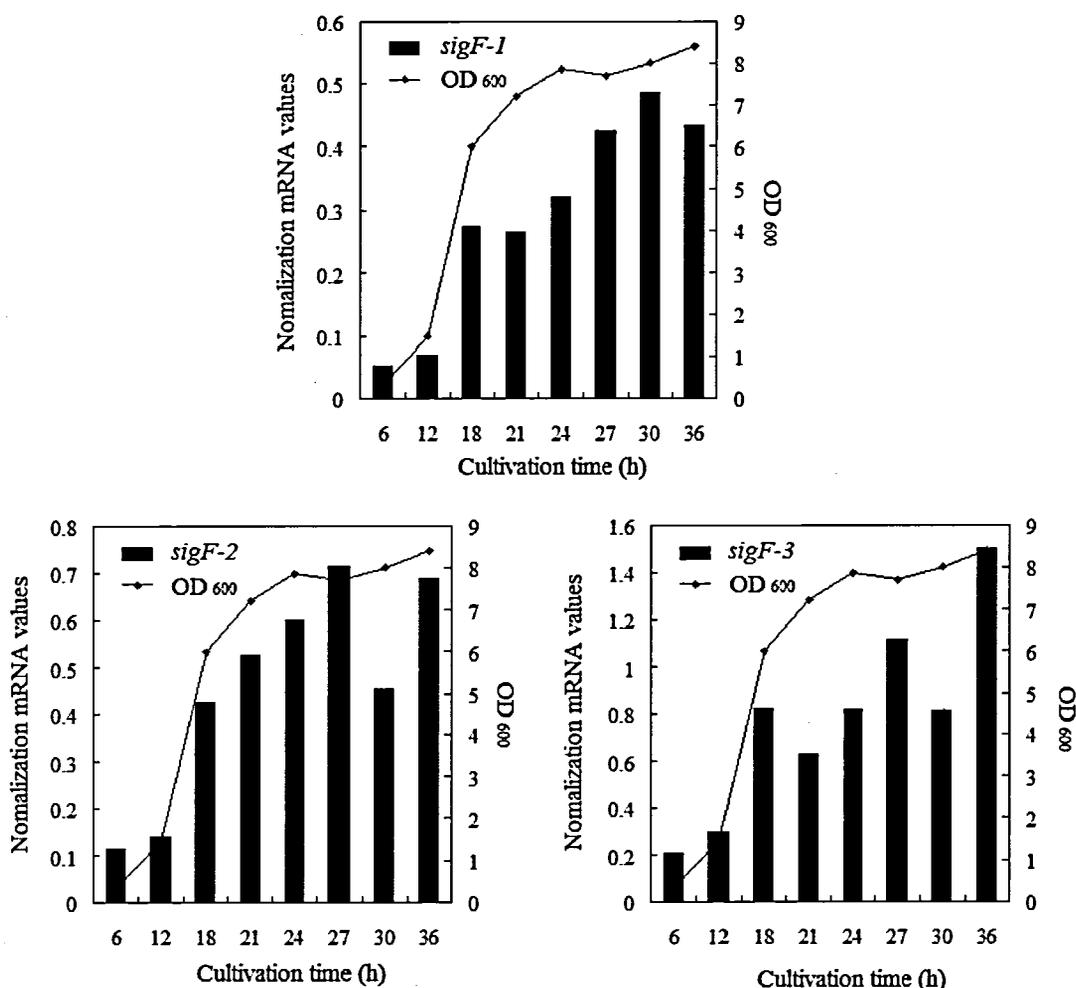


Fig.3-18 各増殖段階における *sigF-1,F-2,F-3* 遺伝子転写量の比較  
各遺伝子の転写量は *gyrB* により標準化した。

#### 第4節 要約

B4株において、*sigB* は対数増殖期後期以降および、熱ストレス、エタノールストレス、トルエンストレス条件下で誘導されていることが確認された。*sigB* 破壊株は熱ストレス、エタノールストレスに対する耐性が低下していた。さらに、有機溶媒耐性を調べたところ、ベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンに対する耐性が顕著に低下していた。*sigB* 発現ベクターを構築、相補性試験を行ったところ、それらの有機溶媒に対する耐性の復帰が確認された。

*sigB* 破壊株ではベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子の転写量が低下していた。しかし、トルエンの分解はトルエン耐性に対してプラスには作用していなかった。*efflux pump* の転写量を調べたところ、*esp21*、*esp24* の転写量がトルエンおよび *n*-ヘキサン供給下で顕著に増加していた。

そこで、*efp21* および *efp24* 発現ベクターを構築し、*sigB* 破壊株に導入したところ、*efp21* 導入株では *n*-ヘキサンに対する耐性が若干復帰していた。このことから、*efp21* が *n*-ヘキサンの排出に関与している可能性が示された。

有機溶媒供給下で分子シャペロンの転写量を調べたところ、*clpP-4*、*clpS*、*hscA-1*、*hscA-3*、*groEL-1*、*groEL-2*、*groES* の転写量の増加が確認された。また、シグマ因子遺伝子 *sigF-1*、*F-2*、*F-2* は *sigB* と同様に対数増殖期後期から急激に転写が誘導されることが分かった。今後は、これらの遺伝子が有機溶媒耐性に関与しているか調べていく必要があると思われる。

## 第4章

# *R. opacus* B4株を用いた トルエンからのクレゾール生産

### 第1節 緒言

*R. opacus* B4株は、ベンゼン、トルエン、キシレンおよびエチルベンゼンなどの芳香族炭化水素やオクタンやデカンなどの脂肪族炭化水素を含む種々の有機溶媒に耐性を示す[17]。また、B4株の細胞は非常に疎水度が高く、テトラデカンなどの有機溶媒に容易に懸濁することが可能である。さらに、有機溶媒に懸濁されたB4株細胞は少なくとも5日間は生存するうえに、トルエンジオキシゲナーゼ活性を示すことが報告されている[49]。このことから、B4株は疎水性バイオプロセスにおける生体触媒の宿主として多いに期待されている。

そこで本研究では、B4株を用いた疎水性バイオプロセスのモデル系として、トルエンからクレゾールの生産を試みた。

### 第2節 実験材料および方法

#### 4.2.1 使用菌株およびプラスミド

使用菌株およびプラスミドは Table 4-1 に示した。*R. opacus* B4株およびB4派生株は Tryptic Soy Broth(Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)を用い、28°Cで振とう培養した。MSB培地(2.2.1参照)を用いる際は、炭素源としてグルコースを2g/l加えるか、適当な有機溶媒を蒸気で供給した。寒天培地の調製では寒天を15g/l添加し、スクロースを加える際は200g/lとなるように加えた。抗生物質は必要に応じて75mg/lカナマイシン(Km)、30mg/lクロラムフェニコール(Cm)、5mg/lゲンタマイシン(Gm)を加えた。*E. coli* MV1184はプラスミド構築のために使用した。MV1184はLuria Bertani(LB)培地[45]を用いて、37°Cで振とう培養した。LB寒天培地の調整には寒天を15g/l加え、スクロースを入れる際は50g/lとなるように加えた。必要に応じて、30mg/lのCm、10mg/lのGmを加えた。

Table 4-1 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<b><i>E. coli</i></b>		
MV1184	<i>ara</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) Δ( <i>srl-recA</i> )306::Tn10(Tc <sup>r</sup> ) F'[ <i>traD36 proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>a</sup> <i>lacZ</i> ΔM15]	[43]
<b><i>R. opacus</i></b>		
B4	有機溶媒耐性細菌。	[17]
B4DeKm	B4-bnzB 破壊株。bnzB::Km <sup>r</sup> 。	[18]
DeKm-BA	B4DeKm 株に <i>bnzA1A2A3A4</i> 発現ベクター pKNR-bnzA を導入。Km <sup>r</sup> ,Cm <sup>r</sup> 。	This study
dPhC	B4 派生株。 <i>phlB,phlA,cata</i> ノンマーカ 破壊株。	This study
dPCZ	dPhC 派生株。 <i>bnzA1A2A3A4,bnzC,bnzB</i> ノ ンマーカ破壊株。	This study
dPCZ-P2	dPCZ 派生株。 <i>phlB2,phlA2</i> ノンマーカ 破壊株。	This study
dPCZ-P2-BA	dPCZ-P2 株に <i>bnzA</i> 発現ベクター pKNR-bnzA を導入。Cm <sup>r</sup> 。	This study
dPCZ-P2-pkB	dPCZ-P2 株に <i>bnzA1A2A3A4</i> 発現ベクター pKNApk を導入。Cm <sup>r</sup> 。	This study
<b>Plasmids</b>		
pKNR01.1	<i>R. opacus-E. coli</i> シヤトルベクター	[41]
pG19II	ノンマーカ遺伝子組換え用プラスミド。 ポジティブマーカとして Gm 耐性遺 伝子、カウンターセレクションマーカとし て <i>sacB</i> を持つ。	[44]
pKNR-bnzA	<i>bnzA1A2A3A4</i> 発現ベクター、pKNR01.1 に <i>bnzA1A2A3A4</i> を挿入。	This study
pKNApk	<i>bnzA</i> 発現ベクター、pKNR01.1 に <i>kan</i> プロ モーター+ <i>bnzA1A2A3A4</i> を挿入	[50]
pG19-dph1	pG19II 派生プラスミド。 <i>phlB,phlA</i> 破壊用。	This study
pG19-dbnz2	pG19II 派生プラスミド。 <i>bnzA1A2A3A4CB</i> 破 壊用。	This study
pG19-dph12	pG19II 派生プラスミド。 <i>phlB2,phlA2</i> 破壊 用。	This study

Ap:ampicillin, Km:kanamycin, Gm:gentamycin, Cm: chloramphenicol

#### 4.2.2 使用プライマーおよび PCR

本研究で使用したプライマーは Table 4-2 に示した。PCR は KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) を用い、メーカーの指定する使用方法に従って行った。

**Table 4-2** 使用プライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
bnzA-ex-F	ACTGAAGCTTGAATTCCAGCCGGGTGG
bnzA-ex-R	ACTGGTACCTCCTGTTGCCGTGTGTGATG
phlB0-F	ACTTCTAGAACCTGTTGGTGGACTGTG
phlB0-R	ACTGGTACCGACCTGCACAACGTATGAC
catA0-F	AGTGGTACCAGGTCGTGACCTACGAC
catA0-R	ACTGAATTCOAAGTACAGCATCAGTCGTC
bnzA0-2F	AGAAGATCTAGAAACGCATCCGACCCAACAC
bnzA0-2R	AGAAGACTGCAGCCTTACGGCAACCAATATGGTC
bnzS0-2F	AGAAGACTGCAGAACAACAGCGAACGACACCAGG
bnzS0-2R	AGAAGAAGCTTTCGCGTTTCCTCCATCGCTATC
phlB2-0-F	GAAGTTATCAGTCGACGATGCTTCGGTGCTCC
phlB2-0-R	ACTGGTACCGACCTGCACAACGTATGAC
phlA2-0-F	ACTGGTACCCTGAGATACCGACCATTACC
phlA2-0-R	ATGGTCTAGAAAGCTTTCGAACTGTTCCACGTAG
phl-RT-F	TGACGTATGGCTGGATGG
phl-RT-R	ACCTTCTCCTGCGACTC
bnzA-RT-F	TGTACGAACAGGAACTGGAG
bnzA-RT-R	ATCCTCGCCCATGTAGTTC
16s-RT-F	CGTGCTTAACACATGCAAGTCG
16s-RT-R	ACCCAGTTTCCCAGGCTTATC
P1-RT-F	TGTCGACGTTCTGCTGC
P1-RT-R	TGAACTCCGGAATGGAGG
P2-RT-F	AGACTGTGCCAGGTCAC
P2-RT-R	ACGGGTTCGGGATTCTG
P3-RT-F	ACCACGCGATCATCAACC
P3-RT-R	TGAAGTTGTAGTTGGTGATCG
P4-RT-F	TTCTCGTCACGCTCGAC
P4-RT-R	GATGTGGAACCTCGAGCAG
P5-RT-F	ATCGAACCTCGGCTCTG
P5-RT-R	TGCCTGCGAAGTGCATG
P6-RT-F	TGACGTATGGCTGGATGG
P6-RT-R	ACCTTCTCCTGCGACTC
P7-RT-F	CACGAACTGAAGGTCGAC

P7RT-R	CACTCCGAGATTGACGAC
P8-RT-F	TCCAGCCGAGGTTGTAG
P8-RT-R	CATGTGAACGTGCGCATG
P9-RT-F	TGTGCGATCTGCTGGAG
P9-RT-R	AACTCGCGATGGAGGAC
P10-RT-F	AACCAGTTGACGAGGTCG
P10-RT-R	TCGAACCACGATATGTAGG
P11-RT-F	GTCGTTCTCGTCGAACC
P11-RT-R	ATCTTCACGGTGCCGATG
P12-RT-F	AGTGTGTCGAAGATCCACC
P12-RT-R	GTTGATCGTGACGGGATC
P13-RT-F	TGGGTACTGATCACCTCG
P13-RT-R	ACCACATGGTCGTGAC

---

#### 4.2.3 遺伝子操作

第2章 2.2.3 参照

#### 4.2.4 *R. opacus* B4 株からの染色体抽出

第2章 2.2.4 参照

#### 4.2.5 プラスミドの構築

##### 4.2.5.1 *bnzA* 発現ベクターの構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー *bnzA-ex-F/bnzA-ex-R* を用いて PCR した。増幅断片を *HindIII/KpnI* で処理し、同じく *HindIII/KpnI* で処理した pKNR01.1 に挿入した。

##### 4.2.5.2 pG19-*dphI* の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー *phlB0-F/phlB0-R* および *catA0-F/catA0-R* を用いて、それぞれ *phlB* 上流、*catA* 下流領域を増幅した。*phlB* 上流領域を *XbaI/KpnI* で処理、*catA* 下流領域を *KpnI/EcoRI* で処理し、pG19II の *XbaI/EcoRI* サイトに挿入した。

##### 4.2.5.3 pG19-*dbnz2* の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー *bnzA0-2F/bnzA0-2R* および *bnzS0-2F/bnzS0-2R* を用いて、それぞれ *bnzA1* 上流、*bnzB* 下流領域を増幅した。*bnzA1* 上流領域を *XbaI/PstI* で処理、*bnzB* 下流領域を *PstI/HindIII* で処理し、pG19II の *XbaI/HindIII* サイトに挿入した。

#### 4.2.5.4 pG19-dphl2 の構築

B4 株の染色体を鋳型にして、プライマー *phlB2-0-F/phlB2-0-R* および *phlA2-0-F/phlA2-0-R* を用いて、それぞれ *phlB2* 上流、*phlA2* 下流領域を増幅した。*phlB2* 上流領域を *XbaI/KpnI* で処理、*phlA2* 下流領域を *KpnI/EcoRI* で処理し、pG19II の *XbaI/EcoRI* サイトに挿入した。

#### 4.2.6 エレクトロポレーションによる形質転換

第 2 章 2.2.6 参照。Buffer は HG buffer (0.3M glycerol、7mM HEPES[pH7.0 by KOH]) を用いた。

#### 4.2.7 二相系培養システム

B4 株または B4 派生株を TSB 液体培地で一晚培養し、20400×g で 3 分間遠心分離して集菌した。ペレットを MSB 培地に懸濁し、遠心分離 (20400×g、3 分間) で集菌することにより洗浄した。ペレットを適当量の TSB または MSB に懸濁し、10ml ずつスクリー管瓶に分注した。有機溶媒相として、テトラデカンを 5ml 重層した。基質となる有機溶媒が 300 $\mu$ l 入ったダーラム管をスクリー管瓶に入れてキャップをし、有機溶媒を蒸気で供給した。基質となる有機溶媒にはトルエンを用いた。培養は 28°C、120rpm で行った。

#### 4.2.8 HPLC による分析

カラムは TSK-GEL ODS-80Tm カラム (260×4.6 ; TOSOH, Tokyo) を用いた。流速 0.5ml/min、water : acetonitrile (30:70)、検出は 220nm で行った。

#### 4.2.9 ノンマーカ―遺伝子組換え株の構築

ノンマーカ―遺伝子組換えの原理、方法は第 2 章を参照。B4 株に pG19-dphl を導入し、dPhC 株 (*phlA, phlB, catA* 破壊株) を構築した。dPhC 株に pG19-dbnz2 を導入し、dPCZ (*phlA, phlB, catA, bnzA1A2A3A4, bnzC, bnzB* 破壊株) を構築した。dPCZ 株に pG19-dphl2 を導入し、dPCZ-P2 株 (*phlA, phlB, catA, bnzA1A2A3A4, bnzC, bnzB, phlB2, phlA2* 破壊株) を構築した。遺伝子組み換え株の確認は PCR を用いた。dPhC 株の確認にはプライマー *phlB0-F/catA0-R* および *phl-RT-F/phl-RT-R* を、dPCZ の確認には *bnzA0-2F/bnzS0-2R* および *bnzA-RT-F/bnzA-RT-R* を、dPCZ-P2 の確認にはプライマー *phlB2-0-F/phlA2-0-F* および *P2-RT-F/P2-RT-R* を用いた。

#### 4.2.10 有機溶媒資化性テスト

有機溶媒資化テストは、MSB 寒天培地に B4 株または B4 派生株を植菌し、有機溶媒の入った小瓶と共に密閉容器（タッパー）に入れて有機溶媒を蒸気で供給し、28°Cで培養した。

スポット培養の場合は、TSB 液体培地で培養した B4 株または B4 派生株を MSB で洗浄した後に、濃度が同じになるように MSB に懸濁した。MSB 培地で 10 倍ずつ希釈した懸濁液を、MSB 寒天培地に 6  $\mu$ l ずつスポットした後に、有機溶媒の入った小瓶と共にタッパーに入れて、28°Cで培養した。

液体培養によるフェノール資化性テストの場合は、TSB 液体培地で一晚培養した B4 株または B4 派生株を MSB 培地で洗浄した後に、濃度が同じになるように MSB 培地に懸濁した。懸濁液を新しい MSB 培地 10ml が入ったスクリー管に 1%~5%分注し、培養開始から 0 時間、24 時間、40 時間、48 時間目に炭素源としてフェノールを 5  $\mu$ l 滴下した。吸光濁度の測定は OD<sub>600</sub>で行った。

#### 4.2.11 リアルタイム逆転写 PCR (RT-PCR)

B4 株および B4KP 株を TSB 寒天培地および TSB 寒天培地をタッパーに入れてトルエン蒸気を供給し、約 48 時間 28°Cで培養した。プレートから菌体を少量かきとり、RNAprotect bacteria reagent (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)を用いて RNA 安定化を行った。総 RNA の抽出は RNeasy kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)を使用し、メーカーの指定する使用方法に従った。リアルタイム-RT-PCR は LightCycler system (Roche diagnostics)を用いて行い、試薬は One Step SYBR<sup>®</sup>PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (TaKaRa Bio)を使用し、メーカーの指定する使用方法に従って行った。内部標準には 16S rRNA (プライマー 16s-RT-F/16s-RT-R)を用いた。*bnzA1* 転写量測定用のプライマーは *bnzA-RT-F/bnzA-RT-R*を用いた。

### 第3節 結果と考察

#### 4.3.1 B4 組換え株によるトルエンからのクレゾール生産

*R. opacus* B4 株は、*bnzA1A2A3A4*,*bnzC*,*bnzB* という遺伝子にコードされたトルエン代謝経路を持つ (Fig.4-1)。ここで、*bnzB* を破壊するとメチルベンゼングリコールが蓄積される。メチルベンゼングリコールは化学的に不安定であるため、pH7 以下だと容易にクレゾールに変換される。B4 株における疎水性バイオプロセスのモデル系として、トルエンからクレゾールを生産するために、本研究室で相同組み換えを利

用して構築された *bnzB* 破壊株 (B4DeKm) を使用した[18]。さらに、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子 *bnzA1A2A3A4* を過剰発現させるために、*R. opacus* -*E. coli* シャトルベクターである pKNR01.1[41]に *bnzA1A2A3A4* を挿入した発現ベクターpKNR-*bnzA* を構築し、エレクトロポレーションにより B4DeKm 破壊株に導入した (DeKm-BA 株)。B4DeKm 株と DeKm-BA 株における、*bnzA1* 発現量をリアルタイム-RT-PCR で測定したところ、DeKm-BA 株は DeKm 株に比べてトルエン供給時の *bnzA1* 発現量が約 5 倍増加していた (Fig.4-2)。そこで、DeKm-BA 株を用いてトルエンからのクレゾール生産を試みた。

クレゾール生産には二相系培養システムを用いた。二相系培養システムとは、培養液を水相と有機溶媒相に分け、水相で生産された疎水性物質を有機溶媒相で回収するシステムである (Fig.4-3)。有機溶媒相にはテトラデカンを用いた[49]。培養 5 日目には DeKm-BA 株の培養液は茶色く変色していた。しかし、有機溶媒相、水相における *o*-クレゾール濃度を HPLC で測定した結果、B4DeKm 株ではそれぞれ 0.3g/l 以下であり、DeKm-BA 株においても 0.5g/l 以下と予想に反してクレゾール生産量は少なかった (Fig.4-3)。この理由として、B4 株には phenolhydroxylase (Phl) および catecol-1,2-dioxygenase (CatA) により構成されているフェノール資化経路が存在することが分かった (Fig.4-4) [50]。

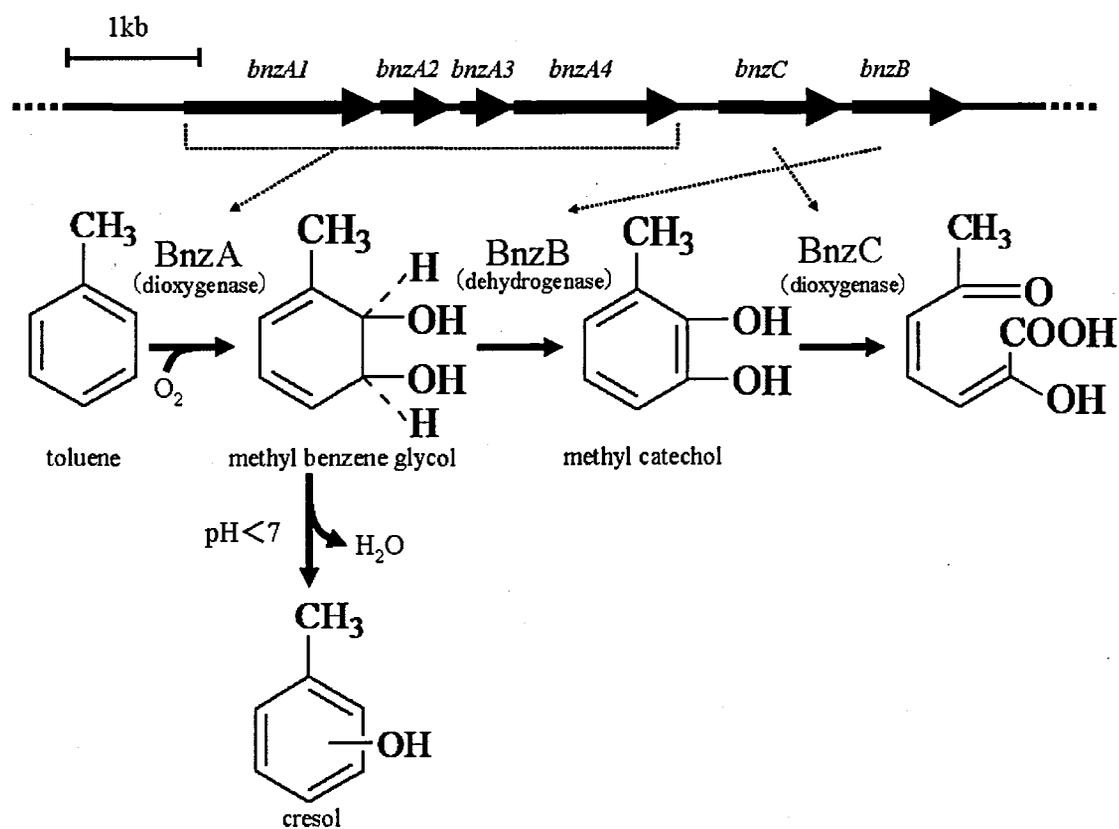


Fig.4-1 B4 株におけるトルエン代謝経路

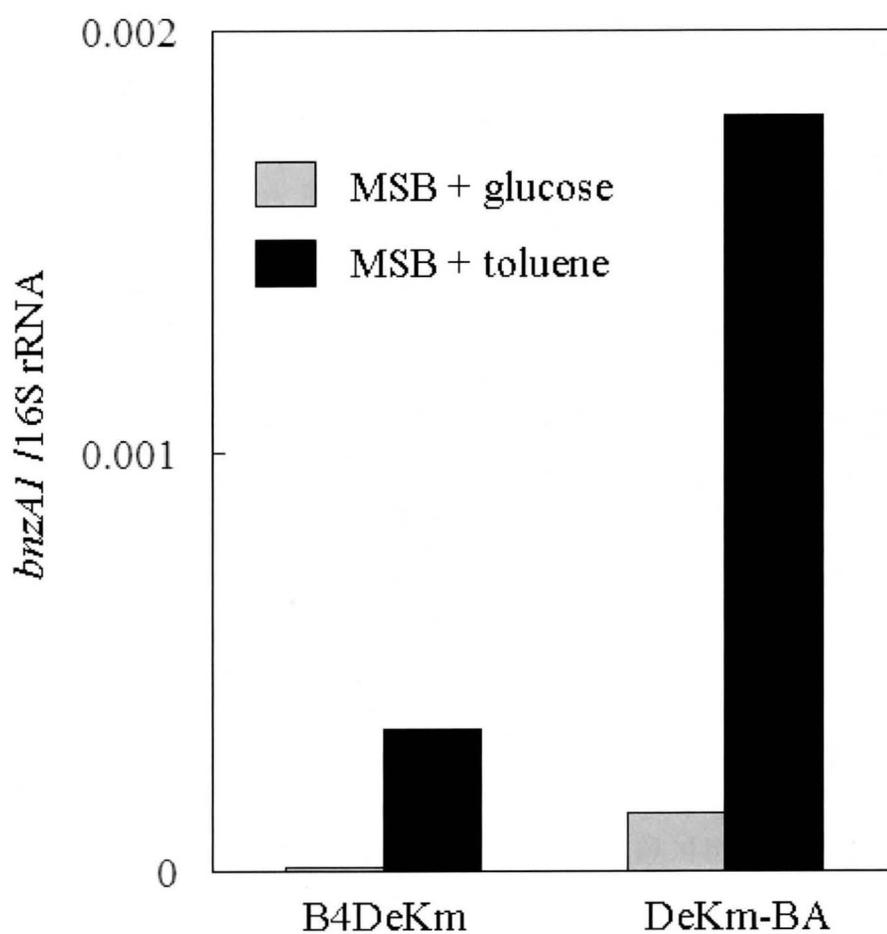


Fig.4-2 BeDeKm 株および DeKm-BA 株における *bnzA1* 転写量の比較  
*bnzA1* 転写量は 16S rRNA 転写量で標準化した。

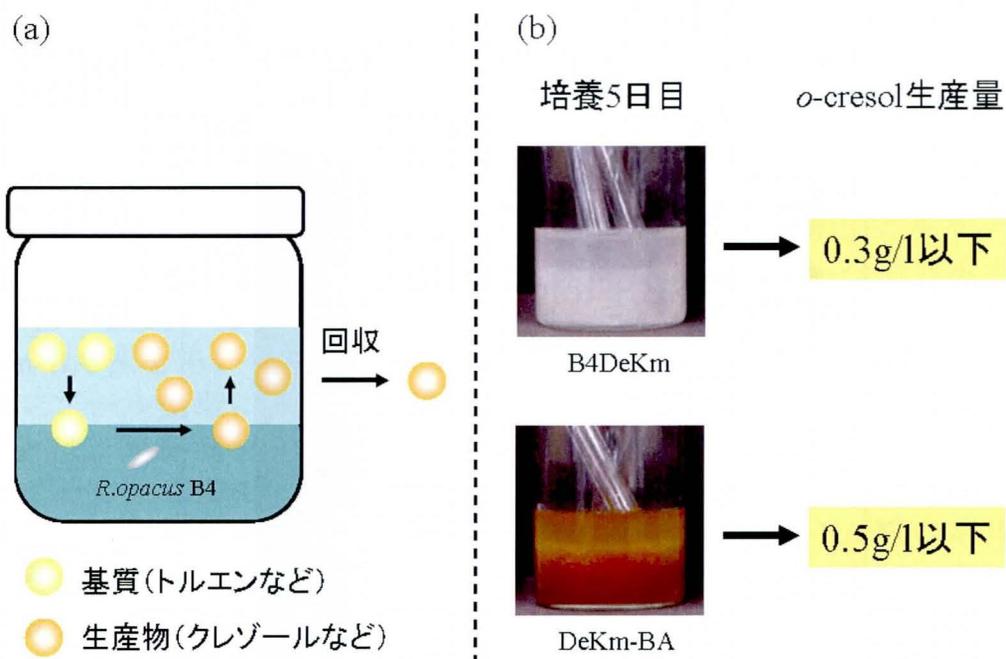


Fig.4-3 二相系培養システムの原理(a)と、DeKm-BA 株によるクレゾール生産(b)

- (a) 疎水性の基質は主に有機溶媒相と培地相の境界面で変換され、有機溶媒相に蓄積される。ただし、*R. opacus* B4 株は疎水性が高いため、有機溶媒相に移行してしまう。
- (b) 培地には MSB 培地を用い、炭素源も兼ねて有機溶媒相にはテトラデカンを用いた。

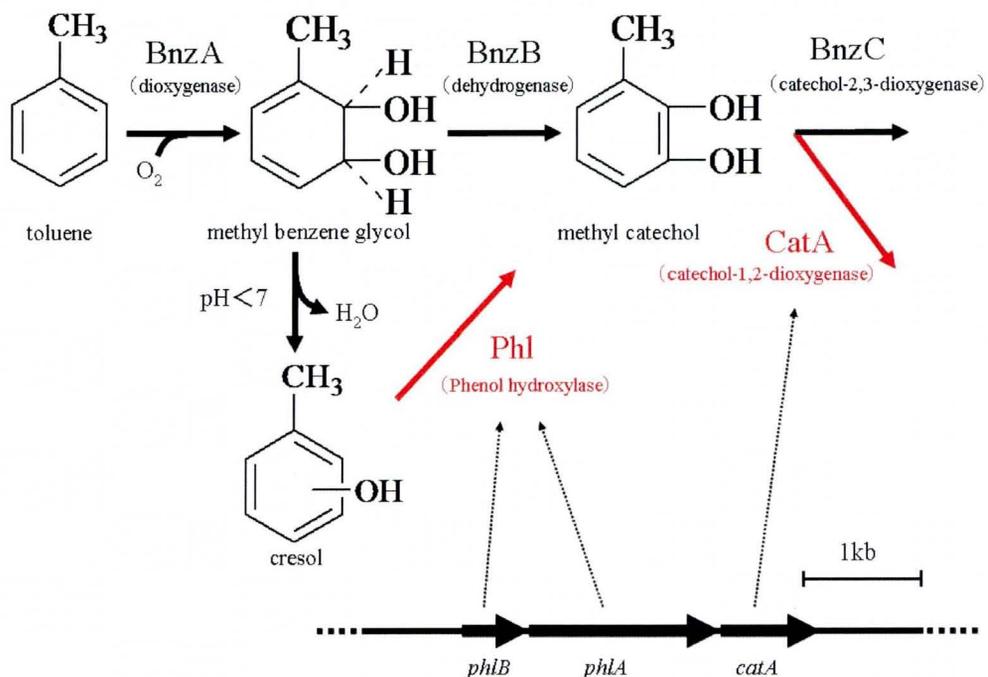


Fig.4-4 B4 株における PhI 経路および遺伝子地図

#### 4.3.2 *phl* オペロンの破壊

phenolhydroxylase を構成する PhlA サブユニット遺伝子 (*phlA*) の発現量をリアルタイム-RT-PCR により測定した。その結果、B4 株を MSB 寒天培地に *o*-クレゾールを蒸気供給して培養すると、*phlA* の発現が誘導されることが分かった (Fig4-5)。そこで、Phl 遺伝子 (*phlB*、*phlA*) および CatA 遺伝子 (*catA*) をノンマーカージン組換え技術で破壊した (Fig.4-6)。PCR による確認の結果、Phl、CatA 破壊株 (dPhC 株) は 5 株取得することが出来た (Fig.4-7)。dPhC 株のフェノール、クレゾール資化テストをおこなったところ、Phl、CatA を破壊したにも関わらず、フェノール、クレゾールを唯一炭素源として増殖することができた (Fig.4-8)。これは、既知の Phl 経路以外にもクレゾール (フェノール) 資化経路が存在することを示唆していた。そこで、新たなクレゾール (フェノール) 資化経路の探索を行った。

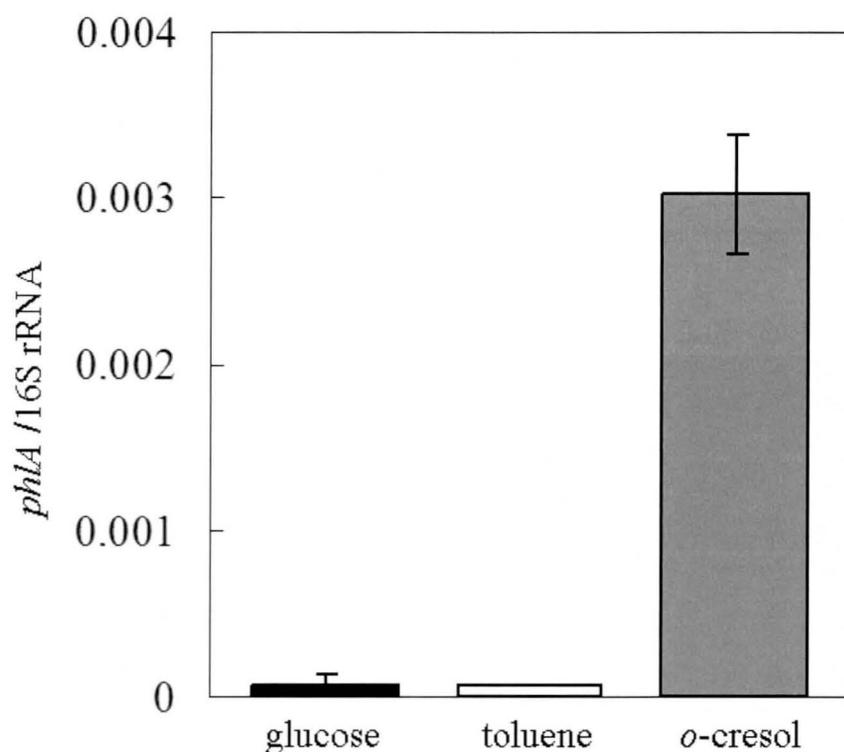


Fig.4-5 *phlA* 転写量の比較

*phlA* 転写量は 16S rRNA 転写量により標準化した。B4 株を MSB 寒天培地 (glucose 2g/l)、MSB 寒天培地+トルエン蒸気、MSB 寒天培地+*o*-クレゾール蒸気で培養し、総 RNA を抽出した。

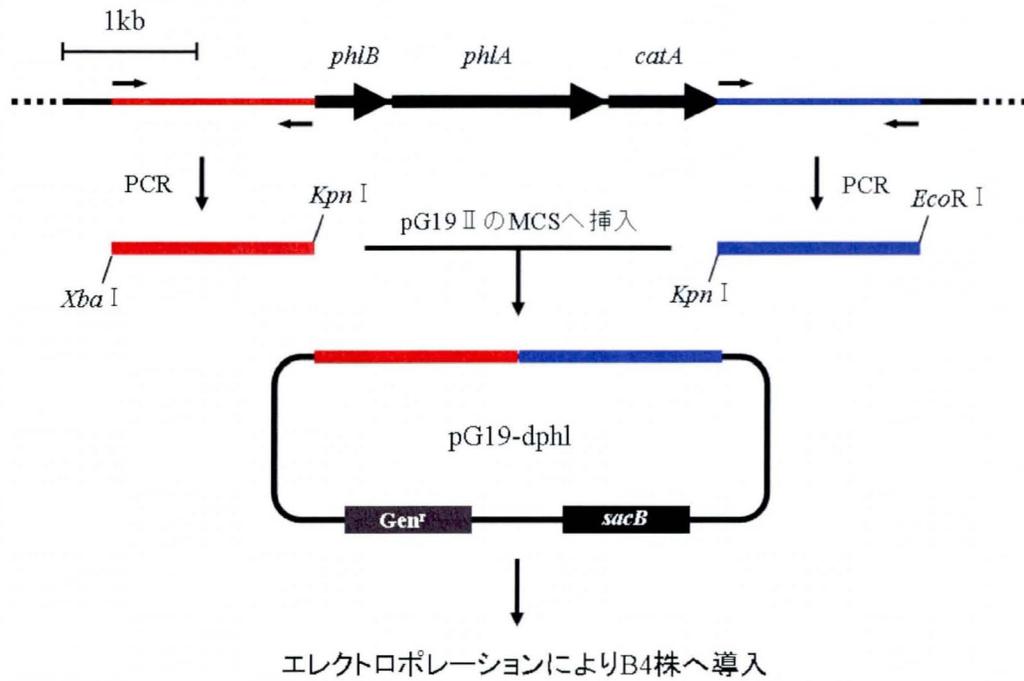


Fig.4-6 pG19-dphl の構築

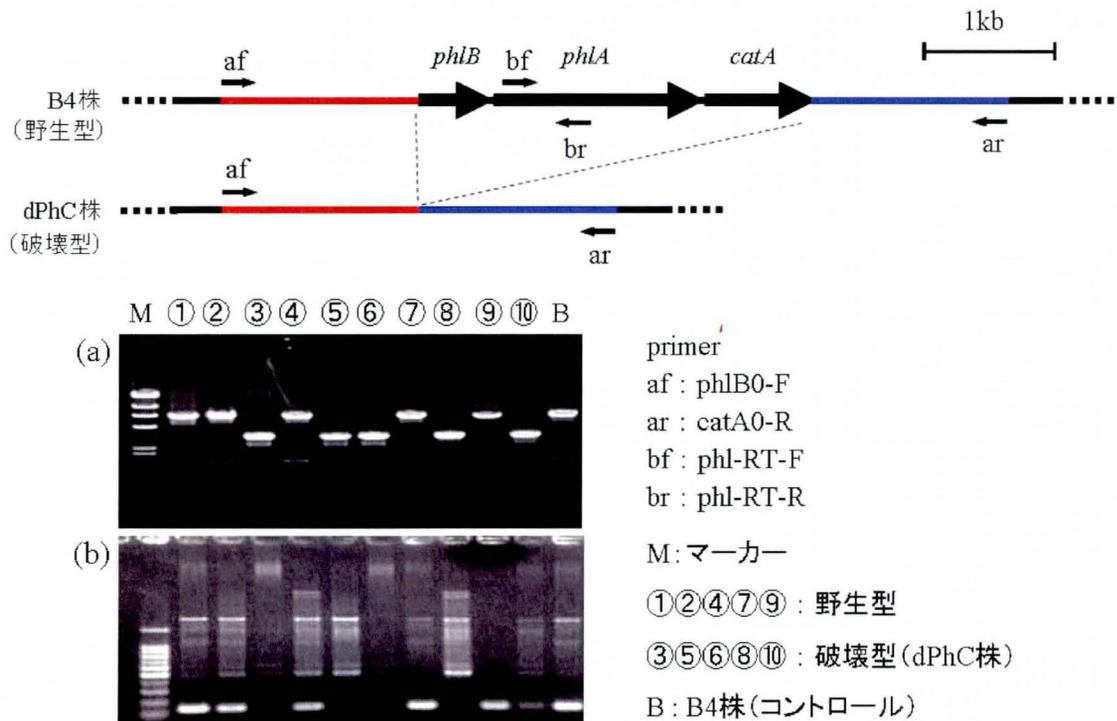


Fig.4-7 *phlBA-cata* 破壊株の確認

(a)はプライマーaf/arを用いた PCR 産物の電気泳動写真。(b)はプライマーbf/brを用いた PCR 産物の電気泳動写真。プライマーaf/arを用いた PCR では野生型は約 6.2kbp、破壊型は約 3.0kbp のバンドが増幅される (a)。プライマーbf/brを用いた PCR では野生型は約 120bp、破壊型では増幅されない (b)。したがって、レーン③⑤⑥⑧⑩の株が dPhC 株であると確認された。

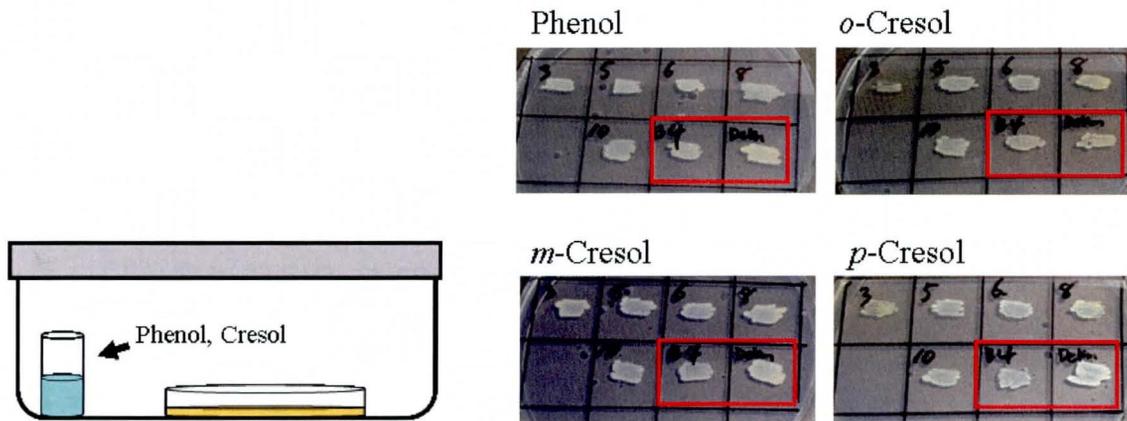


Fig.4-8 dPhC 株のフェノールおよびクレゾール資化テスト

ノンマーカ―遺伝子組換えにより構築された dPhC 株 5 株を MSB 寒天培地に植菌してタッパーに入れ、フェノールおよび *o,m,p*-クレゾールを蒸気で供給した。コントロールとして B4 株を用いた(赤枠内)。dPhC 株は B4 株と同程度の増殖を見せた。

#### 4.3.3 フェノールヒドロキシラーゼ遺伝子の探索と破壊

新たなフェノール資化経路を探索するため、既に解読されている B4 株のゲノム情報を元に、フェノール資化に関与している可能性のある遺伝子を検索した。その結果、既知の *phlB*、*phlA* を含めて 13 種類の候補遺伝子が見つかり、識別番号を P1~P13 として分類した (Fig.4-9)。これらの遺伝子がフェノールまたは *o*-クレゾール供給下で発現しているか調べるために、B4 株を TSB 寒天培地に植菌し、フェノールまたは *o*-クレゾールの入った小瓶とともにタッパーに入れて培養した。培養 2 日後に菌体を 1 白金耳かきとり、RNA 安定化後に、total RNA を抽出した。リアルタイム-RT-PCR の結果 (Fig.4-10)、既知の *phlB* (P5)、*phlA* (P6) を除くと、新たに P2 および P5 の 2 種類の遺伝子の発現が確認された (Fig.4-11)。さらに面白いことに、P2 と P5 (*phlB*) の遺伝子は 74%、P3 と P6 (*phlA*) の遺伝子は約 90% の相同性があった。このことから、P2 および P3 の遺伝子をそれぞれ *phlB2*、*phlA2* とし、これらの遺伝子を破壊することにした。

*phlB2*、*phlA2* を破壊するにあたり、*phl*・*bnz* オペロン破壊株 (Fig.4-12, Fig.4-13)、dPCZ 株を用いた。これまでと同様にノンマーカ―遺伝子組換え技術を用いて *phlB2*、*phlA2* を削除し、dPCZ-P2 株 (Fig.4-14, Fig.4-15) とした。dPCZ-P2 株は *phlB*、*phlA*、*catA*、*bnzA1A2A3A4*、*bnzC*、*bnzB*、そして *phlB2*、*phlA2* が削除された株である。これまでに構築した株は Fig.4-16. に示した。

これらの株を用いてフェノールおよびクレゾール資化テストを行った。B4 株、dPhC 株、dPCZ 株、dPCZ-P2 株を MSB 寒天培地にスポットし、フェノールまたは *o,m,p*-クレゾールを蒸気で供給した。その結果、

dPCZ および dPCZ-P2 株はフェノールおよび *o,m,p*-クレゾールを資化することが可能であったが、その増殖速度は顕著に低下していた。また、B4 株、dPhC 株、dPCZ-P2 株を MSB 液体培地で培養し、フェノールを炭素源として添加した結果でも、dPCZ-P2 株の増殖速度は低下していた (Fig.4-17)。dPhC 株に比べて dPCZ 株の増殖速度が低下した理由は、catechol-1,2-dioxygenase(CatA)と catechol-2,3-dioxygenase (BnzC)が削除されたためだと思われる。また、dPhC 株と dPCZ-P2 株の増殖速度は、ほとんど同じであったため、PhI2 を破壊したことにより、dPCZ-P2 株のフェノールまたはクレゾール分解能力が低下したかどうかは分からなかった。今後、PhI2 の正確な機能を調べるためには、PhI と PhI2 のみの破壊株を構築するか、dPCZ-P2 株に *bnzC* または *catA* 発現ベクターを導入する必要がある。

しかし、少なくとも現在までに PhI2 以外のフェノール資化に関与する候補遺伝子は見つかっていない。そこで、dPCZ-P2 株に *bnzA* 発現ベクターを導入して、クレゾール生産を試みることにした。

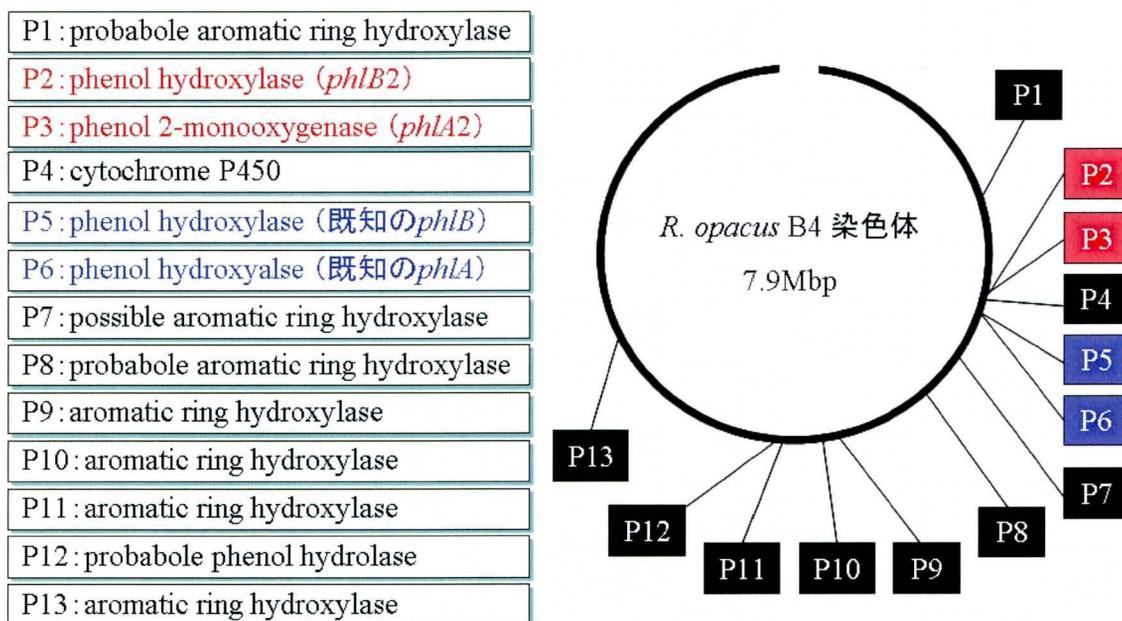


Fig.4-9 クレゾール資化性候補遺伝子

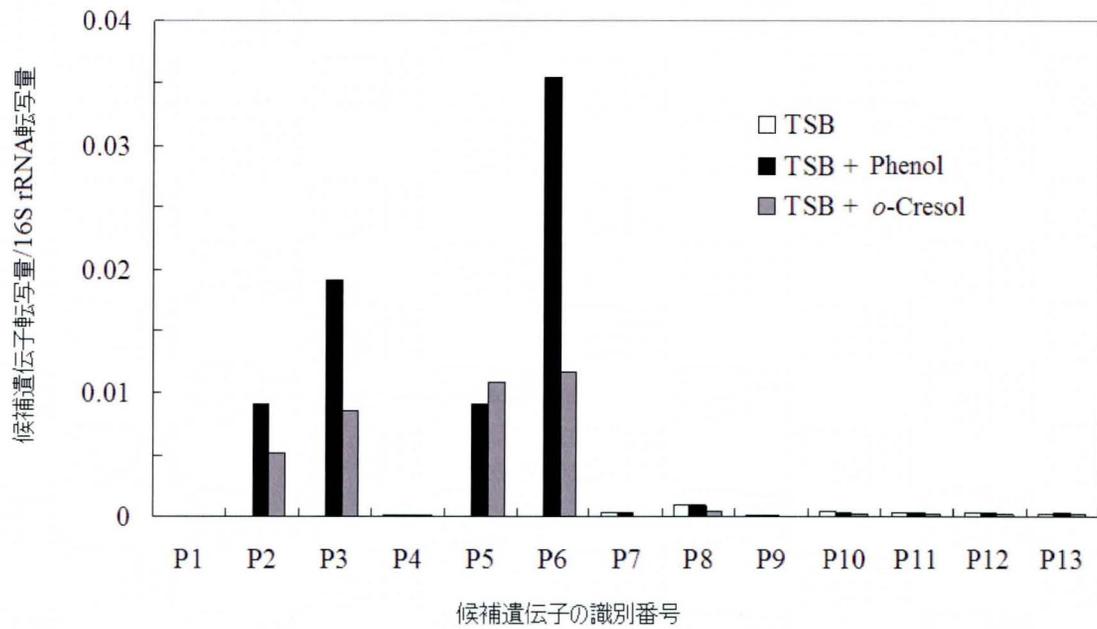


Fig.4-10 フェノールおよび *o*-クレゾール資化性候補遺伝子の転写量  
各遺伝子の転写量は 16s rRNA の転写量で標準化した。

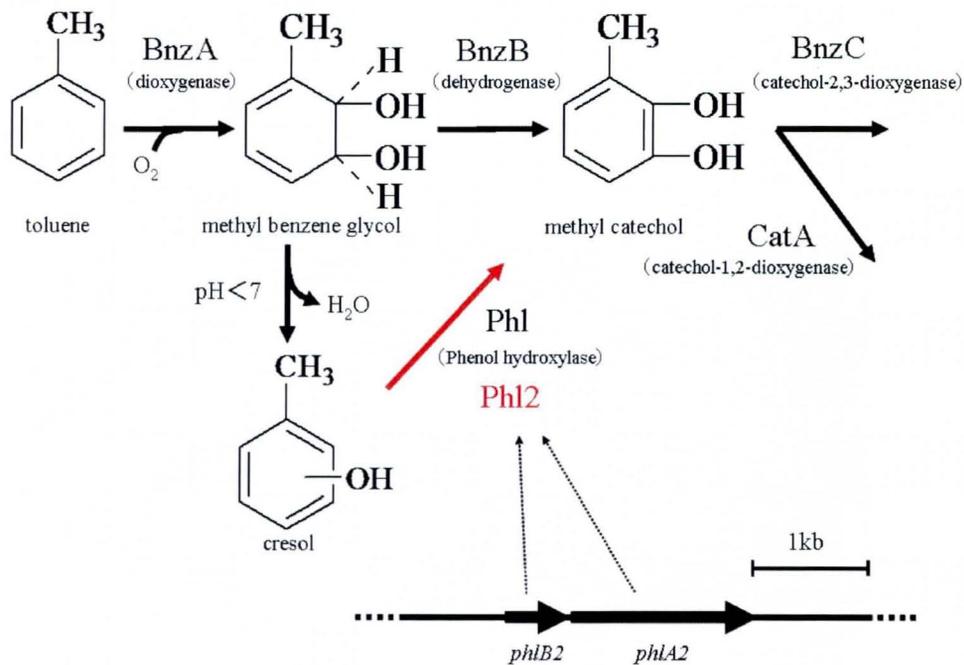


Fig.4-11 Phl2 とその遺伝子地図

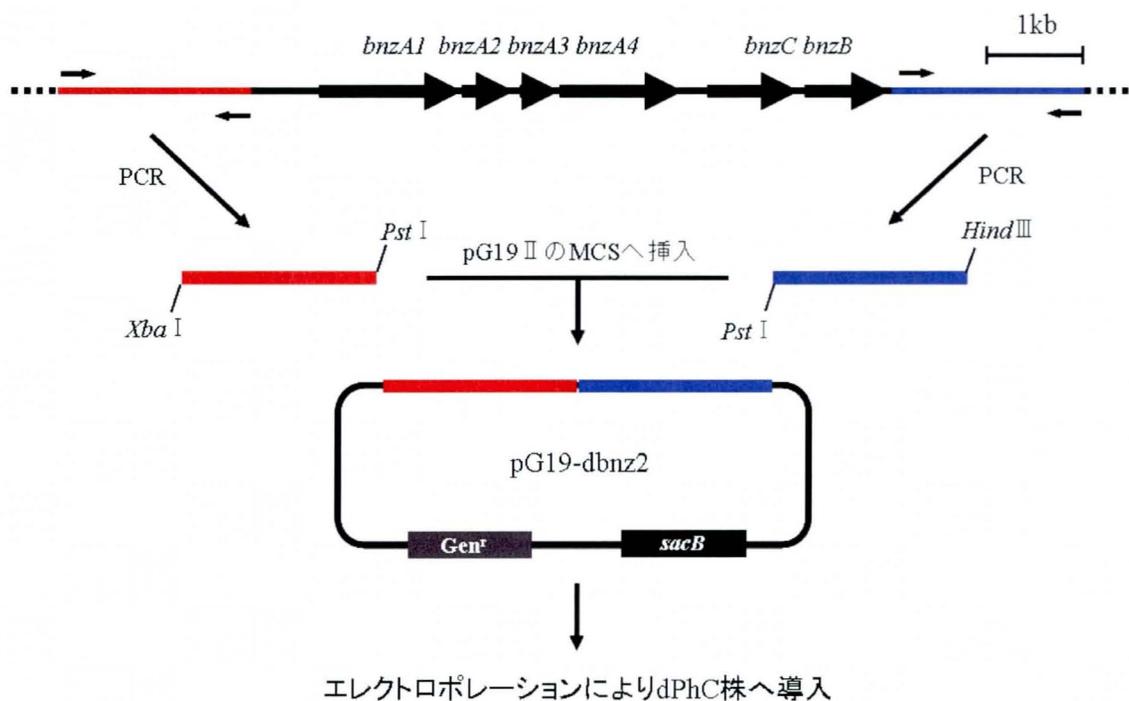


Fig.4-12 pG19-dbnz2 の構築

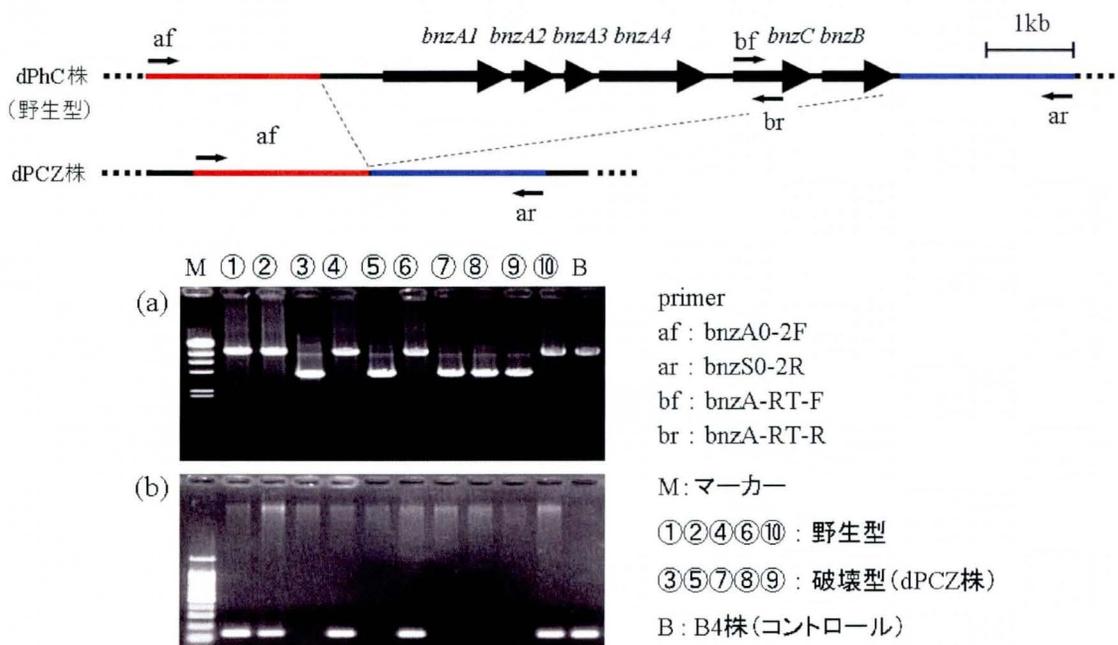


Fig.4-13 *bnzA1A2A3A4CB* 破壊株の確認

(a)はプライマーaf/arを用いたPCR産物の電気泳動写真。(b)はプライマーbf/brを用いたPCR産物の電気泳動写真。プライマーaf/arを用いたPCRでは野生型は約9.3kbp、破壊型は約4.0kbpのバンドが増幅される(a)。プライマーbf/brを用いたPCRでは野生型は約120bp、破壊型では増幅されない(b)。したがって、レーン③⑤⑦⑧⑨の株がdPCZ株と確認された。

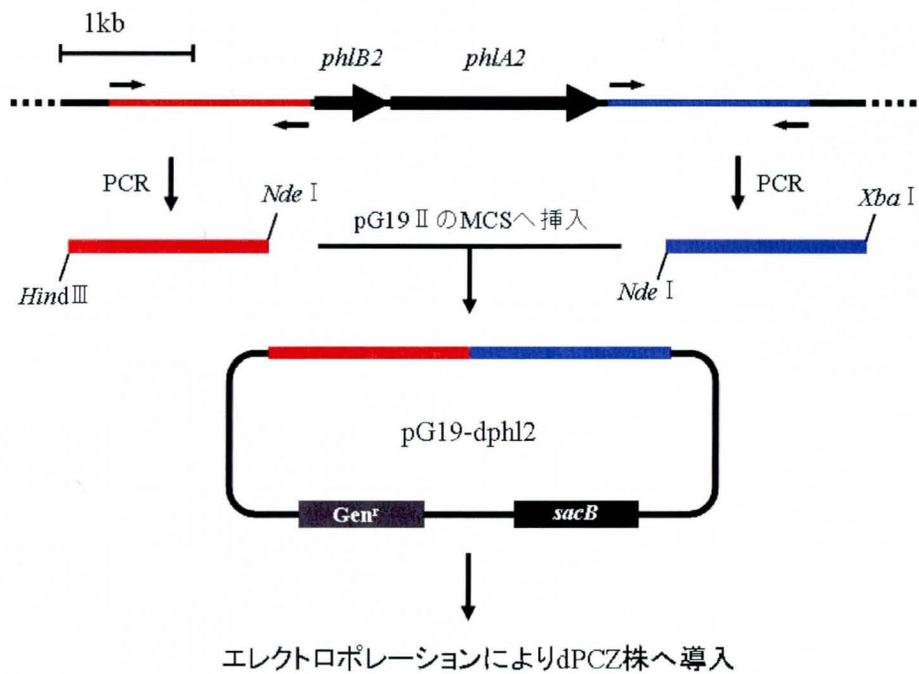


Fig.4-14 pG19-dphl2 の構築

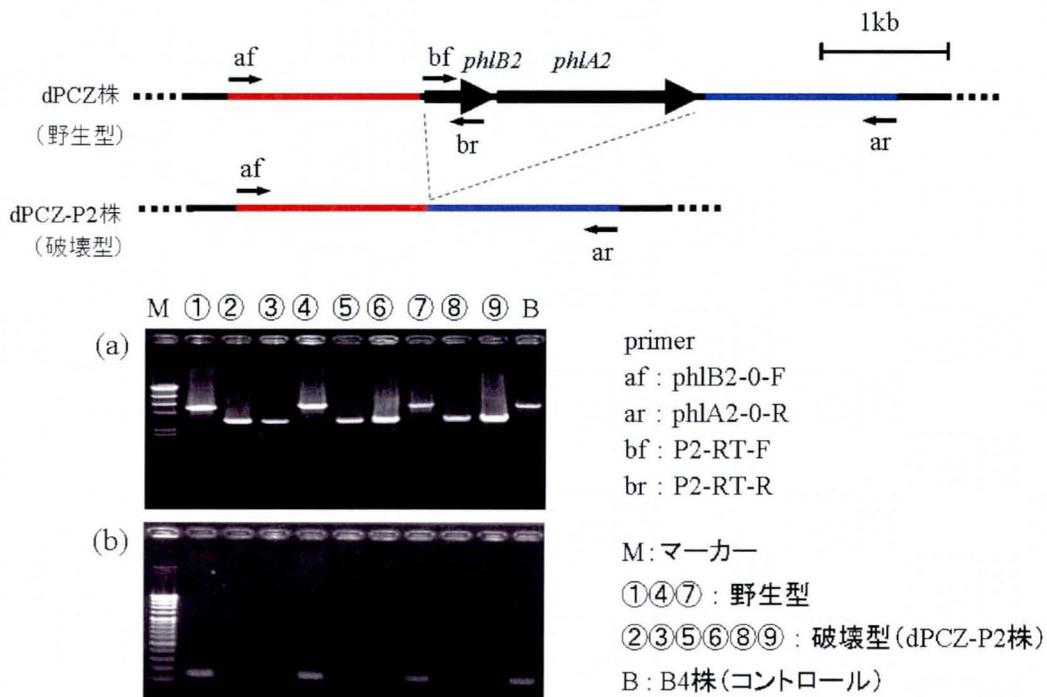
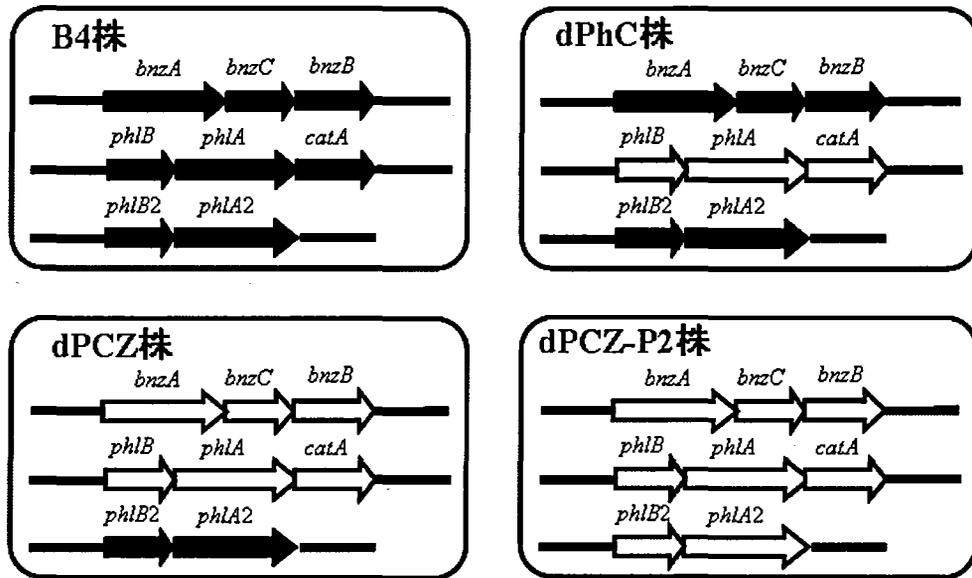


Fig.4-15 *phlB2*、*phlA2* 破壊株の確認

(a)はプライマーaf/arを用いたPCR産物の電気泳動写真。(b)はプライマーbf/brを用いたPCR産物の電気泳動写真。プライマーaf/arを用いたPCRでは野生型は約5.2kbp、破壊型は約3.0kbpのバンドが増幅される(a)。プライマーbf/brを用いたPCRでは野生型は約120bp、破壊型バンドが増幅されない(b)。したがって、レーン②③⑤⑥⑧⑨の株がdPCZ-P2株と確認された。



⇒ 破壊した遺伝子

Fig.4-16 これまでに構築した遺伝子破壊株

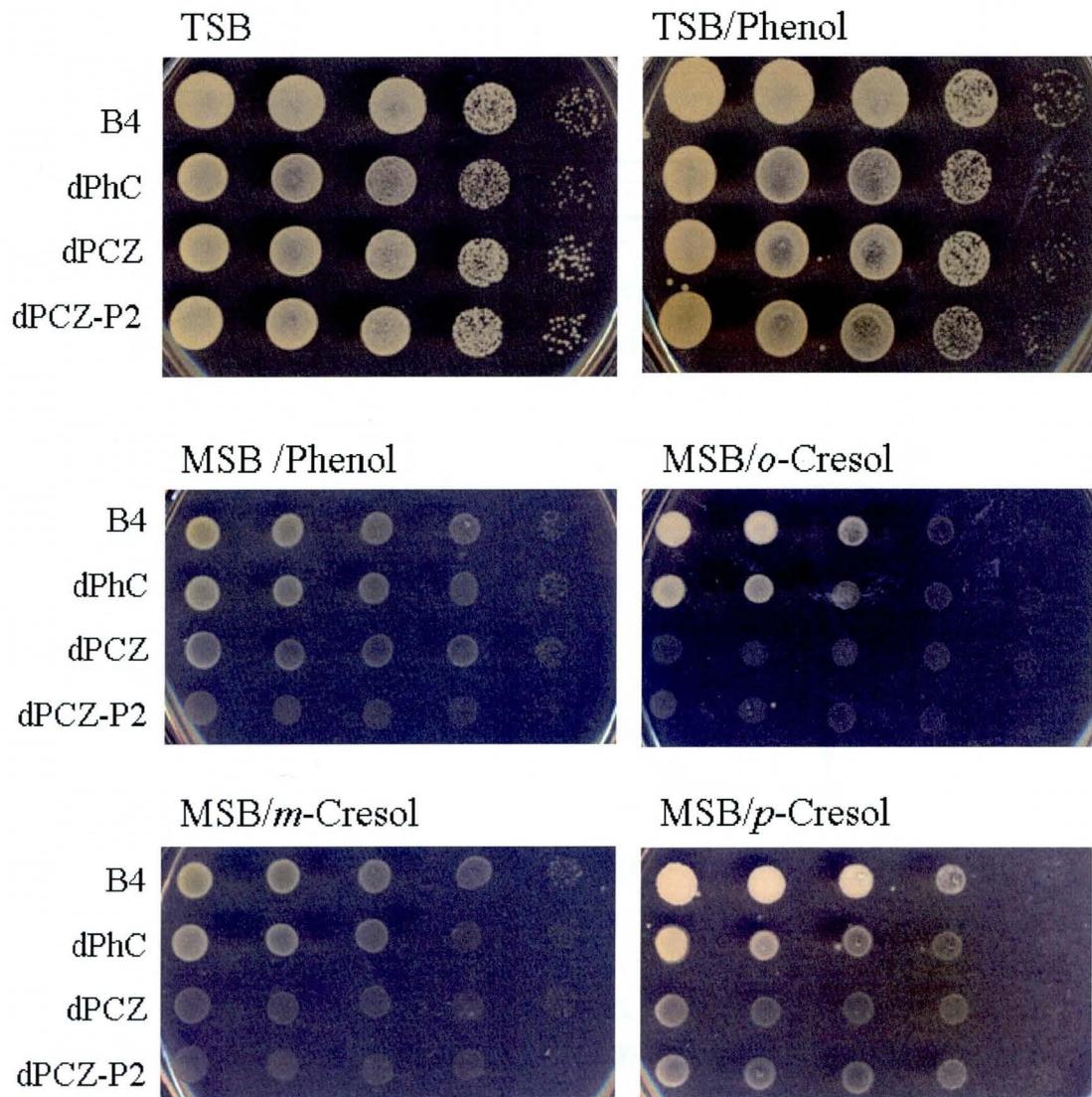


Fig.4-17 フェノールおよびクレゾール資化テスト

B4 株および、各遺伝子破壊株を MSB 寒天培地にスポットし、フェノールまたは *o,m,p*-クレゾールを蒸気で供給した。コントロールとして TSB 培地寒天培地を用いた。TSB 寒天培地では増殖の差は見られなかった。MSB 寒天培地では B4 株と dPhC 株の増殖の差はほとんどなかったが、dPCZ 株および DPCZ-P2 株では増殖速度が低下した。しかし、dPCZ と dPCZ-P2 間の増殖速度の差はほとんど無かった。

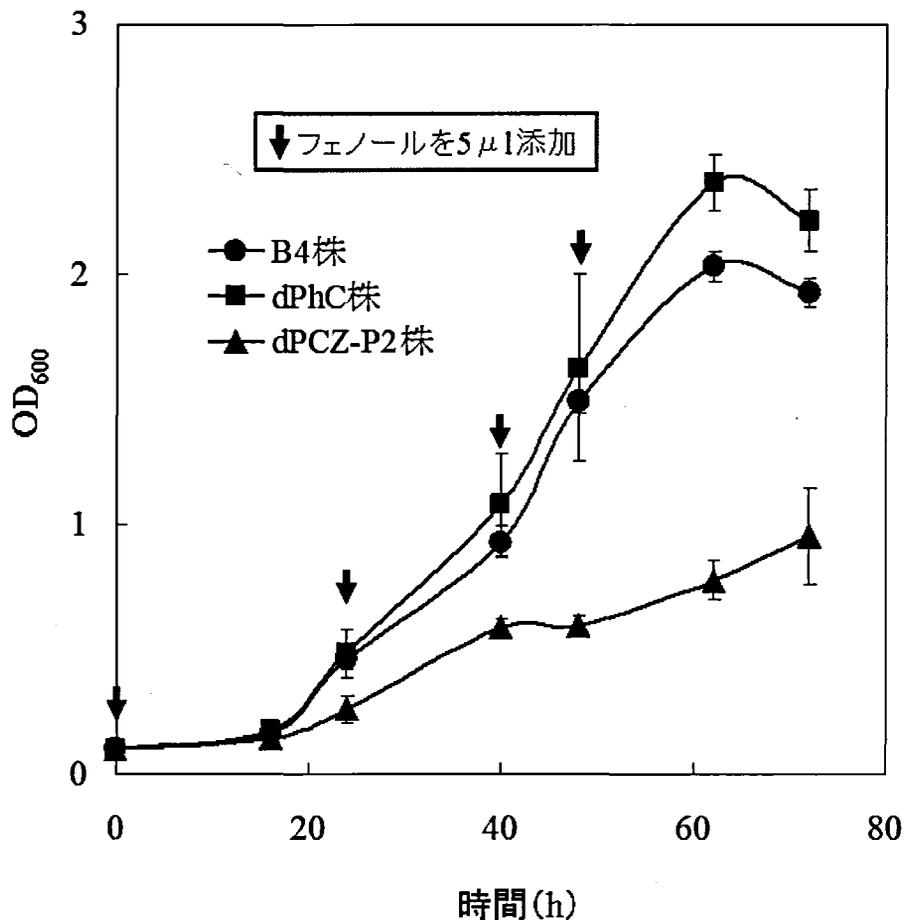


Fig.4-18 液体培養によるフェノール資化テスト  
MSB 液体培地に B4 株および遺伝子破壊株を植菌し、唯一炭素源としてフェノールを経時的に添加した。B4 株と dPhC 株では増殖に差が見られなかったが、dPCZ-P2 株では増殖速度が低下していた。ただし、dPCZ-P2 株のフェノール資化性が低下した理由は、Ph12 の破壊よりも、CatA と BnzC を破壊した事によるところが大きいと思われる。

#### 4.3.4 dPCZ-P2 株を用いたクレゾール生産

dPCZ-P2 株を用いてクレゾール生産を試みるために、dPCZ-P2 株に *bnzA1A2A3A4* 発現ベクター pKNR-*bnzA* および pKNApk を導入した株を構築し、それぞれ dPCZ-P2-BA 株、dPCZ-P2-pkB 株とした。なお、pKNR-*bnzA* は *bnz* プロモーターによりトルエン存在下で発現誘導されるが、pKNRpk は *bnz* プロモーターを *kan* プロモーターに置換してあるため、トルエンの誘導が無くても構成的に *bnzA1A2A3A4* が発現する [50]。

クレゾール生産を試みるため、B4DeKm、dPCZ-P2-BA、dPCZ-P2-pkB 株を用いて、3.3.1 と同様の操作を行った。トルエンを蒸気で供給して、

生産物の蓄積量を HPLC により測定した結果、*o*-クレゾール生産量はやはり 0.5g/l 以下だった。今回は、*o*-クレゾールがメチルカテコールに変換されている可能性も考慮したが、メチルカテコールも生産されていなかった。つまり、そもそも *o*-クレゾールが生産されていない可能性が示唆された。

その原因は現在のところ分かっていないが、例えば、*o*-クレゾールが細胞内で生産され蓄積されると、その強い毒性により細胞が死滅してしまうのかもしれない。または、二相系培養システムに用いる有機溶媒相の有機溶媒の種類や、培地の種類、トルエンを供給するタイミングなどを検討することによって、*o*-クレゾールが蓄積される可能性もある。本研究室では *Pseudomonas putida* T-57 株を用いた *o*-クレゾール、3-メチルカテコールの生産に成功しているが、培養条件や重層する有機溶媒の種類によって、その生産量が左右されるようである [16,23]。したがって、B4 株を用いたバイオプロセスにおいても、*o*-クレゾールの分解に対する検討だけでなく、培養システムの最適化も検討する必要があると思われる。

## 第 4 節 要約

本章では B4 株を用いた疎水性バイオプロセスのモデル系として、トルエン代謝経路を改変し、トルエンからのクレゾール生産を目指した。B4DeKm 株に *bnzA* 発現ベクターを導入し、二相系培養システムを用いてクレゾール生産を試みたが、*o*-クレゾールの生産量は少なかった。Phl、CatA から構成されるフェノール、クレゾール資化経路の存在が明らかになった。Phl および CatA を破壊しても、フェノールまたはクレゾール資化能力はそれほど低下しなかった。遺伝子検索の結果、既知の *phlB*、*phlA* と高い相同性を持ち、同程度の転写量をもつ遺伝子が見つかり、*phlB2*、*phlA2* とした。ノンマーカージェン組換えにより、*phlB*、*phlA*、*catA*、*bnzA1A2A3A4*、*bnzC*、*bnzB*、そして *phlB2*、*phlA2* が削除された株を構築した。この株に *bnzA* 発現ベクターを挿入してクレゾール生産を試みたが、クレゾールもカテコールもほとんど蓄積されていなかった。今後は、クレゾール分解に関わる遺伝子の探索だけでなく、クレゾール生産における培養条件などを検討する必要があると思われる。

## 第5章

### 総括

本研究における最終的な目標は、石油化学プロセスに疎水性バイオプロセスを導入し、その環境適合性を大幅に向上させることである。疎水性バイオプロセスでは、生体触媒として菌体を用い、細胞内で代謝エネルギーを供給しつつ目的の反応を行わせるのが有利であるが、その際に、疎水性の原料および生産物が有する強い生物毒性が大きな問題となる。しかしながら、本研究においては前任者の研究において様々な有機溶媒に耐性・資化性を持つ *R. opacus* B4 株、B9 株、B10 株の取得に成功しており [17]、*R. opacus*-*E. coli* シャトルベクターの構築、エレクトロポレーションによる遺伝子導入技術にも成功している [41]。そこで、本研究は、*R. opacus* B4 株における染色体加工技術の構築および B4 株における有機溶媒耐性機構の解明、そして B4 株を用いたトルエンからのクレゾール生産を目指した。

第2章では染色体加工技術として、ノンマーカージェネティック組換え技術を確立した。ノンマーカージェネティック組換えには、ポジティブマーカージェネティックとしてゲンタマイシン耐性遺伝子、カウンターセレクトションマーカージェネティックとしてスクロース感受性を付与する *sacB* 遺伝子 pG19II を用いた。*sacB* を持つ B4 株の形質転換株をカウンターセレクトするためのスクロース濃度は 20% とした。ノンマーカージェネティック組換えの際の挿入断片の長さは、1.0~2.0kb とすることにした。2 回目の相同組換えを起こさせるための培養時間は 6 時間で十分であった。

ノンマーカージェネティック組換え技術を用いて *bnz* オペロン破壊株の構築に成功した。また、*bnz* オペロンの上流に *kan* プロモーターを挿入することに成功した。*kan* プロモーター挿入株では、*bnzA1* が構成的に発現していた。

第3章では有機溶媒耐性機構の解明について報告した。B4 株において、*sigB* は対数増殖期後期以降および、熱ストレス、エタノールストレス、トルエンストレス条件下で誘導されていることが確認された。*sigB* 破壊株は熱ストレス、エタノールストレスに対する耐性が低下していた。さらに、有機溶媒耐性を調べたところ、ベンゼン、トルエン、*n*-ヘキサンに対する耐性が顕著に低下していた。*sigB* 発現ベクターを構築、相補性試験を行ったところ、それらの有機溶媒に対する耐性の復帰が確認された。

*sigB* 破壊株ではベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子の転写量が低下していた。しかし、トルエンの分解はトルエン耐性に対してプラスには作用していなかった。*efflux pump* の転写量を調べたところ、*efp21*、*efp24* の転写量がトルエンおよび *n*-ヘキサン供給下で顕著に増加していた。

そこで、*efp21* および *efp24* 発現ベクターを構築し、*sigB* 破壊株に導入したところ、*efp21* 導入株では *n*-ヘキサンに対する耐性が若干復帰していた。このことから、*efp21* が *n*-ヘキサンの排出に関与している可能性が示された。

有機溶媒供給下で分子シャペロンの転写量を調べたところ、*clpP4*、*clpS*、*hscA-1*、*hscA-3*、*groEL-1*、*groEL-2*、*groES* の転写量の増加が確認された。また、シグマ因子遺伝子 *sigF-1*、*F-2*、*F-2* は *sigB* と同様に対数増殖期後期から急激に転写が誘導されることが分かった。今後は、これらの遺伝子が有機溶媒耐性に関与しているか調べていく必要があると思われる。

第5章ではトルエンからのクレゾール生産を試みた。B4DeKm 株に *bnzA1A2A3A4* 発現ベクターを導入し、二相系培養システムを用いてクレゾール生産を試みたが、*o*-クレゾールの生産量は少なかった。Phl、CatA から構成されるフェノール、クレゾール資化経路の存在が明らかになった。Phl および CatA を破壊しても、フェノールまたはクレゾール資化能力はそれほど低下しなかった。遺伝子検索の結果、既知の *phlB*、*phlA* と高い相同性を持ち、同程度の転写量をもつ遺伝子が見つかり、*phlB2*、*phlA2* とした。ノンマーカージェノ型組換えにより、*phlB*、*phlA*、*catA*、*bnzA1A2A3A4*、*bnzC*、*bnzB*、そして *phlB2*、*phlA2* が削除された株を構築した。この株に *bnzA1A2A3A4* 発現ベクターを挿入してクレゾール生産を試みたが、クレゾールもカテコールもほとんど蓄積されていなかった。今後は、クレゾール分解に関わる遺伝子の探索だけでなく、クレゾール生産における培養条件などの検討を行う必要があると思われる。

## 引用文献

- 1) Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258-268.
- 2) Carla, C. C. R., de Carvalho, M., Manuela, R., and da, Fonseca. 2005. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:715-726.
- 3) 石油化学プロセス 石油学会 講談社 2001
- 4) Kisumi, M., Kato, J., Sugiura, M. and Chibata, I. 1971. Production of L-arginine by arginine hydroxamateresistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.* 22:987-991.
- 5) Nishio, Y., Nakamura, Y., Usuda, Y., Sugimoto, S., Matsui, K., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., Gojobori, T. and Ikeo, K. 2004. Evolutionary process of amino acid biosynthesis in *Corynebacterium* at the whole genome level. *Mol. Biol. Evol.* 21:1683-1691.
- 6) Hashiguchi, K., Takesada, H., Suzuki, E. and Matsui, H. 1999. Construction of an L-isoleucine overproducing strain of *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:672-679.
- 7) Short, J. M. 1997. Recombinant approaches for accessing biodiversity. *Nat. Biotechnol.* 15:1322-1323.
- 8) Isken, S. and de, Bont, J. A. 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* 2:229-238.
- 9) Sikkema, J., de, Bont, J. A., and Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59:201-222.
- 10) Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A. and Horikoshi, K. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from *Pseudomonas putida* IH-2000. *FEMS Microbiol. Lett.* 15:219-225.
- 11) Fang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., Liu, S., Ding, Z. and Xu, W. 2006. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. 2006. *Curr. Microbiol.* 53:510-515.
- 12) Nielsen, L. E., Kadavy, D. R., Rajagopal, S., Drijer R. and Nickerson, K. W. 2005. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5171-5176.
- 13) Nakajima, H., Kobayashi, H., Aono, R. and Horikoshi, K. 1992. Effective isolation and identification of toluene-tolerant *Pseudomonas* strains. *Biotech. Biochem.* 56:1872-1873.
- 14) Zahir, Z., Seed, K. D. and Dennis, J. J. 2006. Isolation and

- characterization of novel organic solvent tolerant bacteria. *Extremophiles* 10:129-138.
- 15) Fang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., Liu, S., Ding, Z. and Xu, W. 2006. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Curr. Microbiol.* 53:510-515.
  - 16) Faizal, I., Dozen, K., Hong, C. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., Takeda, K., Tsunkawa, H. and Kato, J. 2005. Isolation and characterization of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* T-57, and its application to biotransformation of toluene to cresol in a two-phase (organic-aqueous) system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:542-547.
  - 17) Na, K. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H. and Kato, J. 2005. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *J. Biosci. Bioeng.* 99:378-382.
  - 18) Na, K. S. 2005. Isolation, Characterization, and Application of Solvent-Tolerant *Rhodococcus opacus* Strains 博士論文
  - 19) Aono, R., Doukyu, N., Kobayashi H., Nakajima, H. and Horikoshi, K. 1994. Oxidative bioconversion of cholesterol by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 in a water-organic solvent two-phase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2518-2523.
  - 20) Doukyu, N., Toyoda, K. and Aono, R. 2003. Indigo production by *Escherichia coli* carrying the phenol hydroxylase gene from *Acinetobacter* sp. strain ST-550 in a water-organic solvent two-phase system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:720-725.
  - 21) Park, J. B., Buhler, B., Panke, S., Witholt, B. and Schmid, A. 2007. Carbon metabolism and product inhibition determine the exoxidation efficiency of solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. Strain VLB120  $\Delta$  C. *Biotechnol. Bioeng.* 98:1219-1229.
  - 22) Wierckx, N. J., Ballersterdt, H., de, Bont, J.A. and Wery, J. 2005. Engineering of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 for bioproduction of phenol from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8221-8227.
  - 23) Wierckx, N. J., Ballerstedt, H., de, Bont, J. A., de, Winde, J.H., Ruijssenaars, H. J. and Wery J. 2008. Transcriptome analysis of a phenol-producing *Pseudomonas putida* S12 construct: genetic and physiological basis for improved production. *J. Bacteriol.* 190:2822-2830.
  - 24) Faizal, I., Ohba, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., Honda, K. and Kato, J. 2007. Bioproduction of 3-methylcatechol from toluene in a two-phase (organic-aqueous) system by a genetically modified solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain T-57. *J. Environ. Biotechnol.* 7:39-44.

- 25) Kieboom, J., Dennis, J., Zylstra, G. and de, Bont, J. 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J. Bacteriol.* 180:6769-6772.
- 26) Li, X., Zhag, L. and Poole, K. 1998. Role of the multi-drug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* 118:2987-2991.
- 27) Ramos, J., Duque, E., Godoy, P. and Segura, A. 1998. Efflux pumps involved in the toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 180:3323-3329.
- 28) Tsukagoshi, N. and Aono, R. 2000. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid phase system and substrate specificity of the AcrAB-tolC solvent extruding pump. *J. Bacteriol.* 182:4803-4810.
- 29) Aono, R. and Kobayashi, K. 1997. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *E. coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3637-3642.
- 30) Heipeiper, H., Meulenbeld, G., van, Oirschot, Q., de, Bont, J. 1996. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ration of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2773-2777.
- 31) Holtwick, R., Meinhardt, F. and Keweloh, H. 1997. *Cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids. Cloning and sequencing of Cti gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4292-4297.
- 32) Junker, F. and Ramos, J. 1999. Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in the solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 181:5693-5700.
- 33) Kobayashi, K., Takami, H., Hirayama, H., Kobata, K., Usami, R. and Horikoshi, K. 1999. Outer membrane changes in a toluene sensitive mutant of toluene tolerant *Pseudomonas putida* IH-2000. *J. Bacteriol.* 181:4493-4498.
- 34) Weber, F., Isken, S. and de, Bont, J. 1994. *Cis-trans* isomerisation of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* S12 to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* 140:2013-2017.
- 35) Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R.P. 2004. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5929-5936.
- 36) Kang, H. J., Heo, D. H., Choi, S. W., Kim, K. N., Shim, J., Kim, C.W., Sung, H. C. and Yun C. W. 2007. Functional characterization of Hsp33 protein from *Bacillus psychrosaccharolyticus*; additional function of HSP33 on resistance to solvent stress. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun. 358:743-750.
- 37) Fiocco, D., Capozzi, V., Goffin, P., Hols, P. and Spano, G. 2007. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:909-915.
  - 38) Boylan, S., Redfield, M., Brady, A. and Price, C. 1993. Stress induced activation of the  $\sigma^B$  transcription factor of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 175:7931-7987.
  - 39) Gaidenko, T. and Price, C. General stress regulon transcription factor sigma B and sporulation transcription factor sigma H contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. J. Bacteriol. 180:3730-3733.
  - 40) Volker, U., Manl, B. and Hecker, M. 1999. Expression of the sigma B dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181:3942-3948.
  - 41) Na, K.-S., Nagayasu, K., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H. and Kato, J. 2005. Development of a genetic transformation system for benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. J. Biosci. Bioeng. 99:408-414.
  - 42) Sallam, K. I., Tamura, N. and Tamura, T. 2007. A multipurpose transposon-based vector system mediates protein expression in *Rhodococcus erythropolis*. Gene 386:173-182.
  - 43) Vieira, J., and Messing, J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol. 153:3-11.
  - 44) Maeda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T. and Nomura, N. 2004. Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 48:1320-1328.
  - 45) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  - 46) Halgasova, N., Bukovska, G., Timko, J. and Kormanec, J. 2001. Cloning and transcriptional characterization of two sigma factor genes, *sigA* and *sigB*, from *Brevibacterium flavum*. Curr. Microbiol. 43:249-254.
  - 47) Hu, Y., and Coates, A. R. M. 1999. Transcription of two sigma 70 homologue genes, *sigA* and *sigB*, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 181. 469-476.
  - 48) Gomez, M., Doukhn, L., Nair, G. and Smith, I. 1998. *SigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol. 29:617-628.
  - 49) Yamashita, S., Satoi, M., Iwasa, Y., Honda, K., Sameshima, Y., Omasa, T., Kato, J. and Ohtake, H. 2007. Utilization of hydrophobic bacterium *Rhodococcus opacus* B-4 as whole-cell catalyst in anhydrous organic

solvents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:761-767.

- 50) Takesige, G. 2006. 有機溶媒耐性 *Rhodococcus opacus* を活用した芳香族炭化水素酸化バイオプロセスの構築 修士論文

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻下さいました加藤純一教授、滝口昇助教に心より感謝申し上げます。本論文を作成するにあたり、御校閲ならびに御助言をしていただきました西尾尚道教授、黒田章夫教授に厚く御礼を申し上げます。また、崇城大学在学時に御指導、御鞭撻下さいました崇城大学の小川隆平教授、松岡正佳教授、長濱一弘準教授に深謝いたします。

在学中お世話になりました廣田隆一助教、石田丈典さん、池田丈さん、細胞機能工学グループおよび細胞工学グループの皆様感謝いたします。

そして、経済的、精神的に多大な支援をしてくださった、父・一平、母・三知代、妹・祐子、弟・泰之、妹・莉沙、義父・豊茂、義母・多賀子、義弟・悟に深く感謝いたします。また、いつも一緒に研究をしていた後輩であり妻の靖子、いつも可愛い笑顔で癒してくれた長女の美仁に心より感謝申し上げます。

# 公表論文

- (1) Development of Unmarked Gene Modification System in Organic Solvent-Tolerant *Rhodococcus opacus* Strain B4  
AKIHISA KITA, NOBORU TAKIGUCHI, and JUNICHI KATO  
Journal of Environmental Biotechnology, 9, 25-29, (2009).
- (2) Cloning and Characterization of *sigA* and *sigB* Genes from *Rhodococcus opacus* Strain B4: Involvement of *sigB* in Organic Solvent Tolerance  
AKIHISA KITA, NOBORU TAKIGUCHI, and JUNICHI KATO  
Journal of Environmental Biotechnology, 9, 43-50, (2009).