

Trametes versicolor 由来ラッカーゼ遺伝子を導入した 形質転換体の作出

徳廣美千代¹, 藤広 覚², 中山 雄介², 大野 祐輔²,
河合 彩², 久松 伸², 其木 茂則²

¹江東微生物研究所, ²麻布大・環境保健

1. はじめに

人類は、生活水準の向上と引き換えに大量の化学物質を環境中に放出してきた。重金属を含む化学物質においては、化合物を何らかの方法で分解しても重金属そのものに毒性があるため、これらに汚染された土壌を浄化するには、汚染土壌を洗浄するなど、物理化学的な方法で除去する必要がある。しかしながら、この物理化学的な手法は、多大な労力と膨大なコストが必要となっている。また、近年問題視されている環境ホルモンのような難分解性有機化合物においても、その除去が難しいのが現状である。

一方、これら化学物質に汚染された環境を修復するために、植物を用いた環境修復技術、即ちファイトレメディエーションが注目されている。このファイトレメディエーションは、汚染物質を植物に蓄積させて回収したり、代謝・分解することで無毒化することなどを行う安価で効果的な技術であり、汚染物質の種類や汚染地域の特質にあわせた精力的な研究が行なわれている。

ところで、担子菌類の一種である白色腐朽菌は、難分解性有機化合物を分解する能力を有することが、最近の研究により明らかになった。我々は、この白色腐朽菌が持つ難分解性有機化合物の分解能力を植物に持たせることによって、ダイオキシン類のファイトレメディエーションが可能になるよう研究を進めている。これまでに、白色腐朽菌の一種である *Trametes versicolor* が産生するラッカーゼに着目し、*T. versicolor* 培養液を部分精製したラッカーゼ溶液が

水酸化PCBなどを分解することを明らかにしている。そこで本研究では、ラッカーゼのダイオキシン類分解能を検討するために、*T. versicolor* からクローニングしたラッカーゼ遺伝子を微生物や植物に導入することにした。

2. 材料と方法

ラッカーゼ遺伝子のクローニングには、バクテリオファージラムダと大腸菌ゲノム間の相同組換え反応を応用した Gateway クローニングシステム (Invitrogen) を用いて行った。まず、*T. versicolor* の菌体より mRNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得た後、相同組換えに必要な配列をもつプライマーを用いて PCR を行った。これら PCR 産物と Gateway 用ドナーベクター間で組換え反応を行い、エントリークローンを得た。このエントリークローンをを用いてクローニングしたラッカーゼ遺伝子の塩基配列を調べたところ、DNA の相同性が異なる 4 種類のラッカーゼ遺伝子を得た。このラッカーゼ遺伝子は、大腸菌用発現ベクター及びコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系用ベクターに組み込み、更に植物発現ベクターとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を含む pH7WG2D、或いはバスタ耐性遺伝子を含む pB7WG2D にも導入した。pH7WG2D に組み込んだラッカーゼ遺伝子は、パーティクルガン (PDS-1000, BioRad) を用いてタバコ培養細胞 BY-2 に導入し、ハイグロマイシンを含む寒天培地で形質転換体をスクリーニングした。pB7WG2D に組み込んだラッカ

ラーゼ遺伝子は、減圧浸潤法を用いてシロイヌナズナに導入し、バスタを含む培地で形質転換体をスクリーニングした。形質転換体のラッカーゼ活性は、ラッカーゼの基質である ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium] と反応させ、得られる青緑色を測定することで確認した。

3. 結果及び考察

大腸菌細胞内及びコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系においてラッカーゼ遺伝子を発現させ、ラッカーゼ活性の測定を行ったところ、両実験系共に SDS-PAGE においてラッカーゼのバンドを検出することが出来た。しかしながら、これらの実験系においてラッカーゼ活性を検出することは出来なかった。これはラッカーゼが高度に糖鎖修飾を受けるタンパク質であることから、これらの系ではラッカーゼ遺伝子の翻訳産物は得られるものの、活性のある酵素としての翻訳後の修飾が不十分であったためではないかと考えられた。

一方、BY-2の形質転換実験においては、ハイグロ

マイシン含有培地での選抜において、数十個の耐性コロニーが得られ、そのうちいくつかのコロニーからラッカーゼ活性を検出することが出来た(図1)。更に、これらのコロニーを液体振盪培養した場合でも、その細胞懸濁液内にラッカーゼ活性を検出することができた。また、シロイヌナズナの形質転換実験においても、バスタ耐性をもつT1世代の個体の葉片を切除してラッカーゼ活性を調べたところ、ラッカーゼ活性を持つ株が得られ、T2及びT3世代の株においてもラッカーゼ活性を検出することが出来た。これらのことから、*T. versicolor* からクローニングしたラッカーゼ遺伝子は、高等植物内で翻訳後の修飾も行われ、活性のあるラッカーゼを安定に発現できることが分かった。

今回の実験で *T. versicolor* 由来のラッカーゼを発現する植物を作出することができたことから、今後、この形質転換体のダイオキシン類分解能を詳細に調べ、ファイトレメディエーション実現のための検討を行っていきたいと考えている。

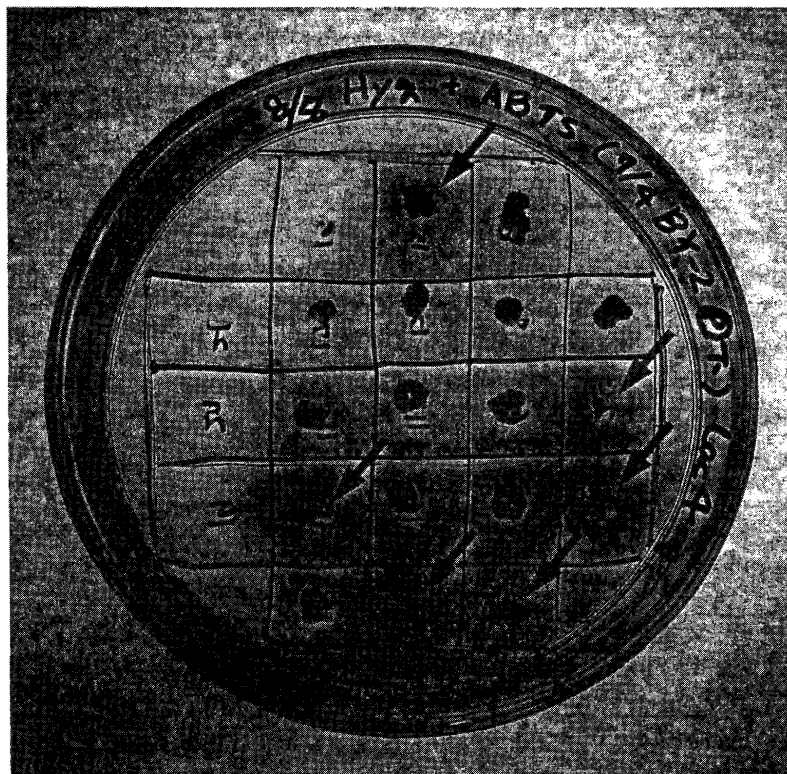


図1. ラッカーゼ遺伝子を導入した形質転換 BY-2
矢印は、ラッカーゼ活性が検出されたコロニーを示す。