

2P-2017 カルバゾール分解プラスミド pCAR1 が宿主の生育に与える負荷

○高瀬 識之, 高橋 裕里香, 山根 久和, 野尻 秀昭
(東大・生物工学セ)

IncP-7群プラスミドpCAR1は全塩基配列が決定済みで、主に*Pseudomonas*属細菌を宿主とする自己伝達性プラスミドである。3種の*Pseudomonas*属細菌(*P. putida* KT2440株, *P. aeruginosa* PAO1株, *P. fluorescens* Pf0-1株)がpCAR1を保持した際の生育への負荷を評価した。各菌株のプラスミド保持株と非保持株を等量混合し、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地で振盪培養した。24時間ごとに植え継ぎ、pCAR1上の*repA*遺伝子をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより、経時的に培養液中のpCAR1保持菌株の比率を測定した。その結果、3宿主全てでプラスミド保持株の比率が減少することが示された。プラスミド保持に伴う生育負荷は宿主によって異なり、Pf0-1株(培養開始144時間後までに15%以下まで減少)<PAO1株(同2%以下)<KT2440株(同0.1%以下)の順に負荷を受けやすいことが見出された。また、同様の手法でpCAR1保持株を単独培養した際、144時間培養してもプラスミド保持株の割合が85%以上であることが示されたため、プラスミド保持株の比率が減少したのは、宿主がプラスミドを脱落したためではないことが示された。また、KT2440株を用い、植え継ぎの間隔を12時間に変更して同様に解析したところ、植え継ぎごとのプラスミド保持株の比率は植え継ぎ時間が24時間の場合とほぼ一致することが見出された。ここから、淘汰は主に菌体の対数増殖期に起こり、定常期は菌体比率の変化にあまり影響を及ぼさないことが示唆された。現在、より実環境に近い条件プラスミドが宿主の生育に与える負荷を評価するために、濾過滅菌した湖沼水中で挙動解析を行っている。

Effects of carbazole degradative plasmid pCAR1 on the fitness of three *Pseudomonas* host strains

○Noriyuki TAKASE, Yurika TAKAHASHI, Hisakazu YAMANE, Hideaki NOJIRI
(Biotech. Res. Center, Univ. Tokyo)

Key words plasmid, *Pseudomonas*, pCAR1, fitness

2P-2018 海洋魚類の体表面から分離されたセレン酸還元菌からのセレン酸還元酵素の検出

○清水 亮佑, 阪口 利文
(県立広島大・生命環境・環境科学)

【目的・背景】セレンはガラスの着色剤や電子材料など工業的に広く用いられている希少元素である。その結果、産業活動から排出される機会も多く、セレンによる環境汚染が問題となっている。また、その希少性からセレン元素の回収が要望されている。ある種の微生物は嫌気条件下でセレンオキシアニオンを元素体セレンまで還元しながら生育できる。この現象はセレンに汚染された環境の浄化、資源回収、セレン結晶材料の合成への利用可能性がある。本研究では、海洋など塩分を含む環境中からのセレンの除去・回収等への利用を目的に海洋性セレンオキシアニオン還元微生物の分離、及び分離株に対する培養特性や還元酵素の探索をおこなった。

【方法・結果】本実験では、採取したシロギスの体表面からセレン酸還元菌SK3-1, SK3-2, SK4-1, SK4-2株を分離した。塩要求性試験では分離株は全て、NaCl塩濃度が1~10%の条件で生育がみられた。また、ミネラル溶液以外にNaClを添加しない条件では増殖が見られず、生育には塩が必要である好塩性菌であった。また、Native-PAGEとメチルビオローゲンを用いた活性染色法によってセレン酸還元酵素及び硝酸還元酵素を検出した。その結果、各分離株において165~199 kDa付近にセレン酸還元能を有するバンドが、246~280 kDa付近に硝酸還元能を有するバンドが出現した。このことから、分離菌株では、セレン酸及び硝酸還元酵素は独立したものであることが強く示唆された。また、セレン酸還元酵素は嫌気状態において誘導されることが明らかとなった。

Detection of selenate reductase enzyme from marine selenate-reducing bacteria isolated from a marine fish skin surface

○Ryosuke SHIMIZU, Toshifumi SAKAGUCHI
(Dept. of Environ. Sci., Pref. Univ. of Hiroshima)

Key words bioremediation, selenate reduction, marine microbe, biorecovery

2P-2019 Pentachlorophenol 分解菌の単離と解析

○堀寄 允文¹, 沼田 充¹, 八田 貴², 山根 久和¹, 野尻 秀昭¹
(¹東大・生物工学セ,²岡山理大・工)

【目的】農薬として利用されてきたpentachlorophenol (PCP)などの塩素化芳香族化合物は、環境残留性や毒性が高く難分解性であることが多い。それら化合物を微生物によって効率よく分解するためには、強力な分解菌・分解酵素を単離し、解析・利用する必要がある。そこで本研究では、新たなPCP分解菌を単離し、脱塩素化酵素を中心に解析することを目的とした。【結果】PCPが唯一の炭素源となる培地に、486サンプルの土壌を単離源としてそれぞれ加えて集積培養を行った結果、約14日で終濃度100 ppmのPCPをGC-MSにて検出限界以下まで分解するPCP分解菌群を10サンプル取得した。得られたPCP分解菌群10サンプルの培養液中における塩化物イオン濃度は、PCPの減少に伴い増加し、理論上PCPの全ての塩素を脱塩素化していることが確認された。そこで、PCP分解菌単離のため、PCPを唯一の炭素源とする寒天培地や、LB、R2A培地等の様々な培地に抗生物質を添加した寒天培地を用いて分解菌の分離を試みたが、分解活性を持つ菌体の取得には至らなかった。しかし、終濃度1000 ppmのPCPを加えたPCP懸濁R2A寒天培地を用いて分解菌の単離を試みたところ、クリアゾーンを形成するコロニーを14種取得した。得られたコロニーは、30℃の条件下のPCP懸濁R2A寒天培地で4時間にてクリアゾーン形成を伴うコロニーを形成する生育が非常に速いPCP分解菌であり、*Pseudomonas*や*Burkholderia*に属する細菌であることが示された。現在、得られた分解菌の液体培地における分解活性を測定するとともに、PCP分解酵素をコードする遺伝子の取得を試みている。

Isolation and characterization of pentachlorophenol degrading bacteria

○Tadafumi HORISAKI¹, Mitsuru NUMATA¹, Takashi HATTA², Hisakazu YAMANE¹, Hideaki NOJIRI¹
(¹Biotech. Res. Center, Univ. Tokyo, ²Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words degradation, pentachlorophenol

2P-2020 台湾の水銀汚染環境における水銀還元酵素遺伝子 *merA* の分布と多様性に関する研究

○簡 梅芳¹, 石堂 里英¹, 棚木 優子¹, 小山 雅之¹,
宮内 啓介¹, 張 祖恩², 遠藤 銀朗¹
(¹東北学院大・工,²成功大・永統環境研究セ・台湾)

本研究室では遺伝子工学によって微生物の汚染浄化能を強化し、汚染環境を修復するための研究を進めてきている。本研究では、実際に水銀によって汚染された台湾台南市の安順地区の土壌を採取し、その土壌における水銀濃度を測定するとともに、微生物の水銀浄化反応の鍵である水銀還元酵素遺伝子*merA*を指標としてそこに生息する細菌が持つ*merA*の存在状況と特徴を調べた。採取した汚染土壌の水銀濃度は、フレイムレス原子吸光計を用いて測定した。汚染土壌から抽出したDNAを鋳型として、*Actinobacteria*, *Firmicutes*, α -*Proteobacteria*, β/γ -*Proteobacteria*が保有する既知の*merA*配列に特異的なプライマーを用いたPCR及びその増幅産物をアミノ酸配列に置き換えて解析を行った。その結果、*Firmicutes*と β/γ -*Proteobacteria*の*merA*は多くのサンプルから検出された。また、アミノ酸配列による系統解析の結果では、各土壌サンプル中には既知の*merA*配列と異なる新規の*merA*が多く存在していることが示唆された。一方、汚染濃度の高い土壌から検出された*merA*の多様性は低いことがわかり、高濃度の水銀汚染土壌には特定の*merA*が優先的に存在し、その汚染土壌において水平伝播している可能性が考えられた。本発表では、水銀耐性遺伝子の水平伝播に関与するトランスポゾンに特異的なプライマーを用いたPCR及びその増幅産物における*merA*の存在について検討した結果についても報告する。

Study on distribution and diversity of mercuric reductase gene, *merA*, in a mercury polluted site in Taiwan

○Mei-Fang CHIEN¹, Rie ISHIDO¹, Yuko TANAKI¹, Masayuki KOYAMA¹, Keisuke MIYAUCHI¹, Juu-En CHANG², Ginro ENDO¹
(¹Faculty of Eng., Tohoku-Gakuin Univ., ²SERC, NCKU, Taiwan)

Key words mercuric reductase, *merA* diversity, mercury resistant bacteria, horizontal gene transfer