

遺伝子改良キノコ菌による芳香族有害塩素化合物の分解処理技術の開発

宍戸 和夫

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

研究の目的

地球が種々の有害物質で汚染され、生活・産業廃棄物が山積みされている。このままでは人間の生活基盤や生物としての活動が危うくなる。21世紀の我々に課された最も重要なテーマの一つが地球環境に関わる諸問題の解決である。本研究では、代表的環境汚染物質である芳香族塩素化合物のダイオキシンやペンタクロロフェノールを分解・無毒化するバイオ技術の開発を目的とした。

方法

上記の目的を達成するために、生態系で最も難分解性の芳香族化合物のリグニンを分解できる唯一の生物である白色腐朽性のキノコ菌、アラゲカワラタケの一核菌糸（環境に対し孢子による飛散汚染のない）を用いることにした。本菌が分泌するリグニン分解酵素はダイオキシンやペンタクロロフェノールも分解する。そこで、当該酵素の生産性が顕著に上昇した菌株を遺伝子工学的育種法（分子育種法）により作出する。他方、哺乳類シトクロムP450の一つ、CYP1A1がダイオキシン分解性を有するので、ラットCYP1A1を生産する菌株も同時に作出する。

結果

1) リグニン分解酵素のリグニンペルオキシダーゼ (LiP) 高生産性アラゲカワラタケの作出とそれらによるダイオキシンの効率的分解無毒化

アラゲカワラタケのLiP遺伝子 (*lip*) をアラゲカワラタケ *gpd*プロモーターとシイタケ *priA*ターミネーターの間に挿入した発現カセット及びアラゲカワラタケ *ARG1* 遺伝子を持つ複合プラスミドMIP30-*lip*を、アラゲカワラタケ一核菌糸Arg⁻ Leu⁻株に導入し、染色体上に発現カセットが数コピー組み込まれた形質転換株ChTF6-1 (Ch. LiP) とChTF6-2 (Ch. LiP)を得た。これらはArg⁺対照株と比較してそれぞれ5倍高いLiP活性を示した。分子育種株をビール滓培地中25℃で培養し、得られた11日目の培養ろ液についてダイオキシン[2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (2,7-DCDDと略称)]分解性をGC (ガスクロマトグラフィー) により分析した。その結果、Arg⁺対照株が2,7-DCDDを33.5%分解したのに対し、両分子育種株はそれぞれ73.7%, 63.5%の2,7-DCDD分解性を示した (図1)。また、ペンタクロロフェノール(PCP)については、Arg⁺対照株が19.2%分解したのに対し、両分子育種株は80-70%の分解性を示した。

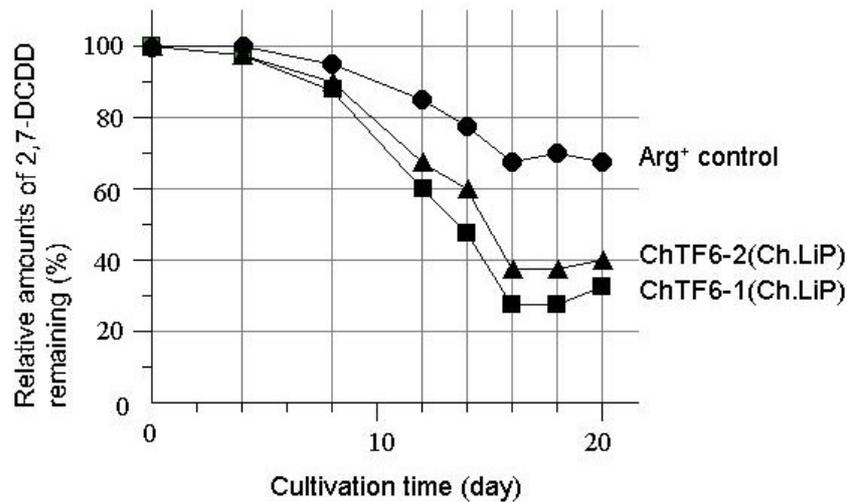


Fig. 1. 2,7-DCDD degradation by the culture supernatants of *C. hirsutus* transformants

2) ラット由来シトクロム CYP1A1 生産性アラゲカワラタケの作出とそれらによるダイオキシンの分解無毒化

ラット CYP1A1 の cDNA 遺伝子 (*cyp1a1cDNA*) の発現カセット[アラゲカワラタケ *gpd* プロモーター—*gpd* 5' 部位 (第 1 エキソンから第 4 エキシソンの 8 番目の塩基までの 224 bp 配列) —ラット *cyp1a1cDNA*—シイタケ *priA* ターミネーター]及びアラゲカワラタケ *ARG1* 遺伝子を持つ複合プラスミド MIp5-(*cyp1a1+arg1*) を上述のアラゲカワラタケ—核菌糸の染色体中に導入・発現させ、形質転換株、ChTF5-2(CYP1A1), ChTF5-4(CYP1A1), ChTF5-6(CYP1A1) を得た。これら分子育種株は、それぞれ染色体上に 9, 6, 7 コピーの発現カセットを持ち、ほぼ等量の CYP1A1 を菌体内生産していることが分かった。分子育種株 3 株と受容菌株を 10 ml 中に 10 µg の 2, 7/2, 8(1:1)-DCDDs (2, 7-DCDD と 2, 8-DCDD の等量混合物) を含む MYGC 培地を用いて 30°C で 5 日間培養し、培養物全体に残存するダイオキシンをアセトン抽出法により回収し、GC により残存量を求めた。5 日間培養としたのは、アラゲカワラタケはこの培養日数ではほとんど LiP や他のリグニン分解酵素マンガンペルオキシダーゼ (MnP) を分泌生産しないので、CYP1A1 によるダイオキシン分解を評価し易いと考えたからである。分析の結果、受容菌株が 11.8 % のダイオキシンを分解したのに対し、ChTF5-2(CYP1A1), ChTF5-4(CYP1A1), ChTF5-6(CYP1A1) がそれぞれ 71.6 %, 69.8 %, 69.4 % のダイオキシンを分解することが分かった (図 2)。因みに、16 日間培養では、受容菌株が 30-35 %, 分子育種株 3 株が 85-90 % のダイオキシンを分解すると推定された。

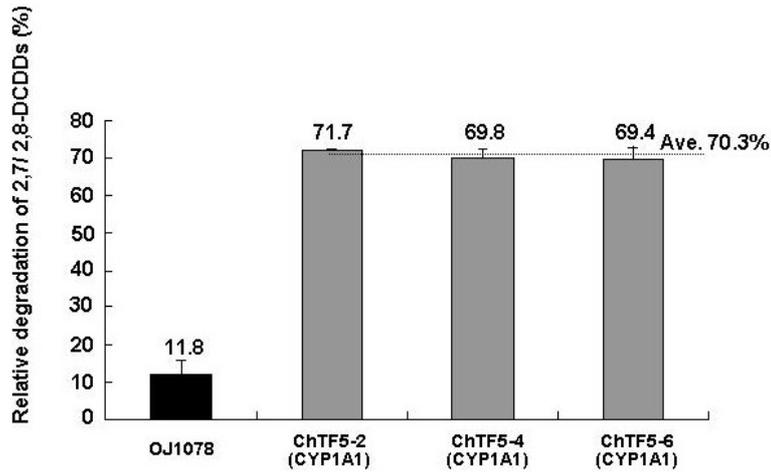


Fig. 2. Degradation (transformation) of 2,7/2,8(1:1)-DCDDs during cultivations of the three rat CYP1A1- producing transformants of *C. hirsutus*

結論

生育が速く、非病原性のアラゲカワラタケー核菌糸に対して分子育種を行い、リグニン分解酵素 LiP 高生産性及び、ラット由来 CYP1A1 生産性の菌株を作出することに成功した。このことにより、ダイオキシンを菌体外分泌酵素 LiP (と MnP) で攻撃し、攻撃を免れたダイオキシンを菌体内で CYP1A1 により攻撃することが可能となった (図 3 参照)。以上の実験室内での研究成果を工業的規模にまで発展させるには、遺伝子改良キノコ菌の酵素生産性をさらに高める低コストの培養条件の設定、環境中からの環境汚染物質の抽出・濃縮化等が必要である。

おわりに、本研究を遂行するに当たり多大な研究助成を頂きました野田産業科学研究所に厚くお礼申し上げます。

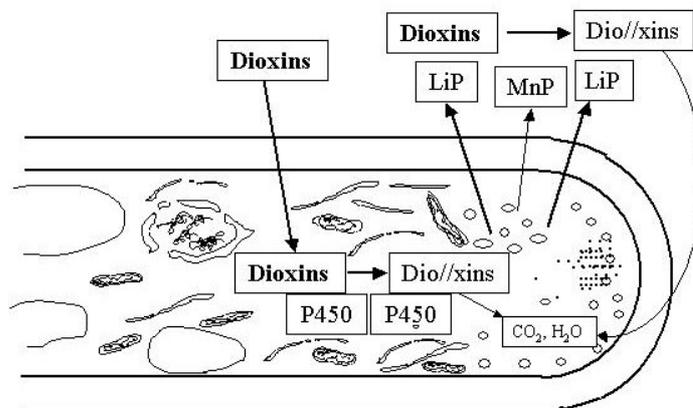


Fig. 3. Degradation of dioxins outside and/or inside mycelial cells of molecular-genetically bred basidiomycetous mushrooms (fungi)