

機能相補による芳香族化合物複合汚染土壌からの 新規分解酵素遺伝子の探索

Functional Screening of Novel Genes for Degradation of Aromatic Compounds from Soils That Were Artificially Contaminated with Aromatic Pollutants

永山 浩史, 菅原 智詞, 遠藤 諒, 加藤 広海, 大坪 嘉行, 永田 裕二, 津田 雅孝*
HIROFUMI NAGAYAMA, TOMONORI SUGAWARA, RYO ENDO, HIROMI KATO, YOSHIYUKI OHTSUBO, YUJI NAGATA and MASATAKA TSUDA

東北大学大学院生命科学研究科 〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1

* FAX: 022-217-5699

* E-mail: mtsuda@ige.tohoku.ac.jp

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai 980-8577, Japan

(原稿受付 2013年1月17日 / 原稿受理 2013年5月27日)

Aromatic ring-hydroxylating oxygenases (AHOs) are key enzymes for the degradation of aromatic hydrocarbons, and abundant unculturable microorganisms are expected to potentially encode AHOs with novel catalytic activities. However, only almost identical AHO genes with known ones were isolated from oil-contaminated soil even by using the cultivation-independent approaches, probably because only a few specific genes were excessively enriched in such 'naturally' contaminated soils and variation of genes in such environments was relatively low. In order to efficiently obtain novel AHO genes in cultivation-independent manner, a soil was 'artificially' contaminated with four aromatic hydrocarbons (biphenyl, phenanthrene, carbazole, and 3-chlorobenzoic acid). Metagenomic DNA extracted from the soil was cloned to a broad-host-range cosmid vector, and the resultant library was introduced into derivatives of a naphthalene-degrading bacterial strain whose AHO activity for naphthalene degradation is lacking. The clones harboring the cosmids that carries the metagenomic genes for the AHO activity were obtained by the functional complementation. The subsequent Southern blot analysis indicated that none of the cosmids carried the genes highly homologous to the known AHO gene. These results suggested that novel AHO gene(s) were obtained by our approach.

キーワード: 環境細菌, メタゲノム, 環境汚染物質分解

Key words: environmental bacteria, metagenome, biodegradation of environmental pollutants

1. 諸 言

環境中には、人工合成されたものも含む環境汚染物質を分解資化し、炭素源やエネルギー源として利用できる微生物が棲息する。環境汚染物質の多くは自然界の物質循環に組み込まれにくいことを考慮すると、これら汚染物質を分解する微生物の能力は、環境中に汚染物質が放出された後に確立された可能性が考えられる。こうした微生物能力の本質の解明と環境浄化への応用を目的として、環境汚染物質を分解する微生物（主に細菌）が数多く単離され、その機能に関する詳細な解析が行われてきた。しかし、(i) 環境中に棲息する微生物の大多数は実験室環境下では純粋培養困難であること²⁰⁾、(ii) 自然環境中では、汚染物質は複数の細菌集団により協調的に分解されている場合が多いこと¹⁾、を考慮すると、従来の「古典的な」手法により実験室環境で純粋培養可能な分解細菌が、実際の汚染環境中における汚染物質分解に

中心的な役割を果たしているとは必ずしも言えない。このような背景のもと、近年、純粋分離や培養の過程を経ずに環境に存在する細菌 DNA を対象としたメタゲノム解析が盛んに行われつつある^{5,17,19)}。そこで本稿では著者らが行なっている芳香族化合物の分解酵素遺伝子の取得を目的としたメタゲノム解析手法を紹介する。

2. 材料および方法

2.1. メタゲノム解析の現状

メタゲノム解析は、配列情報から生態学的知見を得ることを目的とした解析と、有用遺伝子（主に酵素遺伝子）の取得を目的とした解析に大別される。現在では、第2世代型シーケンサーの登場に伴い、シーケンス速度が向上し、シーケンスにかかる費用が以前に比べて格段に安価になり、そして、膨大な量の塩基配列を決めることが容易になってきたことから、「メタゲノム」という

と前者を指す場合が多く、様々な生態学的解析がなされている。当研究室においても、芳香族化合物で汚染化した土壌における菌叢解析や棲息細菌集団由来の遺伝子プール解析を目的として、Illumina GA IIx と Roche 454 の第2世代型シーケンサーを用いて解析を実施しているが、その生態学的意義については、別稿を参照されたい⁹⁾。メタゲノムから有用な機能遺伝子取得する方法は、目的の機能に基づく活性発現を指標にしたスクリーニングと、機能既知遺伝子の配列情報をもとにしたスクリーニングに大別される(図1)。前者は、環境サンプルから得られたメタゲノム DNA を適切なベクターに挿入し、適切な宿主細菌に導入して目的機能を発現するクローンをスクリーニングすることで目的遺伝子を取得する方法であり、理論的には既知遺伝子と大きく配列の異なる新規性の高い遺伝子の獲得も期待できる。しかし、未知の微生物遺伝子を宿主細菌で発現させるため、適切な発現系の構築が困難な場合が多く、また、良質なライブラリーの構築には高い技術を必要とする。具体的には、夾雑物の多い土壌サンプルからライブラリーの作製に必要な高純度で高分子の DNA を十分量抽出するのは容易ではない。精製において、ゲル濾過カラムやアガロースゲル電気泳動は有効であるが、取量が激減し、少量の DNA から効率良くライブラリーを構築する高度な技術が必要となる。一方、後者の既知遺伝子の配列情報をもとにしたスクリーニングは、目的とする酵素遺伝子が有する保存配列を利用して、PCR やハイブリダイゼーションなどの比較的平易な実験的手法や、コンピューターによる同源性検索で目的遺伝子を見つけ出す方法であり、目的遺伝子取得の可能性は高いが、得られる遺伝子の新規性は低い。しかしながら、最近のバイオインフォマティクス技術の進歩により、例えば、DNA やアミノ酸配列レベルでの同源性は低い、産物としての酵素タンパク質の推定立体構造が保存された新規性の高い遺伝子を取得することが可能になりつつある¹⁵⁾。さらに、前述のように、現在ではメタゲノム DNA の配列情報を得ることは比較的容易であること、第2世代型シーケンサーでは、ライブラリーの作製をせずに試料 DNA の配列を直接決定できること、さらに、短い遺伝子であれば、人工遺伝子合成が安価で可能であることとも相まって、既知配列情報に基づく目的遺伝子スクリーニングのメリットは大きい。とはいえ、多数の微生物に由来する配列が混在したメタゲノム配列のアセンブルや遺伝子予測などは、未だに技術的に困難であることも事実である⁸⁾。

このように、2つの方法にはそれぞれ一長一短あり、どのようなアプローチが目的遺伝子の取得に適しているかは、それぞれのケースに応じて吟味する必要がある。我々は、新規芳香族化合物初発酸化酵素遺伝子の取得を目的として、機能発現を指標にしたスクリーニング手法を用いてきた^{13,19)}。特に、後述する機能相補の手法はポジティブスクリーニングであることから理論的には効率的な目的遺伝子の取得が可能である。また、前述の生態学的知見を得ることを目的としてメタゲノム配列情報を取得した同試料から、機能発現を指標として実際に活性を持つ遺伝子を取得することで、生態学的議論を深めることもできると期待される。

2.2. 原油汚染土壌からの分解酵素遺伝子群の取得と解析

芳香族化合物は芳香族系アミノ酸に代表されるように天然の生体成分としても存在するが、芳香環は化学的に安定であり、ベンゼン、トルエン、ナフタレンを含む多環芳香族化合物などの原油成分は代表的な難分解性の環境汚染物質である。このような難分解性芳香族化合物の微生物分解は、一般に初発酸化酵素による芳香環への水酸基の導入により開始されることから、本酵素が分解の鍵酵素であるといえる^{12,14,21)}。すなわち、新規性が高く、しかも実際の汚染環境中で機能している本酵素遺伝子が取得できれば、生態学的知見に加えて、環境浄化、さらには芳香族化合物の変換による物質生産への応用も期待できる。

ナフタレンを唯一の炭素源として生育する細菌 *Pseudomonas putida* G7 株が有するナフタレン分解プラスミド NAH7 上には、ナフタレン代謝に必要な一連の遺伝子がクラスターを成して存在している¹⁸⁾。このうち、ナフタレンの初発酸化酵素は、*nahAa* から *nahAd* の4つの遺伝子にコードされるコンポーネントからなる(図2)。当研究室では、まず、*nahAc* のみを破壊した *P. putida* G7K2 株を作製した。本株はナフタレンを唯一の炭素源として生育できないが、*NahAc* 機能が相補されると生育可能になる。この機能相補の原理を用いて、原油汚染土壌メタゲノムから、(i) 広宿主域コスミドベクターを用いて作製したライブラリーを G7K2 株にエレクトロポレーション法で導入する方法、(ii) *nahAc* を破壊した NAH7 誘導体を *P. putida* KT2440 染色体上に導入して構築した *P. putida* KTSK2 株と土壌試料中の微生物集団を直接接合させ、目的遺伝子を含む因子の可動性を利用する手法、により *NahAc* の機能を担う遺伝子を取得した¹⁹⁾。両手法とも方法論的には機能したが、獲得した遺伝子はいずれも *nahAc* とほぼ同一のものであり、新規性の高い遺伝子は取得できなかった。その主な原因として、まず、用いた試料では *nahAc* 遺伝子が優先化していることが考えられたが、非汚染土壌メタゲノムを用いた同様の系でのスクリーニングでは目的遺伝子の取得には至らず、目的遺伝子がある程度の多様性を維持した状態で濃縮されている試料を用いることが望ましいと考えられた。また、ナフタレン資化能の回復を指標とした機能相補の手法は、ナフタレン分解に特化した酵素遺伝子が取得される可能性が高いことに加えて、目的遺伝子が特定の宿主内で高発現する必要があり、発現レベルの低い遺伝子や、目的活性の弱い酵素遺伝子の取得は困難である。これらの点を踏まえ、次に、(i) 非汚染土壌を人工的に汚染化させた試料を用いて、(ii) 目的遺伝子の機能発現をより高感度に検出可能な方法でスクリーニングする実験を行った。

3. 結 果

3.1. 人工的汚染土壌ライブラリーからの芳香族化合物初発酸化酵素遺伝子の取得

芳香族化合物による汚染歴のない花崗岩質畑土壌をガラス瓶に入れ、3-クロロ安息香酸、フェナントレン、

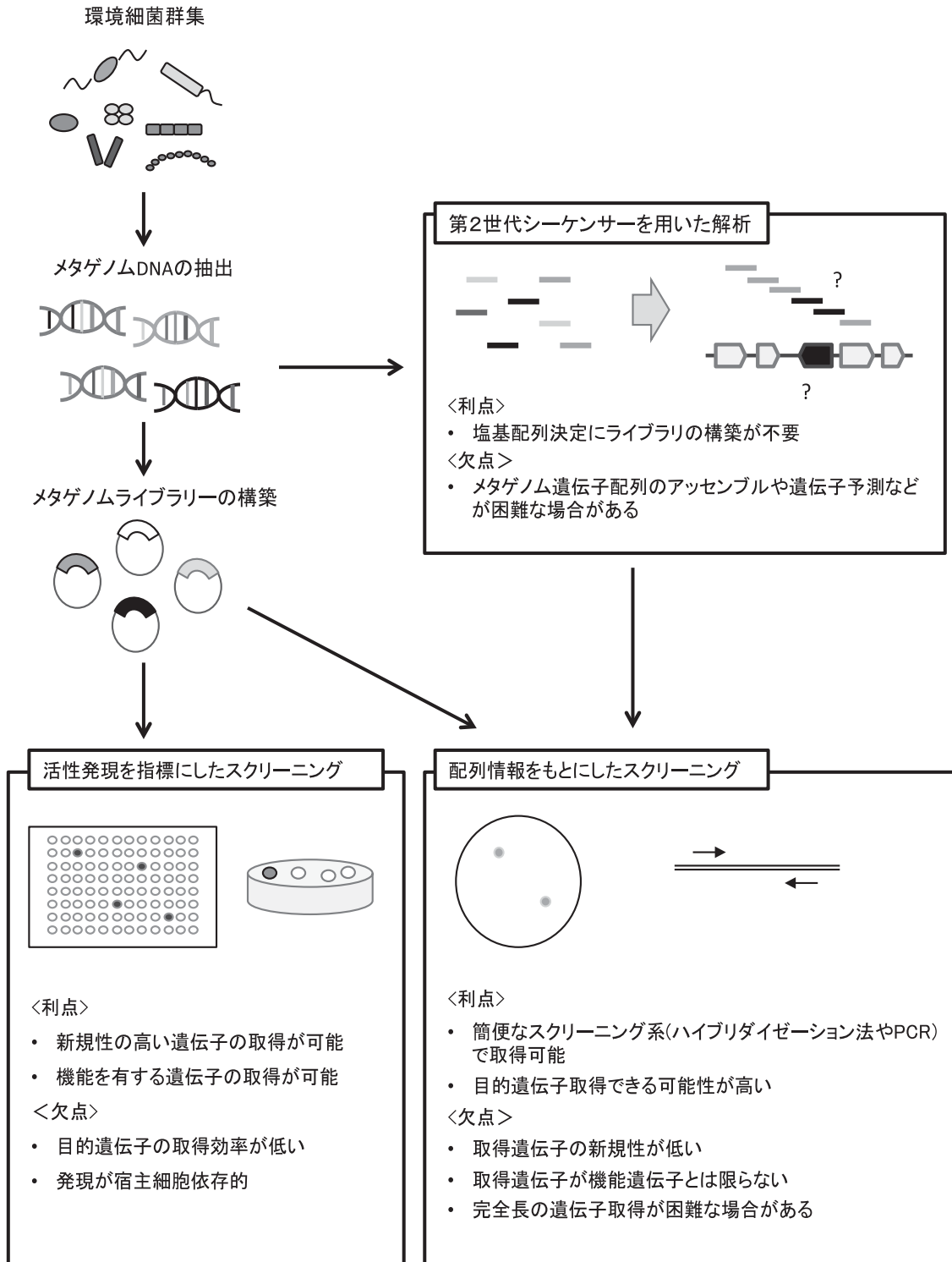


図1. メタゲノムライブラリーからの目的遺伝子の取得法とその特徴

ビフェニル、カルバゾール（ダイオキシンの代用化合物）をそれぞれ 1 mM になるように調整した後に、同時添加して人工的に汚染させた。今回、ナフタレンを基質に加えなかったのは、既知のナフタレン分解遺伝子の優先化を避けるためである。また、逆に、ナフタレンで汚染させない場合にも、既知のナフタレン分解遺伝子が取得できるか確認するという意味合いもある。汚染化後、定量リアルタイム PCR によるモニタリング

でこれら化合物の分解に関与する既知遺伝子 (*benA* と *pdoA*) が十分に増えた時点を見計らい、試料より直接抽出したメタゲノム DNA ライブラリーの構築をコスミドベクターで行った (図3)。なお、これら試料から *nahAc* の PCR 増幅は確認できなかった。活性の発現を検出する宿主細菌としては、前述の *nahAc* を破壊した *P. putida* KTSK2 と、リダクターゼ遺伝子 (*nahAa*) を欠損した *P. putida* G7 *nahAa* dl 株を用いた。今回、後

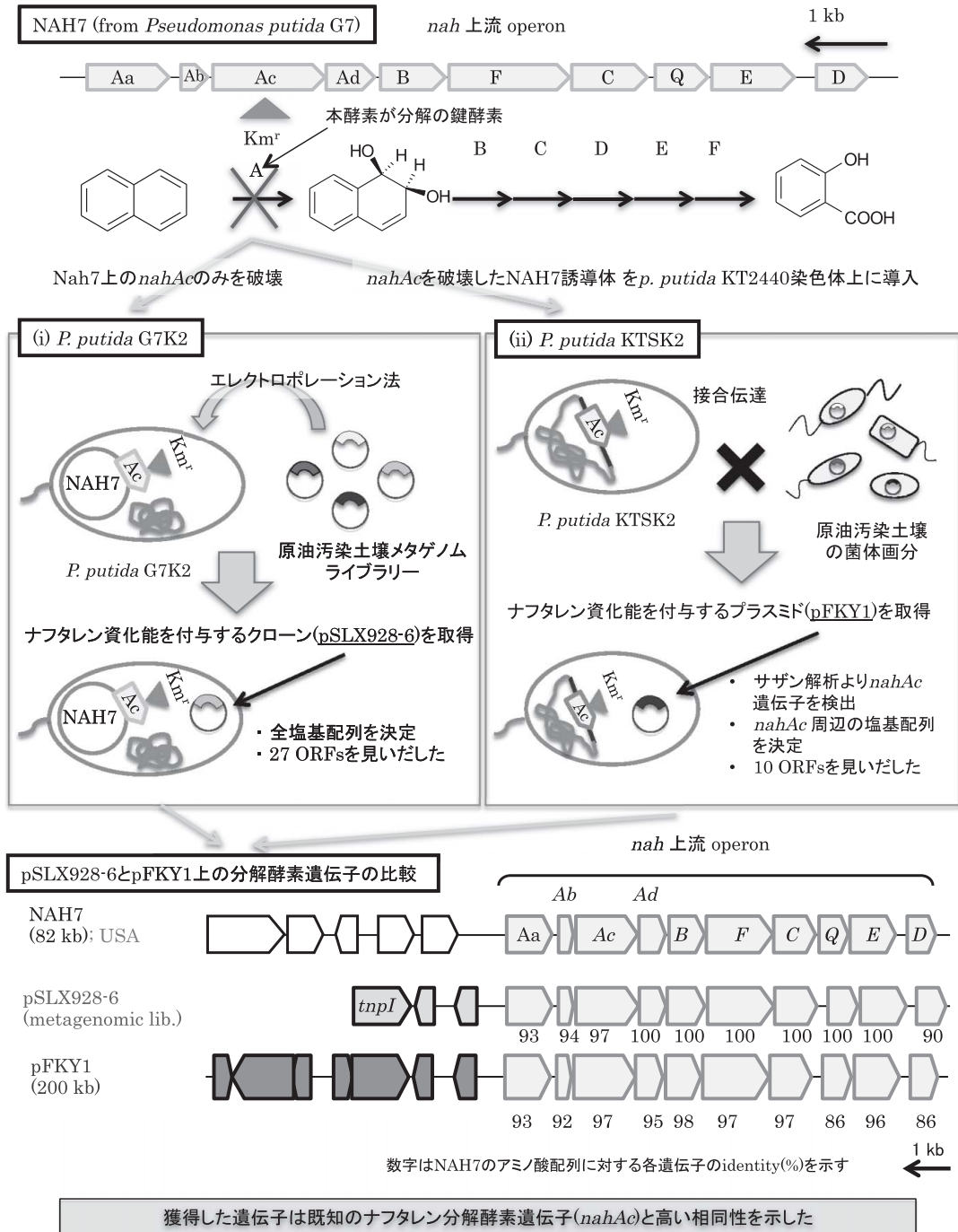


図2. 原油汚染土壌からの分解酵素遺伝子群の取得された汚染物質分解遺伝子の解析

者株も用いたのは、マルチコンポーネントからなるオキシゲナーゼは、酸素添加酵素コンポーネントとフェレドキシン間の認識は比較的厳密であるのに対して、リダクターゼとフェレドキシン間の認識は緩やかであり、リダクターゼ機能を相補することにより、より多様性に富む遺伝子を取得できると考えたためである。一方、一般的に芳香族化合物初発酸化酵素はインドールも基質とし、青色のインディゴを生じさせる活性を備えていることか

ら⁷⁾、インドールを含む培地上で青色コロニーを形成するクローンをスクリーニングすることにした。実際に、本スクリーニング法で、予備的に複数の芳香族化合物で汚染させた土壌から *Burkholderia multivorans* を宿主に用いて 2-ニトロトルエン、ナフタレン、ビフェニルに対して顕著な分解活性を示す新規性の高い初発酸化酵素遺伝子の取得に成功している¹⁹⁾。今回、上記人工的汚染化土壌を対象とした *P. putida* G7 *nahAa* dl 株を用いた

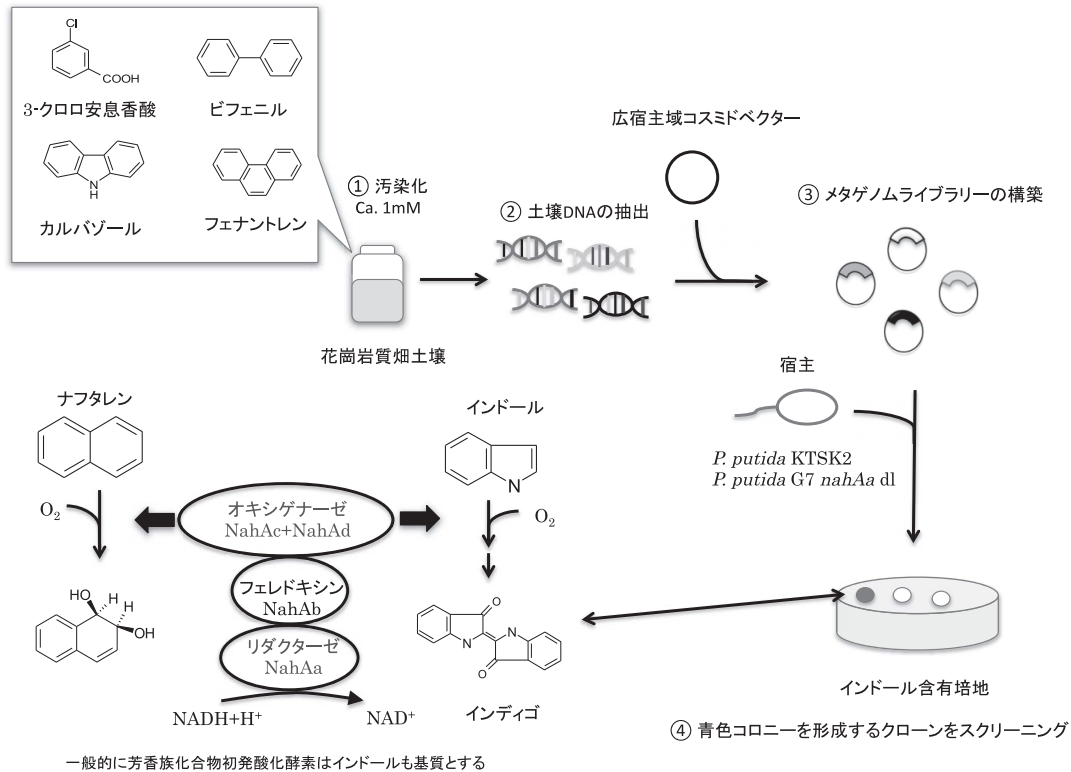


図3. 芳香族化合物初発酸化酵素遺伝子の取得の概要

スクリーニングでは、インディゴ生成により青色コロニーを形成する16株の陽性クローンを取得することができた。各クローンが有するコスミドを制限酵素消化して電気泳動のバンドパターンを比較した結果、互いのバンドパターンはかなり多様であり、少なくとも16クローンからは、*nahAa*をプローブに用いたサザン解析ではシグナルが検出されなかった。一方、*P. putida* KTSK2株を用いたスクリーニングでは、13株の陽性クローンが得られ、同様に*nahAc*をプローブに用いたサザン解析ではシグナルが検出されなかった。しかしながら、*nahAc*破壊株から得られた13クローンが有するコスミドを制限酵素消化したものの電気泳動バンドパターンの類似性は高く、酸化コンポーネントとフェレドキシン間の相互作用は比較的厳密であり^{3,9)}、似た型の遺伝子しか取得できない可能性を示唆している。

4. 考察

4.1. まとめと今後の展望

今回取得した遺伝子のさらなる解析が必要であることは当然であるが、少なくとも既知の初発酸化酵素遺伝子(*nahAc*)とは相同性の低い酵素遺伝子を取得することに成功した。これは、(i) 汚染化されて長い時間が経過した土壌試料でなく、汚染化されて間もない土壌を用いたため、遺伝子の多様性が高いこと、(ii) ナフタレン以外の複数の化合物で汚染化させたこと、(iii) ナフタレン資化能ではなく、高感度な活性の検出法を用いたこと、が主な理由として考えられる。いずれにせよ、メタゲノムからの有用遺伝子の取得方法として、配列情報が

比較的容易に得られる現在でも、機能発現を指標としたスクリーニング手法は依然として有効であると考えられる。ただし、前述のように高品質なライブラリーの作製には高度な技術を要することは確かであり、今回のように、汚染歴の無い土壌を芳香族化合物で汚染化させて初発酸化酵素遺伝子を濃縮してその存在比率を高めた上で、感度の高いスクリーニング方法を用いるなど、様々な工夫も必要である。しかし、実際に機能を有する遺伝子を同定することは生態学的にも重要な知見となることは言うまでもなく、様々な苦労は伴うものの、今後も機能発現を指標とした目的遺伝子のスクリーニングは重要なメタゲノム研究手法のひとつであり続けるであろう。

5. 謝辞

筆者グループの研究は、文部科学省と日本学術振興会の科学研究費補助金、東北大学「生態適応」グローバルCOEからの助成を受けた。この場にて関係各位に謝意を表したい。

文献

- Blasco, R., M. Mallavarapu, R.M. Wittich, K.N. Timmis, and D.H. Pieper. 1997. Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 427-434.
- Fuchs, G., M. Boll, and J. Heider. 2011. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nature Rev. Microbiol.* 9: 803-816.

- 3) 井上謙吾, 野尻秀昭. 2007. マルチコンポーネント型芳香環水酸化酵素の酸化駆動力. 化学と生物. 45: 468–476.
- 4) Janssen, D.B., I.J.T. Dinkla, G.J. Poelarends, and P. Terpstra. 2005. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. Environ. Microbiol. 7: 1868–1882.
- 5) 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2010. 芳香族化合物による土壌攪乱における微生物遺伝子プールの変動. J. Environ. Biotechnol. 10: 63–71.
- 6) Kimura, N. 2006. Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. Microbes Environ. 21: 201–215.
- 7) Mermod, N., S. Harayama, and K.N. Timmis. 1986. New route to bacterial production of indigo. Nat. Biotechnol. 4: 321–324.
- 8) 森 宙史, 林 哲也, 黒川 顕. 2009. メタゲノム研究の最前線. 蛋白質核酸酵素. 54: 1264–1270.
- 9) Nam, J.W., H. Nojiri, H. Noguchi, H. Uchimura, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane, and T. Omori. 2002. Purification and characterization of carbazole 1,9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5882–5890.
- 10) 永田裕二, 津田雅孝. 2005. メタゲノムの発想に基づいた新規環境汚染物質分解酵素遺伝子へのアプローチ. 化学と生物. 43: 33–42.
- 11) 永田裕二, 津田雅孝. 2010. カイメン供在細菌メタゲノム中の環境汚染物質分解酵素遺伝子相同配列の解析. pp. 166–177. マリンメタゲノムの有効利用. CMC 出版.
- 12) Ogawa, N., K. Miyashita, and A.M. Chakrabarty. 2003. Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds. Chem. Rec. 3: 158–171.
- 13) Ono, A., R. Miyazaki, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2007. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 501–510.
- 14) Perez-Pantoja, D., R. Donoso, L. Agullo, M. Cordova, M. Seeger, D.H. Pieper, and B. Gonzalez. 2012. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. Environ. Microbiol. 14: 1091–1117.
- 15) Sato, Y., M. Monincova, R. Chaloupkova, Z. Prokop, Y. Ohtsubo, K. Minamisawa, M. Tsuda, J. Damborsky, and Y. Nagata. 2005. Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4372–4379.
- 16) 末永 光, 宮崎健太郎. 2010. メタゲノム解析により明らかにされた環境中の芳香族化合物分解遺伝子群の姿. 化学と生物. 48: 100–106.
- 17) Suenaga, H. 2012. Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. Environ. Microbiol. 14: 13–22.
- 18) Sota, M., H. Yano, A. Ono, R. Miyazaki, H. Ishii, H. Genka, E.M. Top, and M. Tsuda. 2006. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. J. Bacteriol. 188: 4057–4067.
- 19) 津田雅孝, 小野 玲, 宮崎 亮, 府中玄樹, 永田裕二. 2007. 機能発現に基づく環境汚染物質分解酵素遺伝子の生態系からの直接的取得と解析. J. Environ. Biotechnol. 7: 75–78.
- 20) Torsvik, V. and L. Ovreas. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5: 240–245.
- 21) Vilchez-Vargas R, H. Junca, and D.H. Pieper. 2010. Metabolic networks, microbial ecology and ‘omics’ technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. Environ. Microbiol. 12: 3089–3104.