

微生物によるポリ塩化ビフェニル (PCB) の分解： 最近の遺伝生化学的研究

Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls (PCB): Genetic and Biochemical Bases

末永 光, 渡邊 崇人, 藤原 秀彦
HIKARU SUENAGA, TAKAHITO WATANABE, HIDEHIKO FUJIWARA
西 哲人, 古川 謙介*
AKITO NISHI and KENSUKE FURUKAWA

九州大学大学院・生物資源環境科学府・生物機能科学専攻・応用微生物講座
〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

* TEL: 092-642-2849 FAX: 092-642-2849

* E-mail: kfurukaw@agr.kyusyu-u.ac.jp

Department of Bioscience and Biotechnology Faculty of Agriculture, Kyushu University

キーワード: PCB, *bph* オペロン, 生分細, *bph-sal* エレメント, DNA シャuffling, ビフェニルジオキシゲナーゼ
Key words: PCB, *bph* operon, biodegradation, *bph-sal* element, DNA shuffling, biphenyl dioxygenase

はじめに

ポリ塩化ビフェニル (PCB) はビフェニルを鉄触媒のもとに塩素ガスで直接塩素化して製造される。この過程で、理論的には塩素が0から最高10まで置換した209種類の化合物が生成可能である。PCBはAroclor (アメリカ), Clophen (ヨーロッパ), カネクロール (日本) などの商品名で販売された。PCBの総生産量は世界中で120万トンと見積もられており、その化学的安定性、不燃性、絶縁性、高脂溶性、低揮発性などの優れた性質により、工業的に広く使用された。その多くは3から6塩素化物である。環境中に放出されたPCBは高脂溶性のため、食物連鎖を経て、最終的には海洋のイルカやアザラシなどの大型哺乳動物の脂肪組織に高濃度蓄積する。PCBは1960年代の後半、環境汚染物質として大きな社会問題となった。AhmedとFocht (1973) は *Achromobacter* 属細菌が低塩素 PCB を分解する事を初めて報告した。以来、多数の PCB 分解菌が単離され、生化学的、遺伝学的な解析が精力的に行われた。これまでに微生物による PCB の分解に関していくつかの総説がある (Abramowicz, 1990; Furukawa, 1982, 1994; Unterman, 1996)。本稿では最近の筆者らの研究を中心にレビューしたい。

1. 微生物による PCB の分解

微生物による PCB の分解は2つの方向から進められた。すなわち、好気性細菌による PCB の酸化分解と嫌気性菌による PCB からの脱クロル化である。

1.1. 好気性細菌による PCB の酸化分解

これまでに PCB 分解菌として *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter* などのグラム陰性細菌と、*Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* などのグラム陽性細菌が分離された。これらの細菌はビフェニルを唯一の炭素源・エネルギー源として利用することができる。PCBはビフェニル代謝酵素により PCB を共代謝 (コメタボリズム) を受ける。諸種の菌株による PCB の生分解の研究から PCB の塩基置換性と生分解性について以下のことが明らかになった (Abramowicz, 1990; Arnett et al., 2000; Bedard et al., 1987; Billingsley et al., 1997; Furukawa, 1982; Unterman, 1996)。(1) 一般的に PCB の生分解性は低塩素化物ほど分解されやすく、塩素数が増加するにつれて困難となる。(2) ビフェニル分子の片方の芳香環のみに塩素を置換した PCB は、同じ数の塩素を両方の芳香環に置換しているものより分解されやすい。(3) 片方の環のオルソ位 (2,6-) や両方の環のオルソ位 (2,2'-) に塩素が置換した PCB は極めて分解され難い。(4) PCB の分解特性は菌株により異なる。

北九州のビフェニル工場より分離された *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株は低塩化 PCB を塩素の少ない環の2,3位に分子状酸素を導入する (2,3-ジオキシゲナーゼ活性) (Furukawa and Miyazaki, 1986)。一方米国ニューヨーク州で分離された *Burkholderia cepacia* LB400 株 (Bopp, 1986) は PCB の塩素置換の違いにより2,3-ジオキシゲナーゼ活性と3,4-ジオキシゲナーゼ活

性を有し、KF707 株より幅広い分解スペクトルを示す。19 種類の PCB のうち LB400 株は17種類を分解したが、KF707 株は 8 種類しか分解しなかった (Erickson and Mondello, 1993; Gibson et al., 1993)。両菌株の PCB に対する分解特性を例示すると LB400 株は 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl (2,5,2',5'-CB) を速やかに分解するが、KF707 株は同化合物を全く分解できない。しかし、KF707 株は 4,4'-dichlorobiphenyl (4,4'-CB) を速やかに分解するが、LB400株はほとんど分解できない。Mondello ら (1997)は諸種の PCB 分解菌による PCB 分解特異性を調べ、次いでビフェニルジオキシゲナーゼ (Bph Dox) 遺伝子の部分配列から分解菌を 2 つのグループに分類した (表 1)。まず、各種 PCB に対して幅広く分解能を示すが、4,4'-CB のように両芳香環のパラ位が塩素置換された PCB (double-*para*-substituted PCBs) に対してはほとんど分解能を示さない菌株を LB400 タイプとした。また、狭い範囲の PCB しか分解できないが、double-*para*-substituted PCBs に対しては強い分解活性を示すものを KF707 タイプと分類した。グラム陽性菌である *Rhodococcus* sp. strain RHA1 は強力な PCB 分解菌の一つで PCB mixture であるカネクロール200, 300, 400中の成分の 3, 4, 5 塩素化物が示す62の PCB 成分のうち45を分解した (Seto et al., 1995)。後の研究からこの株には少なくとも 2 セットの PCB 分解遺伝子が存在することが明らかとなった (Yamada et al., 1998)。

カビや酵母、シアノバクテリアもほ乳類と同様に低塩素化 PCB を一水酸化物あるいは二水酸化物に代謝することが知られている (Furukawa, 1982)。また白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* による PCB の分解告

も報告されており、その最大分解活性は PCB 混合物である Aroclor 1242, 1254, 1260 に対し、それぞれ 60.9%, 30.5%, 17.6%であった (Beaudette et al., 1998; Dietrich et al., 1995; Yadav et al., 1995)。この分解はオルソ, メタ, パラ位に塩素置換した様々な PCB が幅広く分解されており、塩素の置換位置における分解特異性は認められなかった。この分解はリグニンパーオキシダーゼ等によるラジカル反応により生起しているものと考えられる。

1.2 嫌気性細菌による PCB の還元的脱ハロゲン化

嫌気条件下における PCB の還元的脱ハロゲン化は極めて重要である。これは塩素数が減少することにより PCB の毒性が減少するばかりでなく好気的条件下での分解が容易になるからである。微生物による PCB 脱塩素化の最初の報告はハドソン川の底泥に蓄積した PCB 各成分のピークの変化に基づくものであった (Brown et al., 1988)。Aroclor 本来のピークと比べると、底泥の PCB のピークには次の 3 つの主要な特徴が認められた。

(1) モノおよびジクロル化合物の割合が高い。(2) オルソ位置換の PCB が多い。(3) 3 塩化物と 5 塩化物の特異的な減少が確認される (Bedard and Quensen, 1995; Tiedje et al., 1993)。後に、河川や湖の底泥の微生物コンソーシアを用いた実験により、同様な脱クロル化が生起することが確認された。即ち、底泥中 700 mg/kg の高濃度 PCB の実験において、全塩素の53%が脱離したが、そのほとんどはメタ位及びパラ位で起こっており、モノ及びジクロル化合物の割合が Aroclor 1242 本来の 9 から88%へと増加していた (Quensen et al., 1988)。また

表 1. 各種ビフェニル置換菌の PCB 分解特性 (Mondello et al., 1997)。

菌株	KF707 タイプ								LB400 タイプ							PCB
	5S54B	MASL4	3B1-4	SR6B	3N61B	ES3	ES1	KF707	LB400	H850	2AV	4AB	2A42	2B2-1	McC3	
PCB																
2,2'	●	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●	2,2'
2,5,2'		●	●	○	●	●			●	●	●	●	●	●	●	2,5,2'
2,5,2',5'									●	●	●	●	●	●	●	2,5,2',5'
2,3,2',5'									●	●	●	●	●	●	●	2,3,2',5'
2,3,2',3'	●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	2,3,2',3'
2,4,5,2',3'									●	●	●	●	●	○		2,4,5,2',3'
2,4,5,2',5'									●	●	●	●	●	○	●	2,4,5,2',5'
2,3,4,2',5'									●	●	●	●	●	●	●	2,3,4,2',5'
double-para-substituted PCBs																
4,4'	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●		4,4'
2,4,4'	●	●	●		●		●	●	●	●	●	○	○	●		2,4,4'
2,4,2',4'									●	●	○		○	●		2,4,2',4'
2,4,3',4'	●	●	●		●				●	●	●	●				2,4,3',4'
PCB																
2,4'	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	2,4'
2,3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	2,3
2,5,4'	●		●		●			●	●	●	●	●	●	●	●	2,5,4'
2,5,3',4'		●	●						●	●	●	●	●	●	●	2,5,3',4'
2,4,5,2',4',5'									●	●						2,4,5,2',4',5'
分解能 (%) ● 80-100 ● 60-79 ● 40-59 ● 20-39 ○ 10-19																

分解能 (%) ● 80-100 ● 60-79 ● 40-59 ● 20-39 ○ 10-19

無酸素の底泥において、3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl (3,4,3',4'-CB) や 3,4,5,3',4'-CB など、構造がダイオキシンに類似するコプラナー PCB は、パラ位における特異的な脱クロル化が認められた (Kuo et al., 1999)。河川や湖の底泥中の PCB の嫌氣的脱ハロゲン化に関して、多数の研究が報告されている。このことは微生物による高塩化 PCB の嫌氣的脱ハロゲン化は、ステップワイズに行われること示唆している。しかし、微生物による PCB の嫌氣的脱ハロゲン化の詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。PCB を脱クロル化する微生物は河川や湖の底泥に普遍的に存在しているが、多くの努力にもかかわらず未だ分離されていない。

2. PCB の代謝システム

2.1. PCB の分解経路

PCB はビフェニル代謝酵素によって共代謝 (コメタボリズム) を受ける。多くの土壌細菌による PCB の一般的な分解経路はビフェニルジオキシゲナーゼによる 2,3 位への初発酸素添加反応により開始される。この反応により PCB の塩素数の少ないリングの 2,3-位に分子状酸素が導入され、2,3-ジヒドロジオールが生成する。この 2,3-ジヒドロジオールは、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼにより脱水素され 2,3-ジヒドロキシビフェニルが生成する。次に 2,3-ジヒドロキシビフェニルジオキシゲナーゼは水酸化された芳香環の 1 位と 2 位の炭素原子間を開環し、2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエノエイト (環開裂黄色化合物) を生成する。さらにこの環開裂黄色化合物はヒドロラーゼにより、安息香酸と 2-オキソペンタ-4-エノエイトへと加水分解される。これが細菌による PCB の代表的な代謝経路であるが、PCB の種類によっては、ジヒドロキシ化合物や環開裂黄色化合物のような代謝中間産物が蓄積する (Furukawa, 1982; Furukawa et al., 1983)。

一方、*Burkholderia cepacia* LB400 株をはじめとするいくつかの細菌は、2,5 位が塩素置換された芳香環の 3,4-位に優先的に酸素を添加し、3,4-ジヒドロジオールを最終産物として蓄積する (Haddock et al., 1995)。またビフェニル資化菌の多くは塩化安息香酸を資化できない。LB400 株については各種 PCB について酸素添加反

応の位置特異性が詳細に検討された (Seeger et al., 1999)。また *Rhodococcus globerulus* P6 株は 2,4,6-トリクロロビフェニルを、ジヒドロキシ化合物を経てトリヒドロキシ化合物へと変換する (Furukawa et al., 1979)。

2.2 PCB 分解酵素

一般的に芳香環酸素添加酵素は末端ジオキシゲナーゼ成分とレダクターゼ成分から成る (Mason and Cammack, 1992)。末端ジオキシゲナーゼは分子状酸素を活性化し基質へ添加する。これはホモ多量体のものと、大サブユニット (α) と小サブユニット (β) から成るヘテロ多量体のものが知られている。一方レダクターゼは NAD(P)H から末端ジオキシゲナーゼへの電子伝達に関与する。PCB の分解はビフェニルジオキシゲナーゼ (Bph Dox) による分子状酸素の添加により開始される (図 1)。これらの Bph Dox はクラス IIB に属し、末端ジオキシゲナーゼの大サブユニット (*bphA1* によりコード)、小サブユニット (*bphA2*)、フェレドキシン (*bphA3*)、フェレドキシンレダクターゼ (*bphA4*) の 4 つのサブユニットから成る (Taira et al., 1992)。フェレドキシンとフェレドキシンレダクターゼは NADH からの電子伝達系を構成し、末端ジオキシゲナーゼを還元する (Broadus and Haddock, 1998)。また BphA1 と BphA2 は会合し $\alpha_3\beta_3$ のヘテロ 6 量体を形成している (Haddock and Gibson, 1995; Haddock et al., 1995; Hirose et al., 1994b; Imbeault et al., 2000)。BphA1 は活性に必須な Fe(II) と電子伝達系関与する Rieske 型 [2Fe-2S] クラスターをコーディネートする Cys-X-His-X17-Cys-X2-His モチーフを含む。Fe(II) は酸素の活性化の触媒部位と考えられている (Haddock and Gibson, 1995)。

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *B. cepacia* LB400 株の Bph Dox に関しては詳細な研究が行われてきた。この 2 つの酵素は PCB に対する基質特異性が大きく異なる (表 1)。即ち、LB400 株由来の Bph Dox は KF707 株由来のそれに比べて、幅広い PCB 酸化活性を示す (Erickson and Mondello 1993; Gibson et al., 1993)。精製された LB400 の Bph Dox は 1~4 塩化物の種々の PCB に対して酸素を添加する。すなわち、PCB の塩素置換の違いにより 2,3 位あるいは 3,4 位に水酸基を導入する。またオルソ位が塩素置換した PCB(2,2'-CB) に対し

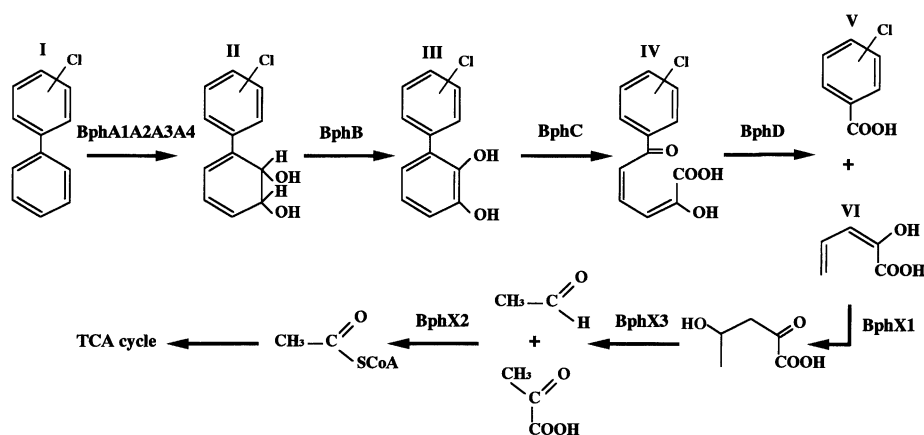


図 1. 微生物による PCB の生分解経路.

ては脱クロル化する (Haddock et al., 1995)。一方, KF707 株 Bph Dox は 2,3-ジオキシングナーゼ活性のみで 3,4-ジオキシングナーゼ活性を示さない。このように両酵素の PCB に対する分解能は大きく異なるにもかかわらず, アミノ酸配列は極めて類似している。図 2 に示すように, 両 Bph Dox の大サブユニット BphA1 はそれぞれ 459 および 460 のアミノ酸から成るが, この両酵素間では僅か 20 のアミノ酸が異なる。この違いが KF707 株と LB400 株の PCB 分解能の違いを反映する (Erickson and Mondello 1992; Taira et al., 1992)。小サブユニット (BphA2) もまた基質認識に関与しているという報告もある (Chebrou et al., 1999; Hurtubise et al., 1998)。Chebrou (1999) らは *Rhodococcus globerulus* P6 株由来 Bph Dox の α , β サブユニットを *B. cepacia* LB400 株や *Comamonas testosteroni* B-356 の α , β サブユニット相互に置換したハイブリッド Bph Dox を構築した。PCB に対する基質特異性を解析した結果, β サブユニットも PCB の分解特性に関与していることを見いだした。

ビフェニル代謝経路の 2 番目の酵素はジヒドロジオールデヒドロゲナーゼであり, ジヒドロジオールからジヒドロキシ化合物への変換を触媒する (Barriault et al., 1999; Khan et al., 1997)。3 番目の酵素は 2,3-ジヒドロキシビフェニルジオキシングナーゼであり, 芳香環の 1,2 位のメタ開裂を触媒する (Etlis et al., 1993; Furukawa et al., 1987; Heiss et al., 1995; Khan et al., 1996)。この酵素は *P. pseudoalcaligenes* KF707 株ではホモ 8 量体として会合している (Furukawa and Arimura 1987)。2,3-ジヒドロキシビフェニルに対し高い基質特異性 (K_m 値, 87 μ M) を示す一方, 3,4-ジヒドロキシビフェニル, カテコール, 3-メチルカテコール, 4-エチルカテコールに対してはほとんど活性を示さない。*Pseudomonas* sp. KKS101 株 (Senda et al., 1996; Sugiyama et al., 1995) と *B. cepacia* LB400 株 (Han et al., 1995) 由来の 2,3-ジヒドロキシビフェニルジオキシングナーゼについては X 線結晶構造が明らかにされている。KKS102 株の酵素では

1-135 番目のアミノ酸残基から成る N 末端ドメインと, 136-292 番目のアミノ酸残基から成る C 末端ドメインからモノマーが構成されている。鉄原子は C 末端ドメインに存在し, 1 つのグルタミン残基 (Gln260) と 2 つのヒスチジン残基 (His145, His201), さらに 2 つの水分子から構成される四角錐構造中に 5 つのリガンドを保有している。また Tyr249 は基質である 2,3-ジヒドロキシビフェニルの C2-水酸基と結合していることが明らかにされた。4 番目の酵素は, 環開裂黄色化合物 (2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエノエイト) を塩化安息香酸と 2-オキソペンタ-4-エノエイトへと加水分解するヒドロラーゼである。この酵素は芳香族化合物を好氣的に分解する酵素ファミリーに属しており, アレーンの酸化的環開裂によって形成されたビニル化 1,5-ジケトンに加水分解する (Sear et al., 1998, 2000)。

トランスポゾン変異を用いて, 様々な芳香族化合物に対し幅広い基質特異性を示すビフェニル代謝酵素系が構築された (Furukawa et al., 1991; Hirose et al., 1994a)。*P. pseudoalcaligenes* KF707 のビフェニル代謝酵素群はハロゲン, 水酸基, メチル基, ニトロ基で置換されたビフェニルと, ジフェニルメタン, ジベンジル, ジフェニルエーテル, ジフェニルメタン, ベンザルアセトフェノンのようなビフェニル関連化合物を分解できるが, ベンゼン, トルエンに対してはほとんど分解活性を示さない。*Pseudomonas* sp. KF712 株のトランスポゾン変異を株を用いた実験から本菌株の Bph 酵素は KF707 株酵素よりも広い基質特異性を示すことが明らかとなった。

3. PCB 代謝遺伝子

1986 年にビフェニル/PCB 代謝遺伝子 (*bph*) が *P. pseudoalcaligenes* KF707 株より世界で初めてクローニングされた (Furukawa and Miyazakaki, 1986)。その後, *B. cepacia* LB400 株の *bph* 遺伝子も 1989 年クローニングされた (Mondello, 1989)。その後, 様々なグラム陰

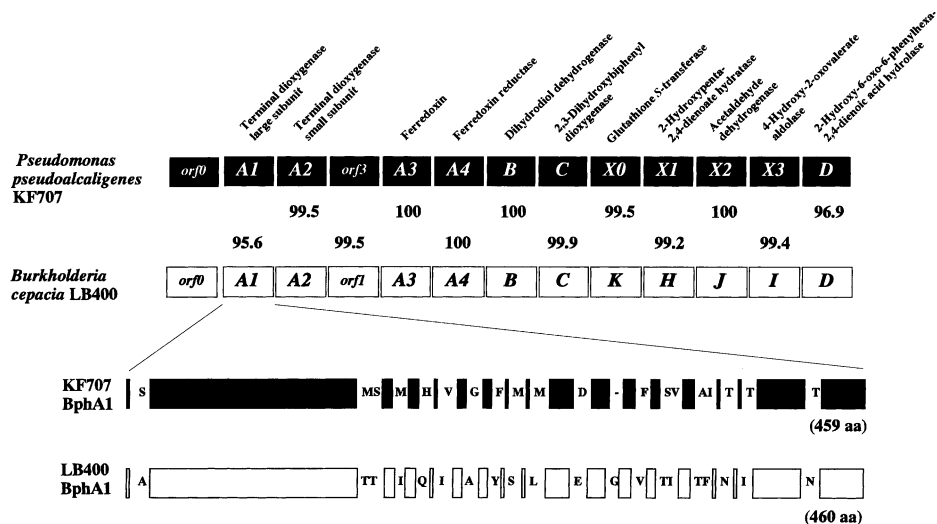


図 2. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株と *Burkholderia cepacia* LB400 株における *bph* オペロンの比較。

KF707 株と LB400 株の *bph* オペロン間の数字はアミノ酸配列の相同性を示す。特に BphA1 については両菌株間で異なる 20 のアミノ酸を示した。

性、陽性菌より *bph* 遺伝子がクローニングされ解析された (Fukuda et al., 1994; Hauschild., 1996; Hayase et al., 1990; Kikuchi et al., 1994a, b; Kim and Zylstra, 1995; Kimbara et al., 1989; Maeda et al., 1995; Peloquin and Greer, 1993; Pflugmacher et al., 1996; Sylvestre et al., 1996; Taira et al., 1988)。KF707 株由来の *bph* 遺伝子クラスターは *orf0-bphA1-bphA2-orf3-bphA3-bphA4-bphB-bphC-bphX0-bphX1-bphX2-bphX3-bphD* から成る (図 2)。KF707 株と LB400 株の PCB 分解能は大きく異なるにも拘わらず、その遺伝子の並びは一致しており、予想されるアミノ酸配列は極めて類似している。この中で、*bphA1* にコードされる末端ジオキシゲナーゼの大サブユニットのアミノ酸配列が最も違っている (95.6%) (Erickson and Mondello, 1992; Taira et al., 1992)。BphA2 (末端ジオキシゲナーゼ小サブユニット) 間では僅か 1 アミノ酸が異なるだけであり、BphA3 (フェレドキシン), BphA4 (フェレドキシンレダクターゼ) のアミノ酸配列は同一である。BphB (ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ), BphC (2,3-ジヒドロキシビフェニルジオキシゲナーゼ), BphD (環開裂ヒドロラーゼ) のアミノ酸配列もほとんど一致している。これらの事実は KF707 と LB400 間の分解能の違いは、460 アミノ酸残基から成る BphA1 中の 20 のアミノ酸の違いに起因している (Kimura et al., 1997)。

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *B. cepacia* LB400 株において、*bphC* と *bphD* の間に存在する *bphX* 領域は、4 つの遺伝子から構成される (Hofer et al., 1994)。KF707 においては、それぞれグルタチオン S-トランスフェラーゼをコードする *bphX0* (LB400 では *bphK*), 2-ヒドロキシペンタ-2,4-ジエノエイトヒドラターゼをコードする *bphX1* (LB400 では *bphH*), アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする *bphX2* (LB400 では *bphJ*), 4-ヒドロキシ-2-オキソバレロイトアルドラーゼをコードする *bphX3* (LB400 では *bphI*) である。

KF707 *bph* オペロンにおいて、*orf0* と *orf3* の 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) は機能不明であった (Taira et al., 1992)。最近、Orf0 が GntR ファミリーに属する制御タンパクであることが明らかになった (Watanabe et al., 2000)。Orf0 タンパクは後述するように自身の転写・発現を制御し、また 2-オキソペンタ-

2,4-ジエノエイト (化合物 VI, Fig. 1) からアセチル CoA への代謝を行う酵素群をコードする *bphX0X1X2X3* と、*bphD* の転写において、アクチベーターとして働いている。

bph 遺伝子群の相互関係が *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Arthrobacter* 属について研究された (Furukawa et al., 1989)。遺伝的、免疫学的解析により、それらビフェニル資化菌が 4 つに分類できた。16 株のうち、6 株の *Pseudomonas* 属と 1 株の *Alcaligenes* 属が *P. pseudoalcaligenes* KF707 株とほとんど同一の *bphABCXD* 遺伝子を保有していた (グループ I)。3 株は KF707 株と非常に類似した *bphABCD* 遺伝子を保有していたが、制限酵素地図が異なり、KF707 株には存在する *bphX* 領域が欠失していた (グループ II)。さらに 3 株の *bph* 遺伝子は KF707 株のそれと相同性は低く (グループ III)、残りの 3 株の *bph* 遺伝子については認められなかった (グループ IV)。これらの事実から特定の *bph* 遺伝子は土壌細菌間を転移するメカニズムをもつことを示している。また、あるビフェニル資化菌の *bph* 遺伝子間の相違はこの遺伝子が共通の祖先をもつが、長い進化の過程で様々な変異の蓄積や、遺伝子の再編成が生じたことを示唆している。諸種のバクテリア由来の *bph* 遺伝子群の構造を図 3 に示す。*Pseudomonas* sp. KKS102 株の *bph* 遺伝子群は KF707-*bph* 遺伝子と比較すると、遺伝子のシャフリングが認められ、*bphD* 遺伝子の下流に *bphA4* 遺伝子が存在する (Kikuchi et al., 1994a, 1994b)。*Pseudomonas putida* KF715 株の *bph* 遺伝子クラスターは 3.5 kb の *bphX* 領域が欠失している (Hayase et al., 1990; Nishi et al., 2000)。グラム陽性 *Rhodococcus* sp. RHA1 株では *bphB* と *bphC* の位置が逆転している (Yamada et al., 1998)。*Rhodococcus globerulus* P6 株の *bph* オペロンの構造は KF707 株と類似しているが、*bphC* 遺伝子が複数存在しているという点で特徴的である (Asturias and Timmis, 1993; Asturias et al., 1995; Peloquin and Greer, 1993)。同様に *Rhodococcus erythropolis* TA421 は 7 つの *bphC* 遺伝子のうち 3 つが線状プラスミド上に存在しているほか、*bph* 遺伝子群の大部分が巨大線状プラスミド上に存在している (Kosono et al., 1997)。さらに *Rhodococcus* sp. RHA1 株における *bph* 遺伝子群が明らかにされている (Fukuda

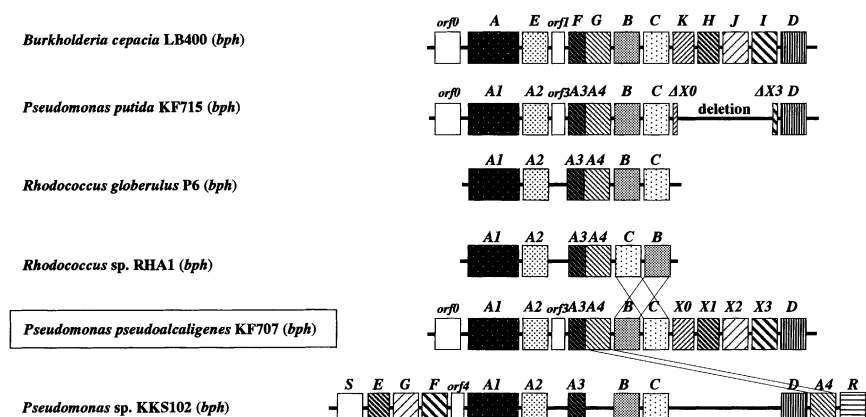


図 3. 諸種の細菌における *bph* 遺伝子群の構造。

et al., 1998; Masai et al., 1995, 1997; Yamada et al., 1998)。この株では *bph* 遺伝子クラスターの大部分が 1100 kb の巨大線状プラスミド上に存在しており、その並びは *bphA1A2A3A4-bphC-bphB* であり、*bphD* は同プラスミド上で他の *bph* 遺伝子群と離れた位置に存在する。また RHA1 株には 450 kb 線状プラスミド上に、*etb* と名付けられた *bph* 遺伝子に類似した代謝遺伝子群が存在し、エチルベンゼンにより誘導されることが明らかになった。それぞれの *etb* 遺伝子によりコードされる Etb 酵素は、同株が発現する Bph 酵素より PCB に対して高い分解能を示した。また RHA1 株では合計 7 つの *bphC* 遺伝子が発見されており、そのうち 4 つがプラスミド上に、3 つが染色体上に存在している。

4. *bph* オペロンの転写制御

諸種の細菌の *bph* 遺伝子については、遺伝生化学的研究が詳細に行われたが、転写制御に関する知見は長い間不明であった。最近、Watanabe ら (2000) により、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* オペロンの転写制御が報告された。KF707 株の *bph* 遺伝子クラスターは (*orf0*)*bphA1A2(orf3)bphA3A4BCX0X1X2X3D* から成る (図 2)。プライマー伸長による解析から *orf0*, *bphA1*, *bphX0*, *bphX1* のそれぞれの上流と、*bphD* の上流に 2 つ、少なくとも 6 つの転写開始点が認められた。*orf0* 破壊株はビフェニルで生育できず、多量の環開裂黄色化合物を蓄積した。*Orf0* タンパク質はビフェニル存在下で誘導的に発現され、またゲルシフトアッセイによりこのタンパクは *orf0* オペレーター領域に直接結合することが明らかとなった。さらにビフェニル環開裂黄色化合物 (2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエノエイト) の添加により結合が促進された。これらの結果より、GntR ファミリーに属する *Orf0* タンパク質は、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* オペロンの転写制御に関与していることが明らかとなった。*Orf0* タンパク質は自身の転写・発現を制御し、*bphX0X1X2X3* と *bphD* の 2 つの遺伝子クラスターの転写に対してはアクチベーターとして機能する。しかしなが

ら、同タンパクは *bphA1A2(orf3)bphA3A4BC* 遺伝子の転写・発現については関与しておらず、この遺伝子クラスターの発現は構成的であった。KF707 *bph* オペロンの転写制御モデルを図 4 に示す。*Pseudomonas* sp. KKS102 株の *bph* 遺伝子の転写・発現もまた、環開裂化合物により誘導されることが報告されている (Ohtsubo et al., 2000)。最近、ビフェニルと 4-クロロビフェニルの代謝に関与する *bph* 遺伝子クラスターが、*Ralstonia eutropha* A5 株の 55 kb のトランスポゾン Tn4371 上で発見された (Merlin et al., 1997; Springael et al., 1993)。Tn4371 上に存在する *bphEFGA1A2A3BCD* は $\sigma 70$ プロモーターから転写されるオペロンを形成しており、その際 *bphS* 遺伝子産物はリプレッサーとして、*bph* 遺伝子クラスターの転写を負に制御することが示唆された (Mouz et al., 1999)。一方、グラム陽性菌 *Rhodococcus* sp. M5 株の *bpdC1C2BADEF* オペロンは、*bpdS* と *bpdT* から成る二成分シグナル伝達システムにより転写・発現制御されていることが示唆された (Labbe et al., 1997)。このシステムにおいて BpdS と BpdT はそれぞれ、センサーヒスチジンキナーゼと反応調節因子として機能している。もし *bph* 遺伝子群が可動性因子上に存在していた場合、それら遺伝子群が新規な宿主に導入された際には、異なる転写制御を受ける可能性が考えられる。

5. 接合伝達因子としての *bph* 遺伝子群

bph 遺伝子群は細菌の染色体 (Bergeron et al., 1994; Furukawa and Miyazaki, 1986; Hayase et al., 1990; Kimbara et al., 1989; Mondello, 1989)、プラスミド (Hopper et al., 1989; Yamada et al., 1998)、あるいはトランスポゾン上 (Lloyd-Jones et al., 1994; Springael et al., 1993) に存在している。異なる菌株間に類似の遺伝子群が存在している事実は、染色体上の *bph* 遺伝子群が他の菌株へ転移する機能を備えているか、以前にその機能を保有していたことを意味する。*Pseudomonas* sp. CB406 株の *bph* 遺伝子群は、菌体内で広宿主域プラスミド RP4 内に挿入され、融合プラスミドを形成した後に転移される

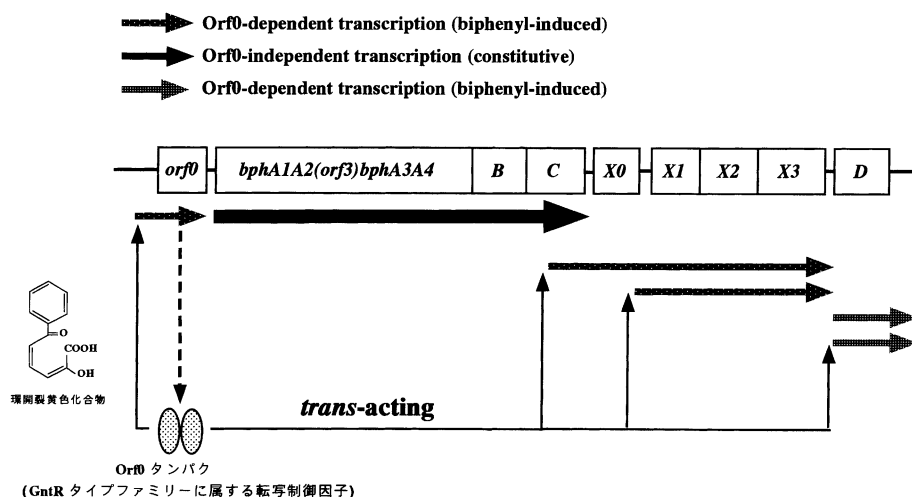


図 4. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株における *bph* オペロンの転写制御。

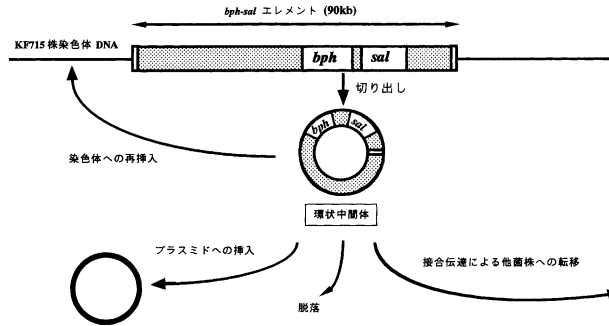


図5. *Pseudomonas putida* KF715 株における *bph-sal* エLEMENTの転移機構モデル。

(Lloyd-Jones et al., 1994)。Springael ら (1993) は *Ralstonia eutrophus* A5 株より、ビフェニルから安息香酸への代謝をコードする *bph* 遺伝子群を保有するトランスポゾン, Tn4371 を明らかにした。Tn4371 は、まず染色体から A5 株固有の *IncP1* プラスミドに転移し、その後 Tn4371 を保有する *IncP1* 融合プラスミドが、接合伝達により他菌株へと転移する。最近、Tn4371 は 55 kb の接合トランスポゾンであるという報告がなされている (Merlin et al., 1997, 1999)。興味深いことに、Tn 4371 内部にもうひとつ、小型 (13 kb) でビフェニル代謝遺伝子をコードしている、トランスポゾンが存在した。Tn-*bph* と名付けられた *bph* 遺伝子を含むこの因子は、Tn 4371 と独立して切り出され、接合伝達により転移し、*R. eutrophus* ゲノム上に挿入する能力を保有していた。

P. putida KF715 株において、ビフェニルとサリチル酸の代謝経路は染色体上にコードされている (Hayase et al., 1990; Lee et al., 1995)。*bph-sal* エLEMENTと名付けられる *bph* 遺伝子とサリチル酸代謝に関与する *sal* 遺伝子を共に含む 90 kb の DNA 領域は、接合により KF715 株から *P. putida* AC30 株へと高頻度に転移される (Nishi et al., 2000)。この *bph-sal* エLEMENTは受容菌の染色体上に転移しており、こうして得られた接合伝達株は、ビフェニルとサリチル酸を唯一の炭素源として生育できる能力を獲得した。さらに AC30 株内の *bph-sal* エLEMENTは、*P. putida* KT2440 株の染色体上に再び転移した。

Pseudomonas sp. B13 株において、3-クロロベンゼン分解遺伝子を含む *clc* 遺伝子クラスターは、105 kb の可動因子 (*clc* エLEMENT) として染色体上に存在している (Merlin et al., 1999; Ravatn et al., 1998)。この因子は自己可動化機構を有しており、様々な供与菌へ、染色体上のグリシン tRNA 構造遺伝子 (*glyV*) 上に特異的に転移する (Ravatn et al., 1998)。*bph-sal* エLEMENTの転移機構は、接合トランスポゾンである *clc* エLEMENTのものと類似している。また、バクテリオファージ P4 ファミリーに属するインテグラーゼ遺伝子が、*clc* エLEMENT同様、*bph-sal* エLEMENT内でも発見された (Furukawa et al., 未発表データ)。予想される *bph-sal* エLEMENTの転移機構を図5に示す。まず *bph-sal* エLEMENTは染色体から自身を切り出し、環状化する。この環状 *bph-sal* エLEMENTは接合により供与菌へと転移し、新しい宿主のゲノム上に挿入される。可動性 *bph* エLEMENTの発見によって、諸種のビフェニル資化菌が自然界

に広く分布すること、*bph* 遺伝子が類似する構造を保持していることを説明できる。

6. ビフェニルジオキシゲナーゼの進化分子工学

自然界において化学物質を代謝する遺伝子は、変異や組換え、さらに遺伝子伝播などにより、環境に適応しつつ進化してきた。その結果、起源を同一にする多様な構造を示す遺伝子ファミリーが生じたと考えられる (van der Meer, 1992)。上述したように、Bph Dox は末端ジオキシゲナーゼ大サブユニット (BphA1)、小サブユニット (BphA2)、フェレドキシン (BphA3)、フェレドキシンレダクターゼ (BphA4) の4つのサブユニットから成る多成分複合酵素である。これら4つのサブユニットのうち、BphA1 が基質認識、ひいては基質特異性に重要な役割を果たしていることが以下の研究から明らかとなった。(i) BphA1 を、*Pseudomonas putida* F1 株由来トルエンジオキシゲナーゼの鉄硫黄タンパク大サブユニットである TodC1 (Zylstra and Gibson, 1989) と置換したハイブリッドジオキシゲナーゼ、TodC1-BphA2A3A4 は、野生型トルエンジオキシゲナーゼと類似する基質特異性を示した (Furukawa et al., 1993; Hirose et al., 1994b)。(ii) BphA1(LB400)-BphA2A3A4(KF707) から成るハイブリッド Bph Dox は野生型 LB400 Bph Dox 同様、広範な PCB 分解能を示した (Kimura et al., 1997)。

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *B. cepacia* LB400 株間では PCB 分解能が大きく異なるが、両菌株の *bph* 遺伝子群の塩基配列は極めて類似している。Bph Dox の4つのサブユニットのアミノ酸配列の相同性はそれぞれ BphA1, 95.6%; BphA2, 99.5%; BphA3, 100%; BphA4, 100% である (Erickson and Mondello, 1992; Taira et al., 1992)。Mondello らは (Erickson and Mondello, 1993; Mondello et al., 1997) LB400 株の BphA1 中の4アミノ酸を、KF707 株の BphA1 のアミノ酸に置換することで、PCB の分解能が上昇することを明らかにした。Kimura ら (1997) は、KF707 と LB400 *bphA1* 遺伝子に共通な3つの制限酵素サイト利用して、様々なキメラ *bphA1* を構築した。ついでこれらのキメラ Bph Dox を大腸菌で発現させた。その結果、BphA1 のC末端領域に存在する僅かなアミノ酸残基が、諸種の PCB の認識と酸素添加部位、ひいては PCB の分解能に大きく関与することを明らかにした (Kimura et al., 1997; Suenaga et

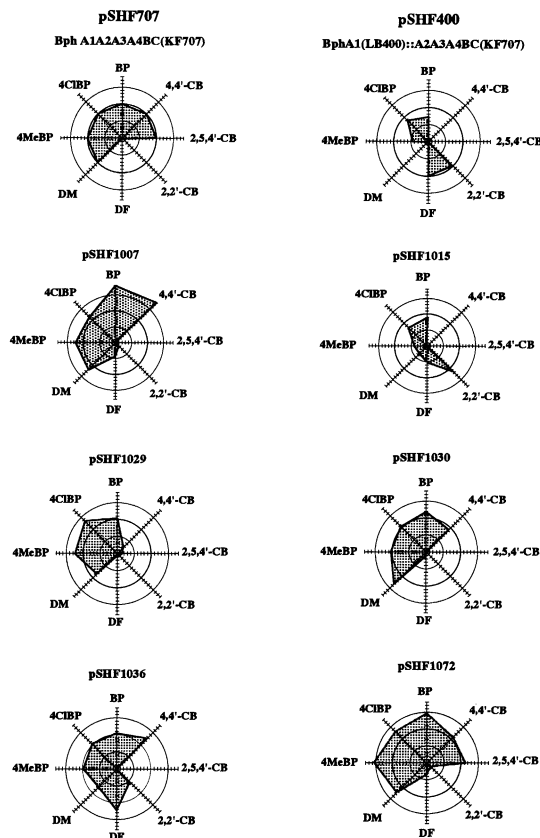


図6. 野生型および変異型ビフェニルジオキシゲナーゼを発現する大腸菌株を用いた環開裂黄色化合物の蓄積量.

al., 1999).

DNA シャフリング法は、遺伝子を断片化し PCR 法により再結合させることにより、目的の遺伝子にランダムに変異を導入する方法である (Stemmer, 1994)。筆者らは、この技術を *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *B. cepacia* LB400 株の *bphA1* に対して適用した (Kumamaru et al., 1998; Suenaga et al., 2001a)。DNA シャフリングにより構築された Bph Dox を発現する大腸菌株についてビフェニル (BP)、4-クロロビフェニル (4CIBP)、2,2'-ジクロロビフェニル (2,2'-CB)、4,4'-ジクロロビフェニル (4,4'-CB)、2,5,4'-トリクロロビフェニル (2,5,4'-

CB)、4-メチルビフェニル (4MeBP)、ジフェニルメタン (DM)、ジベンゾフラン (DF) 分解を調べた。野生型 KF707 株 Bph Dox 発現大腸菌 (*E. coli* [pSHF707]) と、野性型 LB400 株 Bph Dox 発現大腸菌 (*E. coli* [pSHF400]) は、各基質に対する環開裂黄色化合物の蓄積に大きな差異を示した。4,4'-CB および 2,5,4'-CB, DM に対し *E. coli* [pSHF707] は、環開裂黄色化合物を蓄積したが、*E. coli* [pSHF400] は同化合物をアタックしなかった。一方、2,2'-CB および DF に対しては LB400-Bph Dox は環開裂黄色化合物を蓄積したが、KF707-Bph Dox は同化合物をほとんど分解しなかった (図6)。DNA シャフリングにより構築されたキメラ Bph Dox 発現株には、興味深い特徴を示す株が認められた。*E. coli* [pSHF1007] は、ビフェニルと 4,4'-CB に対し、共に *E. coli* [pSHF707] の180%と、高い環開裂黄色化合物を蓄積しただけでなく、DF に対しても新規に黄色化合物の生成能を獲得していた。しかし、2,5,4'-CB に対しては黄色化合物の蓄積が認められず、3,4-ジヒドロジオールが生成していた。*E. coli* [pSHF1072] は試験した全ての基質について *E. coli* [pSHF707] よりも高い分解能を示した。さらに興味深いことにこの酵素は KF707 株および LB400 株の Bph Dox がアタックしないベンゼンやトルエンの単環芳香族炭化水素に対し新規に分解能を獲得していた (図7)。DNA 塩基配列から、これらの新規 BphA1 は、野生型 BphA1 の僅か数アミノ酸残基が置換していた。このようにして得られた新規 *bphA1* 遺伝子は接合より大腸菌からシュードモナス菌である KF707 株に伝達され、ついで相同組換えにより染色体 *bph* 遺伝子クラスターに導入された。BphA1 上の Thr-376 が LB400-BphA1 由来の Asn に変化した Bph Dox を発現する *P. pseudoalcaligenes* KF707-D34 株は、4,4'-ジクロロビフェニルを KF707 株同様、2,3-ジオキシゲナーゼ活性により分解し、2,5,4'-トリクロロビフェニルと 2,5,2'-,5'-テトラクロロビフェニルに対しては、LB400 株同様 3,4-ジオキシゲナーゼ活性により分解する能力を新規に獲得していた (Suenaga et al., 1999)。

ランダムプライミング法 (Shao et al., 1998) を用いて、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bphA1* 遺伝子に対しランダムに変異が導入された。この手法はランダムな配列を持つ 6 塩基のオリゴヌクレオチドを使用するも

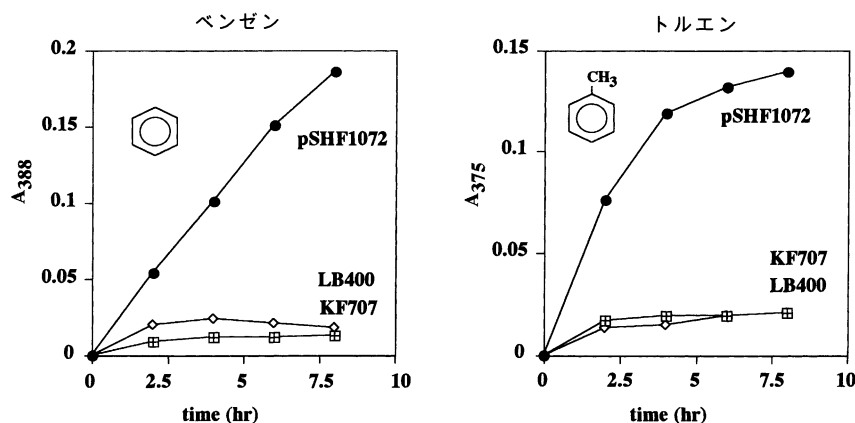


図7. pSHF1072 によるベンゼン、トルエンの分解.

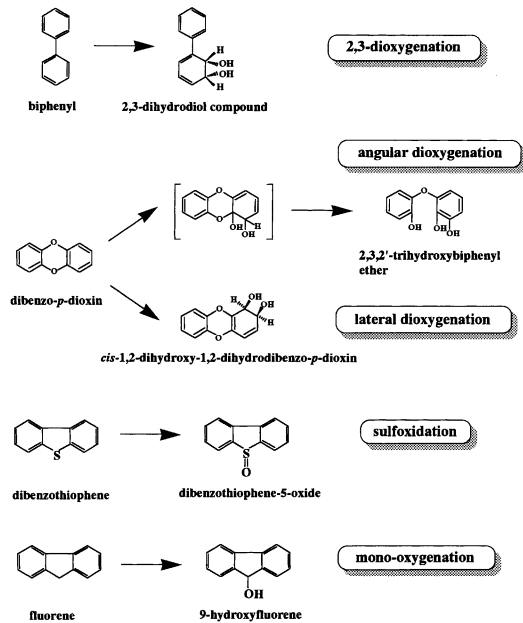


図8. ランダムプライミング法による多様な酸素添加様式の獲得.

のである。はじめに鋳型となる KF707 *bphA1* 遺伝子を熱変性により 1 本鎖にし、+鎖と-鎖それぞれにランダムヘキサマーをアニーリングさせ、*Taq* DNA ポリメラーゼによりヘキサマーの伸長反応を行う。この結果様々なサイズの DNA 断片が得られるが、そのうち 10~150 bp の断片を回収し、再度 PCR により断片の再結合を行う。このようにしてランダムに変異が導入された *bphA1* 遺伝子が得られた。このうち pRPF2202 のコードする酵素は KF707 株由来の Bph Dox に対し 150% の 4,4'-CB の分解力を示すだけでなく、本来 KF707 株が分解できないダイオキシンに対して新規な分解能を示した。図 8 にその酸素添加様式を示す。ジベンゾフラン資化菌の *Sphingomonas* sp. RW1 株由来のダイオキシンジオキシゲナーゼはダイオキシンの 4,4a- 位に対して酸素を導入し (angular dioxygenation), 不安定な中間体構造を経て 2,3,2'-トリヒドロキシビフェニルエーテルに変換する (Wittich et al., 1992)。一方、ナフタレン資化菌 *Pseudomonas putida* G7 株由来のナフタレンジオキシゲナーゼは、ダイオキシンの 1,2-位に対して酸素を添加する (lateral dioxygenation) (Kleckle et al., 1979)。ここで興味深いことに pRPF2202 がコードする酵素は angular dioxygenation と lateral dioxygenation 活性を共に示すだけでなく、ジベンゾチオフェンに対しては sulfoxidation 活性、フルオレンに対しては mono-oxygenation 活性と、多様な酸素添加能力を有していた (図 8, Suenaga et al., 2001b)。

ビフェニル資化菌は互いに類似した *bph* 遺伝子を保有しているが、その酵素の基質特異性と酸素添加様式は異なっており、それ故 *bph* 遺伝子を標的とした DNA シャプリングやその他の進化分子工学的手法を用いることにより、更に特異性の高い、且つ高活性な Bph Dox を創製することが可能であろう。これらの技術は他の代謝遺伝子についても適用可能である。こうして構築され

た強力な分解能を保有する“スーパー微生物”は、難分解性環境汚染物質の分解への利用が期待される。

7. おわりに

この30年、微生物による PCB の分解について、微生物生態学、生化学、遺伝学的な研究、さらに、強力な分解能を持つ株の分子育種に関する研究が行われた。ビフェニル/PCB 分解菌は、非生体内化学物質に対し、微生物がいかにして分解能を獲得してきたかを研究するための秀れたモデル系である。

引用文献

- 1) Abramowicz, D.A. 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 241-251.
- 2) Ahmed, M. and Focht, D.D. 1973. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* 19: 47-52.
- 3) Arnett, C.M., J.V. Parales, and J.D. Haddock. 2000. Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2928-2933.
- 4) Asturias, J.A., and K.N. Timmis. 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* 175: 4631-4640.
- 5) Asturias, J.A., L.D. Eltis, M. Prucha, and K.N. Timmis. 1994. Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6. Identification of a new family of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* 269: 7807-7815.
- 6) Asturias, J.A., E. Diaz, and K.N. Timmis. 1995. The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria. *Gene* 156: 11-18.
- 7) Barriault, D., M. Vedadi, J. Powlowski, and M. Sylvestre. 1999. *cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase and *cis*-1, 2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase catalyze dehydrogenation of the same range of substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 181-187.
- 8) Beaudette, L.A., Davies, S., Fedorak, P.M., Ward, O.P., and Pickard, M.A. 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2020-2025.
- 9) Bedard, D.L., Haberl, M.L., May, R.J., and Brennan, M.J. 1987. Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1103-1112.
- 10) Bedard, D.L., and J.F. Quensen. 1995. Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. pp. 127-216. *In* Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, ed. by Yong, L.Y. and Cerniglia, C.E., Wiley-Liss, Inc., N.Y.
- 11) Bergeron, J., D. Ahmad, D. Barriault, A. Larose, M. Sylvestre, and J. Powlowski. 1994. Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Can. J. Microbiol.* 40: 743-753.
- 12) Billingsley, K.A., S.M. Backus, C. Juneson, and O.P. Ward. 1997. Comparison of the degradation patterns of polychlorinated biphenyl congeners in Aroclors by *Pseudomonas* strain LB400 after growth on various carbon sources. *Can. J. Microbiol.* 43: 1172-1179.

- 13) Bopp, L.H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 53: 23–29.
- 14) Broadus, R.M., and J.D. Haddock. 1998. Purification and characterization of the NADH: ferredoxinBPH oxidoreductase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Arch. Microbiol.* 170: 106–112.
- 15) Brown, M.P., B. Bush, G.Y. Rhee, and L. Shane. 1988. PCB dechlorination in Hudson River sediment. *Science* 240: 1674–1676.
- 16) Chebrou, H., Y. Hurtubise, D. Barriault, and M. Sylvestre. 1999. Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it. *J. Bacteriol.* 181: 4805–4811.
- 17) Dietrich, D., W.J. Hickey, and R. Lamar. 1995. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3904–3909.
- 18) Eltis, L.D., B. Hofmann, H.J. Hecht, H. Lunsdorf, and K. N. Timmis. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268: 2727–2732.
- 19) Erickson, B.D., and F.J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174: 2903–2912.
- 20) Erickson, B.D., and F.J. Mondello. 1993. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3858–3862.
- 21) Fukuda, M., Y. Yasukochi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi, and K. Yano. 1994. Identification of the bphA and bphB genes of *Pseudomonas* sp. strains KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 850–856.
- 22) Fukuda, M., S. Shimizu, N. Okita, M. Seto, and E. Masai. 1998. Structural alteration of linear plasmids encoding the genes for polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* strain RHA1. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.* 74: 169–173.
- 23) Furukawa, K. 1982. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls. pp. 33–57. In *Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants*, ed. by Chakrabarty, A. M., CRC Press, Boca Raton.
- 24) Furukawa, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 5: 289–300.
- 25) Furukawa, K., and N. Arimura. 1987. Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned bphC gene. *J. Bacteriol.* 169: 924–927.
- 26) Furukawa, K., N. Arimura, and T. Miyazaki. 1987. Nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 169: 427–429.
- 27) Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. *J. Bacteriol.* 171: 5467–5472.
- 28) Furukawa, K., S. Hayashida, and K. Taira. 1991. Gene-specific transposon mutagenesis of the biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation-controlling bph operon in soil bacteria. *Gene* 98: 21–28.
- 29) Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki, and S. Hayashida. 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl(bph operon) and toluene (tod operon). *J. Bacteriol.* 175: 5224–5232.
- 30) Furukawa, K., and T. Miyazaki. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166: 392–398.
- 31) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1979. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 301–310.
- 32) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1983. Metabolic breakdown of Kaneclors (polychlorobiphenyls) and their products by *Acinetobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 140–145.
- 33) Gibson, D.T., D.L. Cruden, J.D. Haddock, G.J. Zylstra, and J.M. Brand. 1993. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bacteriol.* 175: 4561–4564.
- 34) Haddock, J.D., and D.T. Gibson. 1995. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 177: 5834–5839.
- 35) Haddock, J.D., J.R. Horton, and D.T. Gibson. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 177: 20–26.
- 36) Han, S., L.D. Eltis, K.N. Timmis, S.W. Muchmore, and J.T. Bolin. 1995. Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad. *Science* 270: 976–980.
- 37) Hauschild, J.E., E. Masai, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1996. Identification of an alternative 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 and cloning of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2940–2946.
- 38) Hayase, N., K. Taira, and K. Furukawa. 1990. *Pseudomonas putida* KF715 bphABCD operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 1160–1164.
- 39) Heiss, G., A. Stolz, A.E. Kuhm, C. Muller, J. Klein, J. Altenbuchner, and H.J. Knackmuss. 1995. Characterization of a 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from the naphthalenesulfonate-degrading bacterium strain BN6. *J. Bacteriol.* 177: 5865–5871.
- 40) Hirose, J., N. Kimura, A. Suyama, A. Kobayashi, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1994. Functional and structural relationship of various extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas* origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 273–277.
- 41) Hirose, J., A. Suyama, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1994. Construction of hybrid biphenyl(bph) and toluene(tod) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases. *Gene* 138: 27–33.
- 42) Hofer, B., S. Backhaus, and K.N. Timmis. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* 144: 9–16.
- 43) Hooper, S.W., T.C. Dockendorff, and G.S. Sayler. 1989. Characteristics and restriction analysis of the 4-chlorobiphenyl catabolic plasmid, pSS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1286–1288.
- 44) Hurtubise, Y., D. Barriault, and M. Sylvestre. 1998. Involvement of the terminal oxygenase β subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls. *J. Bacteriol.* 180: 5828–5835.
- 45) Imbeault, N.Y., J.B. Powlowski, C.L. Colbert, J.T. Bolin, and L.D. Eltis. 2000. Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transform-

- ing dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 275: 12430–12437.
- 46) Khan, A.A., R.F. Wang, M.S. Nawaz, W.W. Cao, and C.E. Cerniglia. 1996. Purification of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* OU83 and characterization of the gene (*bphC*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1825–1830.
 - 47) Khan, A.A., M.S. Nawaz, and C.E. Cerniglia. 1997. Rapid purification of an active recombinant His-tagged 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* OU83. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 23–29.
 - 48) Kikuchi, Y., Y. Nagata, M. Hinata, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1994. Identification of the *bphA4* gene encoding ferredoxin reductase involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176: 1689–1694.
 - 49) Kikuchi, Y., Y. Yasukochi, Y. Nagata, M. Fukuda, and M. Takagi. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the meta-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176: 4269–4276.
 - 50) Kim, E., and G.J. Zylstra. 1995. Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J. Bacteriol.* 177: 3095–3103.
 - 51) Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi, and K. Yano. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 171: 2740–2747.
 - 52) Kimura, N., A. Nishi, M. Goto, and K. Furukawa. 1997. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. *J. Bacteriol.* 179: 3936–3943.
 - 53) Klecke, G.M., D.T. Gibson. 1979. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by a *Pseudomonas* species. *Biochem. J.* 180: 639–645.
 - 54) Kosono, S., M. Maeda, F. Fuji, H. Arai, and T. Kudo. 1997. Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3282–3285.
 - 55) Kumamaru, T., H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe, and K. Furukawa. 1998. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat. Biotechnol.* 16: 663–666.
 - 56) Kuo, C.E., S.M. Liu, and C. Liu. 1999. Biodegradation of coplanar polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from estuarine sediments. *Chemosphere.* 39: 1445–1458.
 - 57) Labbe, D., J. Garnon, and P.C. Lau. 1997. Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. strain M5. *J. Bacteriol.* 179: 2772–2776.
 - 58) Lee, J., K.R. Min, and Y. Kim. 1995. Cloning of salicylate hydroxylase gene and catechol 2,3-dioxygenase gene and sequencing of an intergenic sequence between the two genes of *Pseudomonas putida* KF715. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 382–388.
 - 59) Lloyd-Jones, G., C. De Jong, R.C. Ogden, W.A. Duetz, and P.A. Williams. 1994. Recombination of the *bph* (biphenyl) genes from pWW100 and their deletion during growth on benzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 691–696.
 - 60) Maeda, M., S.Y. Chung, E. Song, and T. Kudo. 1995. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 549–555.
 - 61) Masai, E., A. Yamada, J.M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2079–2085.
 - 62) Masai, E., K. Sugiyama, N. Iwashita, S. Shimizu, J. E. Hauschild, T. Hatta, K. Kimbara, K. Yano, and M. Fukuda. 1997. The *bphDEF* meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Gene.* 187: 141–149.
 - 63) Mason, J.R. and R. Cammack. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 277–305.
 - 64) Merlin, C., D. Springael, M. Mergeay, and A. Toussaint. 1997. Organisation of the *bph* gene cluster of transposon Tn4371, encoding enzymes for the degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl compounds. *Mol. Gen. Genet.* 253: 499–506.
 - 65) Merlin, C., D. Springael, and A. Toussaint. 1999. Tn4371: A modular structure encoding a phage-like integrase, a *Pseudomonas*-like catabolic pathway, and RP4/Ti-like transfer functions. *Plasmid.* 41: 40–54.
 - 66) Mondello, F.J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* 171: 1725–1732.
 - 67) Mondello, F.J., M.P. Turcich, J.H. Lobos, and B.D. Erickson. 1997. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3096–3103.
 - 68) Mouz, S., C. Merlin, D. Springael, and A. Toussaint. 1999. A GntR-like negative regulator of the biphenyl degradation genes of the transposon Tn4371. *Mol. Gen. Genet.* 262: 790–799.
 - 69) Nishi, A., K. Tominaga, and K. Furukawa. 2000. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J. Bacteriol.* 182: 1949–1955.
 - 70) Ohtsubo, Y., Y. Nagata, K. Kimbara, M. Takagi, and A. Ohta. 2000. Expression of the *bph* genes involved in biphenyl/PCB degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 induced by the biphenyl degradation intermediate, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid. *Gene.* 256: 223–228.
 - 71) Peloquin, L., and C.W. Greer. 1993. Cloning and expression of the polychlorinated biphenyl-degradation gene cluster from *Arthrobacter* M5 and comparison to analogous genes from gram-negative bacteria. *Gene.* 125: 35–40.
 - 72) Pflugmacher, U., B. Averhoff, and G. Gottschalk. 1996. Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3967–3977.
 - 73) Quensen, J.F., J.M. Tiedje, and S.A. Boyd. 1988. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. *Science.* 242: 752–754.
 - 74) Ravatn, R., S. Studer, A.J. Zehnder, and J.R. van der Meer. 1998. Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol.* 180: 5505–5514.
 - 75) Seah, S.Y., G. Terracina, J.T. Bolin, P. Riebel, V. Snieckus, and L.D. Eltis. 1998. Purification and preliminary characterization of a serine hydrolase involved in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls. *J. Biol. Chem.* 273: 22943–22949.

- 76) Seah, S.Y., G. Labbe, S. Nerdinger, M.R. Johnson, V. Snieckus, and L.D. Eltis. 2000. Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls. *J. Biol. Chem.* 275: 15701–15708.
- 77) Seeger, M., M. Zielinski, K.N. Timmis, and B. Hofer. 1999. Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the *bph*-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3614–3621.
- 78) Senda, T., K. Sugiyama, H. Narita, T. Yamamoto, K. Kimbara, M. Fukuda, M. Sato, K. Yano, and Y. Mitsui. 1996. Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Mol. Biol.* 255: 735–752.
- 79) Seto, M., K. Kimbara, M. Shimura, T. Hatta, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3353–3358.
- 80) Shao, Z., H. Zhao, L. Giver, and F.H. Arnold. 1998. Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 26: 681–683.
- 81) Springael, D., S. Kreps, and M. Mergeay. 1993. Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5. *J. Bacteriol.* 175: 1674–1681.
- 82) Stemmer, W.P.C. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature.* 370: 389–391.
- 83) Suenaga, H., A. Nishi, T. Watanabe, A. Sakai and K. Furukawa. 1999. Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 430–435.
- 84) Suenaga, H., M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, and K. Furukawa. 2001a. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: Emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzene. *J. Bacteriol.* 183: 5441–5444.
- 85) Suenaga, H., M. Goto, and K. Furukawa. 2001b. Emergence of multifunctional oxygenase activities by random priming recombination. *J. Biol. Chem.* 276: 22500–22506.
- 86) Sugiyama, K., H. Narita, T. Yamamoto, T. Senda, K. Kimbara, N. Inokuchi, M. Iwama, M. Irie, M. Fukuda, K. Yano, and et al. 1995. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain KKS102 having polychlorinated biphenyl(PCB)-degrading activity. *Proteins.* 22: 284–286.
- 87) Sylvestre, M., M. Sirois, Y. Hurtubise, J. Bergeron, D. Ahmad, F. Shareck, D. Barriault, I. Guillemette, and J.M. Juteau. 1996. Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases. *Gene.* 174: 195–202.
- 88) Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, and K. Furukawa. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry.* 27: 3990–3996.
- 89) Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1992. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267: 4844–4853.
- 90) Tiedje, J.M., J.F. Quensen., 3.r.d., J. Chee-Sanford, J.P. Schimel, and S.A. Boyd. 1993. Microbial reductive dechlorination of PCBs. *Biodegradation.* 4: 231–240.
- 91) Unterman, R. 1996. A history of PCB biodegradation, pp. 209–253. *In* Bioremediation: Principles and Applications ed by Crawford, R. L. and Crawford D. L., Cambridge University Press, New York, N.Y.
- 92) van der Meer, J.R., W.M. de Vos, S. Harayama, and A.J.B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677–694.
- 93) Watanabe, T., R. Inoue, N. Kimura, and K. Furukawa. 2000. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 275: 31016–31023.
- 94) Wittich, R.-M., H. Wilkes, V. Sinnwell, W. Francke, P. Fortnagel. 1992. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1005–1010.
- 95) Yadav, J.S., J.F. Quensen., 3.r.d., J.M. Tiedje, and C.A. Reddy. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures(Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2560–2565.
- 96) Yamada, A., H. Kishi, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Nakamura, E. Masai, and M. Fukuda. 1998. Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2006–2012.
- 97) Zylstra, G.J. and D.T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bio. Chem.* 264: 14940–14946.