

総説論文

有機塩素系農薬による汚染の浄化のための環境バイオテクノロジー

Biotechnology for bioremediation of soil contaminated with organochlorine agricultural chemicals

永田 裕二

YUJI NAGATA

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

TEL: 022-217-5682 FAX: 022-217-5704

E-mail: aynaga@ige.tohoku.ac.jp

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

キーワード：有機塩素系農薬，環境汚染，バイオレメディエーション，微生物分解， γ -HCH(γ -BHC)

Key words: organochlorine agricultural chemical, environmental pollution, bioremediation, microbial degradation, gamma-hexachlorocyclohexane

1. はじめに

環境汚染問題に対する最も有効な解決手段が「汚染物質を排出しないこと」であることはいうまでもなく、実際、かなりの環境汚染物質について製造・使用が規制されつつある。しかし、人類が現在の生活レベルを維持するためには製造・使用を急にストップさせるわけにはいかないものもある。また、事故なども含めて、環境汚染物質の排出を事前に防ぐことができない場合もある。さらに、既に多量に環境中に放出されてしまったものや、過去に多量に製造されたものが不十分な管理状況下で放置されているケースもあり、汚染物質の製造・使用の規制のみでは環境問題が解決できないのもまた事実である。農業に限ってみても、少なくとも先進諸国で現在使用されているものの多くは、ヒトやその他の生物には害が少なく、使用目的に対してのみ効果があるように作用や機能の特異性を高めたり、また環境中への残留性を低下させるように十分に検討が加えられて製造・使用されている。ところがその一方で、経済性を最優先するために安全性が疑われている農薬を現在でも大量に使用している地域もある。農薬のように環境中に多量に散布する物質は、ごく限られた地域で使われたとしても大気や海水等の移動や循環によって地球全体に汚染が広がることも報告されており^{1,2)}、決して特定の地域の問題では済まされない。このように、残留性農薬の処理や浄化は、依然として地球的規模で考えねばならない重要な環境問題のひとつである。2001年5月には、農薬などの化学物質の汚染から人類および生態系を保全することを目的とした「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(いわゆる POPs [persistent organic pollutants] 条約) が採択され、農薬や PCB, ダイオキシンなどによる汚染の動態を十分に把握することが国際的に強く求め

られている。一方、これまでの研究の蓄積で、環境中に棲息する細菌・カビなどの微生物の中には、環境全体からみれば微弱ながらも有機合成した農薬などの非天然化合物に対しても分解活性を示し、これらを炭素源・エネルギー源として利用できるものも存在することが明らかにされてきた。このような微生物の能力の本質を明らかにすることは、必ずしも即効的な効果があるとはいえないが、環境浄化への応用に向けて将来的には重要な知見となるものと期待できる。また、応用的な側面のみならず、微生物が如何にして新規化合物に対する分解能力を獲得するのかという基礎学問的な側面からも興味深い。本稿では、著者らが研究を進めている有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, 別名 γ -BHC, lindane) の分解細菌の研究³⁾を中心に、代表的な有機塩素系農薬とその分解細菌に関する比較的最近の研究成果を紹介する。なお、環境中での有機塩素系農薬の微生物分解を考える際に、カビや嫌気性細菌などによる分解も重要であるが、本稿では一部を除き省略させて頂く。

2. 代表的有機塩素系農薬とその微生物分解

代表的な有機塩素系農薬とその土壤中における残留期間を図1に示した。いわゆる有機塩素系農薬と呼ばれているもの以外にも、尿素系除草剤などにハロゲン置換基を持つ農薬は存在し、それらの分解にも、有機塩素系農薬の微生物分解に関する知見が生かされるものと思われる。以下、図1に示した代表的な有機塩素系農薬を分解する細菌に関する研究成果を紹介するが、著者らが実際に研究を行っている γ -HCH について、特に詳しく述べる。また、aldrin については微生物分解に関する報告がない。

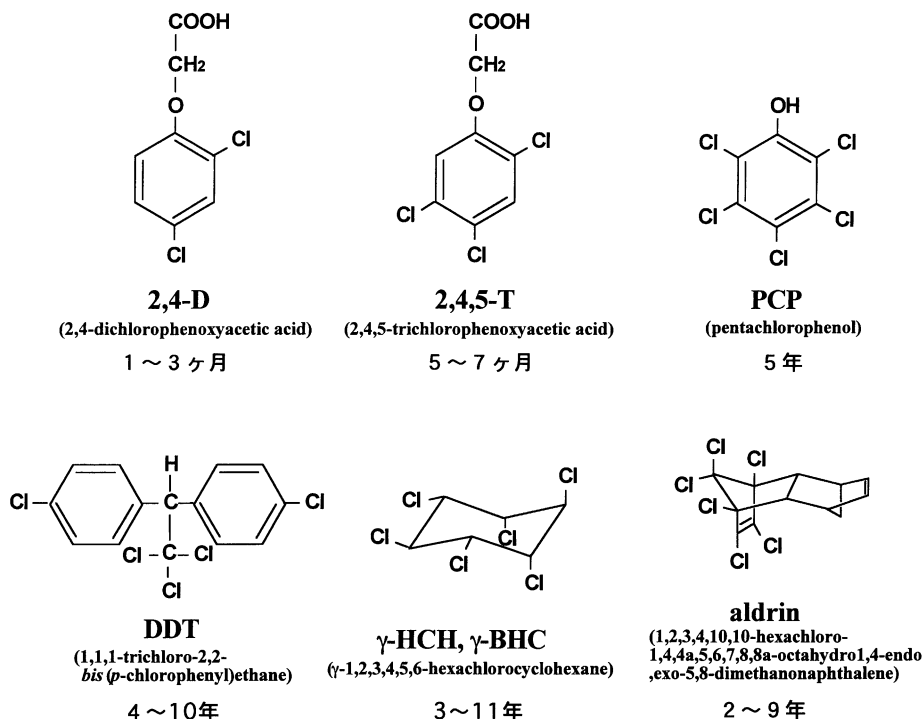


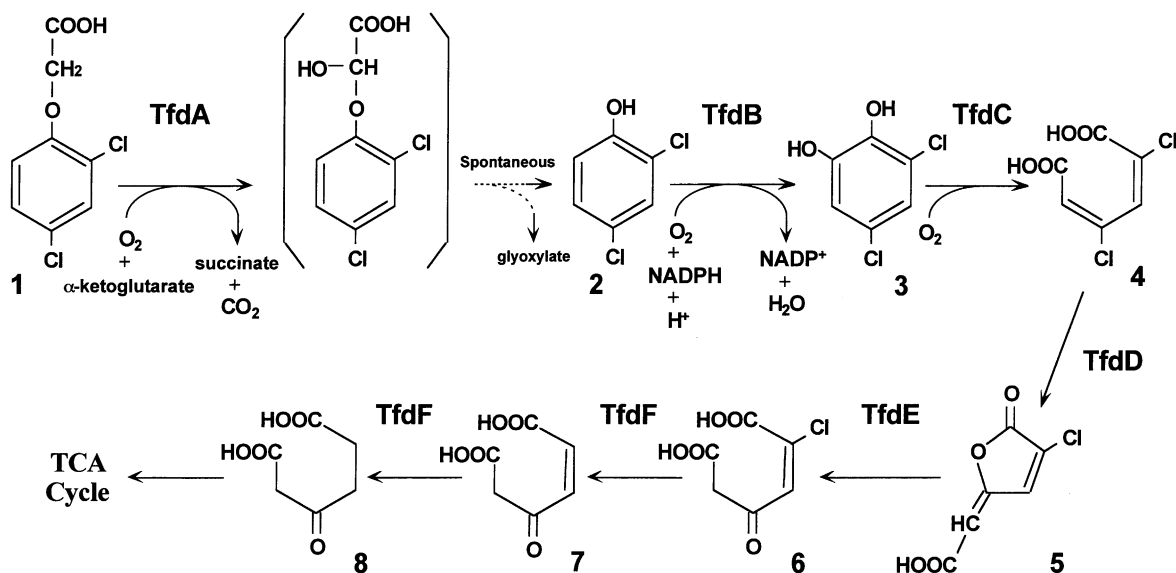
図 1. 代表的な有機塩素系農薬.

土壌中での残留期間をそれぞれの物質の下に記した.

1) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

2,4-D は特に広葉雑草に対する効果が高く、農耕地・家庭用と現在でも使用されている除草剤のひとつである。2,4-D は図 1 に示した有機塩素系農薬の中では環境中で比較的分解を受けやすいが、これは分解微生物が環境中に広く存在しているためであると考えられている。実際、2,4-D 分解菌は多数獲得されているが、特に *Ral-*

stonia eutropha JMP134 について、最も詳細な解析がなされている^{4,5)}。JMP134 による 2,4-D の推定代謝経路を図 2 に示す。2,4-D は、まず *tfdA* にコードされた α -ketoglutarate 依存性の 2,4-D dioxygenase^{6,7)} により 2,4-dichlorophenol に変換されたのちに、*tfdB* にコードされた monooxygenase で 3,5-dichlorocatechol に変換され、修飾オルト開裂経路で代謝される。カテコール中間体の環開裂には、隣り合った水酸基の外側で開裂が起

図 2. *Ralstonia eutropha* JMP134 の 2,4-D 推定分解経路.

物質名: 1, 2,4-D; 2, 2,4-dichlorophenol; 3, 3,5-dichlorocatechol; 4, 2,4-dichloro-*cis, cis*-muconate; 5, 2-chlorodienelactone; 6, 2-chloromaleylacetate; 7, maleylacetate; 8, 3-oxoadipate (β -ketoadipate).

こるメタ開裂と内側で起こるオルト開裂があるが、修飾オルト開裂経路は、塩素化中間体に対して適応したオルト開裂経路である。2,4-D から 2-chloromaleylacetic acid までの代謝は、JMP134 が保持するプラスミド pJP4 上に存在する *tfdABCD* 遺伝子産物によって行われる。pJP4 上の *tfdF* は、2-chloromaleylacetic acid から 3-oxoadipate の変換を行う maleylacetate reductase をコードしているが、JMP134 中では、少なくとも染色体由来の同酵素遺伝子産物も利用されているようである⁹⁾。3-oxoadipate は、succinate と acetyl CoA に変換され、TCA 回路に入っていく。pJP4 は自己伝達能を持ち、実際の環境中に保持菌を接種した際のその土着菌への伝達性に関する解析もなされている⁹⁾。また、他の 2,4-D 分解菌 *Burkholderia* sp. strain RASC では、*tfdA* 遺伝子は染色体上に存在している¹⁰⁾。

tfdA, *tfdB*, および *tfdCDEF* は、それぞれ独立した転写単位からなり、2つの LysR-type の制御因子（後述）、TfdR と TfdS によって発現制御を受けている^{11,12)}。*tfdR*, *tfdS* genes と最初に同定された *tfdCDEFB* genes (module I) の間には、もう一組の *tfdDCEFB* genes (module II) が存在する^{4,5)}。*tfdS* と *tfdR* は全く同一の塩基配列であり、遺伝子の重複によって生じたと考えられるが、module I と II は、単純な遺伝子の重複によって生じたものではなく、同機能を持つ起源の異なる遺伝子群が近傍に存在しているようである。また、どちらも機能的な遺伝子であり、TfdCDE 活性は module I 由来の、TfdF 活性は module II 由来のものがそれぞれ高く、効率的な 3-chlorobenzoate の分解には両 module が必要であると考えられている⁹⁾。

修飾オルト開裂経路の *tfdCDEF* 遺伝子群は、3-chlorobenzoic acid, 1,2,4-trichlorobenzene の分解にそれぞれ関与する *clcABC* および *tcbCDEF* 遺伝子群と相同性を示す。同様に、*tfdB* は他の細菌が保持する phenol hydroxylase 遺伝子と相同性を示す。これに対して、*tfdA* は 2,4-D 分解菌以外からは相同性を示す遺伝子が見つかっておらず、2,4-D 分解に特有のものであると考えられている。すなわち、2,4-D 分解経路は、独立に進化した *tfdA*, *tfdB*, および *tfdCDEF* の組み合わせによって誕生したことが示唆されている。このような考え方を元に、Top らは *tfdA* のみを欠失させた pJP4 派生型プラスミドを保持する JMP134 を 2,4-D 汚染土壌と混合し、機能的相補により *tfdA* ホモログを獲得した¹³⁾。2,4-D 資化能を回復した株は、新たに約 75-kb のプラスミドを保持しており、これに pJP4 由来の *tfdA* と 77% の相同性を示す遺伝子が存在していた。このプラスミド上には *tfdB* 以下と相同性を示す遺伝子は存在せず、本プラスミドのみを保持する菌も TfdB 以下の活性は示さなかった。以上の結果は、*tfdA* が *tfdB* 以下の遺伝子とは独立に環境中を転移するという仮説を支持するものである。

2,4-D 分解菌は、人類が 2,4-D を利用しはじめてから自然界に広く棲息するようになったと考えられている。Tiedje らのグループは、2,4-D 分解菌の多様性について解析を行い、*tfd* タイプの遺伝子を保持しない 2,4-D 分解菌も存在することを明らかにした¹⁴⁾。2,4-D に曝されていない、いわば原始環境の非汚染土壌から単離された

2,4-D 分解菌は、生育が遅く、*tfdA* 遺伝子も TfdA (α -ketoglutarate 依存性の 2,4-D dioxygenase) 活性も持たないものであった¹⁵⁾。Kitagawa らは、ハワイの 4,800 年前に溶岩流により外界から遮断された非汚染土壌から単離された *Bradyrhizobium* sp. strain HW13¹⁵⁾ より、2,4-D 分解関与遺伝子の新しいファミリーとして、*cad* 遺伝子群を単離した¹⁶⁾。2,4-D oxygenase を構成する subunit と予想される *cadABC* 遺伝子産物は、2,4,5-T 分解菌 *Burkholderia cepacia* AC1100（後述）由来の 2,4,5-T oxygenase の TftA, TftB subunit, および *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 由来の推定 ferredoxin, ThcC とそれぞれ 46, 44, 37% の identity を示した。このセットが、2,4-D や 2,4,5-T を含む数種の phenoxyacetic acid 類の変換活性を持つことが、*Sinorhizobium meliloti* Rm1021 を宿主とした系で確認されている。さらに、サザン解析により、*tfdA* タイプの遺伝子を持たない 2,4-D 分解菌の多くが *cadA* 相同遺伝子を有していることが示唆された。以上の結果は、*tfdA* タイプ以外の重要な 2,4-D 分解遺伝子の存在を示すだけでなく、2,4-D 分解菌の起源を考える上でも興味深い。すなわち、2,4-D 汚染により環境中に元々存在していた 2,4-D 分解菌が単純に増幅されたわけではなく、*tfdA* タイプの遺伝子を有する、より 2,4-D の利用効率の高い 2,4-D 分解菌が 2,4-D 汚染の歴史の中で創製され、自然界に広まった可能性が高いと推測される。

汚染土壌に実際に分解菌を散布しバイオレメディエーションを行う場合、分解菌そのものを接種する bioaugmentation の他に、環境中での分解活性が弱いステップを触媒する酵素遺伝子のみを接合伝達性プラスミドやトランスポゾンに乗せたものを保持する菌（自身は汚染物質を完全分解できない）を接種する gene augmentation と呼ばれる方法がある。この 2つの方法の実際の汚染環境に与える効果について、pJP4 を用いたパイロット実験が行われている¹⁷⁾。Newby らは、pJP4 を保持する JMP134（染色体にコードされた下流代謝遺伝子を利用し 2,4-D を資化できる）と *E. coli* DM11（下流代謝遺伝子を持たず、2,4-D を資化できない）を 2,4-D 汚染土壌に接種した際の 2,4-D の分解パターン、および pJP4 の土着菌への伝播について検討を行った。2,4-D 分解の即効性という点では JMP134 (pJP4) を接種した方が良好であったが、DM11 (pJP4) を接種した方が、より広範囲の土着菌への pJP4 の伝播が起り、再度 2,4-D を散布した際の分解効率は、DM11 (pJP4) 接種の方が良好であった。この実験結果は、実際に汚染土壌に分解菌の接種を行う際に、どのような目的のためにどのような菌を接種したら良いかということに関して示唆に富んでいる。例えば、高濃度で汚染された土壌をすばやく浄化したい場合には分解資化菌そのものの、長期間にわたり持続的に汚染の除去をする必要がある場合には、遺伝子のみ接種が有効であろう。また、有機塩素系化合物の汚染土壌のバイオレメディエーションを考えた場合、必ずしも完全分解菌の接種は必要ではなく、分解の鍵となるデハロゲナーゼ遺伝子（後述）のみを伝達性プラスミドやトランスポゾンに乗せて接種する方法も考えられる。

以上のように、2,4-D については、特定の分解菌につ

いての研究のみならず、環境中での分解菌・分解遺伝子の多様性や、遺伝子動態に関する情報の蓄積があり、バイオレメディエーションの際のモデルケースとして重要な基礎的知見となっている。

2) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

2,4,5-T は、2,4-D と類似の除草剤だが、より難分解性で、ベトナム戦争で用いられた枯れ葉剤の成分として有名である。2,4,5-T 自身にもある程度の催奇性はあるようだが、ベトナム戦争後に多発した奇形児の誕生は、主に含有していたダイオキシンによるものだと考えられている。2,4,5-T を単独で分解資化する菌の取得は困難と考えられていたが、いわゆる *plasmid breeding* と呼ばれる育種方法で、2,4,5-T を単独で分解資化する細菌 *Burkholderia cepacia* AC1100 が単離された¹⁸⁾。本方法は、土壌にさまざまな分解プラスミド保持菌を加え、各プラスミドの基質および微量の 2,4,5-T を炭素源として与え連続培養を行いながら、徐々に 2,4,5-T 濃度を上げ、最終的には 2,4,5-T を唯一の炭素源として生育可能な菌を育種するという方法である。さまざまな分解プラスミドを加えることによって、細菌の 2,4,5-T に対する適応進化速度を加速したものと考えられているが、分解プラスミドの添加による実際の効果については不明な部分が多い。AC1100 の 2,4,5-T 分解経路、および分解関与遺伝子群 (*tft* genes) についての解析もなされている^{19,20)}。図3に示すように、2,4,5-T は γ -HCH 代謝経路(後述)と同様に 2,5-dichlorohydroquinone を中間代謝産物として経るが、 γ -HCH の場合とは異なり 1, 2,4-trihydroxybenzene に変換された後に環開裂を受ける。

3) pentachlorophenol (PCP)

PCPは、防腐剤、殺菌剤、除草剤など幅広い用途で使われる。PCP を唯一の炭素源、エネルギー源として

利用可能な細菌も複数単離されている。PCP 汚染土壌から単離された *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC-39723 は、高濃度の PCP を分解資化する²¹⁾。本菌の PCP 推定分解経路を図4に示す。PCP は、まず *pcpB* にコードされた PCP 4-monooxygenase によって、2,3,5,6-tetrachlorohydroquinone に変換された後に、*pcpC* にコードされた glutathione (GSH) *S*-transferase によって2段階の還元的脱塩素反応を受け、2,6-dichlorohydroquinone (2,6-DCHQ) にまで変換される²²⁾。2,6-DCHQ以降の代謝経路は、当初 6-chloro-1,2,4-trihydroxybenzene へ変換された後に環開裂を受けると考えられていたが²³⁾、PCP 代謝に必須で、PCP によって発現誘導を受けるペリプラズム酵素の *PcpA* が、*LinE* (後述) と同様の hydroquinone タイプの物質を基質とする環開裂 dioxygenase であることが明らかになり、2,6-DCHQ が直接環開裂を受ける可能性が高いと思われる²⁴⁻²⁶⁾。

4) 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chloro-phenyl)ethane (DDT)

DDTは、農薬のみならず、公衆衛生の目的でも多用された殺虫剤であり、アメリカのレーチェル・カーソンが「沈黙の春」で大きく取り上げてたことでも有名である。DDT 耐性のハエで発現が上昇している GSH *S*-transferase (GST) である DDT dehydrochlorinase によって、DDT は、1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethylene (DDE) に変換される(図5A)²⁷⁾。一方、DDT の微生物分解についての報告は限られている。嫌気的条件下では、嫌気性微生物により、還元的脱塩素反応によって生じる 1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDD) を経て分解されと考えられている(図5B)²⁸⁾。好氣的分解では、*Ralstonia eutropha* (以前は *Alcaligenes eutrophus* とよばれていた) A5 において、初発分解反応で脱塩素は起こらずに、一方の環が水酸化された後に環開裂され、4-chlorobenzoic acid を生じる代謝経路が推定されている(図5C)²⁹⁾。

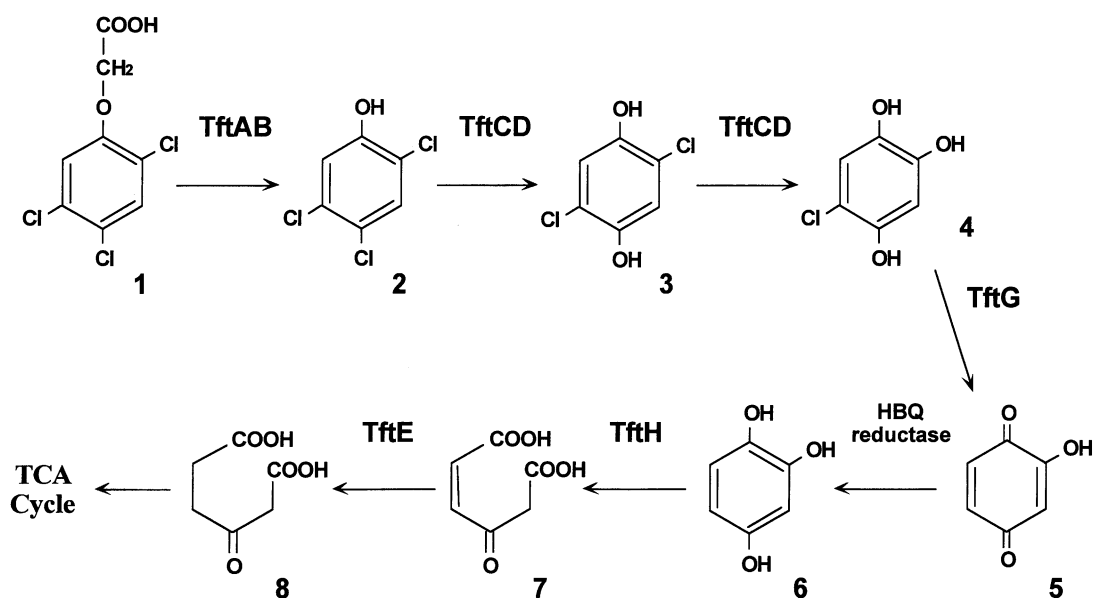


図3. *Burkholderia cepacia* AC1100 の 2,4,5-T 推定分解経路。

物質名: 1, 2,4,5-T; 2, 2,4,5-trichlorophenol; 3, 2,5-dichlorohydroquinone; 4, 5-chlorohydroxyquinol; 5, 2-hydroxy-1,4-benzoquinone (HBQ); 6, hydroxyquinol (1,2,4-trihydroxybenzene); 7, maleylacetate; 8, 3-oxoadipate (β -ketoadipate) (文献20より)。

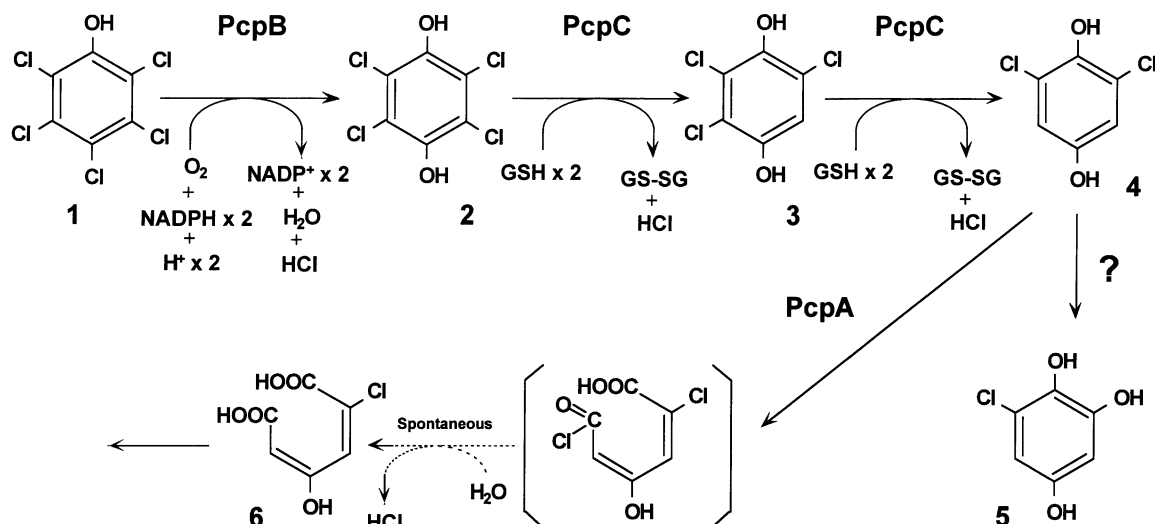


図 4. *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC39723 の PCP 推定分解経路。

物質名: 1, PCP; 2, tetrachlorohydroquinone; 3, 2,3,6-trichlorohydroquinone; 4, 2,6-dichlorohydroquinone; 5, 6-chloro-1,2,4-trihydroxybenzene; 6, 2-chloromaleylacetate.

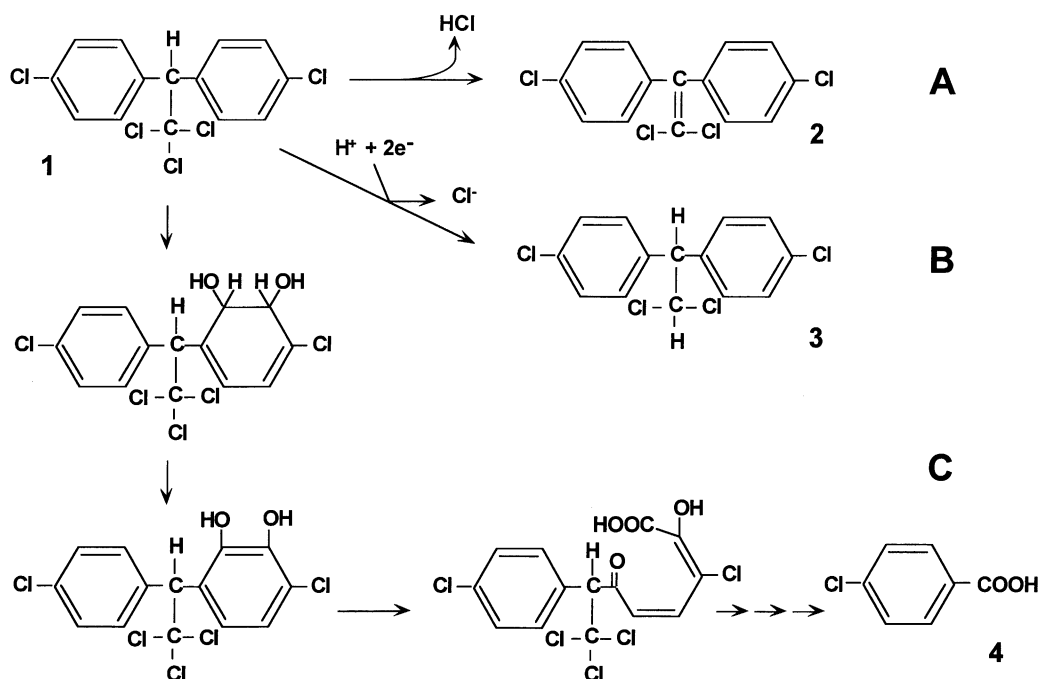


図 5. DDTの推定分解経路。

A. ハエなどの昆虫由来の GST による脱塩化水素反応。B. 嫌気的微生物によって行われていると考えられる還元的脱塩素反応の最初のステップ。C. *Ralstonia eutropha* A5 の DDT 推定分解経路。物質名: 1, DDT; 2, DDE; 3, DDD; 4, 4-chlorobenzoic acid.

5) γ -hexachlorocyclohexane(γ -HCH, 別名 γ -BHC, lindane)

γ -HCH は、第二次世界大戦前にアメリカで開発された、DDT と並ぶ代表的な人工の有機塩素系殺虫剤である。 γ -HCH は、殺虫スペクトルの広さ、効力の高さに加え、安価であることから一般家庭から農業まで広い範囲で使用されてきたが、その後、人体への蓄積性と有害性（変異原性とガン原性の可能性）や環境中での残留性が指摘され、1971年以降、日本では全面的に使用が禁止

されている。他の先進諸国でも現在では使用が禁止されているものの、イギリス・オランダなど過去に大量に使用した地域では、依然残留汚染に悩まされている。また、インド・中国・旧ソ連などの地域では主に経済的理由から現在でもその使用が続けられている。さらに、低緯度の熱帯地域で使用された HCH のほとんどは上昇気流に乗って大気中に拡散し、高緯度地域に降り注いでいることも明らかになった^{1,2)}。このように、現在でも HCH による環境汚染は地球的規模で拡がっており、早急に解決しなければならない問題を提起している。

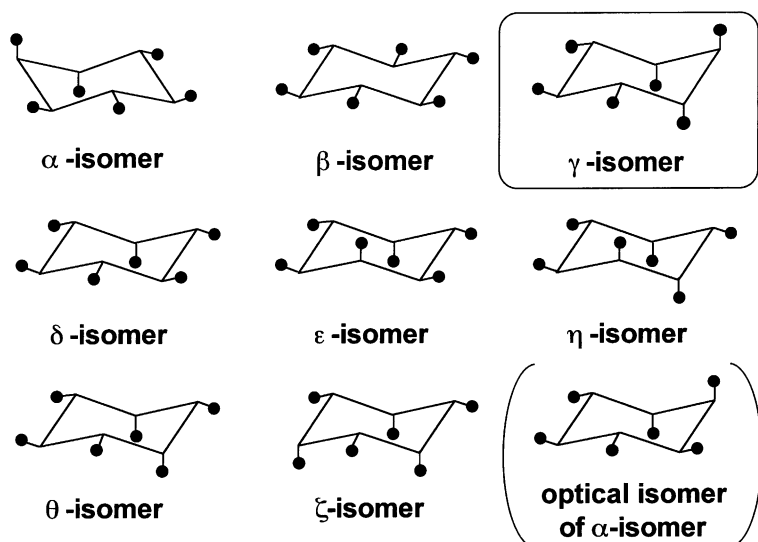


図 6. HCH の立体異性体.
●: 塩素原子.

HCH には理論上 8 つの立体異性体 (図 6) が存在するが、工業原体に含まれる割合が多いのは α -, β -, γ -, δ -体である。このうち、実際に殺虫効果を持つのは γ -体だけで、 γ -体を 99% 以上の純度に精製した製品は特にリンデン (lindane) と呼ばれている。経済的に苦しい発展途上地域では γ -体を精製して利用するケースは希であり、化学合成した混合物をそのまま使用することが多い。このため、環境中にも γ -体以外に α -, β -, δ -体が放出され、環境汚染を引き起こしている。特に β -体は塩素原子が全てエクアトリアルな位置に存在するために化学的に最も安定であり、環境中での残留性も高い。すなわち、実際の環境浄化を考える場合にはこれらの異性体についても考慮する必要がある。環境中に放出された γ -HCH は、嫌気的条件下では、主に *Clostridium* 属細菌などの嫌気微生物の作用により比較的速やかに分解されるが、好気的な畑土壌では残留性が高いことが知られている。 γ -HCH の微生物分解については、他の総説も参考にされたい³⁰⁾。こうした背景のもと、旧東京大学農学部農芸化学科の土壌学研究室において、農学部構内の試験圃場を利用し、毎年 1 回 γ -HCH を散布して、土壌での変動を追跡する実験が 1974 年より開始された。最初の 2 年間は γ -HCH の分解は観察されなかったが、3 年目より急激な分解が観察され、12 年目の土壌より集積培養、単コロニー分離によって γ -HCH を好気的条件下で唯一の炭素源として生育する *Sphingomonas paucimobilis* SS86 が分離された³¹⁾。著者らは、本菌のナリジキニン酸耐性株 UT26³²⁾ の γ -HCH 分解機構についての解析を行った³⁾。UT26 による γ -HCH の推定分解代謝経路を図 7 に示す。本経路では、3 種類の脱塩素反応 (脱塩化水素反応、加水分解的脱塩素反応、還元的脱塩素反応) を伴ってシクロヘキサン環から芳香環が形成され、hydroquinone 型の物質が直接の環開裂基質となって分解されていく。環開裂に伴って脱塩素が起こる酸素添加反応も広義の脱塩素反応であるとみなすことができ、これを加えると実に 4 種類のタイプの異なる脱塩素反応が γ -HCH の分解代謝に関与していることになる。有機塩素化合物

の微生物分解の鍵反応となるのが脱塩素反応であること³³⁻³⁵⁾ を考えると、UT26 は有機塩素化合物分解に関して極めて多彩な能力を有しているといえよう。一方、本分解過程において、UT26 中でそれ以上分解されない dead-end 産物 (図中 4, 6 の物質) が生じることから、本分解経路は物質の効率の利用という点では不完全な代謝経路であることも示唆される。実際、 γ -HCH を唯一の炭素源とした場合の UT26 の生育は非常に悪く、代謝経路だけを取り上げて、UT26 は γ -HCH 分解に対して進化の途上であると考えられることもできる。これまでの研究で、 γ -HCH の分解代謝に直接関与する 5 つの酵素遺伝子 (*linA*, *linB*, *linC*, *linD*, *linE*)³⁶⁻⁴⁰⁾ と、1 つの制御遺伝子 (*linR*)⁴¹⁾ を獲得し (表 1)、遺伝子および遺伝子産物の解析を行った。

脱塩化水素酵素は、基質分子から HCl を取り除き、炭素二重結合を導入する反応を触媒する酵素であるが、報告例が *LinA* を含めて 3 例しかなく、極めて特殊性の高い酵素である。イエバエ (*Musca domestica*) などの昆虫由来の DDT dehydrochlorinase と、*P. putida* 由来の 3-chloro-D-alanine dehydrochlorinase は、それぞれ、GSH, pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を反応に必要とするが、*LinA* はこのような補因子を必要とせず、タイプの異なる酵素であると考えられる⁴²⁾。また、少なくとも検討した範囲では *LinA* は γ -HCH およびその関連化合物に対してのみ活性を示し、基質特異性がかなり狭いことが示唆された⁴²⁾。同時に、 β -体に対しては活性を示さず、基質とする物質が全て塩素と水素の trans and diaxial (TD) pair を有することから、*LinA* がこの立体構造を認識していることが予想された⁴²⁾。その後、代謝産物の立体化学的な解析により、確かに *LinA* は基質の TD pair に対して脱塩化水素反応を行っていることを確認した⁴³⁾。*LinB* は α/β -hydrolase fold enzymes と呼ばれる一群の加水分解酵素と有意な相同性を示し、中でも加水分解的ハロアルカン脱ハロゲン酵素と比較的高い相同性を示す。実際、精製した *LinB* は様々なハロアルカン類を基質とし、*LinB* が基質特異性の広いハロアルカン

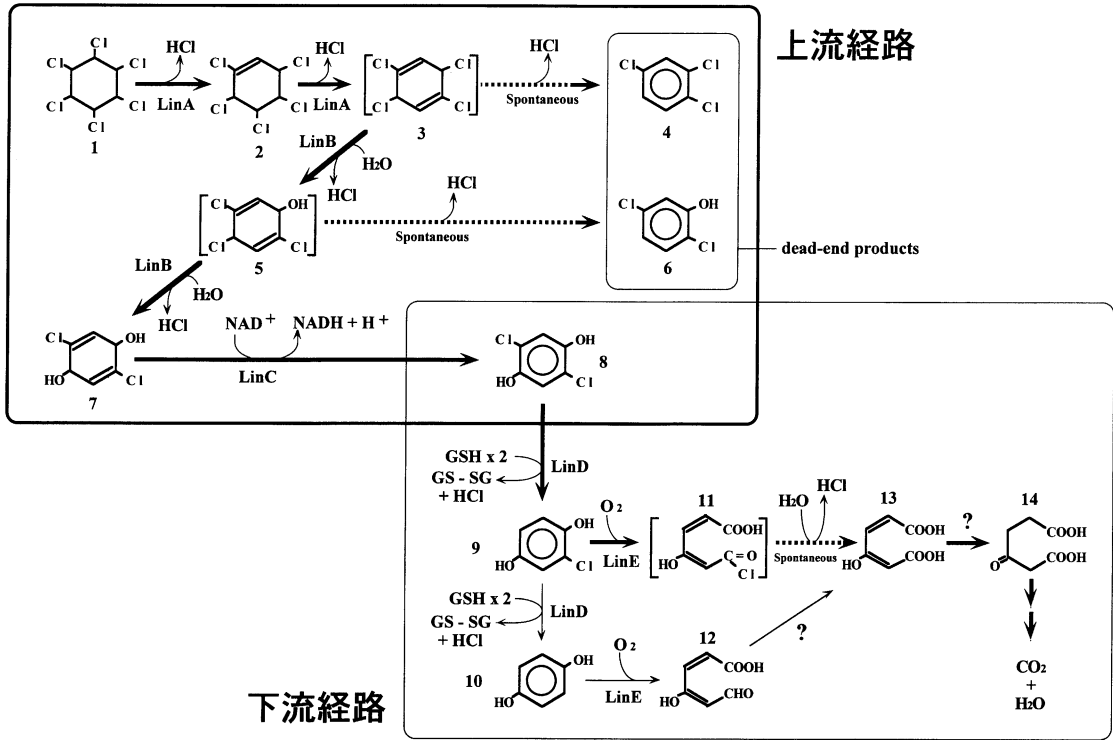


図 7. *Sphigomonas paucimobilis* UT26 の γ -HCH 推定分解経路。
カッコ内の物質は不安定であり、直接の検出はできていない。物質名: 1, γ -HCH; 2, γ -pentachlorocyclohexene; 3, 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene; 4, 1,2,4-trichlorobenzene; 5, 2,4,5-trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol; 6, 2,5-dichlorophenol; 7, 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol; 8, 2,5-dichlorohydroquinone; 9, chlorohydroquinone; 10, hydroquinone; 11, acylchloride; 12, γ -hydroxymuconic semialdehyde; 13, maleylacetate; 14, β -ketoadipate.

表 1. *S. paucimobilis* UT26 由来の γ -HCH 分解関与遺伝子群。

	Nucleotide (bp)	Amino Acid Residue	Molecular Mass (kD)	G+C Content (%)	Function	Expression in UT26	Ref.
<i>linA</i>	468	156	17.3	53.9	Dehydrochlorinase	Constitutive	36
<i>linB</i>	888	296	33.1	62.5	Halohydrolase	Constitutive	37
<i>linC</i>	750	250	25.6	64.3	Dehydrogenase	Constitutive	38
<i>linD</i>	1,038	346	38.4	61.0	Reductive dechlorinase	Inducible	39
<i>linE</i>	963	321	36.0	60.1	Ring-cleavage oxygenase	Inducible	40
<i>linR</i>	909	303	33.6	61.3	LysR-type transcriptional regulator for <i>linD</i> and <i>linE</i>	?	41

脱ハロゲン酵素の一員であることが明らかになった⁴⁴⁾。LinB が比較的長鎖の基質を好むのに対して、*Xanthobacter autotrophicus* GJ10 由来の Dh1A は、短鎖の基質を好む。また、*Rhodococcus* 由来の DhaA は、LinB 同様、長鎖の基質を好むが、特異性が微妙に異なる⁴⁵⁾。これらのハロアルカン脱ハロゲン酵素は、酵素の構造・機能相関の研究に適した材料であると考えられ、著者らのグループはLinBについての蛋白質工学的研究を進めている（後述）。LinC はアミノ酸配列上、short-chain alcohol dehydrogenase と呼ばれる脱水素酵素の一

員であり、反応に重要なアミノ酸残基も保存されていることから、他の構成員同様 NAD⁺ 依存的な脱水反応を触媒すると考えられる³⁸⁾。このタイプの脱水酵素は互いに30%前後の相同性を示し、細菌から高等真核生物まで広く生物間で保存されている。本酵素活性は、生物が元々ポテンシャルとして有しており、様々な代謝系において基質特異性を変えることによって、つなぎの役割を果たしているようである。一方、*linC* 遺伝子以外に、大腸菌中で発現させると LinC 活性を示す遺伝子 (*linX*) が、*linA* の上流に存在する³⁸⁾。更に、*linX* と *linA* の

間に存在する領域も ORF としては不完全であるが、DNA レベルで *linX* と高い相同性 (69%) を示す。UT26 中では、 γ -HCH の代謝の際に *linX* は発現していないが、LinC 活性のポテンシャルを持つ遺伝子が、*linA* の近傍に存在することは興味深い。 γ -HCH 代謝に関する適応が進めば、やがてこのような遺伝子が *linA* と共にオペロンとして共通の発現制御を受けて、 γ -HCH 代謝に関与するようになる可能性もあるのではないかと考えられる。LinD は還元的脱塩素酵素であり、細菌由来のクラス theta の GST と低い相同性を示す³⁹⁾。GST は 4 つのクラス (alpha, beta, pi, theta) に分類されており、細菌由来の既知の GST は全てクラス theta に分類される⁴⁰⁾。実際、LinD を高発現させた大腸菌の粗酵素抽出液に GSH を添加すると活性が上昇することから、LinD も GST の一員であると考えられる。最近、LinD は、PCP 分解に関与する PcpC などと共に、生物界に広く存在するクロソンの分解系に関与する maleylacetate isomerase から進化した酵素である可能性が指摘された⁴⁷⁾。LinE は、既知のメタ開裂酵素群と極めて低いレベルの相同性を示す⁴⁰⁾。ただし、それらが芳香環のオルト位の水酸基を認識し、反応を行うのに対して、LinE はパラ位の水酸基を認識し環開裂を行う。LinE を高発現させた大腸菌の粗酵素抽出液を用いて LinE の基質特異性を検討したところ、代表的なメタ開裂酵素である XylE が catechol 系の基質に対してのみ活性を示すのに対して、LinE は hydroquinone 系の基質に対してのみ活性を示した。このことは、LinE が新規の環開裂酵素であることを示している。hydroquinone 型の化合物を直接の基質とする環開裂酵素の遺伝子レベルでの報告例は LinE が最初であるが、LinE と相同性を示す PCP 分解に関与する PcpA も LinE と同様の環開裂活性を持つことが明らかになっており²⁴⁻²⁶⁾、hydroquinone 型物質を直接の環開裂基質とする微生物についての報告例^{48,49)}と併せて、自然界では hydroquinone 経路も、研究例の多い catechol 経路と共に芳香族化合物の主要代謝経路のひとつであると思われる。*linE* 遺伝子の発現が hydroquinone 型の化合物によって特異的に誘導されること⁴¹⁾や、*linRDE* 遺伝子群が約 185 kb のプラスミド上に存在し、接合伝達による環境中での遺伝子伝播が示唆されていること (未発表データ) など、この経路が自然界で主要経路であることを支持する結果であると考えている。また、LinE と PcpA は、*P. putida* GJ31 由来の CbzE と共に、水酸基と塩素基の間での環開裂反応を効率よく行う報告例の少ない酵素でもある。3-chlorocatechol を catechol 2,3-dioxygenase と反応させた場合、通常の酵素では、反応性の高い反応産物の acylchloride (図 7 の物質 11) が酵素を不活化させてしまい、それ以上反応が進まないが、CbzE は、これに対する耐性を有しており、反応を効率的に進めることができる⁵⁰⁾。耐性機構の詳細は不明であるが、これらの酵素が他の酵素と異なり、acylchloride の加水分解を積極的に行う機構を活性中心に有している可能性も指摘されている⁵¹⁾。LinR は、LysR-type の転写活性化因子 (LTTR)⁵²⁾と有意な相同性を示す。LTTR は、catechol, naphthalene, chlorocatechol などの芳香族化合物の代謝にも関与しており、細菌の主要制御因子ファミリーのひとつで

ある。LTTR の認識配列のコンセンサスである TN₁₁A 回文配列は、*linE* 遺伝子上流にも存在する。レポーターに *lacZ* 遺伝子を用いた大腸菌の実験系により、LinR は、2,5-DCHQ, CHQ を認識し、*linE* 遺伝子上流の TN₁₁A 回文配列を含む領域のプロモーター活性を上昇させることが明らかになった⁴¹⁾。

γ -HCH から 2,5-DCHQ までの代謝に関わる遺伝子 (*linA*, *linB*, *linC*) は UT26 の約 3.5-Mb の染色体上に互いに離れて存在し、構成的に発現しているのに対して、2,5-DCHQ の分解に関わる遺伝子 (*linD*, *linE*) は、プラスミド上に存在し、オペロンとして共通の転写制御因子 (LinR) による発現制御を受けていることから、2,5-DCHQ までを上流経路、それ以下を下流経路と命名した。 γ -HCH の初発分解反応に関与する脱塩化水素酵素遺伝子 (*linA*) は、既知の遺伝子と有意な相同性を示さず、起源が不明であることに加えて、G+C 含量も他の *lin* 遺伝子群、及び *S. paucimobilis* のタイプストレイン (65%) と比べて顕著に低く (表 1)、極めて特殊性の高いものであると考えられる。これに対して、下流代謝系の遺伝子群は、発現制御系を有するまでに確立された遺伝子であることが示された。以上の代謝に直接関与する遺伝子群の情報から、UT26 の γ -HCH 分解能獲得機構として、次の仮説を考えている (図 8)。まず、最初の γ -HCH という極めて人工的で特殊性が高いと思われる物質に対しては、外来の遺伝子を利用し変換を行う。次に、最初の変換により比較的特殊性が低くなった物質に対しては、この菌が元々有していた遺伝子をそのまま、あるいは、ある程度改変することによって対応する。最終的には、上記の過程により、代謝系が自然界で十分に確立された物質にまで変換し、その代謝系の遺伝子群をそのまま利用して代謝を行う。以上のような代謝系は、いわば進化の途上であると考えられることもでき、 γ -HCH の分解代謝という点において適応が進めば、より確立された遺伝子構成に変化していく可能性もある。ただし、*Sphingomonas* 属細菌は、ある種の芳香族化合物を分解する際に、他の芳香族化合物を分解するのに必要な複数のオペロンを構成する遺伝子産物を巧みに組み合わせて利用するケースもあることから⁵³⁻⁵⁵⁾、元々、遺伝子構成や発現制御に関して確立の程度が低い代わりに柔軟性を持っているとも考えられる。そのことが酸化能力に長けた *Pseudomonas* 属細菌などに比べても、*Sphingomonas* 属細菌が、より多様な化合物に対する代謝能を有している理由のひとつかもしれない。

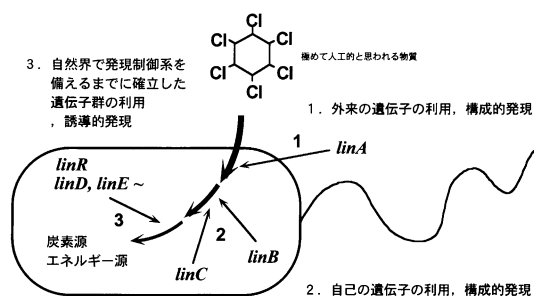


図 8. *Sphingomonas paucimobilis* UT26 の γ -HCH 分解能獲得機構の仮説。

3. デハロゲナーゼの蛋白質工学的研究

有機塩素系化合物の分解において鍵酵素となるデハロゲナーゼ³³⁻³⁵⁾の反応機構の詳細を明らかにし、基質特異性や反応効率などの反応特性に優れた酵素の創製を行うことは、バイオレメディエーションへの応用に直結するものと考えられる。すなわち、 β -HCH, 2-chloropropane, 1,2-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane のような、分解に有効な酵素が見つからない環境汚染物質に対する分解酵素の理論的創製も期待できる。このような観点から、著者らのグループでは、 γ -HCH 分解に関与する2種類のデハロゲナーゼ LinA と LinB についての蛋白質工学的解析を進めている。

1) γ -HCH dehydrochlorinase (LinA)

前述のように新規の脱塩化水素酵素 LinA の反応機構については、相同性からの類推が不可能であり、全く不明であったが、コンピューター解析により、LinA が一次配列上は保存されていないが立体構造が類似しているファミリー⁵⁶⁾の一員であることが明らかになった。このファミリーには既に実験的に立体構造が解かれている scytalone dehydratase, steroid Δ -isomerase, nuclear transport factor 2, naphthalene 1,2-dioxygenase の β -subunit が含まれる。これらの蛋白質は、酵素としての機能の共通性はなく、それぞれ異なる機能を持つ。ホモロジーモデリングにより予測した LinA の立体構造モデルに基づき、部位指定変異導入実験を行ったところ、モデルの正当性が確認されると共に、LinA の活性には Asp25 と His73 のペアによるプロトンの引き抜きが必須であることが明らかになった⁵⁷⁾。この Asp-His のペアによるプロトンの引き抜きは scytalone dehydratase の活性にも必須であり、LinA が脱水酵素 (H-OH を引き抜く) から脱塩化水素酵素 (H-Cl を引き抜く) に進化したものである可能性が強く示唆された。この例のように、一次配列上の有意な相同性が維持されておらず、いわゆる系統樹を描くことはできないタンパク質同士でも、比較的複雑な立体構造上の相同性が維持されている場合には、何らかの進化的関係が存在するものとみなすことができる。現在、多くのタンパク質の立体構造が実験的に決定されていることに加えて、いわゆるコンピューターモデリングの技術も盛んに用いられるようになってきており、今後、立体構造を考慮した進化的考察は、益々重要性を増してくるものと考えられる。一方、著者らが単離した *linA* の情報を元に、*linA* の相同配列がフランスとインドで単離されている。フランスで PCR により新規の γ -HCH 分解菌より単離された *linA* 相同配列は *linA* と全く同一のものであった⁵⁸⁾。他の難分解性物質分解遺伝子にもみられる現象であるが、こうした比較的特殊性が高いと思われる遺伝子が、かなりの地理的距離を隔てて全く同じ遺伝子として存在していることは、その起源を考える上でも興味深い。一方、インドで *linA* をプローブとして単離されたものは、全く同一ではなく、アミノ酸レベルで90.4%の相同性を示した (R Lal 私信)。この遺伝子は β -体をも分解できる菌株から単離されたものであり、その蛋白質産物が我々の LinA とは異なる反応機構で β -体をも変換できる可能性

が示唆されている。

2) ハロアルカンデハロゲナーゼ (LinB)

LinB をはじめ、 α/β -hydrolase ファミリーに属する酵素⁵⁹⁾は、nucleophile-histidine-acid からなる catalytic triad が活性に必要であるため、まず、ホモロジーモデリングと部位指定変異導入実験により、D108, H272, E132 が LinB の catalytic triad であることを明らかにした⁶⁰⁾。更に、結晶化および立体構造の解明に成功し、LinB が立体構造が決定している既知のハロアルカンデハロゲナーゼ、DhlA, DhaA と比較して、特徴的な活性中心ポケット、及び酵素の表層からそこへ至る通路の構造をしていることを明らかにした⁶¹⁾。これら3種類のハロアルカン脱ハロゲン酵素 DhlA, DhaA, LinB の基質特異性の違いは、立体構造からも説明が付く⁶²⁾。LinB の L177 にあたるアミノ酸残基は、立体構造解析の結果、酵素の表面から活性中心へ至るトンネル部分の入り口付近の内側に突き出しており、基質特異性に重要であることが示唆された⁶¹⁾。さらに、各種ハロアルカンデハロゲナーゼのアライメント解析を行うと、活性中心およびそこへ至るトンネルを形成するアミノ酸残基のうち、L177 にあたるものが最も多様である⁶²⁾。加えて、LinB の活性中心を *Mycobacterium* 由来の仮想デハロゲナーゼのものに変える実験 (後述) の過程においても、このアミノ酸残基の重要性が示された。以上の情報を総合し、LinB の L177 を A, C, G, F, K, T, W の7つのアミノ酸に置換する実験を行った結果、全ての変位酵素で反応特性の変化が見られ、その影響は、基質によって異なっていた (未発表データ)。このように、L177 が基質特異性に与える重要性が実験的にも確認された。以上のような研究の蓄積により、今後の理論に基づいた基質特異性の改変・新規能力の付与にも期待が持たれる。

4. 新しい遺伝子資源からの環境汚染物質分解酵素遺伝子の取得

従来の有機塩素系農薬を含む難分解性環境汚染物質の微生物分解の研究の多くは、まず、集積培養により、目的の物質を唯一の炭素源・エネルギー源として利用可能な細菌を獲得する操作から開始された。この方法は、多くの物質に対して有効であったが、集積培養や培地上でのコロニー形成といったバイアスをかけてしまい、実験室内の条件で容易に培養可能で、かつ、資化に必要な全ての遺伝子セットを保持した菌のみが選択されてきたと考えることもできる。すなわち、実際の環境中では、このようなプロセスでは獲得できない微生物、いわゆる VBNC (viable but non-culturable) 菌も分解に関与している可能性も考えられる。また、例えば尿素系の除草剤 linuron の連用圃場は、高い linuron および類縁物質分解活性を示すが、この土壌から linuron を単独で資化できる菌の単離には至っておらず、denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 解析などにより、linuron 完全分解には複数の菌が関与していることが明らかになった⁶³⁾。この例のように、実際の環境中では汚染物質の分解を単独の菌ではなく、複数の菌で行っているケースも多く、遺伝子獲得のアプローチを変えることにより、従

来のものとは基質特異性や反応効率の異なる新規の環境汚染物質分解酵素遺伝子の獲得も可能であると考えられる。このような観点から、現在、著者らが進めている2つのアプローチについて紹介したい。

1) ゲノム情報の利用

近年のゲノムプロジェクトの著しい進展により、いわゆる環境細菌を含めた様々な細菌の全ゲノム配列が次々と明らかになりつつある。それに伴い、どのようなアミノ酸配列のホモロジー検索を行った場合でも、以前より多くの相同配列がヒットするようになった。しかし、ゲノムプロジェクトで明らかにされた配列のほとんどは機能についての解析がなされていない。そこで、我々は、これらを重要な遺伝子資源と捉え、デハロゲナーゼ相同遺伝子配列の解析を開始した。デハロゲナーゼ相同遺伝子配列を有する細菌が有機ハロゲン化合物を完全分解できなくても、相同配列の蛋白質産物が特定のデハロゲナーゼ活性を有している可能性はある。また、逆に、これらデハロゲナーゼ相同遺伝子配列の解析により、人為起源物質に作用するデハロゲナーゼのオリジナルの基質や機能に関する知見が得られることも期待できる。前述のように新規の脱塩化水素酵素 LinA の反応機構は明らかになりつつが、その直接の起源については依然不明のままである。現在、LinA の相同性検索を行うと、図9のような配列がヒットするが、そのほとんどが機能不明の推定遺伝子である。我々はこのうち、ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 のゲノムに存在する *mlr5878* (推定蛋白質産物が LinA と25% identity) について、大腸菌中で蛋白質産物を発現させ、LinA 活性の有無を検討した (未発表データ)。残念ながら LinA 活性は検出されなかったが、この推定遺伝子産物のアミノ酸配列には、LinA 活性に重要と考えられるアミノ酸残基の多くが保存されていることから、少ない変異の導入で LinA 活性を付与できる可能性はある。また、*mlr5878* は共生領域に存在することから、そのミヤコグ

サ根粒菌における機能についても興味を持たれ、現在解析中である。一方、LinB が含まれるハロアルカンデハロゲナーゼ相同配列も、多くの細菌のゲノム配列から見つかっている⁶²⁾。結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv に複数のハロアルカンデハロゲナーゼ相同遺伝子配列が存在することから、Damborsky らのグループでは、*Mycobacterium* のさまざまな株のハロアルカンデハロゲナーゼ活性の検討を行った⁶⁴⁾。その結果、多くの *Mycobacterium* の株がハロアルカンデハロゲナーゼ活性を有することが明らかになった。さらに、PCR で遺伝子を単離し、その解析も進めている。著者らは、H37Rv のゲノムに存在する Rv2579 が、LinB と特に高い相同性 (約70% identity) を示すことから、LinB への累積変異導入による Rv2579 の再構築を行った (未発表データ)。Rv2579 には加水分解的脱ハロゲン反応に必須の catalytic triad を形成するアミノ酸残基が保存されているが、LinB の結晶構造と Rv2579 のホモロジーモデルを比較した結果、活性中心ポケットを形成する13個のアミノ酸残基のうち、6個が異なっていた。そこで、LinB のこの6個のアミノ酸残基に順次累積変異を導入し、変異酵素のハロアルカンデハロゲナーゼ活性の評価を行った。6個全てのアミノ酸残基を置換し、Rv2579 の活性中心ポケットを有すると考えられる変異酵素はハロアルカン脱ハロゲン活性を示し、Rv2579 がハロアルカンデハロゲナーゼであることが強く示唆された。また、中間段階の変異酵素の解析より、基質特異性の決定に重要なアミノ酸残基に関する知見も得た。一方、根粒菌のゲノムにもハロアルカンデハロゲナーゼ相同遺伝子配列が存在する。著者らのグループでは、これまでにミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 のゲノムに存在する *mlr5434* (推定蛋白質産物が LinB と48% identity) とダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 に存在する相同配列 (未発表データ) を大腸菌中で発現させ、これらが既知のものとは異なる新規の基質特異性を有するハロアルカンデハ

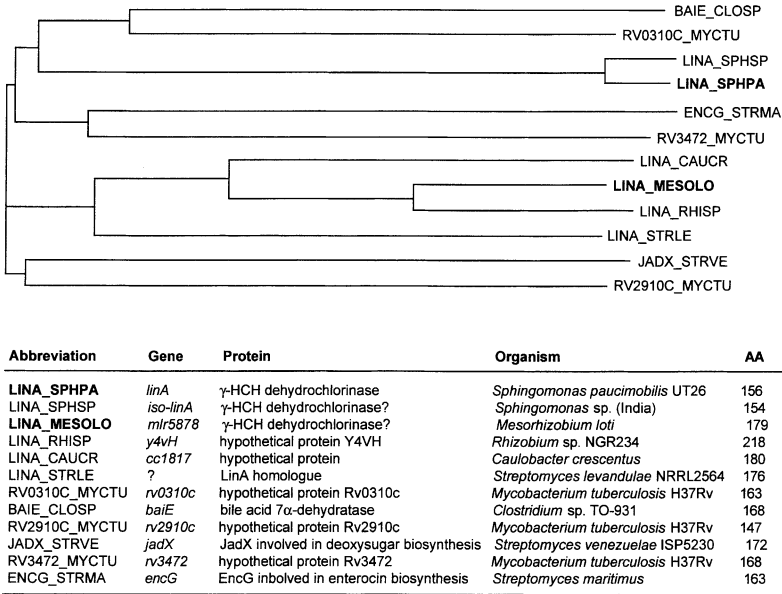


図9. LinA 相同配列とその系統樹。

ログナーゼ活性を示すことを明らかにした（未発表データ）。現在、根粒菌およびその類縁菌におけるハロアルカンデハログナーゼ相同遺伝子配列の分布とその保有菌における役割についての研究を進めている。

以上のように、*Mycobacterium* や根粒菌などの動植物に感染性を示す細菌にデハログナーゼ相同配列が存在することから、デハログナーゼは、元々動植物との相互作用の過程で機能しているものである可能性も考えられ、こうした視点からの解析も必要であろう。

2) 土壌環境遺伝子資源の利用

自然界に棲息する細菌のうち、いわゆる平板培養法で分離・培養可能なものは1%以下だといわれている⁶⁵⁾。すなわち、99%以上の土壌微生物由来の遺伝子資源がこれまでは利用されておらず、その中には環境汚染浄化に有効な遺伝子資源も少なからず含まれていると考えられる。そこで、著者らは機能的相補の手法を用いて、土壌環境遺伝子資源からの新規環境汚染物質分解酵素遺伝子の取得を試みている。ストラテジーの概要を図10に示した。まず、目的の活性のみを欠くことによって、ある物質を唯一の炭素源として生育できない菌を宿主として準備する。この菌に広宿主域コスミドベクターで作製した土壌から直接抽出したDNAの遺伝子ライブラリーを導入し、当該活性が相補されたことによって選択培地での生育が可能になったクローンを選択するという方法である。これまでに、この方法で非汚染土壌よりナフタレンジオキシゲナーゼ活性を示す遺伝子の獲得に成功した。得られた遺伝子は、少なくともNAH7の*nahA*とは高い相同性を示さず、新規のナフタレンジオキシゲナーゼ遺伝子が獲得された可能性が高い（未発表データ）。塩基配列等は現在解析中である。さらに、同様の手法でLinA, LinBに相当する活性を示す遺伝子の獲得を計画している。ただし、このような方法の大きな問題点は、導入遺伝子の宿主内での発現が必要なことである。一般にプロモーター構造やG+C含量の違いから特定の宿主内での異種遺伝子の発現は難しく⁶⁶⁾、なんらかの工夫

が求められる。宿主株自体の検討や、プロモーター活性を持ったISなどを利用して、遺伝子ライブラリー導入後の適応変異を期待する方法などを考えている。このように、より多くの環境遺伝子資源を利用するには、乗り越えなければならない問題点があるものの、以上のような手法を用いて、さまざまな遺伝子資源から新規の環境汚染物質分解酵素遺伝子が獲得できれば、環境浄化への応用の幅も広がるだろう。すなわち、そのまま、あるいは蛋白質工学の出発材料として何らかの改変を施して分解能を上昇させたのちに、他の分解遺伝子との組み合わせで環境浄化に応用することも可能であると考えられる。

5. おわりに

以上述べてきたように、有機塩素系農薬の微生物分解に関する基礎的知見はかなり蓄積されてきている。今後は、これらを如何にして実際の環境浄化へ応用していくかが課題である。2,4-Dのように分解微生物が環境中に広く存在し、比較的分解されやすいものに関しては、すでに米国においてbiostimulationの実施例もある。しかし、 γ -HCHのような、より難分解性の物質に対しては、遺伝子操作細菌を含めたbioaugmentationあるいはgene augmentationも必要となってくるだろう。その際には、環境中での分解微生物や遺伝子の動態に関する情報を今以上に得ておく必要がある。また、 γ -HCHなどの農薬による環境汚染が比較的低濃度で広域に及ぶことを考慮すると、汚染土壌の浄化には低コストで持続的分解処理が可能なファイトレメディエーション⁶⁷⁾が有効であると考えられる。著者らのグループでは、*linA* 及び *linB* 遺伝子の植物への導入を試みている。これまでの研究で、少なくとも植物体が若い時期にはLinA, LinB蛋白質及び活性の植物体での発現が認められた。成長段階が進んだ植物体での活性の安定発現が今後の課題である。

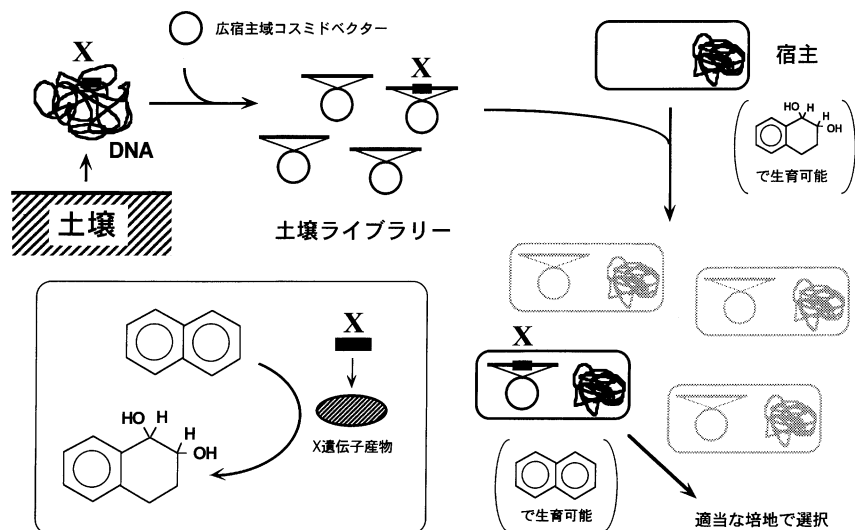


図10. 機能的相補による土壌環境遺伝子資源からの新規遺伝子獲得のストラテジー。

ナフタレンの初発酸化酵素の機能を持つ酵素遺伝子の獲得の場合を示した。詳細は本文参照。

文 献

- 1) Blais, J.M., D.W. Schindler, D.C.G. Muir, L.E. Kimpe, D.B. Donald, and B. Rosenberg. 1998. Accumulation of persistent organochlorine compounds in mountains of western Canada. *Nature*. 395: 585–588.
- 2) Iwata, H., S. Tanabe, N. Sakai, and R. Tatsukawa. 1993. Distribution of persistent organochlorines in the Oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1080–1098.
- 3) Nagata, Y., K. Miyauchi and M. Takagi. 1999. Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J. Industrial Microbiology & Biotechnology*. 23: 380–390.
- 4) Laemmli, C.M., J.H. Leveau, A.J. Zehnder and J.R. van der Meer. 2000. Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 182: 4165–4172.
- 5) Perez-Pantoja, D., L. Guzman, M. Manzano, D.H. Pieper, and B. Gonzalez. 2000. Role of *tfdC₁D₁E₁F₁* and *tfdD₁C₁E₁F₁* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1602–1608.
- 6) Fukumori, F., and R.P. Hausinger. 1993. *Alcaligenes eutrophus* JMP134 “2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase” is an α -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *J. Bacteriol.* 175: 2083–2086.
- 7) Fukumori, F., and R.P. Hausinger. 1993. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268: 24311–24317.
- 8) Seibert, V., K. Stadler-Fritzsche, and M. Schlomann. 1993. Purification and characterization of maleylacetate reductase from *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 175: 6745–6754.
- 9) Newby, D.T., K.L. Josephson, and I.L. Pepper. 2000. Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 290–296.
- 10) Suwa, Y., A.D. Wright, F. Fukumori, K.A. Nummy, R.P. Hausinger, W.E. Holben, and L. J. Forney. 1996. Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2464–2469.
- 11) You, I.S. and D. Ghosal. 1995. Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4. *Mol. Microbiol.* 16: 321–331.
- 12) Leveau, J.H. and J.R. van der Meer. 1996. The *tfdR* gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated TfdT protein as a transcriptional activator of the *tfdCDEF* gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 178: 6824–6832.
- 13) Top, E.M., O.V. Maltseva, and L.J. Forney. 1996. Capture of a catabolic plasmid that encodes only 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: α -ketoglutaric acid dioxygenase (TfdA) by genetic complementation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2470–2476.
- 14) Ka, J.O., W.E. Holben, and J.M. Tiedje. 1994. Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1106–1115.
- 15) Kamagata, Y., R.R. Fulthorpe, K. Tamura, H. Takami, L.J. Forney, and J.M. Tiedje. 1997. Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2266–2272.
- 16) Kitagawa, W., S. Takami, K. Miyauchi, E. Masai, Y. Kamagata, J.M. Tiedje, and M. Fukuda. 2002. Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *J. Bacteriol.* 184: 509–518.
- 17) Newby, D.T., T.J. Gentry, and I.L. Pepper. 2000. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3399–3407.
- 18) Kellogg, S.T., D.K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty. 1981. Plasmid-assisted molecular breeding: new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science*. 214: 1133–1135.
- 19) Hübner, A., C.E. Danganan, L. Xun, A.M. Chakrabarty, and W. Hendrickson. 1998. Genes for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: characterization of the *tftC* and *tftD* genes and locations of the *tft* operons on multiple replicons. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2086–2093.
- 20) Zaborina, O., D.L. Daubaras, A. Zago, L. Xun, K. Sido, T. Klem, D. Nikolic, and A. M. Chakrabarty. 1998. Novel pathway for conversion of chlorohydroxyquinol to maleylacetate in *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* 180: 4667–4675.
- 21) Saber, D.L. and R.L. Crawford. 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1512–1518.
- 22) Orser, C.S. and C.C. Lange. 1994. Molecular analysis of pentachlorophenol degradation. *Biodegradation*. 5: 277–88.
- 23) Lee, J.Y. and L. Xun. 1997. Purification and characterization of 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone chlorohydrolase from *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723. *J. Bacteriol.* 179: 1521–1524.
- 24) Ohtsubo, Y., K. Miyauchi, K. Kanda, T. Hatta, H. Kiyohara, T. Senda, Y. Nagata, Y. Mitsui, and M. Takagi. 1999. *PcpA*, which is involved in the degradation of pentachlorophenol in *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC39723, is a novel type of ring-cleavage dioxygenase. *FEBS Lett.* 459: 395–398.
- 25) Xu, L., K. Resing, S.L. Lawson, P.C. Babbitt, and S.D. Copley. 1999. Evidence that *pcpA* encodes 2,6-dichlorohydroquinone dioxygenase, the ring cleavage enzyme required for pentachlorophenol degradation in *Sphingomonas chlorophenolica* strain ATCC39723. *Biochemistry* 38: 7659–7669.
- 26) Xun, L., J. Bohuslavek, and M. Cai. 1999. Characterization of 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone 1,2-dioxygenase (*PcpA*) of *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 322–325.
- 27) Ranson, H., L. Rossiter, F. Ortelli, B. Jensen, X. Wang, C.W. Roth, F.H. Collins, and J. Hemingway. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione *S*-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359: 295–304.
- 28) You, G., G.D. Sayles, M.J. Kupferle, and P.L. Bishop. 1995. Anaerobic bioremediation of DDT-contaminated soil with nonionic surfactant. In *Bioremediation of Recalcitrant Organics*. edited by R.E. Hinchee, D.B. Anderson, and R.E. Hoeppl. Battille press, Columbus, OH, USA.
- 29) Nadeau, L.J., F.-M. Menn, A. Breen, and G. S. Sayler. 1994. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 51–55.
- 30) Johri, A.K., M. Dua, D. Tuteja, R. Saxena, D.M. Saxena, and R. Lal. 1996. Genetic manipulations of microorganisms for the degradation of hexachlorocyclohexane. *FEMS Microbiology Reviews*. 19: 69–84.
- 31) Senoo, K. and H. Wada. 1989. Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil*

- Sci. Plant Nutr. 35: 79–87.
- 32) Imai, R., Y. Nagata, K. Senoo, H. Wada, M. Fukuda, M. Takagi, and K. Yano. 1989. Dehydrochlorination of γ -hexachlorocyclohexane (γ -BHC) by γ -BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. Agric. Biol. Chem. 53: 2015–2017.
 - 33) Fetzner, S. and F. Lingens. 1994. Bacterial Dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. Microbiol. Rev. 58: 641–685.
 - 34) Fetzner, S. 1998. Bacterial dehalogenation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 633–657.
 - 35) Janssen, D.B., F. Pries, and J.R.v.d. Ploeg. 1994. Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. Annu. Rev. Microbiol. 48: 163–191.
 - 36) Imai, R., Y. Nagata, M. Fukuda, M. Takagi, and K. Yano. 1991. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. J. Bacteriol. 173: 6811–6819.
 - 37) Nagata, Y., T. Nariya, R. Ohtomo, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1993. Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) in *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 175: 6403–6410.
 - 38) Nagata, Y., R. Ohtomo, K. Miyauchi, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1994. Cloning and Sequencing of a 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase gene involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 176: 3117–3125.
 - 39) Miyauchi, K., S.-K. Suh, Y. Nagata, and M. Takagi. 1998. Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of γ -Hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 180: 1354–1359.
 - 40) Miyauchi, K., Y. Adachi, Y. Nagata, and M. Takagi. 1999. Cloning and sequencing of a novel *meta*-cleavage dioxygenase gene whose product is involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 181: 6712–6719.
 - 41) Miyauchi, K., H.-S. Lee, M. Fukuda, M. Takagi, and Y. Nagata. 2002. Cloning and characterization of *linR*, involved in regulation of downstream pathway for γ -HCH degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1803–1807.
 - 42) Nagata, Y., T. Hatta, R. Imai, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1993. Purification and characterization of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1582–1583.
 - 43) Trantirek, L., K. Hynkova, Y. Nagata, A. G. Murzin, A. Ansorgova, V. Sklenar, and J. Damborsky. 2001. Reaction mechanism and stereochemistry of γ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA. J. Biol. Chem. 276: 7734–7740.
 - 44) Nagata, Y., K. Miyauchi, J. Damborsky, K. Manova, A. Ansorgova, and M. Takagi. 1997. Purification and characterization of haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3707–3710.
 - 45) Damborsky, J., E. Rorije, A. Jesenska, Y. Nagata, G. Klopman, and W.J.G.M. Peijnenburg. 2001. Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases. Environ. Toxi. Chem. 20: 2681–2689.
 - 46) Vuilleumier, S. 1997. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? J. Bacteriol. 179: 1431–1441.
 - 47) Copley, S.D. 2000. Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. Trends. Biochem. Sci. 25: 261–265.
 - 48) Darby, J.M., D.G. Taylor, and D.J. Hopper. 1987. Hydroquinone as the ring-fission substrate in the catabolism of 4-ethylphenol and 4-hydroxyacetophenone by *Pseudomonas putida* JD1. J. General Microbiol. 133: 2137–2146.
 - 49) Spain, J.C. and D.T. Gibson. 1991. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. Appl. Environ. Microbiol. 57: 812–819.
 - 50) Mars, A.E., J. Kingma, S.R. Kaschabek, W. Reineke, and D.B. Janssen. 1999. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. J. Bacteriol. 181: 1309–1318.
 - 51) van Hylckama Vlieg, J.E., G.J. Poelarends, A.E. Mars, and D. Janssen. 2000. Detoxification of reactive intermediates during microbial metabolism of halogenated compounds. Curr. Opin. Microbiol. 3: 257–262.
 - 52) Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 47: 597–626.
 - 53) Zylstra, G.J. and E. Kim. 1997. Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19: 408–414.
 - 54) Armengaud, J., B. Happe, and K. N. Timmis. 1998. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome. J. Bacteriol. 180: 3954–3966.
 - 55) Romine, M.F., L.C. Stillwell, K.-K. Wong, S.J. Thurston, E.C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J.K. Fredrickson, and J.D. Saffer. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181: 1585–1602.
 - 56) Murzin, A.G. 1998. How far divergent evolution goes in proteins. Current Opinion in Structural Biology 8: 380–387.
 - 57) Nagata, Y., K. Mori, M. Takagi, A.G. Murzin, and J. Damborsky. 2001. Identification of protein fold and catalytic residues of γ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA. Proteins: Structure, Function, and Genetics 45: 471–477.
 - 58) Thomas, J.-C., F. Berger, M. Jacquier, D. Bernillon, F. Baud-Grasset, N. Truffaut, P. Normand, T.M. Vogel, and P. Simonet. 1996. Isolation and characterization of a novel γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. J. Bacteriol. 178: 6049–6055.
 - 59) Ollis, D.L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J.L. Sussman, K.H.G. Verschuere, and A. Goldman. 1992. The α/β hydrolase fold. Protein Engineering 5: 197–211.
 - 60) Hynkova, K., Y. Nagata, M. Takagi, and J. Damborsky. 1999. Identification of the catalytic triad in the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. FEBS letters. 446: 177–181.
 - 61) Marek, J., J. Vevodova, I.K. Smananova, Y. Nagata, L.A. Svensson, J. Newman, M. Takagi, and J. Damborsky. 2000. Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Biochemistry 39: 14082–14086.
 - 62) Damborsky, J., and J. Koca. 1999. Analysis of the reaction mechanism and substrate specificity of haloalkane dehalogenases by sequential and structural comparisons. Protein Eng. 12: 989–998.
 - 63) El-Fantroussi, S., W. Verstraete, and E. M. Top. 2000. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5110–5115.
 - 64) Jesenska, A., I. Sedlacek, and J. Damborsky. 2000. Dehalogenation of haloalkanes by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and other mycobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 219–222.
 - 65) Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual

- microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-69.
- 66) Hauser, H. and G. J. Zylstra. 2001. Mammals, plants, bacteria, and soil: common problems and solutions in gene expression and analysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 437-438.
- 67) 森川弘道, 高橋美佐, 河村義史. 2001. ファイトレメディエーションによる環境修復の新展開. *J. Environ. Biotech.* 1: 1-14.