

## 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

### Expression-Based Isolation of Bacterial Xenobiotics-Degrading Genes from Environments

津田 雅孝\*, 小野 玲, 宮崎 亮, 府中 玄樹, 永田 裕二

MASATAKA TSUDA, AKIRA ONO, RYO MIYAZAKI, GENKI FUCHU and YUJI NAGATA

東北大学大学院生命科学研究所 〒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

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

(原稿受付 2007年10月20日/原稿受理 2007年10月21日)

#### 1. はじめに

我々の研究室では、多環芳香族炭化水素化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) や PCB, 高度塩素化有機農薬である  $\gamma$ -HCH ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, 別名 BHC, lindane) などの環境汚染物質の微生物分解に関する包括的な研究を、培養が容易な幾つかの細菌株を対象にして行ってきた。PAH 分解に関しては、主に当該分解酵素遺伝子群を担うプラスミドやトランスポソンの構造の解明と水平伝播や転移の分子機構に焦点を当てた詳細な検討を行い、これら可動性遺伝因子の種を超えた水平伝播と細胞内の同一レプリコン内または異種レプリコン間での再編成が、環境細菌における新規な物質分解能の迅速な獲得・進化に大きく寄与していることを示してきた<sup>12,18,19,21,24</sup>。一方、 $\gamma$ -HCH 分解に関しては、分解経路全容解明に始まり、分解酵素の詳細な反応機構の検討を行い、さらに、一部分解酵素遺伝子の接合伝達性プラスミド支配を見いだしてきた<sup>9-11</sup>。このような培養可能な完全分解細菌を対象にした従来からの研究と並行して、ゲノムの全塩基配列が解読された結果、 $\gamma$ -HCH に関わる一部の酵素のみをコードすることが判明した細菌群由来の当該酵素群の詳細な研究<sup>17</sup>を行っている。本稿では、これらの研究を踏まえた上で我々が取り組みを開始した PAH や  $\gamma$ -HCH の分解酵素遺伝子の土壌からの直接的取得と解析についての研究を紹介する。

#### 2. 宿主株の分解能欠損を機能相補する分解酵素遺伝子群の取得・解析

研究開始当初は、原油汚染土壌や  $\gamma$ -HCH 汚染歴のある土壌由来の細菌画分を対象にして、(i) 本画分から調製した長鎖 DNA を広宿主域コスミドに組み込んだメタ

ゲノムライブラリーを用いる方法と、(ii) DNA を調製することなく分解酵素遺伝子の水平伝播能を利用した方法、を併用して、PAH や  $\gamma$ -HCH の分解酵素遺伝子の取得を実施してきた<sup>8,13,20</sup>。その際の目的分解酵素遺伝子取得にあたって、PAH や  $\gamma$ -HCH の完全分解菌の特定分解酵素遺伝子を破壊した突然変異株を受容菌とし、(i) の場合には変異を機能的に相補する形質転換体を、(ii) の場合には土壌細菌画分を供与菌集団と見立てた遺伝学的接合により接合体を、適当な選択寒天培地を用いてポジティブスクリーニングした。

一般に、細菌による好氣的な PAH 分解において、その初発分解水酸化酵素 (ジオキシゲナーゼ) は 3 ないし 4 つのサブユニットから構成され、そのうちの末端オキシゲナーゼの「ラージサブユニット」が基質特異性を規定している (図 1B)<sup>2,16</sup>。そこで我々は、82 kb の IncP-9 群プラスミド NAH7 支配でナフタレンをサリチル酸・カテコール経路で完全分解する分解酵素群をコードする *nah* 遺伝子群 (図 1A)<sup>19</sup> のうち、ナフタレンジオキシゲナーゼ・ラージサブユニット遺伝子 *nahAc* のみを破壊し、本誘導体 *nah* 遺伝子群が染色体に挿入された *Pseudomonas putida* 株 ( $\gamma$ -プロテオバクテリア) を受容菌とした。受容菌を原油汚染土壌の細菌画分から調製したコスミドライブラリーで形質転換することで、受容菌にナフタレン完全分解能を賦与するコスミド pSLX928-6 を得た。本コスミドにはナフタレンをサリチル酸にまで分解する 10 個の *nah* 遺伝子群が 1 つのオペロンを形成して存在していた<sup>14</sup>。一方、上記受容菌と原油汚染土壌の細菌画分との接合により、*nahAc* 変異を相補する 200 kb のプラスミド pFKY1 を取得した。pFKY1 は、ナフタレン完全分解に必要な全遺伝子を有する接合伝達性 IncP-9 群プラスミドであった<sup>14</sup>。ただ、pSLX928-6 と pFKY1 支配でナフタレンをサリチル酸に

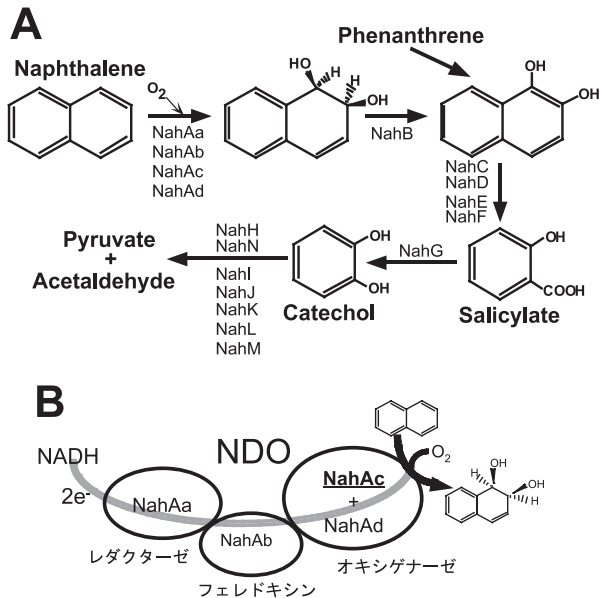


図1. NAH7プラスミド支配のナフタレン分解経路の概略(A)と本プラスミド支配のナフタレンジオキシゲナーゼ(NDO)(B)

まで分解する10個のnah遺伝子群は、NAH7のそれらとアミノ酸配列レベルで86–100%とたいへん高い相関性を持ち、遺伝子の並びもNAH7のものと同じであった。

$\alpha$ -プロテオバクテリアの*Sphingobium japonicum* UT26株が示す $\gamma$ -HCH完全分解能には6つの酵素を必要とする(図2)<sup>9-11)</sup>。このうち、初発分解酵素のLinAは新規性に富む脱塩化水素反応を司り、LinBはLinA反応産物のみならず広範なハロアルカン化合物を基質として脱ハロゲン化できる特色を示す。そこで、 $\gamma$ -HCH汚染土壌からLinA活性とLinB活性を有する遺伝子の直接的取得を行った。汚染土壌の細菌画分から調製したDNAのコスミドライブラリーをUT26株のlinA突然変異株に導入し、 $\gamma$ -HCH完全分解能を回復した形質転換体を選択することで宿主のlinA変異を相補するコスミドを取得したが、コスミド支配のLinAはUT26株由来のLinAと100%同一であった(伊藤通浩, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二: 未発表データ)。ただ、UT26株のlinAの場合とは異なり、コスミド上のlinAは挿入配列IS6100と隣接していた。一方、UT26株のlinB突然変異株を受容菌とし、土壌由来細菌画分との接合を行ったところ、受容菌にLinB活性を賦与できる遺伝子を有する66 kbのプラスミドpLB1を取得できた<sup>7)</sup>。pLB1上では、アミノ酸配列レベルで他のLinBと極めて高い相関性(UT26株のLinBと98%, インドで分離された別の $\gamma$ -HCH分解細菌のLinBと100%)を示すlinBが同一の配向性で2コピー存在し、さらにこれらlinBは同一配向性を示すIS6100に挟まれた構造(IS6100-linB-IS6100)を取っていた。pLB1は他の幾つかの $\alpha$ -プロテオバクテリアへの接合伝達能を有したが、 $\beta$ -プロテオバクテリアや $\gamma$ -プロテオバクテリアへの接合伝達は検出できなかった。このような接合伝達に関わる遺伝子群は、他の $\alpha$ -プロテオバクテリア内在性の

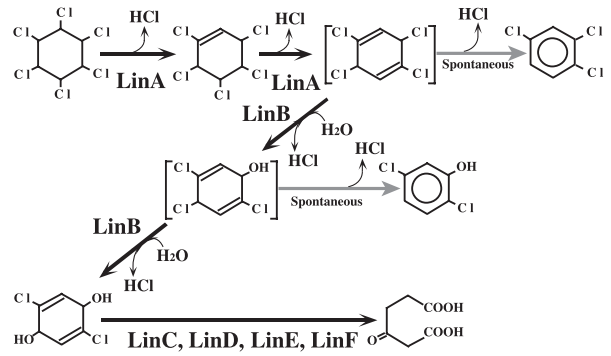


図2. *Sphingobium japonicum* UT26株支配の $\gamma$ -HCH分解経路の概略

プラスミドの関連遺伝子群とある程度の相関性を示したが、pLB1の複製・分配に関する遺伝子は、とりわけ新規性が高かった。

我々が対象としている $\gamma$ -HCH分解細菌株のみならず国内外で単離された他の複数の $\gamma$ -HCH分解細菌株においてもlin遺伝子とIS6100との隣接性が認められている<sup>5,11)</sup>ことを踏まえ、上記 $\gamma$ -HCH汚染土壌から調製したDNAを用い、2コピーのIS6100で挟まれたDNA断片をnested PCRで特異的に増幅した。その結果、増幅された4本のDNA断片のうち、3本ではインタクトな4種lin遺伝子と不完全なlinFが同方向に配向した2コピーのIS6100で挟まれた構造を取っていた(府中支樹, 伊藤通浩, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二: 未発表データ)。ただ、取得したlin遺伝子に新規性はなかった。様々な分解酵素遺伝子は2コピーの同種ISで挟まれた構造を示すことが希でない<sup>21)</sup>ことから、我々が考案したこのような手法は、新たな分解酵素遺伝子の取得に有用であろう。

### 3. 宿主株に新規分解能を賦与する遺伝子群の取得・解析

以上の初期研究において、汚染歴のない土壌からのPAH並びに $\gamma$ -HCHの分解酵素遺伝子の取得も試みたが、成功しなかった。非汚染土壌環境に当該遺伝子が全く存在しないとは考えにくいものの、汚染土壌では当該物質を分解できる細菌あるいは遺伝子の相対的割合が低いことが容易に想像できる。また、選択寒天平板を用いた受容菌の分解能機能相補により汚染土壌から取得できた分解遺伝子は、受容菌の親株が持っていた分解酵素遺伝子との相関性がたいへん高かった。このような原因として、(a) 受容菌内での導入分解酵素遺伝子発現の相性の善し悪しが取得可能な酵素遺伝子の種類を規定していた、(b) 寒天培地でのコロニー形成の有無という「all or none」的指標では、産物の活性が低い導入遺伝子の取得が見落とされていた、などのことが想定された。

これらの経験を踏まえ、(i) 土壌DNA試料での目的遺伝子の存在比率を高める、(ii) 進化的に類縁性の低い複数の宿主受容菌株を用いる、(iii) 高感度で効率の良いスクリーニングを用いる、という工夫を加えたのちに、あらためて土壌DNAライブラリーからの芳香族初発水酸化酵素遺伝子の取得を実施した。

まず、長年にわたり環境汚染物質に晒されなかった花

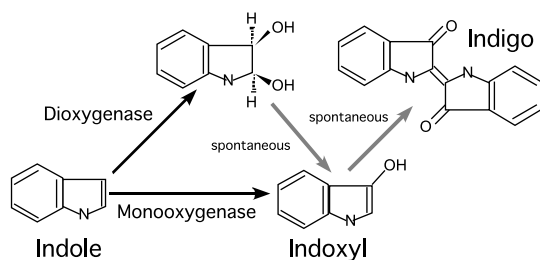


図3. インドールからインディゴ生成の経路

崗岩質畑土壌を実験室での閉鎖系ポットに入れ、トルイル酸、フェナントレン、ビフェニル、カルバゾール（ダイオキシンの代用化合物）を同時添加して人工的に汚染させた。その後、経時的に土壌 DNA を調製し、16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢変動を検討するとともに、4種の異なる既知芳香族化合物分解特異的ジオキシゲナーゼ遺伝子の出現とその存在量を定量 PCR で解析した<sup>15)</sup>。汚染化前には5%以下であったβ-プロテオバクテリアが汚染化後7週目に75%を占めるような劇的な菌叢変動が見られ、また、4種の芳香族化合物分解特異的ジオキシゲナーゼ遺伝子も10–10,000倍の濃縮が認められた。そこで、汚染させてから27週目の土壌から調製したメタゲノムのコスミドライブラリーを、先に述べた*P. putida*の*nahAc*のみを欠く株、α-プロテオバクテリアの*Sinorhizobium meliloti*株、そしてβ-プロテオバクテリアの*B. multivorans* ATCC 17616株に導入した<sup>15)</sup>。ちなみに、*B. multivorans*株はその全ゲノム配列解析の結果<sup>23)</sup>、サリチル酸を唯一の炭素源として生育できることが判明している。一方、様々な芳香族炭水化合物の好氣的分解に関与するジオキシゲナーゼやモノオキシゲナーゼは、無色のインドールを青色のインディゴに変換する反応を行うことができる(図3)<sup>1,6)</sup>ことを踏まえ、各種受容菌株のコスミド導入菌において、インドールからインディゴを産生するクローンを選択した<sup>15)</sup>。

*B. multivorans*を宿主にしたスクリーニングが現在までに最も進行しており、計4Gbの土壌DNAコスミドライブラリーから、再現性良く宿主受容菌株にインディゴ産生能を賦与する8種類のコスミド(pE1A, pE2I, pE3A, pE10I, pE6A, pE7A, pE12A, pE2K)を取得した<sup>15)</sup>。最初の6つのコスミドはNAH7の*nahAc*と同一性があるDNA領域を有することがサザン解析で判明し、このうち、pE6AとpE7Aを除く4つのコスミドは宿主にナフタレン完全分解能を賦与することから、これらコスミド上にはナフタレンをサリチル酸にまで変換する酵素群を支配する遺伝子群が存在すると結論した。実際にpE3Aには、β-プロテオバクテリアに多く認められるNag型のナフタレン分解経路[ナフタレン→サリチル酸→ゲンチジン酸→TCA回路物質]<sup>3)</sup>のうち、ナフタレンからサリチル酸までの分解に関わる*nag*遺伝子群と78–100%の同一性を示す分解遺伝子群が存在していた。一方、pE7Aも同様の*nag*遺伝子群の大部分を担っていたが、サリチル酸生成までに必要な遺伝子セットを有していないために、本コスミドは宿主にナフタレン完全分解能を賦与できなかった。

pE7A, そして、*nahAc/nag*とは相同遺伝子を持たな

いpE12AとpE2Kを保有する*B. multivorans*は、インドール含有寒天培地でそれぞれ濃青、青、淡青のコロニー色を示した。しかし、3種のコスミドを保有する大腸菌や*S. meliloti*では、このような呈色反応は認められず、インディゴ産生能の宿主依存性が存在した。一方、3種のコスミドを保有する*B. multivorans*の休止菌体を用いて9種の単環並びに多環芳香族化合物分解活性を検討したところ、pE7A保有株がナフタレンに対する分解活性を示し、pE2K保有株はどの化合物にも活性が無かったのに対し、pE12A保有株はナフタレンのみならず2-ニトロトルエンとビフェニルに対しても高い分解活性を示す特徴が見出された。pE12Aは土壌DNA由来のorfを22個有していたが、ダイズ根粒菌の機能未知タンパク質とアミノ酸配列レベルで75%の同一性を有するタンパク質をコードするorf9を破壊したpE12A誘導体は、*B. multivorans*に対して上記3種化合物分解活性を賦与できなかった。しかし、orf9のみを大腸菌で大量発現させても当該分解活性は認められなかった。PSI-BLASTを用いてorf9産物の同一性検索を再度実施した結果、本産物は新規性に富むフラビン依存性モノオキシゲナーゼで、上記3種化合物分解活性発現には、NADH等の還元剤から受け取った電子をオキシゲナーゼに伝えるレダクターゼが必要である可能性が示唆された。このような酵素遺伝子がpE12A上に存在しないことを踏まえ、*B. multivorans*ゲノム支配でこのようなレダクターゼの性質を持つと想定される酵素遺伝子を取得した。本遺伝子とorf9を大腸菌で大量に共発現させたところ、この宿主背景下でも上記3種化合物に対する分解活性が検出できた。このような実験により、pE12Aが*B. multivorans*においてのみインドール生成活性と3種化合物の分解活性を示したのは、活性発揮に必要な酵素遺伝子が本菌ゲノムにのみ存在していたことに起因するのであろう。

pE2K上には、複数の酸化酵素遺伝子候補が担われていたが、放線菌由来と想定されるマルチコンポーネント型芳香族化合物水酸化酵素をコードすると推定された3つの遺伝子が隣接して存在していた。これら新規性に富む3つの遺伝子を*B. multivorans*で強制的に共発現すると、2,4-ジニトロトルエンに対する分解能が出現した。

以上のように、人工的汚染土壌や、複数の宿主受容菌株、高感度スクリーニング系を使用することで、新規性の高い芳香族化合物水酸化酵素遺伝子の取得が可能になってきた。取得酵素の解析はまだ初期段階であり、今後はこれら酵素の詳細な解析が必要である。

一方、メタゲノムライブラリーを用いて我々が取得を目指した芳香族化合物水酸化酵素は一般にマルチコンポーネント型で、酵素活性発揮にはサブユニット間かなりの厳密な相性を必要とする<sup>2)</sup>。また、各サブユニットをコードする遺伝子すべてが必ずしも隣接しないこともあるとともに、これら遺伝子群の発現誘導は基質の存在を必要とする。このようなことを考慮すると、機能発現に基づくこれら遺伝子群のメタゲノムからの取得は、リパーゼやアミダーゼなどのシングルコンポーネント型酵素の取得<sup>4)</sup>よりも難易度が高いといえよう。本研究において、閉鎖系土壌に「環境汚染物質添加」という特定環境要因を人工的に加えることが、我々の目的遺伝子

取得を容易にした一因といえよう。このような我々が用いた閉鎖系生態系に別の異なる環境要因変動を与えることで、各々の研究者が標的とする新規酵素遺伝子の取得が容易になると筆者グループは考えている。

#### 4. おわりに

本稿では、新規に環境汚染物質分解酵素遺伝子の生態系からの取得・解析に主眼をおいたが、このようにして取得した遺伝子をプローブにすることで、当該遺伝子の生態系での発現様式の検討や、遺伝子を有する元来の宿主株の分離培養が可能になってくるであろう。そして、分離培養した菌株とその分解遺伝子が汚染環境の浄化に「真の」主役として働くかなどの検討の研究は、その基盤となる様々な研究が進行している現状を鑑みる<sup>22)</sup>と、近々現実味を帯びてくるであろう。

#### 謝 辞

本稿で紹介した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、農林水産省「農林水産生態系における有害化学物質の総合管理技術の開発」からの助成を受けた。

#### 文 献

- 1) Ensley, B.D., B.J. Ratzkin, T.D. Osslund, M.J. Simon, L.P. Wackett, and D.T. Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222: 167–169.
- 2) 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: 468–47.
- 3) Jeon, C.O., M. Park, H.-S. Ro, W. Park, and E.L. Madsen. 2006. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1086–1095.
- 4) Kimura, N. 2006. Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. *Microbes Environ.* 21: 201–215.
- 5) Lal, R., C. Dogra, S. Malhotra, P. Sharma, and R. Pal. 2006. Diversity, distribution and divergence of *lin* genes in hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonads. *Trends Biotechnol.* 24: 121–130.
- 6) Mermod, N., S. Harayama, and K.N. Timmis. 1986. New route to bacterial production of indigo. *Nat. Biotechnol.* 4: 321–324.
- 7) Miyazaki, R., Y. Sato, M. Ito, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2006. Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid pLB1 involved in the degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6923–6933.
- 8) 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.
- 9) 永田裕二, 津田雅孝. 2005. 有機塩素系殺虫剤分解細菌の出現代謝系の構築と酵素の機能. *蛋白質核酸酵素*. 50: 1511–1518.
- 10) 永田裕二, 津田雅孝. 2006. ハロアルカンデハロゲナーゼの構造と機能. *J. Environ. Biotechnol.* 6: 87–92.
- 11) Nagata, Y., R. Endo, M. Ito, Y. Ohtsubo, and M. Tsuda. 2007. Aerobic degradation of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 741–752.
- 12) 野尻秀昭, 津田雅孝. 2005. 環境汚染物質分解細菌の機能進化—特集にあたって. *蛋白質核酸酵素*. 50: 1505–1510.
- 13) 小野 玲, 宮崎 亮, 永田裕二, 津田雅孝. 2006. 環境汚染物質を分解する酵素遺伝子の土壌からの直接的取得と解析. *バイオインダストリー*. 23: 44–49.
- 14) 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.
- 15) 小野 玲. 2007. 培養非依存的手法による土壌からの環境汚染物質分解酵素遺伝子の取得と解析. 東北大学大学院生命科学研究科博士論文.
- 16) Parales, R.E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 271–278.
- 17) 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.
- 18) Sota, M., H. Kawasaki, and M. Tsuda. 2003. Structure of haloacetate-catabolic IncP-1 $\beta$  plasmid pUO1 and genetic mobility of its residing haloacetate-catabolic transposon. *J. Bacteriol.* 185: 6741–6745.
- 19) 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.
- 20) 津田雅孝, 小松春伸, 大坪嘉行, 永田裕二. 2004. 環境細菌ゲノムと環境 DNA. *J. Environ. Biotechnol.* 3: 69–78.
- 21) 津田雅孝, 曾田匡洋. 2005. 環境浄化能をつかさどる遺伝子を担う可動遺伝因子. *蛋白質核酸酵素*. 50: 1527–1534.
- 22) 津田雅孝, 西山依里, 永田裕二, 大坪嘉行. 2007. 自然環境で実際に機能する微生物遺伝子の遺伝学的手法による検索と解析. *化学と生物*. 45: 557–563.
- 23) 津田雅孝, 永田裕二, 大坪嘉行. 2007. 土壌環境細菌の比較ゲノム. pp. 166–172. 藤山秋佐夫監修. 比較ゲノム学から読み解く生命システム—基本概念から最新ゲノム情報まで—. 秀潤社.
- 24) Yano, H., C.E. Garruto, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, G.J. Zylstra, P.A. Williams, and M. Tsuda. 2007. Complete sequence determination combined with analysis of transposition/site-specific recombination events to explain genetic organization of IncP-7 TOL plasmid pWW53 and related mobile genetic elements. *J. Mol. Biol.* 369: 11–26.