

環境微生物の新規な代謝機能の探索と開発

Exploration and Development of Novel Metabolic Capabilities of Environmental Bacteria

古 川 謙 介

KENSUKE FURUKAWA

別府大学食物栄養科学部 〒 874-8501 大分県別府市北石垣 82

TEL: 0977-66-9630 FAX: 0977-66-9631

E-mail: kfurukaw@nm.bepu-u.ac.jp

Department of Food and Bioscience, Beppu University, 82 Kitaishigaki, Beppu, Oita, 874-8501, Japan

キーワード: 有機水銀, ポリ塩化ビフェニル (PCB), クロロエチレン, ジオキシングナーゼ, 進化分子工学

Key words: organomercurials, polychlorinated biphenyls (PCBs), chlorinated ethenes, dioxygenases, evolutionary molecular engineering

(原稿受付 2012 年 9 月 28 日 / 原稿受理 2012 年 10 月 9 日)

1. はじめに

環境バイオテクノロジー学会賞受賞を機に、40 年余りの研究を総括して、本誌に掲載する機会を得た。筆者が大学を出た 1960 年代、わが国は公害列島の様相を呈していた。陸、海、河川、大気は化学物質で汚れ、水俣病、イタイイタイ病、四日市喘息などの公害病がたて続き発生していた。筆者の研究は微生物による有機水銀の分解に始まり、ついでポリ塩化ビフェニル (PCB)、トリクロロエチレン (TCE)、テトラクロロエチレン (PCE) の微生物分解と続いた。微生物と環境汚染物質のかかわり合いを縦糸に、その分子機構の解明を横糸に研究を行ってきたが、本稿では筆者のこれまでの研究を総括し、研究概要を紹介したい。

2. 微生物による有機水銀化合物の分解

1960 年代はフェニル水銀が“いもち病”，エチル水銀が種子消毒などの農薬，塩化第二水銀は家庭消毒薬として使用されていた。すなわち，水銀は非選択的な殺菌剤として認識されていた。当時の発酵研究所の外村らは有機，無機水銀に顕著な耐性をもつ *Pseudomonas* sp. K62 株を分離し，1968 年，*Nature* 誌に論文を発表した¹⁾。筆者は大学を出た 1967 年，外村研に入ったが，この K62 株が何故，水銀に耐性なのか，そのメカニズムについて明らかにするよう言われた。²⁰³Hg でラベルしたフェニル水銀を K62 株と一緒に培養すると，K62 のカロチノイド色素により，培養液はきれいなピンク色になり，²⁰³Hg のほとんどは空気中に揮散してしまう。しかし，培養基の底に鉛色の沈殿が生じていることに気づいた。これをガンマシンチレーターで測定すると針が瞬時に振り切れた。このことで有機水銀も無機水銀も金属水銀に

還元分解されることが判明した²⁾。ガスクロマトグラフィで分析するとフェニル水銀からはベンゼン，メチル水銀からはメタン，エチル水銀からはエタンが検出された。次に水銀を入れて培養した K62 株の細胞抽出液から分解に関与する酵素の精製を行った。当時売り出されたばかりのセファデックス G150 でゲル濾過すると，分子量約 6.7 万の画分に塩化第二水銀を金属水銀へ還元する酵素活性が認められた。一方，フェニル水銀の分解には上記画分の他に，分子量約 1 万の画分を同時に入れる必要があった。その後，DEAE セファデックス，CM セファデックスを用いて酵素を精製した³⁻⁵⁾。前者のフラビン (FAD) 酵素を金属水銀遊離酵素 (metallic mercury releasing enzyme)，後者はシトクローム C と同じ画分に重なって溶出することから，cytochrome C-I と命名して論文を発表した⁶⁾。しかし，この命名は間違っていた。その後，手塚や Silver 等により詳細な研究が行われ，metallic mercury releasing enzyme は mercury reductase (MerA)，cytochrome C-I は mercurial lyase (MerB) と命名された。すなわち，MerB は有機水銀の C-Hg 結合を切断，炭化水素と二価無機水銀 (Hg^{2+}) が生じるが，MerA が Hg^{2+} を金属水銀 (Hg^0) に還元することが判明した。この反応には電子供与体として NADPH とチオグリコール酸のような SH 化合物の添加が必要である。

筆者は水銀の研究で博士号を取得し，1974 年，米国ウィスコンシン大学へ留学，魚肝での無機水銀のメチル化をしばらく研究した。当時ワシントン大学の Simon Silver と共同研究者はグラム陰性／陽性の諸種の水銀耐性菌から *mer* 遺伝子群を明らかにした。MerA 遺伝子，MerB 遺伝子以外にも水銀化合物の結合 (MerP) や運搬 (MerT) に関わるさまざまな遺伝子がクラスターを形成して存在することが明らかとなった。K62 株の *mer* 遺

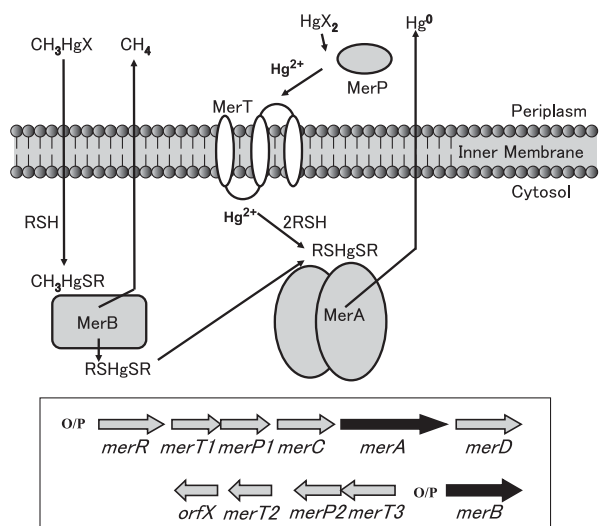


図1. 水俣湾海洋細菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 の有機水銀分解機構と遺伝子クラスター

伝子解析は当時摂南大学の清野／芳らにより解明された。K62株には6つのプラスミドが存在するが、28-kb プラスミド上に *mer* 遺伝子を含む2つのクラスターが存在することを明らかにした^{7,8)}。我々はその後、水俣湾の海洋細菌、*Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1株の *mer* 遺伝子を明らかにしたが、M-1株では *merA* と *merB* は染色体の別々の遺伝子クラスター上に存在する⁹⁾ (図1)。

3. 微生物によるポリ塩化ビフェニル (PCB) の分解と酵素系

ウィスコンシン大学ではハワイ沖で捕獲されたキハダマグロの肝臓を空輸してもらい、これをすり潰して無機水銀を加えるとメチル水銀の生成を示す大きなピークがガスクロで検出された¹⁰⁾。この研究と並行して当時、世界各地で深刻な環境汚染を引き起こしていたPCB分解菌の探索分離の研究を行った。最初、PCBを資化する細菌を探したが、一向に生えてこなかった。しかし、塩素のないビフェニルを資化する細菌は複数分離することができた。¹⁴Cでラベルした2,5,2'-trichlorobiphenylを使うと、グラム陰性 *Alcaligenes* sp. Y42株からさまざまな中間代謝物が認められた^{11,12)} (図2)。すなわち、ビフェニル資化菌は多くのPCB成分を共代謝 (cometabolism) により酸化分解することが分かった¹³⁻¹⁶⁾。PCBはビフェニルに塩素が1～10まで置換したものの総称で、209種類の化合物が存在する。そこで、塩素数の異なる諸種のPCBを購入し、その生分解性を調べた。その結果、以下のことが明らかになった。(1) PCBの分解は置換する塩素の数が多くなるほど分解されにくい、(2) 片方のリングのみに塩素の置換したPCBは同じ数、両リングに置換したものより分解されやすい、(3) 同じビフェニル環の2,6-位に塩素が置換したPCBは極めて分解が困難になる¹⁷⁾ (図3)、(4) 各種ビフェニル資化菌の間でPCB分解能力が大きく異なる。

1976年、千葉の微生物工業研究所 (発酵研究所から

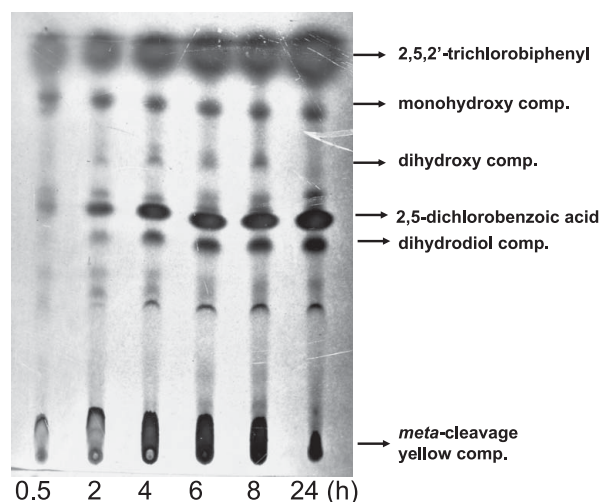


図2. 細菌による¹⁴C-2,5,2'-trichlorobiphenylの分解と中間代謝物質

改称) に帰った。当時、日本電子から売り出されたばかりのGC-MSを購入してもらい、 γ 線照射施設を改造した部屋に閉じこもって諸種PCBの分解経路の研究を行った。ビフェニル資化菌のビフェニル代謝は安息香酸までの酸化分解である¹⁸⁾ (図4)。PCBの分解も基本的には同じで、主経路は塩素置換の無いあるいは塩素が1個ついたリングの2,3-位への酸素分子の導入に始まり、ジヒドロジオール、フェニルカテコール、環開裂を経て、塩化安息香酸へ分解される。この過程で脱塩素化は生じない。この分解に関与する酵素はビフェニルジオキシゲナーゼ、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ、環開裂ジオキシゲナーゼ、ヒドロラーゼの4つの酵素である。しかし、PCB成分の塩素の置換数と置換位置の違いにより、ジヒドロジオールやジヒドロキシ化合物で反応が止まったり、環開裂黄色物質が蓄積したりする。また、ビフェニル資化菌の違い、すなわちそれぞれのビフェニル資化菌の酵素の特異性の違いで代謝経路が異なる場合も認められた。例えば、*Alcaligenes* sp. Y42株では2,4,6-trichlorobiphenylを全く分解できないが、*Rhodococcus* sp. P6株は同化合物を速やかにジヒドロキシ化合物に変え、さらにトリヒドロキシ化合物を蓄積する。また、後述するが、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株は2,5,4'-trichlorobiphenylをメタ開裂黄色化合物に分解するが、*Burkholderia xenovorans* LB400株は同化合物を3,4-dihydroxy-2,5,4'-trichlorobiphenylへと変換し、この化合物がdead end化合物となる¹⁹⁾。

4. ビフェニル/PCB分解遺伝子の単離と解析

1980年、イリノイ大学シカゴ校のチャクラバーティ研究室に客員准教授として1年半、環境微生物の遺伝子工学の研究をする機会を得た。Chakrabarty教授は1980年、遺伝子操作した微生物で初めて特許を取得したチャクラバーティ裁判で有名であるが、これはわが国でも大きなニュースとなった。この研究室では100-kbを超える巨大分解系プラスミドの抽出に苦労したが、トルエン資化菌とサリチル酸資化菌をケモスタットで混合培養す

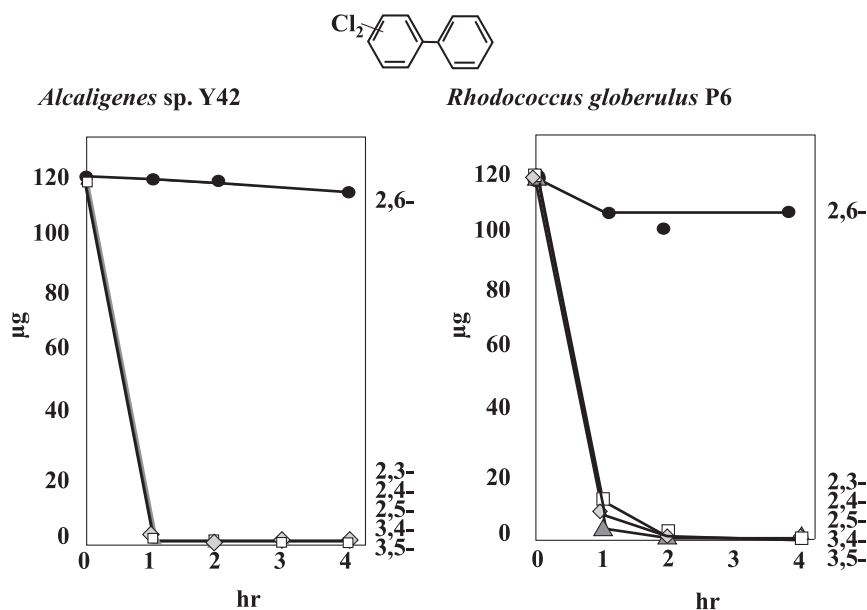


図 3. 細菌による片方のリングに 2 個塩素置換した PCB の分解

***bph* gene cluster**

<i>bphR</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>orf3</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>X0</i>	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X3</i>	<i>D</i>
-------------	-----------	-----------	-------------	-----------	-----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

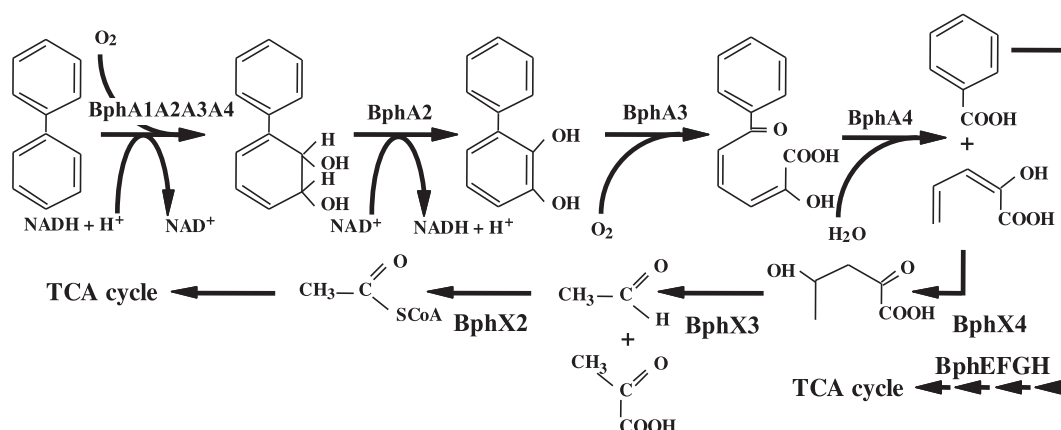


図 4. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニル代謝経路, 酵素及び遺伝子クラスター

BphA1: biphenyl dioxygenase terminal large subunit; BphA2: biphenyl dioxygenase terminal small subunit; BphA3: ferredoxin; BphA4: ferredoxin reductase; BphB: dihydrodiol dehydrogenase; BphC: 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase; BphD: 2-hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoic acid hydrolase; BphX0: glutathione S-transferase; BphX1: 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase; BphX2: acetaldehyde dehydrogenase; BphX3: 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase.

るとトルエンにもサリチル酸にも生育してくる株が得られた。調べてみるとこの株にはTOLプラスミド(pWW0)の一部(57-kb)がSALプラスミド(81-kb)に融合した巨大プラスミド(pKF439; 138-kb)が存在した²⁰⁾。後に津田らの研究からこれがトルエン代謝遺伝子を含むトランスポゾンTn4651(56-kb)であることが判明した²¹⁾。シカゴではビフェニル/PCB分解遺伝子のクローニングはできなかったが、つくばに帰った1985年、*P. pseudoalcaligenes* KF707からゲノムのショットガンクローニングによって成功した²²⁾。制限酵素XhoIでKF707株のゲノムDNAを切断、ドイツで開発された広宿主域ベクターpKT230のXhoIサイトに導入、宿

主として緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1161) を用いた。生育した形質転換体にピフェニル蒸気をあてると1個だけ黄色になるコロニーが出現した。すなわち、得られた6.8-kb DNA上にピフェニルジオキシゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、環開裂ジオキシゲナーゼ遺伝子が存在したわけである。この遺伝子を *bph* と命名した。その後は遺伝子の解析と全 *bph* 遺伝子の取得に没頭した。制御遺伝子を含む13の遺伝子が一つのクラスターを形成していた²³⁻³¹⁾ (図4)。ピフェニルジオキシゲナーゼは多成分酵素で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

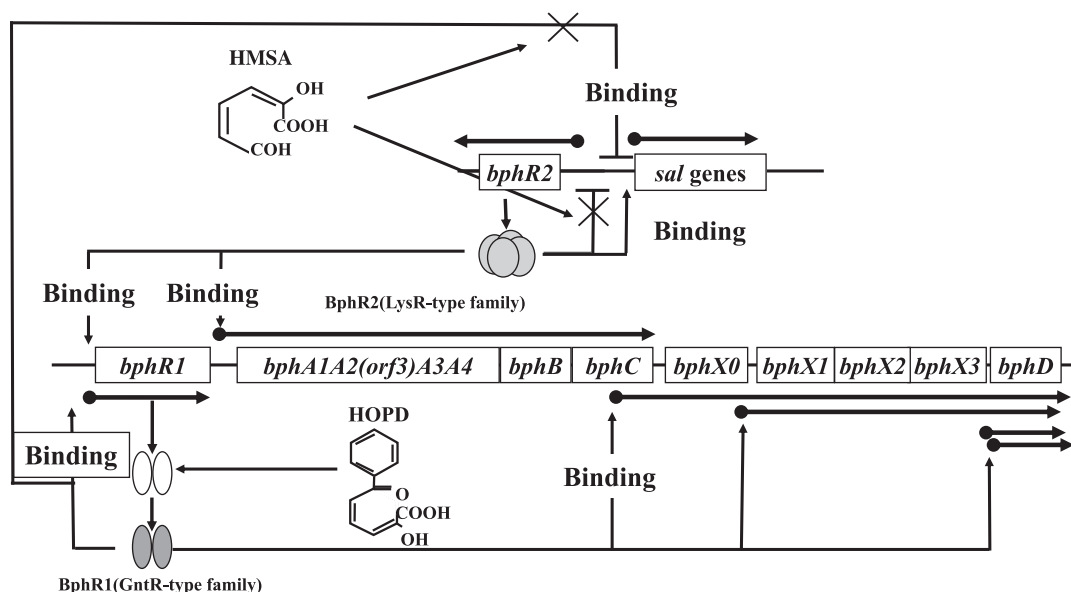


図5. *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 及び *sal* 遺伝子クラスターの発現調節

sal 遺伝子群はサリチル酸のアセチル CoA とビルビン酸への代謝をコードし、*bph* 遺伝子群の約 6.6-kb 下流に存在する。HOPD, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate; HMSA, 2-hydroxymuconate semialdehyde.

還元酵素 (*bphA4*) から構成されること、フェレドキシンとフェレドキシン還元酵素は NADH からの電子伝達に関与し、末端ジオキシゲナーゼを還元すること、同酵素は酸素分子を活性化、ついで基質であるビフェニル/PCB に酸素が導入される。*bphB* はジヒドロジオールデヒドロゲナーゼをコードし、*bphC* は環開裂ジオキシゲナーゼ^{33,34)}を、*bphD* はヒドロラーゼをコードすることが明らかとなった。KF707 の *bph* 遺伝子の *bphC* と *bphD* の間には *bphX0X1X2X3* と名付けた 4 つの遺伝子が存在した。*bphX1X2X3* は環開裂化合物が加水分解されてできる安息香酸と 2-hydroxy-2,4-pentadienoic acid のうち後者をアセチル CoA へ代謝する遺伝子群である。

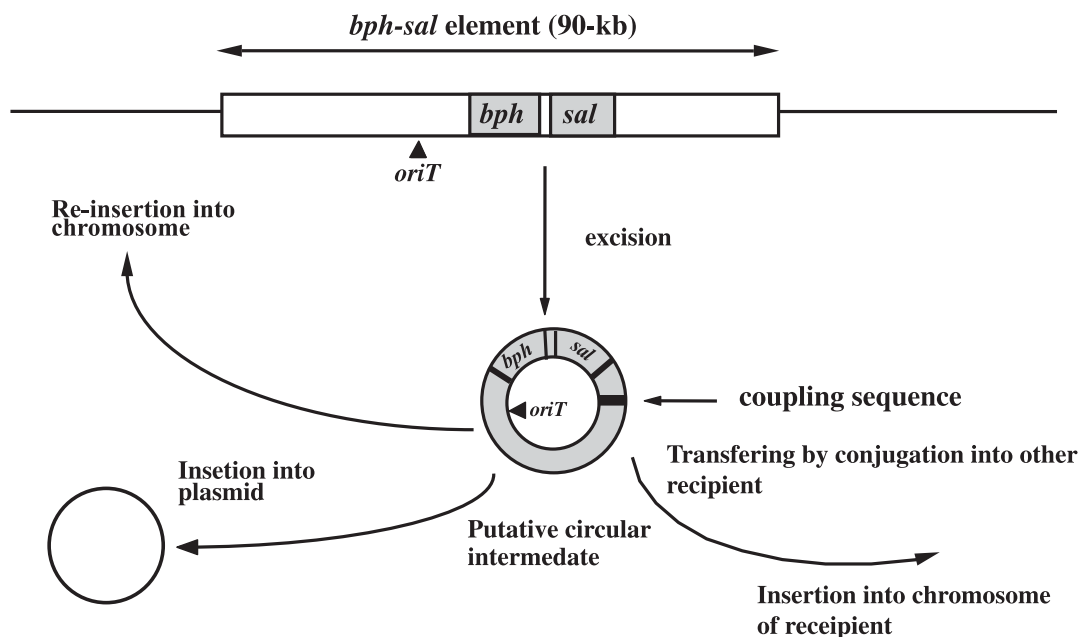
KF707 株の *bph* 遺伝子の発現調節は極めて複雑である。本株の *bph* 遺伝子クラスターの約 6-kb 下流にサリチル酸代謝 *sal* 遺伝子群が存在する。*bph* と *sal* 遺伝子クラスターは相互に関連して制御されている。*bphR1* は *bphA1* の上流に存在し、*bphR2* は *sal* 遺伝子の上流に存在する。BphR1 タンパク質は GntR ファミリーであるが、BphR2 タンパク質は LysR ファミリーに属し、ナフタレン代謝の調節遺伝子である NahR と 81% の相同性を示す。ゲルシフトアッセイとフットプリンティング解析から図 5 に示す *bph* 及び *sal* 遺伝子群の発現調節機構を提案した。ビフェニル及びサリチル酸が存在しない時は少量の BphR2 は自身のオペレーターに結合し、*bphR2* の転写を抑制する。同時に少量生成した BphR1 は *sal* オペレーターに結合して、*sal* 遺伝子の転写を抑制する。この段階で *bph* 及び *sal* 遺伝子の転写は極めて低い。ビフェニルが存在すると BphR2 タンパク質は *bphR1* と *bphABC* のオペレーターに結合して、その転写を促進する。その結果、大量のビフェニル環開裂黄色物質が生産され、*bphR1* の転写が起こり、その産物である BphR1 が *bphR1* 自身と *bphX* 及び *bphD* の転写を活性化する。サリチル酸の存在下では BphR1 は *sal* 遺

伝子群を抑制し続けるが、サリチル酸からの環開裂黄色物質 (HNSA) が生成すると、BphR1 は *sal* オペレーターから離れ、*sal* 遺伝子群の抑制が解除されるとともに、*bphR2* の転写が起きる。大量の BphR2 タンパク質は HMSA と会合し *sal* オペレーターに結合すると *sal* 遺伝子群の転写が開始される。極めて複雑な転写機構であるが、詳細は文献を参照願いたい。³⁵⁻³⁷⁾

KF707 株以外に *Sphingomonas* sp. Q1 から *bphC* 遺伝子³⁸⁾、*Pseudomonas putida* KF715 株 から *bphRA1A2A3A4BCD* 遺伝子をクローン化した³⁹⁾が、KF715 株の *bph* 遺伝子クラスターには *bphX* 領域の大部分が欠失していた³⁹⁾。

5. *bph-sal* エLEMENT

P. putida KF715 株を *Pseudomonas putida* AC30 株と混合培養すると極めて高頻度にビフェニル/サリチル酸資化性 AC30 株が取得できた。得られた AC30Bph⁺Sal⁺ 株を供与株、*Pseudomonas putida* KT2440 株を受容菌として再度、接合伝達すると高頻度に KT2440Bph⁺Sal⁺ 株が得られた。これらの株を調べると、染色体には *bph/sal* 遺伝子群を含む 90-kb の巨大な DNA 分子が存在した。すなわち、この動く巨大 DNA 分子は接合伝達型トランスポゾンとして機能することが判明した⁴⁰⁾。これを *bph-sal* エLEMENT と命名した。*bph-sal* エLEMENT は KF715 株の染色体上に存在するが、受容菌との接触により染色体から切り出され環状となり、接合型プラスミドと同様に一本鎖が受容菌に接合伝達する (図 6)。受容菌では二本鎖に複製されインテグラーゼの働きで再度染色体に挿入する。KF715 株の *bph-sal* エLEMENT の接合伝達はしばらく安定に機能したが、繰り返し培養することでその接合頻度は低下し、接合伝達が不能で、ビフェニル、サリチル酸の資化能をも無くした変異株が多数取

図6. 接合トランスポゾン *bph-sal* エLEMENTの染色体からの切出しと転移

得された。この *bph-sal* エLEMENTには少なくとも3つの異なる挿入配列 (IS), 2種類のグループ II イントロン, *P. putida* B13 株のクロロカテコール代謝遺伝子をコードする接合型トランスポゾン *clc* エLEMENT⁴¹⁾ と高い相同性を示すインテグラーゼ遺伝子など, ゲノムの再編成に関与する数多くの遺伝子が存在した。これが *bph-sal* エLEMENTの不安定性に関与しており, その不安定さは大腸菌で作成されたクローンについても観察された。

筆者が先に北九州のビフェニル工場の土壌から分離した諸種のビフェニル資化菌について *bph-sal* エLEMENTの有無を検証した。KF715を含む12株のKFシリーズ株の染色体DNAをレアカッター制限酵素 *Spe* I で切断し, パルスフィールド電気泳動に供した。これらの断片についてサザン解析を行った。KF715株の *bphA1*, *salA*, *int* (インテグラーゼ遺伝子) DNAをプローブとして用いると12株中の8株においてそれぞれの *Spe* I 断片に上記3つの遺伝子と交雑した。このことは *bph-sal* エLEMENTが12株中, 8株のゲノムに存在することを示す。つまり, この接合型トランスポゾンが広く土壌細菌間で動いていることが判明した。しかし, KF715株を除いて7株いずれも接合伝達能が認められず, 一部はサリチル酸資化能もなかった。現在, (独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) との共同研究により, これらのビフェニル資化菌についてゲノム解読を行っているが, 諸種の菌株の *bph-sal* エLEMENTがいかなる再編成を受けているのか, 興味深い。

6. オキシゲナーゼの進化分子工学

ビフェニル資化菌はわが国はもとより, 世界各国で分離された。さまざまなグラム陰性菌, グラム陽性菌を含むが, *bph* 遺伝子は染色体, プラスミド, あるいは上記の接合型トランスポゾンに存在している。これらのビ

フェニル資化菌はビフェニル代謝酵素により低塩素化PCBを共代謝して塩化安息香酸へと酸化分解する。*P. pseudoalcaligenes* KF707株は塩素数1~3のPCBを良く分解する。しかし, 米国General Electric社 (GE社) で分離された *Burkholderia xenovorans* LB400株は塩素数4~6のPCBに対しても分解が生起する。調べてみるとKF707株は4,4'-dichlorobiphenyl (4,4'-CB), 2,5,4'-CBに対しては4'-リングの2',3'-位に酸素分子を導入して前者からは4-塩化安息香酸, 後者からは環開裂黄色化合物を蓄積した。しかし, 2,5,2',5'-CBをアタックできない。一方, LB400株は4,4'-CBをほとんど分解しないが, 2,5,4'-CBと2,5,2',5'-CBからは2,5-リングの3,4'-位に酸素分子を導入して3,4'-ジヒドロジオール化合物を生じ, これがdead end産物となる¹⁹⁾。このことは両菌株のビフェニルジオキシゲナーゼは上記3PCB成分に対して異なる分子認識をしているわけである。これらの結果からKF707株とLB400株の酵素は大きく異なることが予想された。1992年, 我々はKF707株の *bph* 遺伝子の塩基配列をJ. Bio. Chem. に発表²³⁾, 少し遅れてLB400株の *bph* 遺伝子の塩基配列はJ. Bacteriol. に発表された⁴²⁾。驚いたことに両菌株の *bph* 遺伝子は極めて類似していた (図6)。すなわち, 最も大きな違いは末端ジオキシゲナーゼの大サブユニット (BphA1) に認められた。460アミノ酸のうち, 20アミノ酸が異なっていた (KF707BphA1は459アミノ酸で1アミノ酸欠失を含む)。小サブユニット (BphA2) はアミノ酸が一個のみ異なっており, フェレドキシン (BphA3) およびフェレドキシン還元酵素 (BphA4) は共に100%同一であった³¹⁾。すなわち, KF707株とKB400株のPCB分解能の違いはBphA1の20のアミノ酸の違いに起因していた⁴³⁾。1994年, StemmerはDNAシャフリングによる遺伝子の進化分子工学をNature誌に発表した⁴⁴⁾。我々はこの手法を両菌株の *bphA1* 遺伝子に適用した⁴⁵⁾。

まず, KF707株とLB400株のゲノムから *bphA1*-DNA

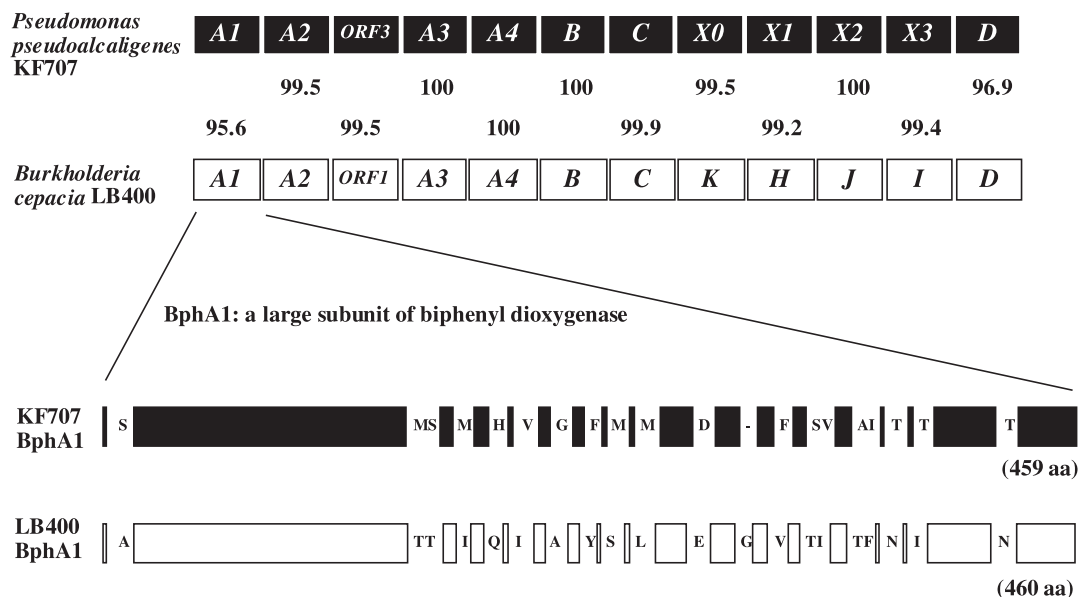


図7. *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *Burkholderia xenovorans* LB400 株の *bph* 遺伝子クラスターの比較とビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニットにおけるアミノ酸配列の比較

を PCR で増幅した。次いでそれぞれの *bphA1*-DNA を DNaseI でランダムに切断、ポリアクリルアミド電気泳動を行った。20 ~ 50-bp 付近の DNA をそれぞれゲルより切出し、精製した後混合した。この DNA 混合物に対してプライマーレス PCR を行った。この過程で KF707-*bphA1*-DNA と LB400-*bphA1*-DNA の間で相互にプライミングし、キメラ *bphA1*-DNA 断片が生成した。次いで、*bphA1*-DNA の 5' および 3' 末端のプライマーを用いて再度 PCR を行うことで、1.4-kb のキメラ *bphA1*-DNA が取得できた。これらの *bphA1*-DNA を *bphA2*-*bphA3*-*bphA4*-*bphB*-*bphC* の上流に挿入し、*Escherichia coli* で発現させ、ビフェニルから黄色化合物をつくる *E. coli* 形質転換体を得た⁴⁶⁾。次に野生株のビフェニルジオキシゲナーゼを凌駕する進化した酵素を生産する形質転換体を選抜した。KF707 株の BphABC 酵素はジフェニルメタンに作用し、環開裂黄色化合物を蓄積するが、LB400 株酵素は同化合物を全く分解できない。一方、LB400BphABC 酵素はジベンゾフランから黄色化合物を蓄積するが、KF707 株の酵素は本化合物にアタックできない。そこでジフェニルメタンとジベンゾフランの両化合物から環開裂黄色化合物を蓄積する形質転換コロニーを探した。結果、100 を超える進化酵素発現株が得られた^{45,47-49)} (図8)。両野生株のビフェニルジオキシゲナーゼはインドールからインジゴを生成できないが、上記選抜株にはインジゴを生成する株が存在していた。進化株について両菌株の BphA1 で異なる 20 のアミノ酸について調べた結果、全ての進化株では KF707 株と LB400 株の BphA1 間で異なる 20 アミノ酸がランダムに相互に置換していた (図9)。図10に代表的な 8 進化株についてビフェニル (BP)、4-chlorobiphenyl (4-CB)、4-methylbiphenyl (4-MB)、diphenylmethane (DM)、dibenzofuran (DF)、2,2'-dichlorobiphenyl (2,2'-CB)、2,5,4'-trichlorobiphenyl (2,5,4'-CB)、4,4'-dichlorobiphenyl (4,4'-CB) の分解特性について調べた。まず、KF707 株

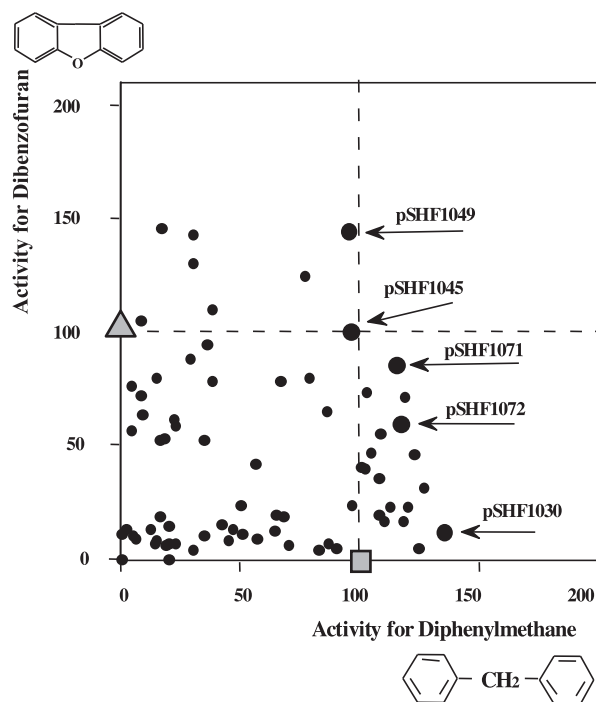


図8. DNA シャフリングにより進化ビフェニルジオキシゲナーゼのスクリーニング

■: KF707 株ビフェニルジオキシゲナーゼ、ジフェニルメタンのみに活性; ▲: LB400 株ビフェニルジオキシゲナーゼ、ジベンゾフランのみに活性; ●: 進化ジオキシゲナーゼ: 両化合物に活性; ●: インドールよりインジゴ生成

と LB400 株のビフェニルジオキシゲナーゼはビフェニルを除く 7 化合物に対して異なる分解特性を示す。一方、進化ビフェニルジオキシゲナーゼを発現する *E. coli* 株中には親株酵素を凌駕する高い分解能を示すもの、広い基質特異性を示すものが認められた。また、pSHF1075 を保有する株は 2,2'-CB のみに高い活性を示

	237	238	247	255	258	277	268	283	285	303	313	320	325	326	335	336	338	341	376
KF707	M	S	M	H	V	G	F	M	M	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
LB400	T	T	I	Q	I	A	Y	S	L	E	G	V	T	I	T	F	N	I	N
pSHF1029	T	T	I	H	V	A	F	M	M	E	G	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1039	M	S	I	Q	I	A	F	M	M	E	G	V	T	I	A	I	T	T	T
pSHF1043	T	T	I	Q	I	G	F	M	M	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1045	M	S	M	Q	I	G	Y	M	M	E	-	F	S	V	A	I	T	T	N
pSHF1049	M	S	I	Q	I	A	F	M	M	E	G	F	T	I	A	I	T	T	N
pSHF1065	T	T	I	Q	I	A	F	S	L	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1072	M	S	M	Q	I	A	Y	M	M	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1075	T	T	M	H	V	G	Y	S	L	E	-	V	T	I	T	F	N	I	N

図 9. 進化オキシゲナーゼ大サブユニットの amino 酸配列
KF707-BphA1 と LB400-BphA1 で異なる 20 アミノ酸のシャフリングを示す。

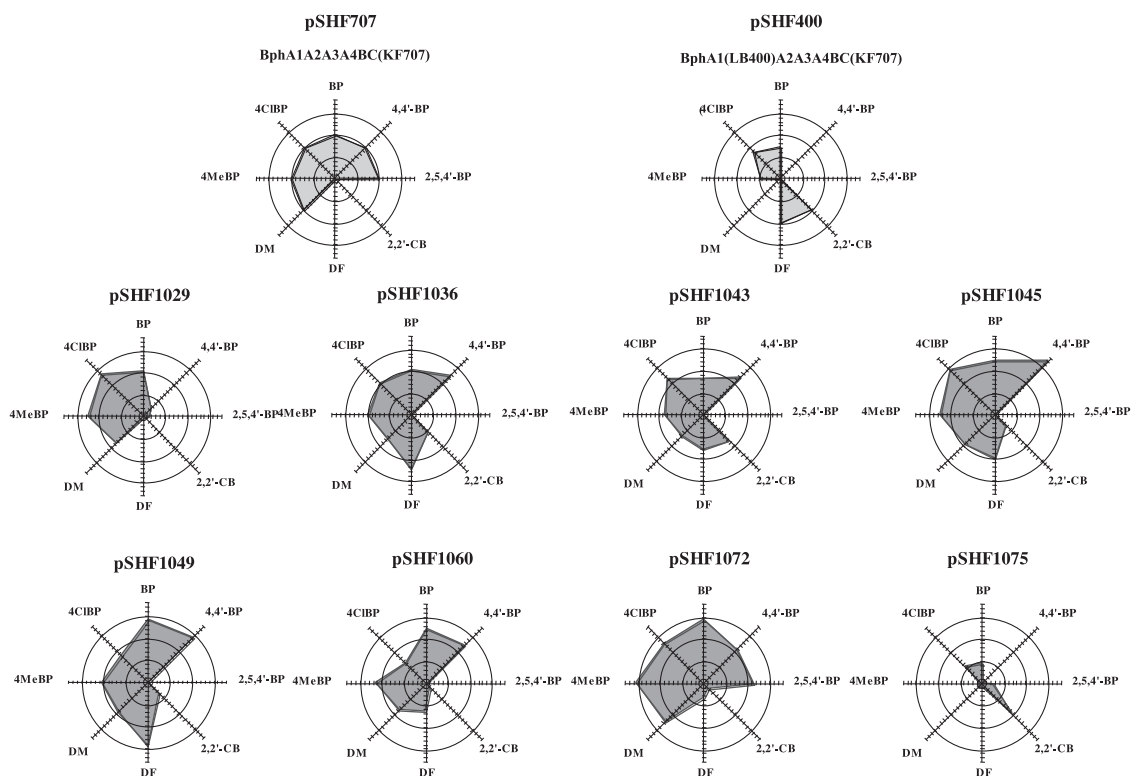


図 10. 進化オキシゲナーゼによるビフェニル関連化合物の分解特性
進化 BphA1-BphA2A3A4-BphB-BphC を発現する *E. coli* 株による環開裂黄色化合物の生成を測定。

した⁴⁵⁾。

進化分子工学手法には DNA シャフリング以外にもランダムな配列をもつプライマーを用いて目的遺伝子に変異を導入する方法があるが、この手法で得られた BphA1 は KF707-BphA1 の Thr-376 を Val に変えることで、親株酵素がアタックできないダイオキシン (塩素 0) に対

する分解能が出現した⁵⁰⁾ (図 11)。KF707 株の BphA1 は未だ X 線解析ができていないが、ナフタレンジオキシゲナーゼをベースにホモロジーモデリングを行った⁵¹⁾。この情報を基に基質結合部位に関与すると考えられるアミノ酸を部位特異的に変えることで、2,5,4'-CB の 2,5- リングの 3,4- 位に OH を導入する変異酵素, Ile335Phe 及

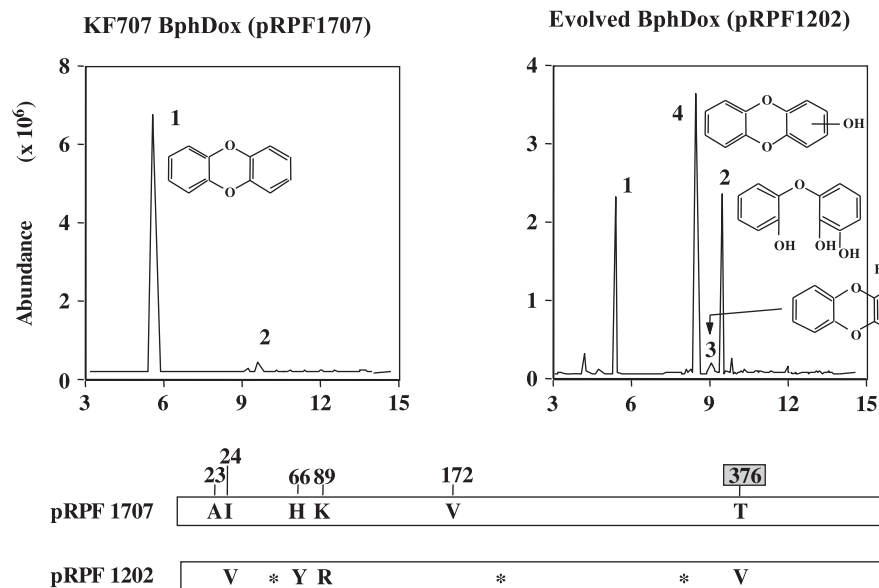


図 11. ランダムプライミング組換え手法によって得られた T376V 変異ジオキシゲナーゼによるダイオキシンの代謝
T376V 以外の変異はこの代謝に影響しなかった。

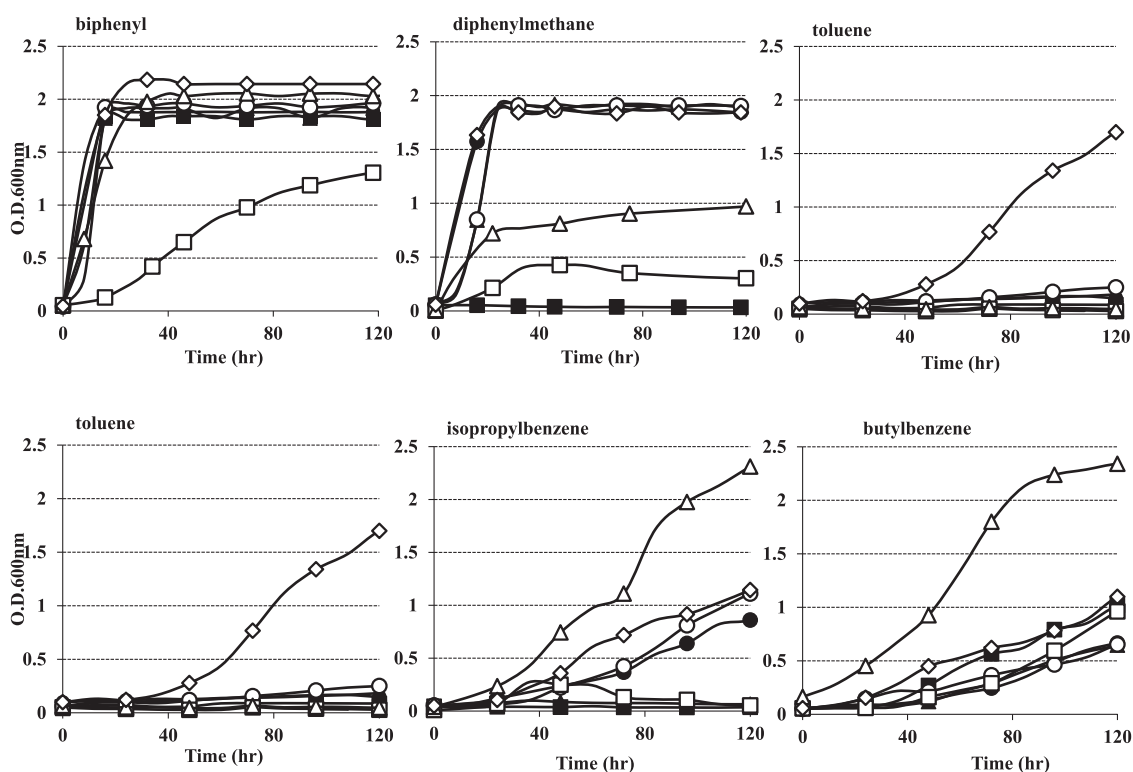


図 12. 進化 *bphA1* 遺伝子を KF707 株染色体野生型 *bphA1* と入れ替えた進化株による諸種芳香族化合物の資化特性

● : *P. pseudoalcaligenes* KF707 ; ■ : *B. xenovorans* LB400 ; ○ : KF707-DC1045 ; □ : KF707-DC1046 ; △ : KF707-DC1049 ; ◇ : KF707-DC1072

び Phe377Leu などが得られた⁵¹⁾。上記進化 *bphA1* を KF707 株野生株の *bphA1* と置換した進化株を作成した⁵²⁾。このため、進化 *bphA1* を *bphR* と *bphA2A3A4* 遺伝子に挟み込み自殺ベクターにつないで KF707 株に導入した。相同組換えによって得られた進化株の生育特性を図 12 に示す。その中には 1072 株のように親株が資化できないトルエンやエチルベンゼンに生育できる進化

株、1049 株のようにイソプロピルベンゼン、エチルベンゼン及びブチルベンゼンに高い生育を示すものなどが得られた。

上記の *bphA1* 遺伝子を対象とした進化工学によるビフェニルジオキシゲナーゼの進化に先だって、サブユニットを交換したハイブリッドジオキシゲナーゼを作成した。本研究では上記 KF707 株のビフェニルジオキシ

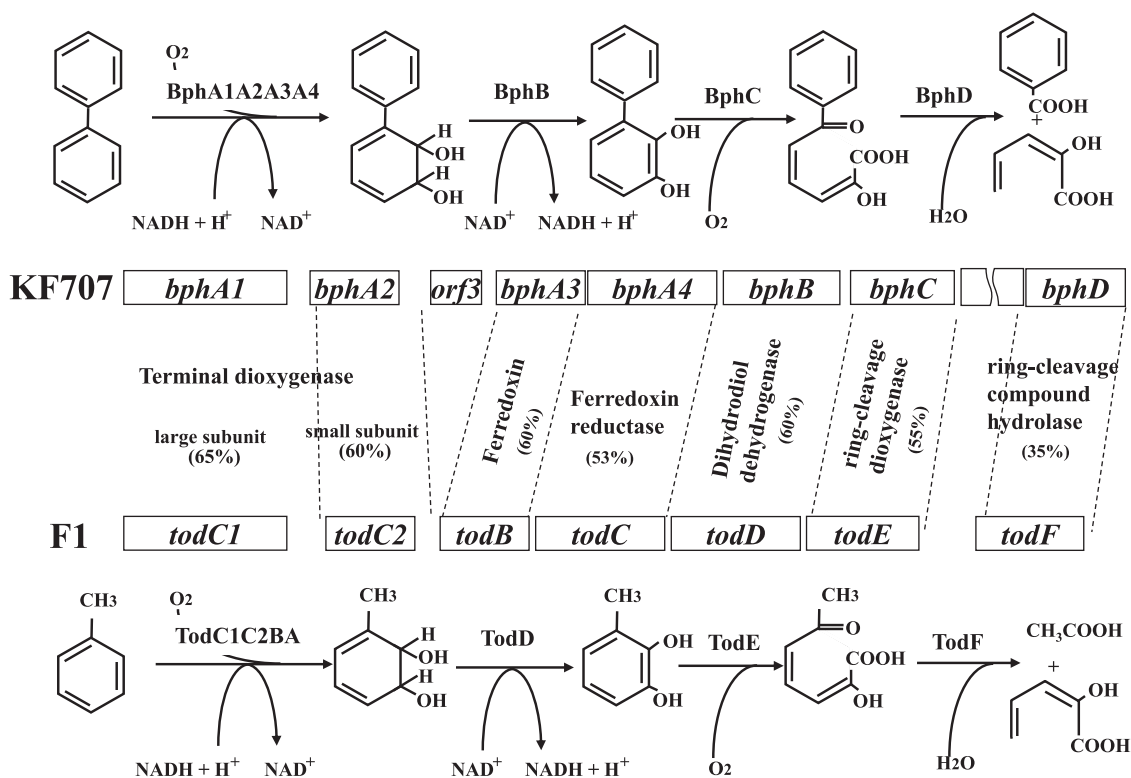


図 13. *P. pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニル代謝 *bph* 遺伝子群と *P. putida* F1 株のトルエン代謝 *tod* 遺伝子群それぞれの遺伝子産物のアミノ酸配列の類似性が比較されている。

	Terminal dioxygenase large subunit	Terminal dioxygenase small subunit	Ferredoxin	Ferredoxin reductase
pJHF108	<i>bphA1</i>	<i>bphA2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>
pJHF3051	<i>todC1</i>	<i>todC2</i>	<i>todB</i>	<i>todA</i>
pJHF101	<i>todC1</i>	<i>bphA2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>
pJHF201	<i>bphA1</i>	<i>todC2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>
pJHF301	<i>todC1</i>	<i>todC2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>

図 14. ビフェニルジオキシゲナーゼとトルエンジオキシゲナーゼのサブユニット間相互置換によるハイブリッドジオキシゲナーゼの構築

E. coli (*todC1-bphA2-bphA3-bphA4*) 発現株はトリクロロエチレンを効率よく分解した。

ゲナーゼの *bpA1-bphA2-bphA3-bphA4* 遺伝子クラスターとトルエン酸化菌 *Pseudomonas putida* F1 株のトルエンジオキシゲナーゼの *todC1-todC2-todB-todA* 遺伝子クラスター (図 13) の各遺伝子を相互に交換したハイブリッドジオキシゲナーゼを構築し, *E. coli* で発現させた⁵³⁻⁵⁵⁾ (図 14)。これらのサブユニット遺伝子を相互置換した酵素のうち, TodC1-BphA2-BphA3-BphA4 を発

現する *E. coli* はトルエンとビフェニルに酸素添加活性を示す外, 土壌, 地下水汚染で深刻な環境汚染を引き起しているトリクロロエチレン (TCE) を極めて効率よく分解することが判明した^{56,57)}。そこで *todC1* 遺伝子を *bphR* と *bphA2A3A4* に挟み込んで, これを自殺ベクターに入れ, KF707 株に導入した。その結果, 相同組換えにより KF707 株の染色体に存在する *bphA1* が *todC1*

と置換したダブルクロスオーバー株が得られた。このハイブリッド株は親株 KF707 株と F1 株を凌駕する TCE 分解能が認められた⁵⁸⁻⁶³⁾ (図 15)。

7. 進化ジオキシゲナーゼを利用した複素環とベンゼン環を分子内にもつ諸種化合物の変換

上述した進化ジオキシゲナーゼのうち、広い基質特異性を有する BphDox-1072 を発現する *E. coli* を用

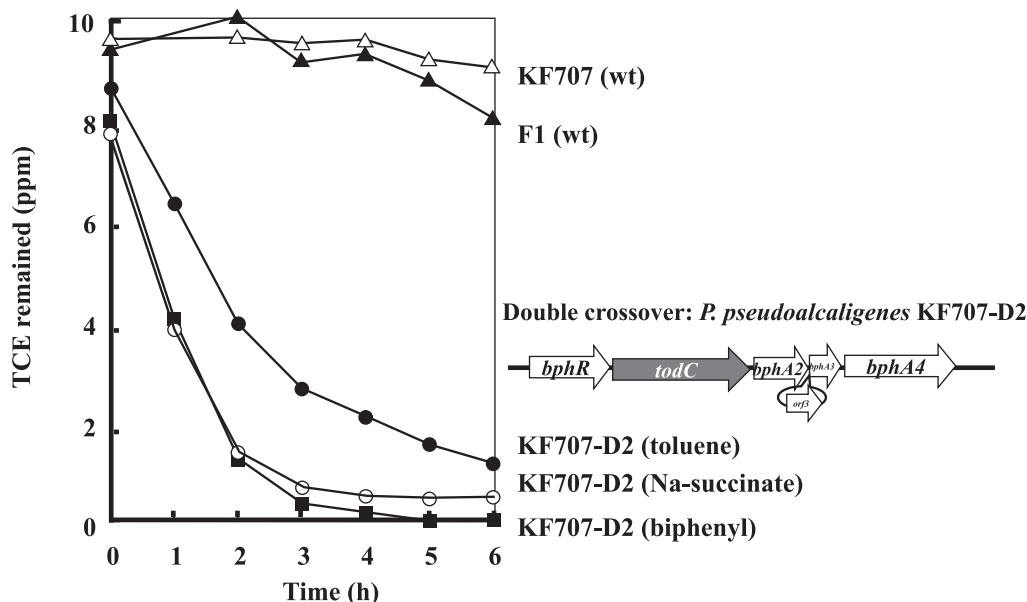


図 15. TodC1-BphA2-BphA3-BphA4 ハイブリッドジオキシゲナーゼを発現する KF707 進化株によるトリクロロエチレン (TCE) の分解
todC1 遺伝子を KF707 株染色体 *bphA1* と置換したハイブリッド株 KF707-D2 株はトルエン、コハク酸、ビフェニルにそれぞれ生育させた。KF707 (wt) : ビフェニル資化菌 *P. pseudomonas* KF707 野生株, F1 (wt) : トルエン資化菌 *P. putida* F1 野生株

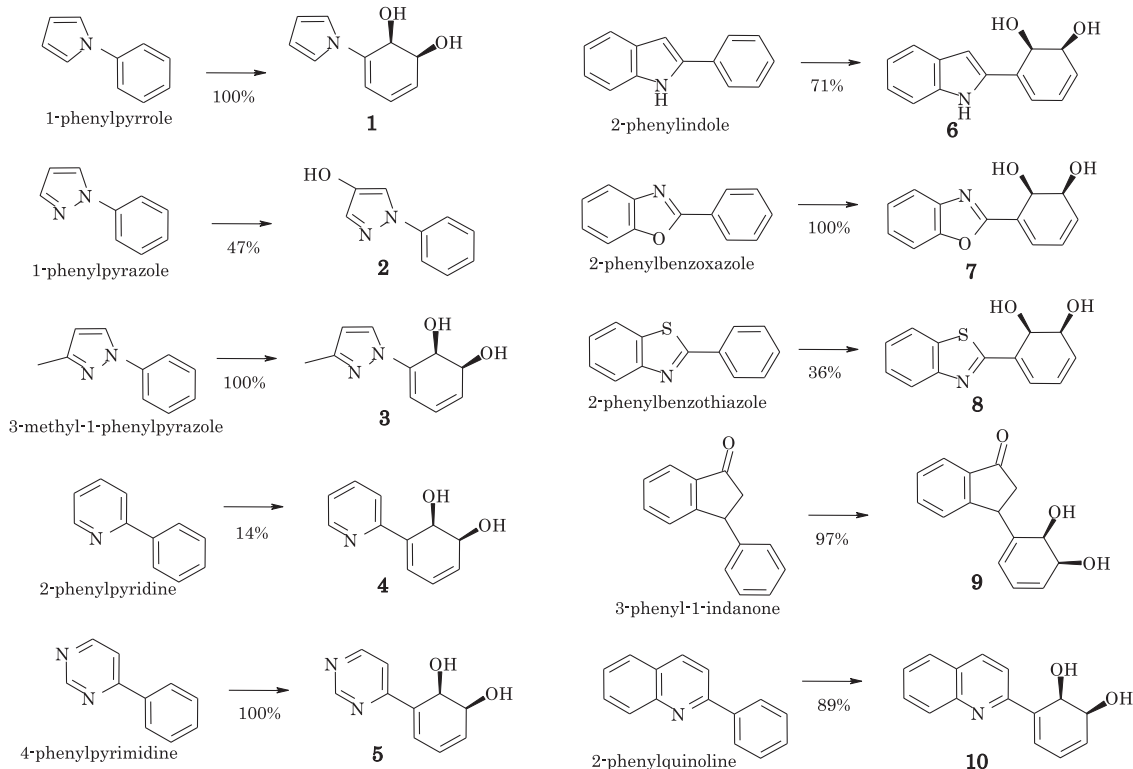


図 16. 進化ジオキシゲナーゼ (進化 BphA1-BphA2-BphA3-BphA4) を発現する *E. coli* 株による諸種芳香族化合物からのジヒドロジオールの生成

いてさまざまな芳香族化合物に対して水酸基の導入を行った^{45,47)}。BphDox-1072の大サブユニットの活性中心周辺基質結合領域の体積を測定した。結果、野生株 707-BphA1 の体積 $82.27 \text{ \AA}^3$ に比べて 1072-BphA1 では $101.25 \text{ \AA}^3$ と計算され、BphDox-1072 酵素ではかさ高い芳香族化合物と結合して分子状酸素を導入できることが推測された。事実、本進化酵素を発現する *E. coli* (BphDox-1072) 株は複素環を含む多くの芳香族化合物に分子状酸素を導入した⁶⁴⁻⁶⁹⁾ (図 16)。すなわち、*E. coli* (BphA1-[1072]-BphA2-BphA3-BpA4) を用いると 1-phenylpyrrole, 3-methyl-1-phenylpyrazole, 4-phenylpyrimidine, 2-phenylindole, 2-phenylbenzoxazole, 3-phenyl-1-indanone, 2-phenylquinoline などから極めて効率よくジヒドロジオール化合物が得られた。効率は落ちるが、2-phenylpyridine や 2-phenylbenzothiazole からジヒドロジオール化合物が得られた⁷⁰⁻⁷²⁾。また、1-phenylpyrazole からはピラゾール環に水酸基が一個ついた化合物が得られた。次いで *E. coli* (BphA1-[1072]-BphA2-BphA3-BpA4-BphB) を用いると上記、ジヒドロジオール化合物はジオール化合物に変換した。また、flavone, 6-hydroxyflavone, flavonone, 7-hydroxyisoflavone, (trans)-chalcone などのフラボン類からもジオール体が生成した。さらに *E. coli* (BphA1-[1072]-BphA2-BphA3-BpA4-BphB-BphC) を用いるとビフェニルは環開裂黄色化合物が生成するが、この反応にアンモニアを過剰添加すると、興味深いことに窒素原子を取込んで環が閉環し、ピコリン酸が生成した。この系を用いてさまざまなピコリン酸が得られた⁷³⁾ (図 17)。

水酸基の導入は通常の有機化学合成では困難な場合が多く、進化したジオキシゲナーゼを利用することで、これまでに数多くの新規な化合物をつくることに成功した。これらの化合物にはラットの脳ホモジェネートに対して抗酸化作用を示すものが存在し、フリーラジカルによる脂質過酸化抑制効果が認められた⁷⁴⁾。また、上記の多くの化合物が創薬の中間体としての利用が期待できる。

8. 脱ハロゲン呼吸細菌によるクロロエテン類の脱塩素化

半導体の脱脂洗浄などに使用されたトリクロロエチレン (TCE) やドライクリーニングの洗浄剤などに使用されたテトラクロロエチレン (PCE) など塩素系有機溶媒による土壌、地下水汚染は世界的な広がりをみせ、深刻な環境汚染物質となって久しい。PCE や TCE から脱塩素化した *cis*-ジクロロエチレン (*cis*-DCE) あるいは *trans*-DCE, さらにビニルクロライド (VC) も広く環境を汚染している。このうち、VC は発がん性物質として知られている。また、PCE は好気性微生物による酸化分解は困難でその研究例はほとんど報告されていない。これらの塩素系有機溶媒を最終電子受容体として脱塩素化する偏性嫌気性細菌はこの 20 数年にわたり、広く分離され積極的に研究されてきた。このような脱ハロゲン呼吸細菌は *Chloroflexi* および *Firmicutes* 門、 ϵ - および γ -proteobacteria など広く分布している。PCE および TCE を脱塩素化する菌として、*Dehalobacter*, *Dehalobium*, *Dehalococcoides*, *Desulfitobacterium*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Sulfurospirillum* が報告されているが、DCE や VC を脱塩素化できるのは *Dehalococcoides* のみである^{74,75)}。

九大発酵化学研究室では PCE 汚染土壌から *Desulfitobacterium hafniense* Y51 株を分離し、その遺伝性化学的研究を行った⁷⁶⁾。本細菌は PCE を *cis*-DCE に脱塩素化呼吸により増殖するほか、フマル酸、チオ硫酸、亜硫酸、硝酸、亜硝酸、ジメチルスルフォキシド、Fe(III) などを最終電子伝達体として呼吸し増殖できる極めて多彩な能力を示す。我々はまず、Y51 株から PCE デハロゲナーゼの精製を行った。本酵素は極めて酸素感受性で空气中に 10 数時間さらすとほとんど失活するため、その精製は困難を極めたが、0.2% の収率で分子量 58-kDa のタンパク質を精製することができた。この N 末端アミノ酸配列から PCE デハロゲナーゼ遺伝子 (*pceA*) のクローニングに成功した^{77,78)}。*pceA* 遺伝子の下流には膜貫通型の小タンパク質遺伝子 (*pceB*) が存在した。

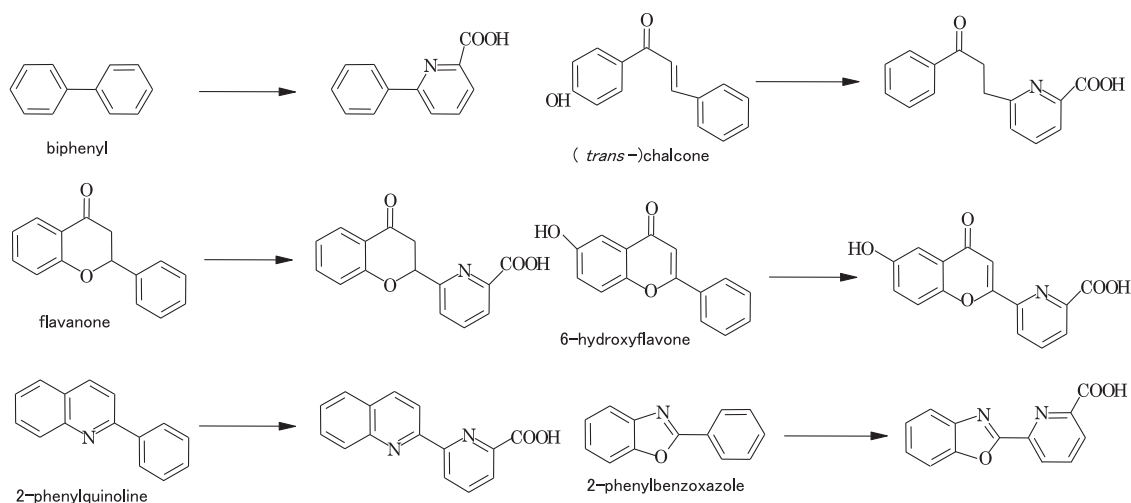


図 17. 進化ジオキシゲナーゼ、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼおよび環開裂ジオキシゲナーゼ (進化 BphA1-BphA2-BphA3-BpA4-BphB-BphC) を発現する *E. coli* 株による諸種芳香族化合物からのピコリン酸の生成

pceB の下流には機能不明な *pceC*, および *pceT* が存在した。これらの *pceABCT* 遺伝子クラスターの upstream と downstream には 2 つの相同な IS が存在し、従ってこの *pce* 遺伝子クラスターはトランスポゾンとして機能することが判明した⁷⁹⁾ (図 18)。PCE デハロゲナーゼの構造は N 末端に 39 アミノ酸からなる Tat (twin arginine translocation) シグナル配列と 2 つの Fe-S 結合部位が認められた。また、コリノイドを含むことが明らかになった。*PceA* の未成熟タンパク質はシャペロンタンパク質 *PceT* により、フォールディングされ、ついで Tat システムにより細胞膜を貫通しペリプラズムに運ばれ、細胞質膜に存在する *PceB* と結合して存在する⁸⁰⁾。

Y51 株を繰返し培養すると PCE の脱塩素化能を無くした株が高頻度で出現することが判明した⁷⁹⁾。これらの株には *pce* 遺伝子を保持するが、脱塩素化能を無くした SD 株と *pce* 遺伝子を全て無くした LD 株の二種類が存在した。調べてみると SD 株は *pceA* の upstream に存在する IS が欠失していた (図 19)。この IS 中に *pceABC* のプロモーターが存在し転写が生起しないこと、LD 株では *pceA* upstream の IS と *pceT* downstream に存在する相同な IS の間で相同組換えが生起し、*pceABCT* が完全に欠失していた (図 20)。興味あることに Y51 野生株では 0.1 μ M の極低濃度のクロロフォルム (三塩化炭素) によってその

生育が完全に阻害されるが、SD 株と LD 株では生育阻害が全く認められない⁸¹⁾。この阻害は四塩化炭素でも同様に認められるが、二塩化炭素では全く阻害されない。この現象が如何にして生起するのかは未だ不明であるが、少なくとも *PceA*, *PceB*, *PceC*, あるいは *PceT* のタンパク質のいずれかとクロロフォルム (および四塩化炭素) が相互作用して生育を阻害していることが想定され、現在検討中である。

Y51 株のゲノムは地球環境産業技術研究機構 (RITE) との共同研究で明らかとなった⁸²⁾。全塩基数は 5,727,534 bp で、GC 含量は 47.4%, 推定遺伝子数は 5060, 極めて多彩なエネルギー獲得系 (脱ハロゲン呼吸の他にフマル酸呼吸, チオ硫酸呼吸, 亜硫酸呼吸, 硝酸呼吸, 亜硝酸呼吸, ジメチルスルフォキシド呼吸, および Fe(III) 呼吸) を持っている。これらの性質は *Dehalococcoides mccartyi* 195 株とは対照的である。195 株は PCE をエチレンまで完全に脱塩素化するが、ゲノムサイズは 1,469,720 bp と小さく、推定遺伝子数は 1,580, この中に 19 のデハロゲナーゼ遺伝子が存在する。またこの株は脱ハロゲン呼吸のみでエネルギーを獲得しており、この点でも Y51 株とは対照的である。

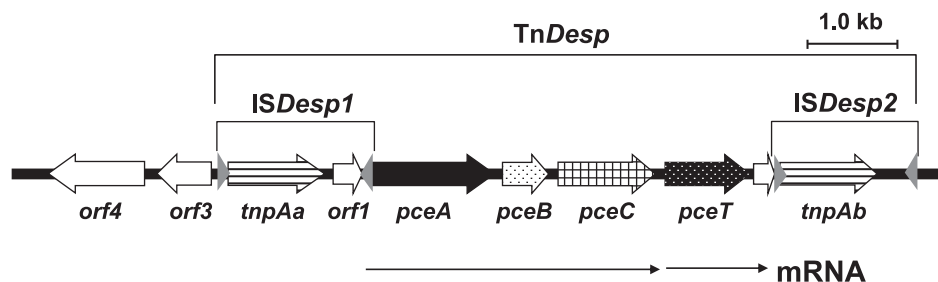


図 18. 脱ハロゲン呼吸細菌 *Desulfitobacterium hafniense* Y51 株の *pce* 遺伝子クラスター

pceA: PCE デハロゲナーゼをコード; *pceB*: 膜アンカータンパク質をコード; *pceC*: 未知遺伝子; *pceT*: シャペロン遺伝子; *tnpA*: トランスポナーゼ遺伝子; IS: 挿入配列; Tn: トランスポゾン

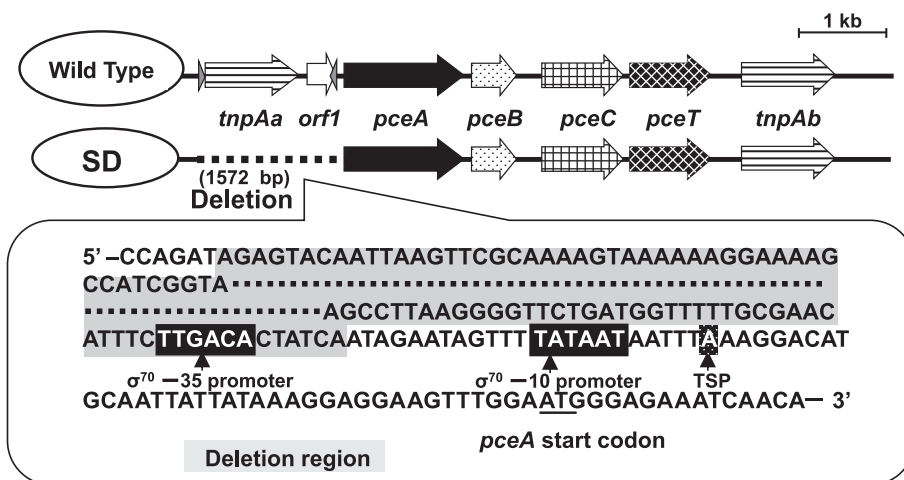


図 19. 脱ハロゲン欠損 SD 株の欠失領域

pce 遺伝子クラスターを挟む 2 つの相同 IS のうち上流が欠失, この中にプロモーターのマイナス 35 領域が含まれ, *pceABC* の転写が生起しない。

TSP: 転写開始点

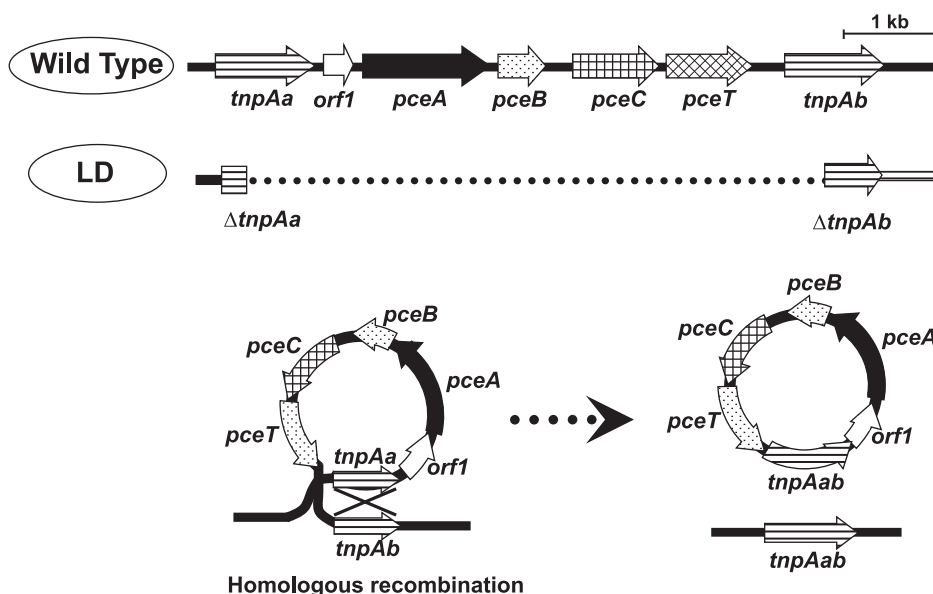


図 20. 脱ハロゲン欠損 LD 株の欠失領域と欠失メカニズム
pce 遺伝子クラスターを挟む 2 つの相同な IS 間で相同組換えが生起, *pce* 遺伝子クラスターが欠失。
tnpAab: *tnpAa* と *tnpAb* のハイブリッド遺伝子

9. 化学的脱塩素化と微生物分解を組合せた 有機ハロゲン化合物の分解

平成 14 年度即効型地域コンソーシアムプロジェクトで我々は梶原宏博士との共同研究で「常温常圧脱ハロゲン化反応を活用した有害物質処理システムの開発」を実施した。これは化学反応による脱ハロゲン化と微生物を組合せた諸種の有機塩素化合物の高効率分解システムの開発である。対象物質として PCB, ダイオキシン, フロン, 有機塩素系農薬について検討した。これらの塩素化合物をテトラヒドロフラン (THF) に溶解し, これに水素化リチウムアルミニウム (LiAlH_4) を添加し, 水中で超音波処理をすることで, 極めて短時間でほとんどの塩素がとれることが判明した。すなわち, 超音波処理により LiAlH_4 から水素ラジカルが発生し, これが有機塩素化合物の塩素と置換する機構が考えられた。脱塩素化した化合物は炭化水素となり, 容易に微生物により分解された。この装置を設計し, 上記有機塩素化合物の全てを常温常圧で短時間で容易に分解することができた。PCB 分解の一例を図 21 に示す。KC400 (四塩化物が中心の PCB 混合物) を常温常圧で一分間超音波処理することで, 多くの PCB 成分がビフェニルと 1~2 塩化物塩に脱塩素化された。脱塩素化された塩素数 1~2 の PCB は *P. pseudoalcaligenes* KF707 により容易に酸化分解された。塩素数 4~10 のダイオキシンも 99% 以上が脱塩素化され, フロンからはフッ素と塩素のとれた炭化水素が得られた。また, 有機塩素農薬である DDT やドリノ系農薬も全て効率よく脱塩素化された。

10. おわりに

現在 10 万種類を超える化学物質が製造され, その一部は環境に流出し, 今なお環境を汚染している。わが国

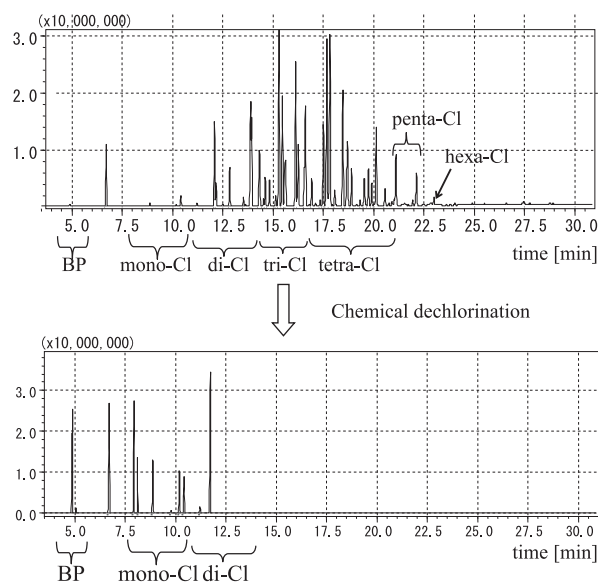


図 21. 水素化リチウムアルミニウム / 超音波処理による PCB (KC400) からの脱塩素化
 KC400, 20000 ppm をテトラヒドロフランに溶解し, 室温で一分間超音波処理したガスクロマトグラフを示す。
 ほとんどの高塩化 PCB はビフェニル, 一塩化物, 二塩化物に脱塩素化した。

では 1960 年代に大きな公害問題に直面した。現在, 中国, インドをはじめ東南アジアを中心に多くの発展途上国が日本の後を追っている。世界は局所的な公害問題に留まらず, 地球規模での深刻な環境問題に直面している。勿論, 汚染物質を環境に出さないのが基本であるが, 一端環境に放出された化学物質は薄く広く環境を汚染し, 食物連鎖を経て我々の人体にも蓄積する。このうち, 有機塩素化合物は微生物による分解が困難であるばかりでなく, 脂溶性で長期間体内に蓄積する。環境の局

部を汚染した物質は微生物などを用いたバイオレメディエーションが可能であるが、広く薄く汚染した物質は土着菌による分解に頼らざるを得ない。環境中で汚染物質がどのような微生物で如何に分解されていくのか、これまでも大きな課題であったが、これからの地球での産業活動を考える時、益々その重要性は高まるはずである。本稿では筆者の40年間にわたる環境バイオテクノロジー関連の研究を総括する形でその概略を記載したが、今にして思えば“少年老い易く学なりがたし”の心境である。本誌に環境バイオの一研究者の記録を掲載していただいたことに感謝したい。

本研究は昭和42年～平成元年、工業技術院微生物工業研究所、平成元年～平成19年、九州大学、平成19年～平成24年。別府大学で行った研究をとりまとめたものである。この研究に関係した多くの共同研究者、学生諸君に感謝したい。

文 献

- 1) Tonomura, K., K. Maeda, F. Futai, T. Nakagami, and M. Yamada. 1968. Stimulative vaporization of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria. *Nature* 217:644–646.
- 2) Furukawa, K., T. Suzuki, and T. Tonomura. 1969. Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 33:128–130.
- 3) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1971. Enzyme system involved in the decomposition of phenylmercuric acetate by mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 35:604–610.
- 4) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1972. Metallic mercury releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 36: 217–226.
- 5) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1972. Induction of metallic mercury-releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 36, 2441–2448.
- 6) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1973. Cytochrome c involved in the reductive decomposition of organic mercurials. *Biochim. Biophys. Acta* 325:413–423.
- 7) Kiyono, M., T. Omura, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1995. Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids. *Arch. Microbiol.* 163:242–247.
- 8) Kiyono, M., T. Omura, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1995. Lack of involvement of *merT* and *merP* in methylmercury transport in mercury resistant *Pseudomonas* K-62. *FEMS Microbiol. Letts*, 128:301–306.
- 9) Iohara, K., R. Iyama, S. Silver, K. Nakamura, and K. Furukawa. 2001. The *mer* operon of a mercury-resistant marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 isolated from Minamata Bay, Japan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 736–741.
- 10) Matsumura, F., Y. G. Doherty, K. Furukawa, and G. B. Boush. 1975. Incorporation of ^{203}Hg into methylmercury in fish liver; studies on biochemical mechanism *in vitro*. *Environ. Res.* 10:224–235.
- 11) Furukawa, K. and F. Matsumura. 1976. Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alcaligenes* sp. *J. Agric. Food Chem.* 24: 251–256.
- 12) Furukawa, K., F. Matsumura and K. Tonomura. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. *Agric. Biol. Chem.* 42: 543–548.
- 13) Furukawa, K., K. Tonomura and A. Kamibayashi. 1978. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 223–227.
- 14) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1979. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 301–310.
- 15) Furukawa, K. and A. M. Chakrabarty. 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 619–626.
- 16) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1983. Metabolic breakdown of Kaneclors (polychlorinated biphenyls) and their products by *Acinetobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 140–145.
- 17) Furukawa, K. 1982. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). pp. 34–57. In Chakrabarty, A.M. (ed.) *Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 18) Furukawa, K. 1986. Modification of PCBs by bacteria and other microorganisms. pp.89–100. In Waid, J.S. (ed.) *PCBs and the Environment vol II*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 19) Suenaga, H., A. Nishi, T. Watanabe, M. Sakai, and K. Furukawa. 1999. Engineering a hybrid pseudomonad acquired 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 430–435.
- 20) Furukawa, K., T. Miyazaki, and N. Tomizuka. 1985. SAL-TOL *in vivo* recombinant plasmid pKF439. *J. Bacteriol.* 162:1325–1328.
- 21) Tsuda, M. and T. Iino. 1988. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on TOL plasmid pWW0. *Mol. Gen. Genet.* 213:72–77.
- 22) Furukawa, K. and T. Miyazaki. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166:392–398.
- 23) Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1992. Analysis of *bph* operon from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267: 4844–4853.
- 24) Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes coding for biphenyl/PCB catabolism: Some soil bacteria possess highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* 171: 5467–5472.
- 25) Furukawa, K., N. Hayase, and K. Taira. 1990. Biphenyl/PCB Catabolic gene (*bph* operon): Organization, function, and molecular relationship in various pseudomonads. pp. 111–120. In Silver, S., Chakrabarty, A.M., Iglewski, B. and Kaplan S (eds.) *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 26) 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.
- 27) Furukawa, K., S. Hayashida, K. Taira. 1992. Biochemical and genetic basis for the degradation of polychlorinated biphenyls in soil bacteria. pp.259–267. In Galli E, Simon S, and Witholt B (eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 28) Furukawa, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 5: 289–300.
- 29) Furukawa, K. 1994. Genetic systems in soil bacteria for the degradation of polychlorinated biphenyls. pp.33–46. In Chaudhry GR (ed.) *Biological Degradation and Bioremediation Technologies of Toxic Chemicals*, Dioscrides Press, Portland, Oreg.
- 30) Kimura, N., H. Kato, A. Nishi, and K. Furukawa. 1996. Analysis of substrate range of biphenyl-catabolic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 220–223.
- 31) Furukawa, K. 2000. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCB). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 283–296.
- 32) Furukawa, K. and H. Fujihara. 2008. Microbial degradation of

- PCB: Biochemical and molecular features. J. Biosci. Biotechnol. 105: 433–449.
- 33) Furukawa, K. and N. Arimura. 1987. Purification of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying cloned *bph* gene. J. Bacteriol. 169: 924–927.
 - 34) Furukawa, K., N. Arimura, and T. Miyazaki. 1987. Nucleotide sequence of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. J. Bacteriol., 169: 427–429.
 - 35) 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.
 - 36) Watanabe, T., H. Fujihara, and K. Furukawa. 2003. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. J. Bacteriol. 185: 3575–3582.
 - 37) Fujihara, H., H. Yoshida, T. Matsunaga, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Cross-regulation of biphenyl- and salicylate-catabolic genes by two regulatory systems in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. J. Bacteriol. 188: 4690–4697.
 - 38) 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.
 - 39) 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.
 - 40) Nishi, A., K. Tomimaga, 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.
 - 41) Ravatn, R. B., S. Studer, A. J. B. 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.
 - 42) Erickson, B. D. and F. J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. J. Bacteriol. 174: 2903–2912.
 - 43) 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 functionally different. J. Bacteriol. 179: 3936–3943.
 - 44) Stemmer, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. Nature 370: 389–391.
 - 45) Kumamaru, T., H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe, and K. Furukawa. 1998. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. Nature Biotechnology 16: 663–666.
 - 46) Suenga, H., M. Goto, and K. Furukawa. 2004. DNA shuffling. pp.13–24. In Brakmann S. and Schwienhorst A. (eds.) Evolutionary Method in Biotechnology Wiley-VCH Verlag GmbH & KgaA, Weinheim.
 - 47) Suenaga, H., M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, and K. Furukawa. 2001. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene and alkylbenzene. J. Bacteriol. 183: 5441–5444.
 - 48) Suenaga H., M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Active site engineering of biphenyl dioxygenase: Effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:168–176.
 - 49) Suenaga, H., M. Sato, M. Goto, M. Takeshita, M., and K. Furukawa. 2006. Steady-state kinetic characterization of evolved biphenyl dioxygenase, which acquired novel degradation ability for benzene and toluene. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 1021–1025.
 - 50) Suenaga, H., M. Goto, K. and Furukawa. 2001. Emergence of multifunctional oxygenase activities of biphenyl dioxygenase by random-priming recombination. J. Biol. Chem. 276: 22500–22506.
 - 51) Suenaga, H., T. Watanabe, Ngadiman, and K. Furukawa. 2002. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active site engineering. J. Bacteriol. 184: 3682–3688.
 - 52) Suenaga, H., K. Nonaka, H. Fujihara, M. Goto, and K. Furukawa. 2010. Hybrid pseudomonads engineered by two-step homologous recombination acquiring novel degradation abilities toward aromatics and polychlorinated biphenyls. App. Microbiol. Biotechnol. 88: 915–923.
 - 53) Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki, and S. Hayashida. 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the catabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon). J. Bacteriol. 175: 5224–5232.
 - 54) 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.
 - 55) Furukawa, K., N. Kimura, A. Nishi, and A. Suyama. 1996. Construction of hybrid operons conferring expanded degradation capability for aromatic hydrocarbons and chlorinated compounds. pp. 81–93. In Nakazawa T., Furukawa K., Haas D. and Simon S. (eds.) Molecular Biology of *Pseudomonas*. American Society for Microbiology, Washington DC.
 - 56) Furukawa, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Nakamura. 1994. Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase. J. Bacteriol. 176: 2121–2123.
 - 57) Maeda, T., Y. Takahashi, H. Suenaga, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. 2001. Functional analyses of Bph-Tod hybrid dioxygenase which exhibits high degradation activity toward trichloroethylene. J. Biol. Chem. 276: 29833–29838.
 - 58) Suyama, A., R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, and K. Furukawa. 1996. Engineering hybrid pseudomonads capable of utilizing a wide range of aromatic hydrocarbons and of efficient degradation of trichloroethylene. J. Bacteriol. 178: 4039–4046.
 - 59) Furukawa, K., A. Nishi, T. Watanabe, A. Suyama, and N. Kimura. 1998. Engineering microorganisms capable of efficient degradation of chlorinated environmental pollutants. Review in Toxicology 2: 179–187.
 - 60) Suyama, A., T. Futagami, M. Takeshita, M. Goto, and K. Furukawa. 2004. Molecular breeding of various *bph-tod* hybrid strains for efficient degradation of trichloroethene. J. Environ. Biotechnol. 3: 95–100.
 - 61) Furukawa, K. 2003. Super bugs for bioremediation. Trends in Biotechnology 21:187–190.
 - 62) Furukawa, K. 2000. Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 244–249.
 - 63) Furukawa, K., H. Suenaga, and M. Goto. 2004. Biphenyl dioxygenase: Functional diversity and directed evolution. Mini-review. J. Bacteriol. 186: 5189–5196.
 - 64) Shindo, K., Y. Ohnishi, H.-K. Chun, H. Takahashi, M. Hayashi, A. Saito, K. Iguchi, K. Furukawa, S. Harayama, S. Horinouchi, and N. Misawa. 2001. Oxygenation reaction of various three fused aromatic compounds using *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* transformants carrying several arene dioxygenase genes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 2472–2481.
 - 65) Misawa, N., K. Shindo, H. Takahashi, H. Suenaga, K. Iguchi, H. Okazaki, S. Harayama, and K. Furukawa. 2002. Hydroxylation of various molecules including heterocyclic aromatics using recombinant *Escherichia coli* cells expressing modified biphenyl

- dioxygenase genes. *Tetrahedron* 58: 9605–9612.
- 66) Shindo, K., R. Nakamura, I. Chinda, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, H. Takahashi, K. Iguchi, S. Harayama, K. Furukawa, and N. Misawa. 2003. Hydroxylation of ionized aromatics including carboxylic acid or amine using recombinant *Streptomyces lividans* cells expressing modified biphenyl dioxygenase genes. *Tetrahedron* 59:1895–1900.
 - 67) Shindo, K., Y. Shindo, T. Hasegawa, A. Osawa, O. Kagami, K. Furukawa, and N. Misawa. 2007. Synthesis of highly hydroxylated aromatics by evolved biphenyl dioxygenase and subsequent dihydrodiol dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1063–1069.
 - 68) Misawa, N., R. Nakamura, Y. Kagiya, H. Ikenaga, K. Furukawa, and K. Shindo. 2005. Biotransformation of vicinal diols from various arenes with a heterocyclic group, amino group, or carboxylic acid by using recombinant *Escherichia coli* cells expressing modified biphenyl dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes. *Tetrahedron* 61: 195–204.
 - 69) Shindo, K., R. Nakamura, A. Osawa, O. Kagami, K. Furukawa, and N. Misawa. 2005. Biocatalytic synthesis of monocyclic arene-dihydrodiols and -diols by *Escherichia coli* cells expressing hybrid toluene/biphenyl dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 35: 134–141.
 - 70) Chun, H.-K., Y. Ohnishi, K. Shindo, N. Misawa, N., K. Furukawa, S. Horinouchi. 2003. Biotransformation of flavone and flavonone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biphenyl dioxygenase genes. *J. Mol. Catalysis* 21: 113–121.
 - 71) Shindo, K., Y. Kagiya, R. Nakamura, A. Hara, H. Ikenaga, K. Furukawa, and N. Misawa. 2003. Enzymatic synthesis of novel antioxidant flavonoids by *Escherichia coli* cells expressing modified metabolic genes involved in biphenyl catabolism. *J. Mol. Catalysis* 23:9–16.
 - 72) Kagami, O., K. Shindo, A. Kyojima, K. Takeda, H. Ikenaga, K. Furukawa, and N. Misawa. 2008. Protein engineering on biphenyl dioxygenase for conferring activity to convert 7-hydroxyflavone and 5,7-dihydroxyflavone (chrysin). *J. Biosci. Biotechnol.* 106: 121–127.
 - 73) Shindo, K., A. Osawa, R. Nakamura, Y. Kagiya, S. Sakuda, Y. Shizuri, K. Furukawa, and N. Misawa. 2004. Conversion from arenes having a benzene ring to those having a picolinic acid by simple growing cell reactions using *Escherichia coli* that expressed the six bacterial genes involved in biphenyl catabolism. *J. Am. Chem. Soc.* 126:15042–15043.
 - 74) Futagami, T., M. Goto, and K. Furukawa. 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *Chemical Records* 8:1–12.
 - 75) Futagami, T., F. Okamoto, H. Hashimoto, K. Furuzawa, K. Higashi, K.H. Nazir, E. Wada, A. Suyama, K. Takegawa, M. Goto, K. Nakamura, and K. Furukawa. 2011. Enrichment and characterization of a trichloroethene-dechlorinating consortium containing multiple *Dehalococcoides* strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1268–1274.
 - 76) Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera, and K. Furukawa. 2001. Isolation and characterization of *Desulfotobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1474–1481.
 - 77) Suyama, A., K. Kai, M. Yamashita, and K. Furukawa. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfotobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* 184: 3419–3425.
 - 78) Furukawa, K., A. Suyama, Y. Tsuboi, T. Futagami, and M. Goto. 2005. Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfotobacterium* sp. strain Y51: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:534–541.
 - 79) Futagami, T., Y. Tsuboi, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halo-respiring *Desulfotobacterium* sp. Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:720–728.
 - 80) Morita, Y., T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. 2009. Functional characterization of the trigger factor protein PceT of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfotobacterium hafniense* Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:775–781.
 - 81) Futagami, T., T. Yamaguchi, S. Nakayama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Effect of chloromethanes on growth of and deletion of *pce* gene cluster in *Desulfotobacterium hafniense* strain Y51. *App. Environ. Microbiol.* 72: 5998–6003.
 - 82) Nonaka, H., Y. Shinoda, G. Keresztes, Y. Ikenaga, M. Abe, K. Naito, K. Inamoto, K. Furukawa, M. Inui, and H. Yukawa. 2006. Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfotobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J. Bacteriol.* 188: 2262–2274.