

## 遺伝子クローニングの黎明期における *Pseudomonas putida* mt-2 の 芳香族化合物分解の研究

### Studies on Degradation of Aromatic Compounds by *Pseudomonas putida* mt-2 at the Dawning Age of Gene Cloning

中澤 晶子

TERUKO NAKAZAWA

山口大学名誉教授 〒755-0047 山口県宇部市島1-4-12

E-mail: nakazawa@yamaguchi-u.ac.jp

Professor Emeritus, Yamaguchi University, 1-4-12 Shima, Ube, Yamaguchi 755-0047, Japan

キーワード: シュードモナス, カテコールジオキシゲナーゼ, TOL プラスミド, 遺伝子クローニング, カスケード調節

Key words: *Pseudomonas*, catechol dioxygenase, TOL plasmid, gene cloning, cascade regulation

(原稿受付 2013年11月26日/原稿受理 2013年12月3日)

#### 1. はじめに

このたびは思いがけず環境バイオテクノロジー学会賞をいただき大変光栄に存じます。私は1963年から京都大学医学部医化学講座でシュードモナスのカテコール二原子酸素添加酵素の研究を行いました。1971年から順天堂大学医学部細菌学講座へ移り、そこで *Pseudomonas putida* mt-2 株の分子遺伝学的研究を始め、TOL プラスミドに出会いました。1978年に山口大学医学部第2生化学講座へ移ったのちは、TOL プラスミドによって支配される芳香族化合物分解系の遺伝子クローニングや遺伝子発現調節機構の解明など、環境バイオテクノロジーの基礎となる研究を行いました。また1995年につくばで開催された第5回国際シュードモナスシンポジウムの組織委員長をつとめました。本稿では、筆者らが日本で行った芳香族化合物分解の研究を、同じ時期に外国で行われた研究と合わせて発表順に記し、遺伝子クローニングの黎明期に行われた環境微生物研究の一例を紹介したいと思います。

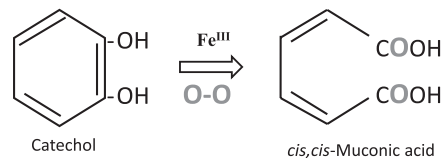
#### 2. 芳香族化合物分解に関する2原子酸素添加酵素

筆者は京都大学医学部卒業後、基礎研究を志し、1962年に医化学講座 早石修教授の大学院生(博士課程)となった。早石教授は1955年に米国NIHにおいて、シュードモナスのカテコール分解酵素ピロカテカーゼ(カテコール1,2-ジオキシゲナーゼ, C12O)の反応について $^{18}\text{O}_2$ を用いた実験を行い、反応生成物である *cis,cis*-ムコン酸に2原子の $^{18}\text{O}$ が取り込まれることを証明し、世界で初めて2原子酸素添加酵素を報告した<sup>16)</sup>。

1963年、大阪大学教授を兼務していた早石教授の下、野崎光洋博士らは *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2 か

ら10%アセトン存在下にメタピロカテカーゼ(カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ, C23O)を精製し、結晶化に成功した<sup>46)</sup>。筆者は、京都大学早石研究室へ移った野崎グループに入り、酸素添加酵素の研究を始めた。最初の研究課題は、同じ基質に作用する2つの酵素が、オルト開裂とメタ開裂という異なる反応を行うのはなぜかを明らかにすることであった(図1)。その謎を解く手掛かりは、酵素タンパク質に含まれる非ヘム鉄にあった。鉄の荷電状態を直接測定するため、大阪大学医学部の山野俊雄教授の指導のもとに酵素のESRを測定し、C23Oは予想通りシグナルを示さない2価鉄酵素であったが、C12Oは $g=4.3$ に非ヘム3価鉄に固有のシグナルを示す3価鉄酵素であることが分かった。また、カテ

Pyrocatechase (C12O)



Metapyrocatechase (C23O)

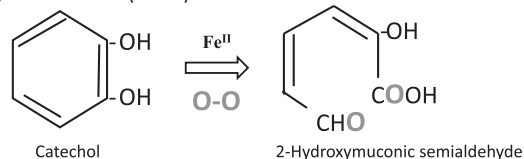


図1. カテコールジオキシゲナーゼの2つの型。

ピロカテカーゼ(C12O)とメタピロカテカーゼ(C23O)はいずれも1分子の酸素をカテコールに取り込む反応を触媒する酵素であり、生成物に2原子の酸素(太字)が取り込まれる。酵素の活性にはC12Oは3価鉄が、C23Oには2価鉄が必須である。

コールを加えるとそのシグナルが完全に消失することから、反応中に鉄が3価鉄から2価鉄に変化すると推測された<sup>40</sup>。同時に、C12O酵素溶液の紫赤色が灰青色に変化することもわかった。そこで、まずカテコールがC12Oの3価鉄に直接結合し、そこに酸素が作用して酸素添加の反応が起こることが推測された。さらに、3価鉄のキレート剤を用いて3価鉄を除去すると酵素活性が失われ、そこに2価鉄を加えたのち空気酸化すると酵素活性が回復することから、C12Oの3価鉄は酵素反応に必須であることを明らかにした<sup>41</sup>。一方C23Oは、過酸化水素処理で活性が無くなること、2価鉄キレート剤によって活性が阻害されることなどから2価鉄酵素であることが証明された<sup>47</sup>。

### 3. *Pseudomonas putida* mt-2 の TOL プラスミド

TOL プラスミドの研究について述べる前に、TOL プラスミドが支配する芳香族化合物分解経路について述べる(図2)。分解経路は上流経路と下流経路(メタ開裂経路)に分けられる。上流経路はトルエンとキシレンから、それぞれベンジルアルコールとメチルベンジルアルコールを経て安息香酸とトルイル酸を生成する経路であり、下流経路は、安息香酸とトルイル酸からそれぞれ生じるカテコールとメチルカテコールがC23Oの働きで2-オキシムコン酸セミアルデヒドとそのメチル化合物になり、さらに分解されてTCA回路に入る経路である。

### 3.1 TOL プラスミドの発見

1969年、糖輸送系の研究で有名な米国ジョンスホプキンス大学生物学科のSaul Rosemann教授の下に留学し、黄色ブドウ球菌の乳糖輸送系の研究を行った。1971年4月に、順天堂大学医学部細菌学講座の横田健教授の教室に講師として採用され、生化学から細菌学の世界へ入ることになった。まず、横田教授の研究テーマである大腸菌の糖代謝におけるサイクリックAMPの役割について、アラビノースイソメラーゼの転写にサイクリックAMPが関与することを明らかにした<sup>42</sup>。

この時期、大腸菌を用いた微生物遺伝学は、分子を対象とする分子遺伝学へと発展しつつあった。大腸菌以外の系で酵素の誘導合成機構を研究するため、*Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2株を京都大学より分与を受けた。C23O誘導合成変異菌の分離を目標に、安息香酸培地で黄色の2-オキシムコン酸セミアルデヒドを生成できない菌の分離を試みたところ、非常に高頻度に現われ、いずれも、C23Oの次に働く脱水素酵素も欠損していた。意外なことに、変異菌は安息香酸を唯一の炭素源とする培地に親株よりもよく発育する。調べるとC12Oが働くオルト開裂系をもつことがわかった。すなわち、*Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-株は、オルト開裂系とメタ開裂系の2つの安息香酸分解系をもつこと、またメタ開裂系の遺伝子群は容易に脱落することが明らかになった<sup>43</sup>。

1972年、米国のChakrabarty博士がサリチル酸分解菌のメタ開裂経路はプラスミドによって支配されるとい

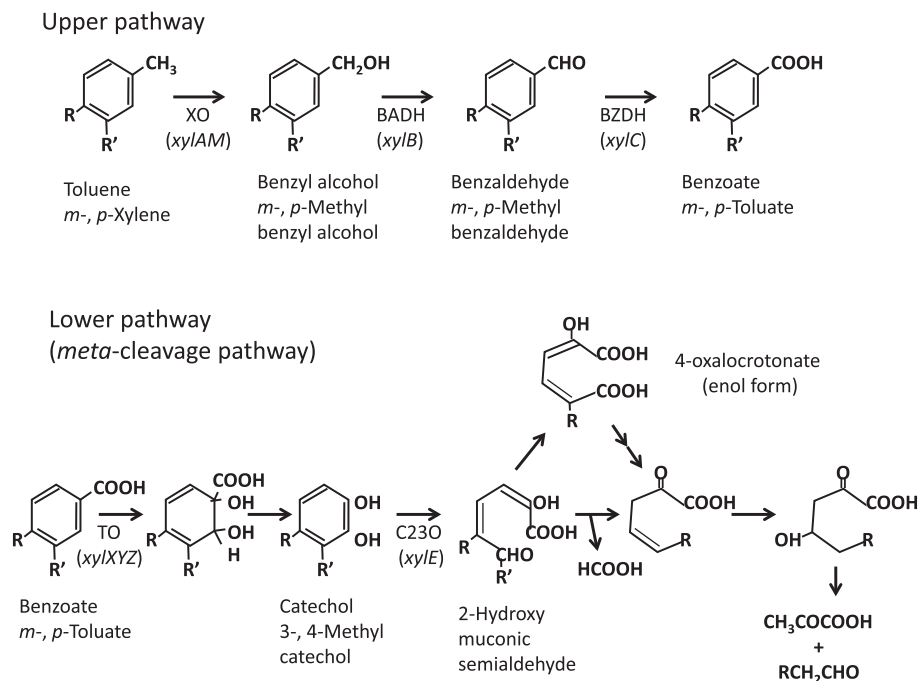


図2. TOL プラスミドが支配するトルエン、キシレン分解経路<sup>14,15</sup>。

上流経路は、トルエンと *m*-, *p*-キシレンがそれぞれベンジルアルコールと *m*-, *p*-メチルベンジルアルコール、およびベンツアルデヒドと *m*-, *p*-メチルベンツアルデヒドを経て安息香酸と *m*-, *p*-トルイル酸へ分解する経路である。下流経路(メタ開裂経路)は、安息香酸と *m*-, *p*-トルイル酸がそれぞれカテコールと 3-, 4-メチルカテコールを経て C23O の作用で 2-オキシムコン酸セミアルデヒドになったのち、*m*-トルイル酸は蟻酸を生じ、他方安息香酸と *p*-トルイル酸は 4-オキサロクロトン酸を経て、いずれも 1-オキソペント 4-エノール酸となり TCA サイクルへ入る。一部の酵素(遺伝子)と化合物名は省略した。XO; Xylene dioxygenase, BADH; Benzyl alcohol dehydrogenase, BZDH; Benzaldehyde dehydrogenase, TO; Toluene dioxygenase, C23O; Catechol 2,3-dioxygenase.

う論文を発表した。分解プラスミドに関する最初の論文である。そこには、サリチル酸分解経路遺伝子群は高頻度に脱落すること、および他の *Pseudomonas* 菌株へ伝達できることが示された<sup>2)</sup>。これに倣って、mt-2 のメタ開裂経路遺伝子群の伝達実験を行い、1973 年に日本細菌学会で報告した。論文を準備中に英国ウエールズ大学の Williams と Murray が “Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid.” という論文を発表した<sup>52)</sup>。論文では mt-2 株のメタ開裂経路のすべての酵素活性が同時に消失すること、および接合伝達することが示されていた。はたして同じ菌株だろうかと半信半疑であったが、筆者らの、mt-2 には 2 つの開裂系があるという論文が繰返し引用されていることから、彼らは同一の菌株だと知っていると思われた。

mt-2 はいかにして Williams 教授の手に渡ったのであろうか。後に、mt-2 を分離した細川桂一博士（元川崎医科大学教授）に直接尋ねる機会があった。1960 年、彼が大阪大学医学部生化学の須田正巳教授の研究室の大学院生のとき、“適応酵素” (successive induction) 研究のため、様々な環境の土壌から芳香族化合物分解菌を分離していた。その中に、箕面市の自宅菜園で採取した土壌から *m*-トルイル酸分解菌として分離された mt-2 があった。この菌株は強い C23O 産生菌で、*m*-トルイル酸分解菌としては 2 番目の分離株であったため、mt-2 と命名された。間もなく米国カルフォルニア大学の R.Y. Stanier 教授のもとへ留学した時、mt-2 を他の数株とともに持参した。*Pseudomonas* 分類学の大家である Stanier 教授は、mt-2 は *P. putida* の同定基準であるオルト開裂系を持たない興味ある菌株だと注目していた。後に彼の研究室で学んだ Hegeman が、mt-2 を用いてメタ開裂系調節機構の研究を行い、それに注目した Williams

が Hegeman から分与を受けて TOL プラスミドの論文を書いたことがわかった。なお同じ 1974 年に、オーストラリアの Wong と Dunn も mt-2 の *m*-トルイル酸分解プラスミドについて報告している<sup>54)</sup>。Dunn はその直前にイリノイ大学の I.C. Gunsalus 教授の研究室にいたので、おそらくそこにあった mt-2 がオーストラリアへ渡ったと推測される。

### 3.2 RP4-TOL プラスミドの分離

こうして筆者は、mt-2 に導かれて最先端のプラスミドの研究へ参入することになった。微生物遺伝学を初歩から学びながら、情報の少ない日本で研究を進めるのは大変難しかったが、幸い横田教授は、R プラスミドの発見者である東京大学医学部細菌学講座の秋葉朝一郎教授の門下生であり、当時の細菌学会には三橋進教授（群馬大）、渡辺力助教授（慶応大）など多数の R プラスミド研究者がいた。これらの先輩から学び、広宿主域プラスミドと TOL プラスミドの組換え体を作り、大腸菌で遺伝子を解析する計画を立てた。

まず、TOL プラスミドの伝達を *m*-トルイル酸培地で調べると、元株に比べて C23O の誘導レベルが 10 倍以上、伝達頻度が約 1000 倍の TOL プラスミドが分離されたので<sup>44)</sup>、以後の研究にはこれを用いた。次に、*P. aeruginosa* PAO1 へ TOL プラスミドを伝達し、プラスミドの温度感受性を調べたところ、41°C 以上で速やかに脱落することから、プラスミドの複製は、その自然宿主である *P. putida* と同様に温度感受性であることを見出した<sup>36)</sup>。一方、広宿主域の RP4 プラスミドは高温で脱落しない。そこで TOL と RP4 を PAO1 内に共存させ、高温で *m*-トルイル酸寒天培地に生える菌を選択すると、RP4 と TOL の融合プラスミドが得られた（図 3）。最初に得られたプラスミド pTN1 は、C23O 活性はあるが、

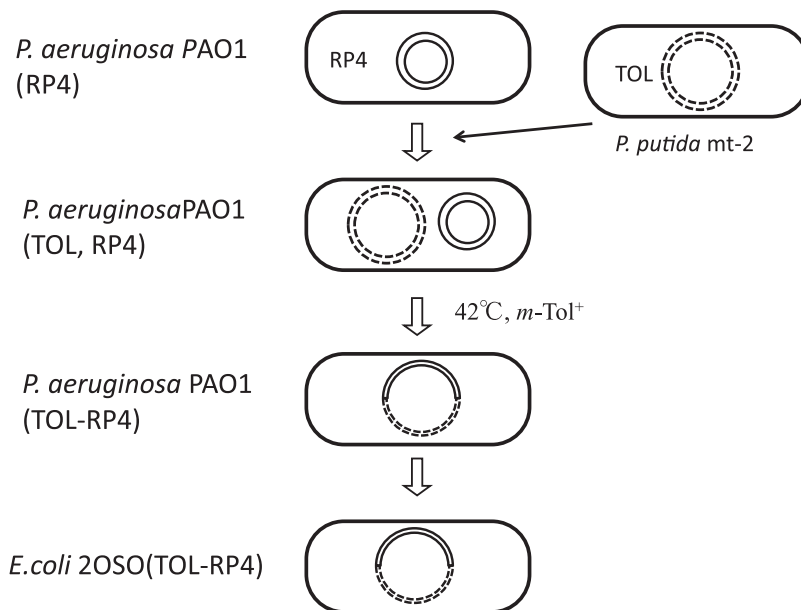


図 3. RP4-TOL ハイブリッドの分離<sup>38)</sup>。

RP4 をもつ緑膿菌 PAO1 へ *P. putida* mt-2 から TOL プラスミドを伝達し、PAO1 (TOL, RP4) を作成した。この菌を L-ブロッソで増殖後、*m*-トルイル酸寒天培地 42°C で培養し、生じたクローンを大腸菌へ伝達して RP4-TOL ハイブリッド、pTN1 と pTN2 を得た。



*m*-トルイル酸による誘導合成が認められなかった。そこから *m*-トルイル酸培地によく発育し、C230 の誘導合成がみられるプラスミドを分離し pTN2 と命名した。

一方、Williams らは 1975 年に、TOL プラスミドはトルエンやキシレンなどの環状炭化水素を安息香酸やメチル安息香酸（トルイル酸）へ分解する遺伝子群もコードしていることを見出した<sup>56</sup>。また 1976 年には、同様の代謝経路を持つプラスミドを他の土壤細菌からも分離し、mt-2 由来の TOL プラスミドを pWW0 と命名した<sup>57</sup>。さらに 1977 年、エジンバラ大学の Broda 教授らと共同で、電子顕微鏡と制限酵素地図から pWW0 の分子量が 78.1 MDa であることを報告した。論文の中で彼らは、TOL プラスミド DNA の分離は非常に困難であったが、大腸菌の F プラスミドの分離法に倣った新しい方法を考案してようやく得られたと記載している<sup>58</sup>。

筆者らは、RP4-TOL 融合プラスミド pTN2 の DNA を大腸菌から塩化セシウム-臭化エチジウム濃度勾配超遠心法により分離し、電子顕微鏡で解析した。pTN2 の分子量は 73.7 MDa であり、ヘテロデュプレックス解析により 37.3 MDa の RP4 プラスミドの全長が取り込まれていることがわかり、TOL プラスミドの一部、おそらく C230 を含むメタ開裂系遺伝子群が転移したものであると推測した<sup>38</sup>。これはその後、東京大学の飯野徹雄教授と津田雅孝博士によりトランスポゾンであることが証明された<sup>51</sup>。なお、TOL プラスミドが大腸菌へ伝達できなかったことについては、米国シカゴ大学の Benson と Shapiro が *P. putida* で TOL::Tn401 を作成し、大腸菌と混合培養してカルベニシリン培地で選択すると伝達が見られることから、TOL は広宿主域プラスミドであるが、大腸菌では分解系の遺伝子発現が悪いために *m*-トルイル酸培地で伝達体が得られないことを報告した<sup>11</sup>。

1978 年、Williams らはさらに重要な論文を発表した。すなわち、mt-2 の TOL プラスミド pWW0 のトルエン・キシレン分解系は、上流の *xylABC*（キシレンからトルイル酸まで）と下流のメタ開裂系である *xylEDFG*（トルイル酸から TCA サイクルへ入る前まで）の 2 つのオペロンから成り、いずれも誘導物質存在下で *xylR* により正の制御をうけるというモデルである<sup>59</sup>。また英国の Downing と Broda は TOL プラスミドの制限酵素地図を発表した<sup>4</sup>。

### 3.3 遺伝子クローニング

筆者は 1978 年に山口大学医学部第 2 生化学講座の中澤 淳教授の研究室へ助教として転任した。中澤（淳）研究室では大腸菌のコリシン E1 について、遺伝子クローニングや試験管内での遺伝子発現の解析やプラスミド DNA の電顕解析が行われ、当時の分子生物学の最先端の研究を行う設備が整いつつあった。まず RP4-TOL プラスミドの制限酵素地図を作製した。実験は、広島大学医学部薬学科出身の井上幸江大学院生と共に行った。pTN2 の TOL 領域は、Broda らが 1979 年に報告した TOL プラスミドの制限酵素地図の分解系をコードする領域とよく一致していた。また pTN1 は、C230 の遺伝子 *xylE* のすぐ上流に 3.6 kbp の DNA 断片が挿入されており、このため C230 の誘導合成が妨げられていると

考えられた<sup>39</sup>。

その頃 mt-2 はドイツへ渡っていた。1981 年、Williams 教授の研究室の Franklin が、マックスプランク研究所の Timmis 博士の研究室に移り、Bagdasarian 夫妻と共同で、大腸菌で Tn5 変異プラスミドを分離した。これを *P. putida* へ入れて分解系の酵素活性を調べることにより、上流オペロンと下流オペロンの位置を明らかにした<sup>7</sup>。

筆者らは pBR322 をベクターとした TOL 遺伝子のクローニングを開始した。まず、上流オペロンの *xylB* 遺伝子および下流メタ開裂系の *xylE* 遺伝子をそれぞれクローニングし、転写の方向を決定した。また、大腸菌から C230 を精製し、精製酵素の比活性と免疫学的性状の比較から、mt-2 株が作る C230 と同一であることを示した<sup>20</sup>。さらに下流のメタ開裂系オペロンを pBR322 に、*xylS* 領域を pACYC177 にクローニングし、XylS タンパク質が下流オペロンを正に調節することを報告した<sup>21</sup>。次に *xylR* のクローニングを行い、これが上流オペロンのみでなく下流オペロンの転写にも必須であることを示すとともに、2 つのオペロンのオペレーター・プロモーター領域を決定した<sup>22</sup>。

その頃スイスのジュネーブ大学へ移った Timmis 教授の研究室から、トランスポゾン変異体の解析により *xylR* と *xylS* の位置を決定したことが報告された<sup>8</sup>。また、東京大学から Timmis の研究室へ移った原山重明博士らは、トランスポゾン変異体を用い、下流オペロンについて、*m*-トルイル酸ジオキシゲナーゼ遺伝子 *xylXYZ* とそれに続くジヒドロジヒドロキシ安息香酸脱水素酵素遺伝子 *xylL* を同定し、下流のメタ開裂系オペロンのプロモーターの下流に *xylXYZLE*... と並んでいることを報告した<sup>11</sup>。さらに、下流オペロンのプロモーターの解析<sup>33</sup>、クロロ安息香酸分解性シュードモナス菌への遺伝子導入による広域分解菌の構築<sup>31</sup>、安息香酸からカテコールを生成する大腸菌の構築<sup>57</sup>、トランスポゾン解析による *xylX* と *xylY* の同定<sup>13</sup> が報告された。上流オペロンについても、Tn5 変異体と遺伝子クローニングによる解析から、プロモーターの下流に、ベンツアルデヒド脱水素酵素の遺伝子 *xylC*、ベンジルアルコール脱水素酵素の遺伝子 *xylB*、キシレンモノオキシゲナーゼの遺伝子 *xylA* がこの順に並んでいることが報告された（図 2）<sup>12</sup>。

### 3.4 プロモーター塩基配列の決定

1980 年当時、日本で DNA 塩基配列決定を行う研究室はまだ限られていた。中澤（淳）研究室の蛭名洋介博士は、ACTH の構造を決定した京都大学医学部中西重忠博士から Maxam-Gilbert 法による DNA 塩基配列法の手ほどきを受け、1981 年 11 月、最初の論文として、大腸菌プラスミドのコリシン E1 プロモーターの塩基配列を発表した<sup>6</sup>。次いで、滋賀医科大学の野崎研究室の中井智恵子助手が山口大学医学部で実験を行い、念願の C230 遺伝子 *xylE* の DNA 塩基配列決定を完成させた<sup>35</sup>。

酵素の誘導機構を解析するためには、転写開始点を正確に決定する必要があった。まず、上流オペロンのオペレーター・プロモーター領域 OP1/Pu の塩基配列を決

定した。次に、pTN2をもつ *P. putida* を *m*-メチルベンジルアルコール存在下で培養して得られた mRNA を用い、S1 ヌクレアーゼ法および逆転写酵素法により正確な転写開始点を決定した。さらに誘導時の mRNA 量は、大腸菌では *P. putida* の約 10%であることを示した<sup>18)</sup>。この結果は PNAS に発表した。投稿に際しては、米国イリノイ大学の Gunsalus 教授に推薦を依頼した。なお、Gunsalus 教授は 1984 年にイリノイ大学でプラスミドシンポジウムを開催し、私も招待された。この会で Chakrabarty, Williams, Timmis, Bagdasarian, Haas など世界の *Pseudomonas* 研究者に会うことができた。またこの時、国際シェードモナスシンポジウムの開催に関する相談があり、第 1 回は 1986 年に Timmis 会長のもとスイスのジュネーブで開催されることが決まった。

筆者らは下流オペロンについても同様に、オペレーター・プロモーター領域 OP2/Pm と転写開始点を決定した<sup>23)</sup>。同じ時期に Timmis 研究室からも Pm プロモーターの塩基配列と S1 マッピングによる転写開始点が報告された<sup>33)</sup>。

筆者らは次に、*xylR* のオペレーター・プロモーターについて解析した。*P. putida* と大腸菌のいずれにおいても、約 30 kb 離れた 2 つの転写開始点があり、それぞれの上流に大腸菌のプロモーター共通配列を認めた。また、マキシセル法で XylR タンパク質の分子量 67,000 を決定した<sup>24)</sup>。さらに *xylS* の塩基配列を決定し、それに基づく分子量が 36,502 であり、マキシセル法で決定された分子量 37,000 とよく一致すること、また XylS タンパク質は塩基性で DNA 結合タンパク質の特徴を備えていることを報告した<sup>25)</sup>。pTN1 についても、*xylE* の上流の挿入配列にある転写開始点を決定し、プロモーター構造について考察した<sup>17)</sup>。

一方 Timmis 教授の研究室からは、下流オペロンの分解能を広げるため、誘導物質の特異性が変異した *xylS* の分離法が報告された<sup>49)</sup>。また、TOL プラスミドの分解系では分解できない 4-エチル安息香酸に着目し、これを分解できる *xylS* および *xylE* の変異株が報告された<sup>50)</sup>。さらに、カテコールのメタ開裂系が詳細に解析され、カテコールから 2-オキシムコン酸セミアルデヒドになったのち、加水分解を受けて 1-オキシペンタ 4-エノール酸を経る経路と、オキサロクロトン酸を経て 3 段階で分解される 2 つの経路があるが、*m*-トルイル酸は前者で、安息香酸や *p*-トルイル酸は後者で分解されることが示された<sup>14)</sup>。

上流オペロンの酵素遺伝子とその産物についても詳細な解析が行われた。その結果、上流オペロンは *xylC-xylM-xylA-xylB-xylN* と遺伝子が並び、プロモーターと *xylC* の間には 1.7 kb のスペースがあること、*xylC* は 57 kDa のベンズアルデヒド脱水素酵素を、*xylM* と *xylA* はそれぞれ 35 kDa と 40 kDa のキシレンジオキシゲナーゼのサブユニットの遺伝子であること、さらに *xylB* は 40 kDa のベンジルアルコール脱水素酵素の遺伝子であることが報告された<sup>15)</sup>。

### 3.5 遺伝子発現調節機構

TOL プラスミドには 2 つの正の調節因子 XylR と XylS がある。筆者らは先に、XylR が上流オペロンのみ

でなく下流オペロンの転写にも必須であることを報告したが<sup>22)</sup>、さらに XylR は *xylS* の転写を活性化することから、下流オペロンの転写活性化は XylS を介していることが考えられた<sup>26)</sup>。また、上流オペロンおよび *xylS* の転写開始点とプロモーター配列の決定から、これらのプロモーター配列はいずれも、窒素代謝関連遺伝子の転写因子である NtrA/RpoN が認識するプロモーターに共通の -12, -24 配列を持つことを見出した。これらの結果に基づき、芳香族化合物完全分解系のカスケード調節機構、すなわち *m*-キシレン存在下で XylR タンパク質が上流オペロンのみでなく *xylS* の転写をも活性化し、次いで XylS タンパク質が下流オペロンを活性化するというモデルを提唱した (図 4)<sup>26)</sup>。なお、窒素代謝遺伝子群の転写との関連について、英国サセックス大学の Dixon 博士が、筆者らが 1984 年に発表した上流オペロンのプロモーター<sup>18)</sup> に *ntr/nif* 共通配列があることを見つけ、大腸菌において上流オペロンのプロモーターの転写が、XylR のみでなく大腸菌の窒素代謝の正の調節因子である NtrC によっても活性化されることを報告した<sup>3)</sup>。さらに筆者らは、カスケード調節機構を検証するため、*xylS* を *tac* プロモーターに連結して大腸菌で強制発現させると、誘導物質を加えなくても下流オペロンが活性化されることを報告した<sup>27)</sup>。

同じ時期に Timmis 研究室からは、XylS タンパク質が大腸菌の正の調節因子として知られる AraC と相同性があり、NtrC とも相同性があることが報告された<sup>34)</sup>。また、上流オペロンの OP1/Pu と *xylS* のプロモーターに共通配列があることなどから、筆者らと同様のカスケード調節機構が報告された<sup>48)</sup>。

次に筆者らは *xylR* の DNA 塩基配列を決定し、XylR が分子量 63,741 のタンパク質であり、*Klebsiella Pneumoniae* の窒素代謝に関係する遺伝子群の転写活性化因子 NtrC/NifA と高い相同性があること、また、XylR タンパク質の中央に NtrA/RpoN に結合する配列が、また C-末端には DNA 結合配列があること、これらの結果から XylR は NtrA/RpoN-RNA ポリメラーゼの転写活性化因子であること、活性化されるのは *xylS* および上流プロモーター OP1/Pu であることを報告した<sup>29)</sup>。

一方 Timmis らは *P. putida* の *ntrA/rpoN* をクローニングし、*in vitro* で Km<sup>r</sup> カセットを挿入した変異 *ntrA/rpoN* を *P. putida* へ導入して変異菌の分離に成功した。これを用いて TOL の上流オペロンおよび *xylS* の発現が

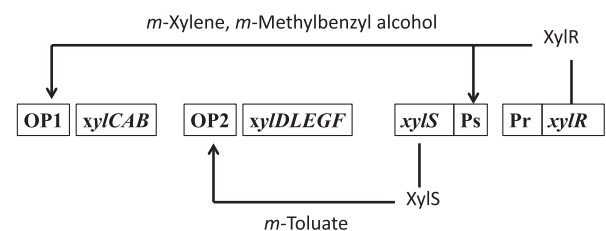


図 4. XylR による 2 つのオペロンのカスケード調節機構<sup>26)</sup>。  
XylR タンパク質は、*m*-キシレンや *m*-メチルベンジルアルコール存在下に上流オペロンのプロモーター (OP1/Pu) と *xylS* のプロモーター Ps からの転写を活性化する。合成された XylS タンパク質は、上流オペロンの酵素の働きにより生じた *m*-トルイル酸の存在下で下流オペロン (メタ開裂系オペロン) (OP2/Pm) の転写を活性化する。

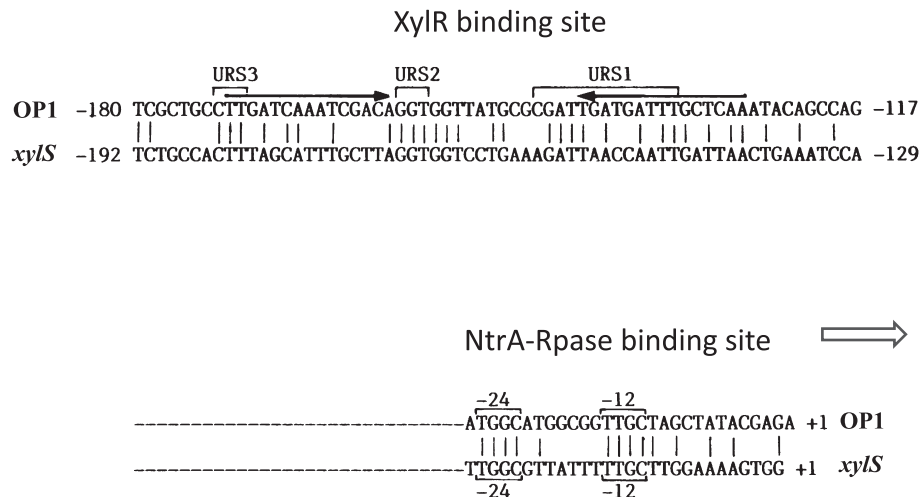


図5. 上流オペロン (OP1/Pu) と *xylS* プロモーター上流の XylR 結合部位および NtrA-RNA ポリメラーゼ認識配列<sup>19)</sup>。各プロモーターの上流領域には、パリンδροーム構造を持つ共通配列 (URS1, URS2, URS3) があり、ここに XylR タンパク質が結合する。また、いずれのプロモーター領域にも NtrA/RpoN-RNA ポリメラーゼ認識配列がある。

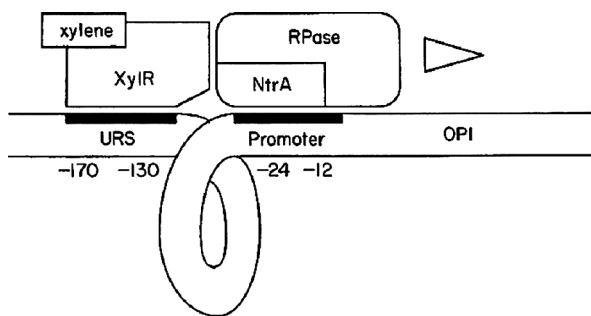


図6. XylR による NtrA 依存的 OP1/Pu プロモーター転写活性化機構のモデル<sup>19)</sup>。誘導物質により活性化された XylR タンパク質がプロモーター上流の調節配列 (URS) に結合し、さらに NtrA に作用することで、URS とプロモーターの間の DNA がループ構造を作り、NtrA-RNA ポリメラーゼによる OP1 の転写が開始される。

みられないことを示したのに加え、RpoN が各種窒素化合物や有機酸の代謝および運動性に関与することを報告した<sup>30)</sup>。

筆者らも *P. putida* の *ntrA/rpoN* のクローニングを行った。大腸菌の *ntrA* 遺伝子をプローブとし、*P. putida* DNA とのクロスハイブリダイゼーションで得た DNA 断片を大腸菌へ導入し、上流オペロンの発現が XylR によって活性化されるクローンを得、*Azotobacter vinelandii* や *Klebsiella pneumoniae* の *ntrA* と高い相関性を示す遺伝子を得た<sup>28)</sup>。

さらに筆者らは、上流オペロンのプロモーター上流域を詳細に解析するため、プロモーターに *xylE* を連結し、*xylR* と共に大腸菌に入れ、上流配列の欠失による C230 活性の低下を調べた。その結果、転写開始点から 150 bp 上流にある長さ約 40 bp の DNA 配列 (URS) が XylR による活性化に必要であることを見出した。*xylS* プロモーターの上流配列も解析し、同様の配列を見出した

(図5)<sup>19)</sup>。さらに *xylR* 自身の転写に関しては、過剰の XylR により抑制されることが明らかになり、マスター調節因子の調節機構が明らかになった<sup>9)</sup>。なお、Timmis 研究室の de Lorenzo らは、上流オペロンのプロモーター上流にある XylR の結合部位の折れ曲がりに IHF (Integration host factor) が関与することを報告している<sup>32)</sup>。

以上の結果から、XylR による NtrA 依存的 OP1/Pu プロモーター転写活性化機構として、マスター調節因子 XylR の活性型と NtrA との相互作用により、固有のプロモーターに結合した NtrA-RNA ポリメラーゼが転写を開始するというモデルを提唱した (図6)<sup>19)</sup>。

#### 4. おわりに

2002 年の終わりに、TOL プラスミド pWW0 とその脱落株である KT2440 の全ゲノム配列が発表され、*P. putida* mt-2 の研究は新しい時代を迎えた。

pWW0 (117 kbp) の配列は、TOL プラスミドの発見者である Williams 教授が、バーミンガム大学の Thomas 教授らと共同で行った<sup>10)</sup>。見出された 148 の ORF のうち、77 が既知の遺伝子と相関性を示した。プラスミドの複製、維持、伝達に関する遺伝子は Inc-P9 プラスミドの特徴を備え、Tn4651 と Tn4653 トランスポゾン上には、トランスポゾン関連遺伝子に加えて、このプラスミドの特性を決める分解系遺伝子と調節遺伝子、紫外線・ラジカル耐性遺伝子、重金属耐性、消毒剤耐性に関連する遺伝子などが存在したと報告している。

KT2440 の全ゲノム配列 (6.18 Mbp) は、米国 TIGR の Fraser 博士らのチームとドイツの Tümmeler 教授や Timmis 教授らの研究グループによって決定された<sup>45)</sup>。緑膿菌ゲノムとの比較については、85% の ORF は共通であるが、緑膿菌の病原因子であるエキソトキシン A や III 型分泌装置の遺伝子は存在しないことから、病原



性は低いと考えられた。また、多彩な物質分解能に関与する透過性と分解系遺伝子が存在することから、環境バイオテクノロジーへの応用が期待される微生物であると述べられている。これに関連して筆者は、“日本から世界中を旅したシュードモナス”と題するエッセイを *Env. Microbiol.* に発表する機会を得た<sup>37)</sup>。

その後 *P. putida* mt-2 の研究は飛躍的に進展している。スペインの de Lorenzo 教授の研究グループや、東京大学の野尻秀昭準教授の研究グループなどによる遺伝子発現調節機構の研究に加えて、mt-2 の研究から得られた成果を環境浄化に応用する研究が数多く進められている。今後も、環境バイオテクノロジーの基盤研究において、mt-2 が重要な役割を担うことが期待される。

## 謝 辞

私が *P. putida* mt-2 に出会って半世紀経ちました。京都大学時代には早石修教授、野崎光洋博士から酵素学の真髄を学び、また Stanier 教授、Gunsalus 教授など当時の国際的な *Pseudomonas* 研究者に会う機会を得ました。順天堂大学時代には横田 健教授から微生物遺伝学の基礎を学び、分解プラスミドの研究を始めました。そのきっかけとなった Chakrabarty の論文を紹介して下さったのが、東京大学の故矢野圭司教授でした。1978 年に移った山口大学第 2 生化学の中澤 淳教授の研究室では、新しい手法を用いて最先端の研究を行い、成果を世界に発信することができました。優れた共同研究者の井上幸江博士を得たことも幸運でした。TOL プラスミドの研究を通じて、欧米の沢山の研究者と交流することができました。

1987 年に医学部微生物学講座へ移って *Helicobacter pylori* の研究を始め、次第に mt-2 の研究から遠のきましたが、立ち上げの会に参加した国際シュードモナスシンポジウムには引き続き出席しました。1995 年、日本における第 5 国際シュードモナスシンポジウムの開催に当たっては、環境バイオテクノロジー学会の前身であるシュードモナス研究会の古川謙介教授、福田雅夫教授を始め多くの皆様に大変お世話になりました。

環境バイオテクノロジー学会賞の受賞にあたり、恩師、共同研究者を始め、お世話になった皆様に心から御礼を申し上げます。最後に、筆者を素晴らしい研究の世界へ導いてくれた *P. putida* mt-2 にも感謝の意を表したいと思います。

## 文 献

- 1) Benson S. and J. Shapiro. 1978. TOL Is a Broad-Host-Range Plasmid. *J. Bacteriol.* 135: 278–280.
- 2) Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112: 815–823.
- 3) Dixon, R.A. 1986. The *xylABC* promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 203: 129–136.
- 4) Downing R.G. and P. Broda. 1979. A cleavage map of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* 177: 189–191.
- 5) Duggleby, C.J., S.A. Bayley, M.J. Worsey, P.A. Williams, and P. Broda. 1977. Molecular sizes and relationships of TOL plasmids

- in *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* 130: 274–280.
- 6) Ebina, Y., F. Kishi, T. Miki, H. Kagamiyama, T. Nakazawa, and A. Nakazawa. 1981. The nucleotide sequence surrounding the promoter region of colicin E1 gene. *Gene.* 15: 119–126.
- 7) Franklin, F.C., M. Bagdasarian, M.M. Bagdasarian, and K.N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78: 7458–7462.
- 8) Franklin, F.C., P.R. Lehrbach, R. Lurz, B. Rueckert, M. Bagdasarian, and K.N. Timmis. 1983. Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathways. *J. Bacteriol.* 154: 676–685.
- 9) Gomada, M., S. Inouye, H. Imaishi, A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1992. Analysis of an upstream regulatory sequence required for activation of the regulatory gene *xylS* in xylene metabolism directed by the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* 233: 419–426.
- 10) Greated, A., L. Lambertsen, P.A. Williams, and C.M. Thomas. 2002. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 4: 856–871.
- 11) Harayama, S., P.R. Lehrbach, and K.N. Timmis. 1984. Transposon mutagenesis analysis of the meta-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* 160: 251–255.
- 12) Harayama, S., R.A. Leppik, M. Rekik, N. Mermod, P.R. Lehrbach, W. Reineke, and K.N. Timmis. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. *J. Bacteriol.* 167: 455–461.
- 13) Harayama, S., M. Rekik, and K.N. Timmis. 1986. Genetic analysis of a relaxed substrate specificity aromatic ring dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* 202: 226–234.
- 14) Harayama, S., N. Mermod, M. Rekik, P.R. Lehrbach, and K.N. Timmis. 1987. Roles of the divergent branches of the meta-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. *J. Bacteriol.* 169: 558–564.
- 15) Harayama, S., M. Rekik, M. Wubbolts, K. Rose, R.K. Leppik, and K.N. Timmis. 1989. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J. Bacteriol.* 171: 5048–5055.
- 16) Hayaishi, O., M. Katagiri, and S. Rothberg. 1955. Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 5450.
- 17) Inouye, S., Y. Asai, A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1986. Nucleotide sequence of a DNA segment promoting transcription in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 166: 739–745.
- 18) Inouye, S., Y. Ebina, A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1984. Nucleotide sequence surrounding transcription initiation site of *xylABC* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1688–1691.
- 19) Inouye, S., M. Gomada, U.M. Sangodkar, A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1990. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XylR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. *J. Mol. Biol.* 216: 251–260.
- 20) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1981. Molecular cloning of TOL genes *xylB* and *xylE* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 145: 1137–1143.
- 21) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1981. Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *xylS*. *J. Bacteriol.* 148: 413–418.
- 22) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1983. Molecular cloning of regulatory gene *xylR* and operator-promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 155: 1192–1199.
- 23) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1984. Nucleotide

- sequence of the promoter region of the *xylDEGF* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Gene*. 29: 323–330.
- 24) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1985. Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 163: 863–869.
  - 25) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene*. 44: 235–242.
  - 26) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1987. Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 5182–5186.
  - 27) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1987. Overproduction of the *xylS* gene product and activation of the *xylDLEGF* operon on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 169: 3587–3592.
  - 28) Inouye, S., M. Yamada, A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1989. Cloning and sequence analysis of the *ntrA* (*rpoN*) gene of *Pseudomonas putida*. *Gene*. 85: 145–152.
  - 29) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1988. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida*. *Gene*. 66: 301–306.
  - 30) Köhler, T., S. Harayama, J.L. Ramos, and K.N. Timmis. 1989. Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.* 171: 4326–4333.
  - 31) Lehrbach, P.R., J. Zeyer, W. Reineke, H.J. Knackmuss, and K.N. Timmis. 1984. Enzyme recruitment in vitro: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 158: 1025–1032.
  - 32) de Lorenzo, V., M. Herrero, M. Metzke, and K.N. Timmis. 1991. An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid. *EMBO J.* 10: 1159–1167.
  - 33) Mermod, N., P.R. Lehrbach, W. Reineke, and K.N. Timmis. 1984. Transcription of the TOL plasmid toluate catabolic pathway operon of *Pseudomonas putida* is determined by a pair of co-ordinately and positively regulated overlapping promoters. *EMBO J.* 3: 2461–2466.
  - 34) Mermod, N., J.L. Ramos, A. Bairoch, and K.N. Timmis. 1987. The *xylS* gene positive regulator of TOL plasmid pWWO: identification, sequence analysis and overproduction leading to constitutive expression of meta cleavage operon. *Mol. Gen. Genet.* 207: 349–354.
  - 35) Nakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Ebina, and A. Nakazawa. 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.* 258: 2923–2928.
  - 36) Nakazawa, T. 1978. TOL plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: thermosensitivity of self-maintenance and inhibition of host cell growth. *J. Bacteriol.* 133: 527–535.
  - 37) Nakazawa, T. 2002. Travels of a pseudomonad, from Japan around the world. *Environ. Microbiol.* 4: 782–786.
  - 38) Nakazawa, T., E. Hayashi, T. Yokota, Y. Ebina, and A. Nakazawa. 1978. Isolation of TOL and RP4 recombinants by integrative suppression. *J. Bacteriol.* 134: 270–277.
  - 39) Nakazawa, T., S. Inouye, and A. Nakazawa. 1980. Physical and functional mapping of RP4-TOL plasmid recombinants: analysis of insertion and deletion mutants. *J. Bacteriol.* 144: 222–231.
  - 40) Nakazawa, T., Y. Kojima, H. Fujisawa, M. Nozaki, O. Hyaishi, and T. Yamano. 1965. Studies on the mechanism of action of pyrocatechase by electron spin resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 240: PC3224–3226.
  - 41) Nakazawa, T., M. Nozaki, O. Hayaishi, and T. Yamano. 1969. Studies on pyrocatechase. II. Electron spin resonance and other properties of iron in the active center. *J. Biol. Chem.* 244: 119–125.
  - 42) Nakazawa, T. and T. Yokota. 1973. Requirement of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate for L-arabinose isomerase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 113: 1412–1418.
  - 43) Nakazawa, T. and T. Yokota. 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida*(*arvilla*) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.* 115: 262–267.
  - 44) Nakazawa, T. and T. Yokota. 1977. Isolation of a mutant TOL plasmid with increased activity and transmissibility from *Pseudomonas putida*(*arvilla*) mt-2. *J. Bacteriol.* 129: 39–46.
  - 45) Nelson, K.E., C. Weinel, I.T. Paulsen, R.J. Dodson, H. Hilbert, V.A. Martins dos Santos, D.E. Fouts, S.R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R.T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J.A. Eisen, K.N. Timmis, A. Dusterhöft, B. Tümmler, and C.M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799–808.
  - 46) Nozaki, M., H. Kagamiyama, and O. Hayaishi. 1963. Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties. *Biochem. Z.* 338: 582–590.
  - 47) Nozaki, M., K. Ono, T. Nakazawa, S. Kotani, and O. Hayaishi. 1968. Metapyrocatechase. II. The role of iron and sulfhydryl groups. *J. Biol. Chem.*, 243: 2682–2690.
  - 48) Ramos, J.L., N. Mermod, and K.N. Timmis. 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 1: 293–300.
  - 49) Ramos, J.L., A. Stolz, W. Reineke, and K.N. Timmis. 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83: 8467–8471.
  - 50) Ramos, J.L., A. Wasserfallen, K. Rose, and K.N. Timmis. 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science*. 235: 593–596.
  - 51) Tsuda, M. and T. Iino. 1987. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWWO. *Mol. Gen. Genet.* 210: 270–276.
  - 52) Williams, P.A. and K. Murray. 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 120: 416–423.
  - 53) Williams, P.A. and M.J. Worsey. 1976. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* 125: 818–828.
  - 54) Wong, C.L. and N.W. Dunn. 1974. Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate and m-toluate in *Pseudomonas arvilla* mt-2. *Genet. Res.* 23: 227–232.
  - 55) Worsey, M.J., F.C. Franklin, and P.A. Williams. 1978. Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWWO) from *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* 134: 757–764.
  - 56) Worsey, M.J. and P.A. Williams. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence of a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124: 7–13.
  - 57) Zeyer, J., P.R. Lehrbach, and K.N. Timmis. 1985. Use of cloned genes of *Pseudomonas* TOL plasmid to effect biotransformation of benzoates to cis-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1409–1413.