

原著論文 (通常論文)

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における BphS/BphT 支配下遺伝子群の 発現への中間分解産物カテコールの影響

Effect of Catechol, an Intermediate Product of Biphenyl Degradation, on the Transcriptional Activation of Biphenyl Inducible Genes in Polychlorinated Biphenyl Degradator, *Rhodococcus jostii* RHA1

伊藤 拓¹・鎌田 裕樹²・遠藤 銀朗²・福田 雅夫³・宮内 啓介^{2*}

TAKU ITO, HIROKI KAMATA, GINRO ENDO, MASAO FUKUDA and KEISUKE MIYAUCHI

¹ 東北学院大学工学研究科 (〒 985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1)

² 東北学院大学工学部 (〒 985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1)

³ 長岡技術科学大学工学部 (〒 940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

* TEL: 022-368-7445 FAX: 022-368-7070

* E-mail: kmiya@mail.tohoku-gakuin.ac.jp

¹ Graduate School of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1 Chuo, Tagajo, Miyagi 985-8537, Japan

² Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1 Chuo, Tagajo, Miyagi 985-8537, Japan

³ Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka-cho, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

(原稿受付 2014 年 8 月 18 日 / 原稿受理 2014 年 9 月 12 日)

Transcription of the *bphAa* gene that is responsible for the first step of biphenyl degradation by a polychlorinated biphenyls (PCBs) degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1, is activated by biphenyl, and the activation was repressed by catechol, an intermediate product of biphenyl bio-degradation. To understand this phenomenon, in this paper, we studied the transcriptional regulation of *etbD1*, *etbAd*, *etbAa1* and *etbAa2* genes that are controlled by the BphS/BphT two component system, which regulates the expression of *bphAa* in strain RHA1. Strain RHA1 and its *catA*-deleted mutant were transformed with reporter plasmids containing promoter regions of the four biphenyl-degradation genes, and the transcription activities were measured with benzoate or without benzoate in the medium. The results showed that like *bphAa*, the presence of catechol affected the transcriptional activation of these four genes. In addition, the bacterial growth activity on biphenyl was improved when the expression of *bphS1* or *bphT1* was increased in RHA1. From these results, it is concluded that catechol represses the transcriptional activation of the genes under the control of BphS/BphT and the reinforcement of *bphS1* and *bphT1* expression is one of the strategies to overcome the catechol repression of the biphenyl degradation by RHA1.

キーワード : PCB, ビフェニル分解, カテコールによる抑制, バイオレメディエーション, 転写制御

Key words: PCB, biphenyl degradation, repression by catechol, bioremediation, transcriptional regulation

1. 緒 言

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は、発癌性、ホルモン異常、内臓障害、胎児への催奇性など生物に対する有害性を示す難分解性の環境汚染物質として知られている¹⁸⁾。これまでに、PCB 汚染の微生物を用いた浄化を目的として、PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 が単離された¹³⁾。RHA1 株はビフェニルとの共代謝によって高塩素置換の PCB も分解可能であり、その PCB 分解経路、および分解に関与する遺伝子群 (*bph* 遺伝子群) が明らかにされている (Fig. 1)⁵⁾。RHA1 中の PCB 分解に関わる遺伝子群はゲノム上に分かれてオペロンとして存在しており (Fig. 2), *bphAa*, *etbD1* (*bphD* ホモログ), *etbAd* (*bphAd* ホモログ), *etbAa1* (*bphAa* ホモログ),

etbAa2 (*bphAa* ホモログ) それぞれの遺伝子上流に共通のプロモーター領域が存在する¹⁴⁾。

これらの遺伝子群の転写は、ビフェニル存在下で、センサーである BphS1, およびレスポンスレギュレーターである BphT1/BphT2 タンパク質からなる二成分制御系によって同時に活性化されることが明らかにされている^{13,16)}。基質であるビフェニルを BphS1 が感知することで BphS1 が自己リン酸化し、リン酸化した BphS1 が BphT1/T2 をリン酸化し、リン酸化された BphT1/T2 がビフェニル分解遺伝子群のプロモーター領域に結合することによって転写が開始されると考えられる (Fig. 2)。

我々はこれまでの研究で、培地中にビフェニルの中間代謝産物である安息香酸を添加するとビフェニルによる *bphAa* プロモーターの転写活性化が抑制されること、

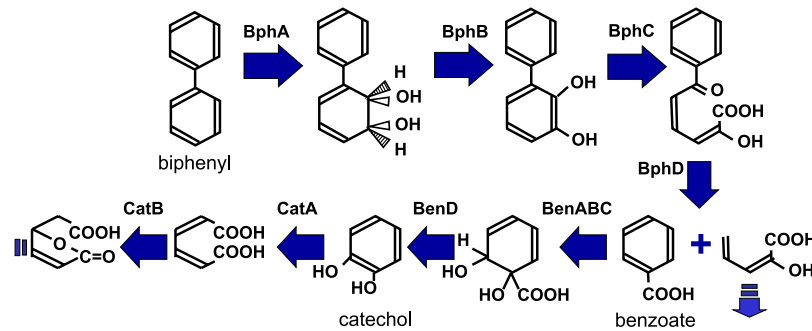


Fig. 1. Biphenyl degradation pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1. PCB is also degraded using this pathway. The name of enzymes corresponding to each degradation step is shown above each arrow, and the names of compounds described in the text are shown. The dashed arrows show that the compounds are degraded via multiple steps.

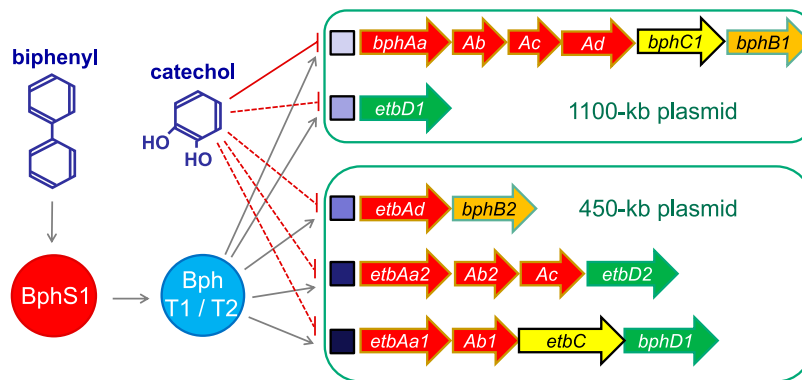


Fig. 2. The transcription mechanism of biphenyl degradation genes under the control of BphS/BphT. Biphenyl degradation genes are showed by thick arrows. Each promoter region is showed by the square above each gene cluster.

安息香酸以下の分解遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を用いた実験により、安息香酸より下流の代謝産物であるカテコールが *bphAa* プロモーターのビフェニルによる転写活性化を抑制することを明らかにした⁷⁾。さらにカテコール分解遺伝子 *catA* を RHA1 中で高発現させることにより、ビフェニルによる *bphAa* プロモーター転写活性化の安息香酸存在下の抑制が解除され、ビフェニルを単一炭素源としたときの生育が大きく向上することが示された⁸⁾。

本研究では RHA1 株の PCB 分解能力を発揮させるにあたって、カテコールによる抑制が *bphAa* プロモーターに特異的か、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響するのかが重要な知見となると考え、実験を行った。また、カテコールによる抑制が BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響するならば、*catA* 高発現のような *bphAa* プロモーターの転写を強化する手法⁸⁾ が他のビフェニル分解遺伝子群の転写強化にも有効に働くと考えられる。そこで、*catA* 高発現とは異なるビフェニル生育能強化のアプローチとして転写制御因子である *bphS1*, *bphT1* に着目し、両遺伝子をそれぞれ高発現させた RHA1 株のビフェニル存在下での生育の変化を調べた。

2. 材料および方法

2.1 使用菌株とプラスミド

本研究で用いた菌株を Table 1 に、プラスミドを Table

2 に示す。野生株である *Rhodococcus jostii* RHA1 株は PCB 分解菌であり、ビフェニルを単一炭素源として生育することができる¹³⁾。RHA1 株および RHA1Δ*catA* 株の培養は 1/5LB 培地 (2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. water), またはビフェニルを単一炭素源とした M9 培地 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄·7H₂O solution, 1 ml 0.1 M CaCl₂ solution, in 1,000 ml of dist. water) を用いて、30°C で行った。ビフェニルは寒天培地のときは蓋上に置いて、液体培地のときは粉を直接加えて用いた。

2.2 *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

Rhodococcus 属細菌の形質転換は既報⁹⁾ に従いエレクトロポレーション法によって行った。

2.3 プロモーター活性測定

RHA1 株のビフェニル分解遺伝子群の転写を観察するため、*etbD1*, *etbAd*, *etbAa1*, *etbAa2* の各プロモーター領域をレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*) の上流に挿入したプラスミド pKLAED1, pKLAED4, pKLAED2, pKLABD1 (Table 2 に記載) をそれぞれ用いた。

各レポータープラスミドを導入した RHA1 株、もしくは RHA1Δ*catA* 株を、カナマイシンを終濃度 50 μg/ml で添加した 1/5LB 培地を 100 ml 入ったバッフル付き三角フラスコで 48 時間培養した。遠心 (4,000 rpm, 10 min)

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB degrader, wild type, BPH ⁺ BEN ⁺	9)
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> -deleted mutant of RHA1, BEN ⁻	7)

BPH⁺, growth on biphenyl; BEN⁺, growth on benzoate; BEN⁻, no growth on benzoate

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pKLAEA4	Promoter plasmid carrying <i>etbAd</i> promoter region, Km ^r	14)
pKLAED2	Promoter plasmid carrying <i>etbAa2</i> promoter region, Km ^r	17)
pKLABD1	Promoter plasmid carrying <i>etbAa1</i> promoter region, Km ^r	17)
pKLAED1	Promoter plasmid carrying <i>etbD1</i> promoter region, Km ^r	17)
pFAJ2574	<i>Rhodococcus-E. coli</i> shuttle vector, Cm ^r	4)
pFJS1	pFAJ2574 carrying <i>bphS1</i>	15)
pFTCm	pFAJ2574 carrying <i>bphT1</i>	10)

Km^r, kanamycin resistance; Cm^r, chloramphenicol resistance

して菌体を回収し、上清を捨てた後、1/5LB 培地 5 ml で菌体を洗浄し、カナマイシン（終濃度 50 μ g/ml）を添加した 1/5LB 培地 5 ml に OD₆₀₀ が 1.0 となるように調整した。必要に応じてビフェニル、安息香酸ナトリウムを終濃度 10 mM となるように加えた。30°C で培養し、3 時間おきに発光値と菌液の濁度（OD₆₀₀）を測定した。発光値は菌液 100 μ l に 1-decanal を 1% 含む Lux Buffer（10 mM リン酸 Buffer（pH 7.0）50 ml, 100% EtOH 49 ml）を 25 μ l 加え、5 秒間の発光を測定した。発光は BERTHOLD TECHNOLOGIES 社製 MicroLumimat Plus で測定した。測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を発光値とした。発光値 / OD₆₀₀ の数値を単位菌数あたりのプロモーター転写活性とした。各サンプルにおける 0 時間における発光値を 1 とし、それとの相対値によって各菌株のプロモーター活性を比較した。

2.4 液体培養時の生育測定

pFJS1, pFTCm もしくは pFAJ2574 を導入した RHA1 株を、クロラムフェニコールを終濃度 30 μ g/ml で添加した 1/5LB 培地 10 ml を入れた試験管で一晩培養した。遠心（4,000 rpm, 10 min）して菌体を回収し、測定の際に用いる培地で菌体を洗浄し、菌液を OD₆₀₀ が 1.0 となるよう調整した後、L 字試験管中の培地 5 ml に 2% 植菌して測定した。培地は 1/5LB か、M9 にビフェニルを添加したものをを用いた。いずれの培地にも、クロラムフェニコールを終濃度 30 μ g/ml で添加した。ビフェニルを用いる場合は、粉末を L 字試験管に入れて 70°C で融解させて壁面に固着させた。菌液濁度（OD₆₀₀）は、ADVANTEC 社製バイオフィォトレコーダー TVS062CA を用いて測定した。測定間隔は 15 分、振とう速度は 60 rpm とした。

3. 結果と考察

3.1 RHA1 株における BphS/BphT 支配下のプロモーター活性の観察

RHA1 株において *bphAa* 以外の BphS/BphT 支配下の

ビフェニル分解遺伝子 *etbD1*, *etbAd*, *etbAa1*, *etbAa2* の各プロモーター領域に、*bphAa* プロモーターと同様にビフェニルによる転写活性化の安息香酸存在下での抑制が現れるかを観察した。上記のプロモーター転写活性を測定するため、4 つのレポータープラスミド pKLAED1, pKLAEA4, pKLAED2, pKLABD1（Table 2）をそれぞれ RHA1 株に導入した。これらの菌株を 1/5LB 培地、および、それにビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加えた培地で培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。以前の結果より、ビフェニルによる *bphAa* の転写活性化を低下させる主要な原因物質はカタコールであることが示された⁷⁾が、高濃度のカタコールを培地に直接添加した場合、菌体の生育に負の影響を与えるため、本研究では安息香酸を添加し、その影響を観察した。結果を Fig. 3 に示す。

0 時間を基準として 9 時間時点のプロモーター活性は、*etbD1* プロモーターにおいてビフェニルを加えた場合は約 17 倍に上昇し、さらに安息香酸を加えた場合は約 10 倍にとどまった（Fig. 3A）。*etbAd* プロモーターにおいては、ビフェニルを加えた場合は約 8 倍、さらに安息香酸を加えた場合は約 5 倍（Fig. 3B）、*etbAa1* プロモーターにおいては、ビフェニルを加えた場合は約 17 倍、さらに安息香酸を加えた場合は約 11 倍（Fig. 3C）、*etbAa2* プロモーターにおいては、ビフェニルを加えた場合は約 12 倍、さら安息香酸を加えた場合は約 7 倍程度の転写活性の上昇が観察された（Fig. 3D）。1/5LB のみの場合は、*etbAd* プロモーター以外の転写活性は 2 倍前後の上昇となったが、*etbAd* プロモーターのみ 5 倍程度まで上昇した（Fig. 3B）。

以上の結果より、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解に関わる 4 つの遺伝子のプロモーターは *bphAa* プロモーターと同様に、ビフェニル存在下でプロモーター活性が上昇するが、さらに安息香酸を加えることで活性化に負の影響があったことが示された。

この実験において、1/5LB 培地のみの場合における *etbAd* プロモーターの転写活性は 9 時間で 5 倍程度の上昇が観察され、*bphAa* プロモーターや他の 3 つのプロ

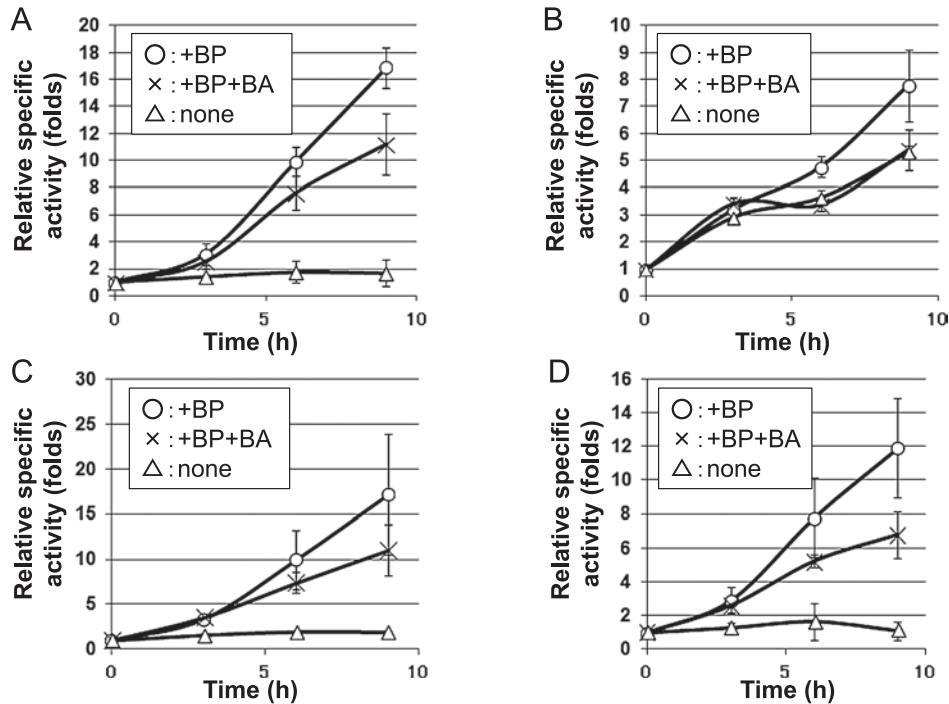


Fig. 3. Promoter activity of *etbD1* (A), *etbAd* (B), *etbAa1* (C), and *etbAa2* (D) that are regulated by BphS/BphT. BP, 1/5LB medium+biphenyl; +BP+BA, 1/5LB medium+biphenyl+benzoate; none, 1/5LB medium. Values are means \pm standard deviations of three determinations.

モーターより比較的高い結果を示した。過去の研究において、ビフェニル存在下における *etbAd* の転写量は、他のビフェニル分解遺伝子の転写量よりも、比較的低いことが示されている⁹⁾。そのため、今回の実験においては、*etbAd* のビフェニルによる転写活性上昇に対して培養中の菌体内の転写活性の全体的な上昇による影響が相対的に大きく現れたものと考えられる。ビフェニルに安息香酸を加えた場合の *etbAd* プロモーターの転写活性は、1/5LB と同程度の倍率となっており、今回の実験で用いた他の3つのプロモーターよりも安息香酸に対する感受性が高いことを示唆している。

3.2 $\Delta catA$ 株における BphS/BphT 支配下のプロモーター転写活性の観察

以前の研究で、*bphAa* のレポータープラスミドを RHA1 の *catA* 破壊株 ($\Delta catA$ 株) に導入してビフェニル存在下で培養するとカテコールが蓄積し、*bphAa* の転写活性化に負の影響を与えることが明らかとなっている⁸⁾。*bphAa* 以外の BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群もカテコールによる転写活性化への負の影響があるかを調べるために、 $\Delta catA$ 株を用いて各プロモーター活性を観察した。

$\Delta catA$ 株に、レポータープラスミド pKLAED1, pKLAEA4, pKLAED2, pKLABD1 をそれぞれ導入した。これらの形質転換株を 1/5LB 培地にビフェニル加えた培地で培養して、3時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定し、前項の実験で得られた RHA1 株における同条件のルシフェラーゼ活性と比較を行った。結果を Fig. 4 に示す。

RHA1 株と $\Delta catA$ 株の結果を比較すると、0時間を基準として9時間時点の *etbD1* プロモーター転写活性は、

RHA1 株において約17倍であったものが、 $\Delta catA$ 株においては約2倍にとどまった (Fig. 4A)。同様に、*etbAd*, *etbAa1*, *etbAa2* の各プロモーターでは RHA1 株と $\Delta catA$ 株の9時間での転写活性化がそれぞれ8倍と2倍 (Fig. 4B), 17倍と6倍 (Fig. 4C), 12倍と5倍 (Fig. 4D) となり、いずれも $\Delta catA$ 株でビフェニルによるプロモーターの活性化に負の影響があった。

以上の結果より、ビフェニルによる転写活性化がカテコールの蓄積によって抑制されるという現象は、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子のプロモーター全般に対して起こることが強く示唆された。前項の RHA1 株における実験では 1/5LB 培地でのみの条件で特異な結果を示した *etbAd* プロモーターは、 $\Delta catA$ 株では他の株同様の転写活性化抑制を示した。 $\Delta catA$ 株において 1/5LB 培地にビフェニルを加えた条件で生育した場合の *etbAd* プロモーターの転写活性は、RHA1 株において 1/5LB のみで生育した場合の転写活性よりも低いことから、菌体内に蓄積したカテコールが *etbAd* プロモーターの転写活性化に対して強い負の影響をもたらすことが示唆された。

3.3 BphS/BphT 高発現株のビフェニル炭素源における生育の観察

前述の結果により、カテコールは BphS/BphT 支配下の5つのプロモーターに対してビフェニルによる活性化に負の影響を与える物質であることが示唆された。以前の研究の結果より、カテコール分解遺伝子 *catA* を高発現することで、ビフェニルを単一炭素源としたときの生育能が向上することが示されている⁸⁾。これは、*catA* 高発現によりカテコールがスムーズに分解されることで、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子の転写活性

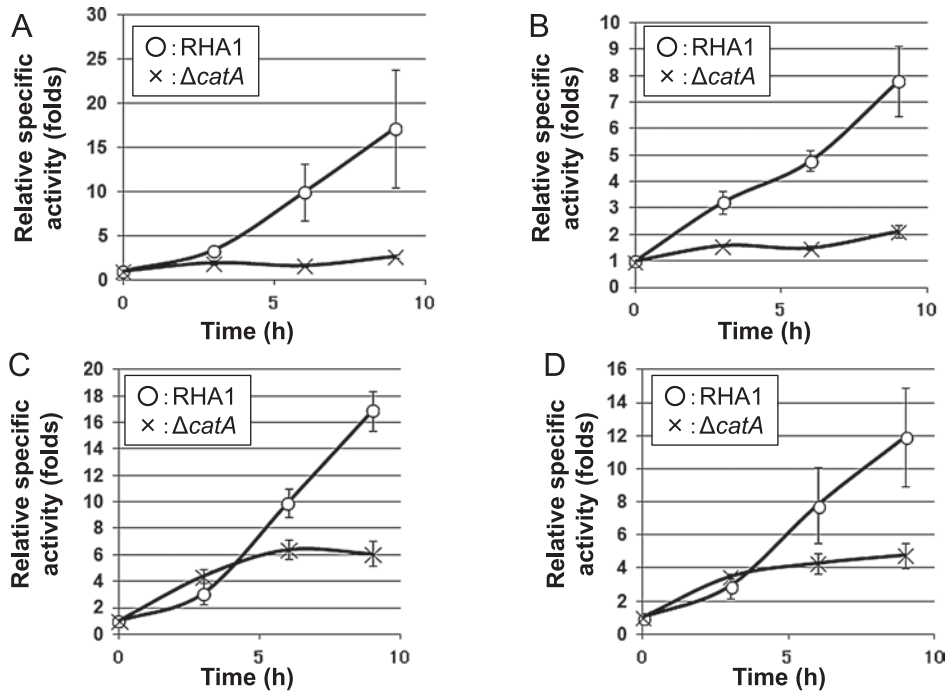


Fig. 4. Promoter activity of *etbD1* (A), *etbAd* (B), *etbAa1* (C), and *etbAa2* (D) in RHA1 and RHA1 Δ *catA* in the existence of biphenyl. Values are means \pm standard deviations of three determinations.

化に対する負の影響が緩和されたことによるものと考えられる。

本項ではビフェニルを単一炭素源としたときの生育能向上を *catA* 強化以外のアプローチによって実現することを目的とした。そこで、ビフェニル分解に関わる正の転写制御遺伝子 *bphS1*、および *bphT1* の増強がビフェニルを単一炭素源としたときの生育能向上に寄与するのか実験を行った。

bphS1 と *bphT1* の高発現のビフェニルでの生育能への影響を検証するため、RHA1 株に *bphS1* 高発現プラスミド pFJS1、*bphT1* 高発現プラスミド pFTCm、およびこれらのベクタープラスミドである pFAJ2574 をそれぞれ導入し、1/5LB 培地と、無機塩培地である M9 培地にビフェニルを加えたもので培養し、15 分ごとに濁度を測定した。

その結果、1/5LB 培地における生育は増殖の立ち上がりは全菌株でほぼ同じであった。最終到達濁度は RHA1 (pFAJ2574) で約 1.5、RHA1 (pFJS1) と RHA1 (pFTCm) で約 2 となった (Fig. 5A)。M9 培地にビフェニルを添加した条件での生育では、約 50 時間で、RHA1 (pFJS1) は濁度 0.8 程度、RHA1 (pFTCm) は濁度 0.6 程度となり、両菌株とも測定終了まで濁度は上昇し続けた。RHA1 (pFAJ2574) は約 80 時間で最終到達濁度は約 0.4 となり、その後の濁度は緩やかに減少した (Fig. 5B)。

増殖の立ち上がりは RHA1 (pFAJ2574) で 50 時間、RHA1 (pFJS1) と RHA1 (pFTCm) で 30 時間となった。RHA1 (pFJS1) と RHA1 (pFTCm) を比較すると、RHA1 (pFJS1) のほうが増殖の立ち上がりはやや早かった。以上の結果より、RHA1 株において *bphS1* または *bphT1* を高発現させることで、ビフェニルを単一炭素源としたときの生育が大きく向上することが示された。

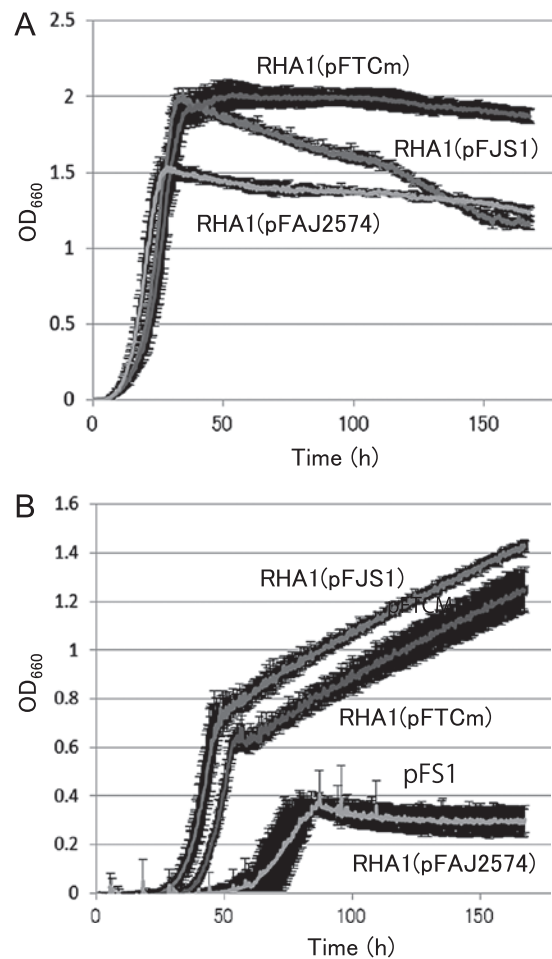


Fig. 5. Growth activity of RHA1 expressing *bphS1* or *bphT1* in 1/5LB medium (A) and M9 medium+biphenyl (B). Values are means \pm standard deviations of three determinations.

この結果は、過去の研究で示された *catA* 高発現株の生育曲線⁹⁾と同様の傾向を示していた。さらに、*bphS1* または *bphT1* の高発現を比較した場合、生育能向上には *bphS1* の高発現がより有効であることが示唆された。

bphS1 または *bphT1* の高発現における生育能向上の詳細なメカニズムは不明であるが、*bphS1* 高発現の場合、細胞内の BphS1 量が増え、より多くのビフェニルを感知可能になったことが考えられる。*bphT1* 高発現の場合、活性化した BphS1 からのシグナルをより多く分解遺伝子のプロモーターに伝えることが可能になったことが考えられる。また、カテコール、あるいはカテコールによって誘導される未知の転写抑制に関与するタンパク質のターゲットが BphS1、あるいは BphT1 であるとしたら、BphS1、あるいは BphT1 を高発現させることでカテコール由来の負の影響を緩和することができたと考えられる。

RHA1 株において、ビフェニル存在下で活性化するビフェニル分解遺伝子群の転写がカテコール存在下で抑制される現象は、上流の基質よりも分解しやすい下流の基質を優先して代謝するカタボライト抑制や、生育に悪影響を与える物質を優先的に分解している可能性が考えられる。RHA1 株においては、グルコースとフルクトースの存在下で、ビフェニル分解遺伝子群のビフェニルによる転写活性化の抑制が起こること¹⁾、また、それぞれの糖の取り込みに関わる遺伝子を破壊した株においては、転写活性化の抑制が解除されること²⁾が報告されている。また、フタル酸分解菌である *Rhodococcus* sp. DK17 株において、フタル酸と同時に安息香酸を与えると、安息香酸の分解が終わるまでフタル酸は分解されない現象が報告されているが、そのメカニズムは不明である³⁾。PCB 分解菌である *Acidovorax* sp. KKS102 株¹¹⁾ の BphS は GntR ファミリーに属するリプレッサータンパク質であり、ビフェニルの中間代謝産物である 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid 非存在下で *bph* 遺伝子群を負に制御することが報告されているが¹²⁾、これは今回の RHA1 株においてカテコールが *bphAa* 遺伝子の転写活性化へ負の影響を与える現象とはメカニズムが異なると考えられ、また、RHA1 株のゲノム上に KKS102 株の *bphS* と同性的のある遺伝子は存在しない。しかし、RHA1 株においてカテコールにより誘導される未知のタンパク質が、KKS102 株の BphS 同様に *bph* 遺伝子群の転写に負の影響を与えている可能性は考えられる。

BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーターに対するカテコールによる抑制のメカニズムとしては、カテコール、もしくはカテコールによって誘導される未知のタンパク質が BphS の働きを抑える、BphT の働きを抑える、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーターからの転写を抑える、転写された mRNA の翻訳を抑える、などが考えられるが、現時点では詳細は不明である。本研究で明らかになった RHA1 株のビフェニル分解遺伝子の転写活性化のカテコールによる抑制の分子メカニズムについては、今後の課題として研究を進める予定である。

謝 辞

pFAJ2574 をご提供いただきました René De Mot 博士に感謝いたします。また、本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 21 年度～平成 25 年度）および日本学術振興会科研費（24580121）の助成を受けたものです。

文 献

- 1) Araki, N., Y. Niikura, K. Miyauchi, D. Kasai, E. Masai, and M. Fukuda. 2011. Glucose-Mediated Transcriptional Repression of PCB/Biphenyl Catabolic Genes in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20: 53–62.
- 2) Araki, N., T. Suzuki, K. Miyauchi, D. Kasai, E. Masai, and M. Fukuda. 2011. Identification and Characterization of Uptake Systems for Glucose and Fructose in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20: 125–136.
- 3) Choi, K.Y., G.J. Zylstra, and E. Kim. 2007. Benzoate catabolite repression of the phthalate degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1370–1374.
- 4) De Mot, R., I. Nagy, A. De Schrijver, P. Pattanapitpaisal, G. Schoofs, and J. Vanderleyden. 1997. Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 and construction of *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vectors. *Microbiology.* 143: 3137–3147.
- 5) 福田雅夫, 宮内啓介, 政井英司. 2005. *Rhodococcus* 属細菌の PCB 分解システム. 蛋白質核酸酵素. 50: 1541–1547.
- 6) Gonçalves, R.E., H. Hara, D. Miyazawa, J.E. Davies, L.D. Eltis, and W.W. Mohn. 2006. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6183–6193.
- 7) 伊藤 拓, 荒木直人, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介. 2011. PCB 分解菌における分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制. 環境工学研究論文集. 48: 485–493.
- 8) 伊藤 拓, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介. 2013. カテコール分解遺伝子導入による PCB 分解菌の分解遺伝子群転写活性の強化. 環境工学研究論文集. 50: 223–229.
- 9) Masai, E., A. Yamada, J.M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of Gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2079–2085.
- 10) Nguyen, P.A.T., T.H.T. Trinh, Y. Fukumitsu, J. Shimodaira, K. Miyauchi, M. Tokuda, D. Kasai, E. Masai, and M. Fukuda. 2013. Gene cluster and regulation system for 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethylene (DDE) degradation in *Janibacter* sp. TYM3221. *J. Biosci. Bioeng.* 116: 91–100.
- 11) Ohtsubo, Y., F. Maruyama, H. Mitsui, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2012. Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. strain KKS102, a polychlorinated-biphenyl degrader. *J. Bacteriol.* 194: 6970–6971.
- 12) Ohtsubo, Y., M. Delawary, K. Kimbara, M. Takagi, A. Ohta, and Y. Nagata. 2001. BphS, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. *J. Biol. Chem.* 276: 36146–36154.
- 13) Seto, M., K. Kimbara, M. Shimura, T. Hatta, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3353–3358.
- 14) Takeda, H., N. Hara, M. Sakai, A. Yamada, K. Miyauchi, E. Masai, and M. Fukuda. 2004. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1249–1258.
- 15) Takeda, H., A. Yamada, K. Miyauchi, E. Masai, and M.

- Fukuda. 2004. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J. Bacteriol.* 186: 2134–2146.
- 16) Takeda, H., J. Shimodaira, K. Yukawa, N. Hara, D. Kasai, K. Miyauchi, E. Masai, and M. Fukuda. 2010. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.* 192: 4741–4751.
- 17) Yamada, A., H. Kishi, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Nakamura, E. Masai, and M. Fukuda. 1998. Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2006–2012.
- 18) 財団法人産業廃棄物処理事業振興財団. 2005. 廃棄物処理方針処理基準に基づく PCB 処理技術ガイドブック (改訂版).