

応用生命工学専攻
平成10年度博士課程進学
氏名 大坪嘉行
指導教官 太田明德

論文題目

Pseudomonas sp. KKS102株のPCB/biphenyl 分解系遺伝子群の発現調節機構の解明

人類はその発展と共に多くの化合物を生み出し利用してきた。そのうちあるものは、自然界において十分に分解されずに残留し、様々な影響を及ぼすこととなった。そのような難分解性物質の中には生体にとって有害なものもあり、例えば非常に低濃度で生物の内分泌系を攪乱する物質いわゆる環境ホルモンは、地球上の生態系にとって大きな脅威となっている。このような有害な人為起源物質を環境中から浄化する試みは、地球上の生物資源の保全の観点から非常に重要である。

PCB（ポリ塩化ビフェニル）は、そのような化合物の一つである。この物質は低揮発性、高絶縁性、高脂溶性、化学的安定性等の有用な性質により、大量に合成され使用されてきた。その後、PCBが生体に対し環境ホルモンとしての活性を含む強い毒性を持つことが明らかになり、製造使用が禁止され、それまでに製造されたものが容易には廃棄出来ないまま蓄積され現在に至っている。

当研究室では微生物を用いたPCBの分解に着目して研究を行ってきた。これまでの結果では、土壤中よりPCB/ビフェニル分解菌、*Pseudomonas* sp.KKS102を単離し、そのPCB / ビフェニル分解経路 (Fig.1) および分解に関与する遺伝子群 (*bph* genes) が明らかにされている (Fig.2)。しかし、*bph*遺伝子群の発現調節機構は未解明のままであった。微生物を用いて効率よくPCBを分解させるには、分解に関与する遺伝子群の発現制御機構を解明し、積極的に利用することが必要であると考えられる。

本研究では、*P. sp.* KKS102の*bph*遺伝子群の発現制御機構の解明を目的に研究を行った。加えて、PCBの高分解菌の作製を行った。

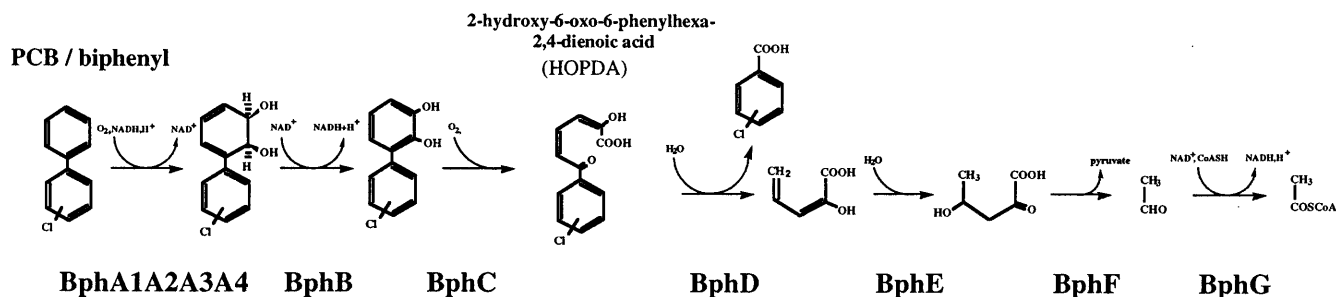


Fig.1 *Pseudomonas* sp. KKS102におけるPCB / biphenylの代謝経路

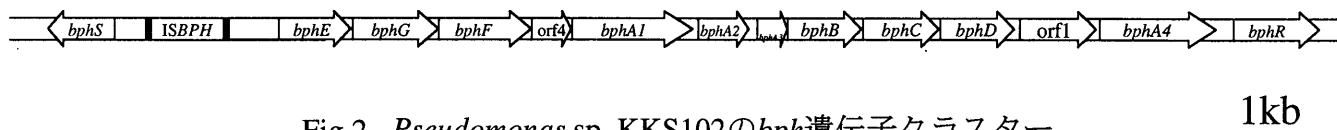


Fig.2 *Pseudomonas* sp. KKS102の***bph***遺伝子クラスター

1. *bph*遺伝子群の誘導基質

*bph*遺伝子群の誘導に関与する物質の同定を試みた。難分解性物質の分解に関与する遺伝子群の誘導基質は多くの場合その分解経路の中間産物であり、経路の出発物質であることの方がまれである。この目的のため、*bphA*、*bphB*、*bphC*、*bphD*の各破壊株を作製し、ビフェニル添加による誘導の有無をノーザン解析で検討した。この結果、*bphD*破壊株においてのみ誘導が観察された。この結果から、*bph*遺伝子群の誘導基質は、ビフェニルがBphA、BphB、BphCの活性によって変換された産物すなわち2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) であることが示唆された。さらに、HOPDAを調整して培地に添加したところ、誘導が観察された。これらの結果から*bph*遺伝子群の誘導基質はHOPDAであると結論した。

2. *bphS*遺伝子の機能

*bph*遺伝子群の上流の塩基配列を解読したところ、挿入配列 (ISBPHと命名)、およびGntRファミリーに属する転写因子をコードするORF (*bphS*と命名) を見いだした。*bphS*の破壊株では、*bphA1*、*bphC*、*bphD*の転写産物およびBphD活性の構成的な発現が観察されたことから、*bphS*は*bph*遺伝子群の負の制御因子であることが明らかになった。

3. *bphE*上流のプロモーターの役割

*bph*遺伝子群の最上流に位置する*bphE*遺伝子が誘導されることから、*bph*遺伝子群の誘導的発現に関与するプロモーターは*bphE*遺伝子上流に存在すると考えられた。そこで、*bphE*上流の転写開始地点をprimer extensionで解析し、*bphE*上流の転写開始地点を決定した。またその対応する位置にプロモーター要素を見出した (*pE*プロモーターと命名)。さらに、*pE*プロモーター領域-*lacZ*融合DNAをゲノムに組み込み、転写活性を測定する系を構築して解析を行い、*bphE*上流には*pE*プロモーターのみが存

在すること、およびプロモーター直下流のDNA配列が誘導的発現に関与することを明らかにした。

*bph*遺伝子群全体が転写される上での*pE*プロモーターの重要性を明らかにするために、*pE*プロモーターを欠失した株を作製した。*pE*プロモーターを欠失させると、BphD活性の低下が観察された。この活性の低下は負の制御因子 (*bphS*) の破壊によっても相補されなかった。また、*bphE*上流に構成的なプロモーターを組み込んだところ、構成的なBphD活性が検出された。以上の結果から、*bph*遺伝子群は1つの転写単位であること、すなわちオペロンをなしていること、および*pE*プロモーターが*bph*遺伝子群の発現に関わる主要なプロモーターであることが明らかとなった。

4. *bphR*遺伝子の機能解析

*bph*遺伝子群の下流にはLysRファミリーに属する転写因子をコードすると考えられる遺伝子*bphR*が存在している。しかしながら*bphR*の破壊株では、KKS株と同等の*bph*遺伝子群の誘導が観察されたので、*bphR*は*bph*遺伝子群の発現には関与しないことが明らかとなった。さらに、*bphR*の破壊株でビフェニルの代謝によって生じる安息香酸の蓄積が観察され、*bphR*遺伝子産物が安息香酸の資化に関与する遺伝子群の発現制御に関与することが示唆された。

5. BphSタンパク質の*pE*プロモーターへの結合

BphSを発現する大腸菌の粗抽出液、あるいはC末端にHisタグをつけて精製したBphSタンパク質を用いて、BphSと*pE*プロモーター領域との結合をゲルシフトアッセイによって解析した。その結果、BphSが*pE*プロモーター領域と特異的に結合することが明らかになった。また、この結合の親和性は誘導基質であるHOPDAの存在下では低下することが明らかになった。さらにDNase footprintingを行ったところ、*pE*プロモーターの直下流に4カ所の連続する結合部位が確認された。

4カ所の結合部位（上流からBS1、BS2、BS3、BS4）のうち、BS1とBS2は比較的低い濃度のBphSタンパク質の存在下でもDNase による切断から保護されたが、BS3と4は比較的高濃度のBphSタンパク質の存在下においてのみ保護された。それぞれの結合部位に対する親和性（解離定数）を測定したところ、その結合強度はBS2>BS1>BS4>BS3の順であった。さらにゲルシフトアッセイによる競合実験により、BphSがBS1とBS2に、またBS3とBS4に協同的に結合すること、さらに結合部位全体にも協同的に結合することが明らかになった。

それぞれの結合部位を欠失させた*pE*プロモーター領域をLacZをレポーターとして解析したところ、BS1およびBS2が抑制において主要な役割を果たすが、BS3およびBS4も効率的な抑制に関与することが明らかになった。

以上、*pE*プロモーターは*bph*遺伝子群の転写を行う上での最重要なプロモーターであること、*bphS*遺伝子産物は*pE*プロモーターの転写を負に制御する主要な転写制御因子であること、その誘導基質であるHOPDAの存在下ではDNAから解離することにより抑制が解除されることを明らかにした。

6. *bph*遺伝子群高発現株の作製

環境汚染物質の微生物による分解を考えると、問題になるのは効率である。分解効率の上昇を達成するには、種々の方法を考案し、組み合わせることが肝要である。KKS株はそのDNA操作、特に相同的組換えが容易である点、分解に関与する遺伝子群のDNA配列が解読されている点で、効率上昇を達成する方法を試みる上での

良い宿主であると考えられる。

本研究では、*bph*遺伝子群の上流に構成的な強いプロモーターを相同的組換えを用いて組み込むことにより、*bph*遺伝子群の高発現株の作製をおこなった。

KKS株中でよく機能するプロモーター配列を選択するため、種々のプロモーターのKKS株中での活性をLacZをレポーターとして測定し、高い活性を示したプロモーター配列を、相同的組換えを用いてKKS株ゲノム上の*bphE*上流に組み込んだ。作製した株のBphD活性を測定したところ、*pE*プロモーターのコア配列を組み込んだ株が、KKS株と比べて4倍程度の、大腸菌の保存されたプロモーター配列を組み込んだ株が2倍程度の活性を示した。これらの株についてビフェニルの分解活性を測定したところ、KKS株と比較しておよそ3倍の分解活性の上昇が見られた。現在PCBの分解活性についても検討中であるが、KKS株よりも分解能力が上昇していた。

本来の分解菌のゲノム中に相同的組換えを用いてプロモーター配列を組み込むこの方法は、*plasmid*を用いたときよりも安定に保持され、かつ薬剤などの選択圧をかける必要がないと考えられる点で、また本来の宿主を用いるためその遺伝子群が発現して効率よく機能するための細胞内環境が整っていると考えられる点において優れていると考えられる。

微生物で目的の遺伝子の高発現をさせる際の方法として幅広く応用されることが期待される。

*

*

*

7. pentachlorophenol (PCP) 分解菌 *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC39723 の *pcpA* 産物の機能解析

本菌のPCP分解経路においてPCPは2,6-dichlorohydroquinoneに変換される。その後PcpAにより代謝される事が示唆されていたが、その変換産物は明らかにならなかった。

本菌株より*pcpA*遺伝子をクローニングした。精製したPcpAを用いて2,6-DCHQを変換し、TMS化した後にGC-MSで分析したところ、2,6-DCHQはPcpAによって2-chloromaleylacetateに変換されることが明らかになった。さらに、hydroquinone、chlorohydroquinoneはそれぞれ γ -hydroxymuconic-semialdehyde、maleylacetateに変換された。

これまで芳香族化合物の微生物による分解代謝においては、基質はベンゼン環上の隣り合った2つの炭素原子が水酸化されたカテコール体に変換された後に、dioxygenaseにより2つの酸素原子が導入され、環開裂するという経路により分解されるとされてきた。それに対して、PcpAは芳香環の一位と四位に水酸基のついた化合物であるhydroquinone類を基質とする新規環開裂dioxygenaseであることが明らかになった。hydroquinone類を直接酸化する活性自体の報告はあるが、その触媒に預かる酵素やその遺伝子に関する報告は今まで無かった。このようなhydroquinoneを経由する代謝経路は、カテコール体を経由する代謝経路と並んで自然界の物質循環を担う重要な経路であると考えられる。