

論文の内容の要旨

論文題目: The Structure and Transcriptional Regulation of the Bacterial Degradative Genes for Chlorocatechols and 2,4-Dichlorophenoxyacetate 細菌のクロロカテコール及び2,4-ジクロロフェノキシ酢酸分解遺伝子群の構造と転写調節

小川直人

PCBや農薬、有機溶剤のような芳香族塩素化合物は分解しにくく環境中に長く残存して汚染問題を引き起こすが、環境中の微生物には、進化、適応の結果、このような化合物を分解する能力を獲得したものがいる。この微生物の分解能力を研究することは、バイオレメディエーション技術の開発のために、また、微生物の進化、適応機構を解明するためにも重要である。このような目的のもと、本研究では、芳香族塩素化合物の一種でPCBの分解中間産物である3-クロロ安息香酸 (3-CB) の分解菌 *Ralstonia eutropha* NH9株の3-クロロカテコール分解遺伝子群、及び農薬として使われた2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) の分解菌 *Alcaligenes* sp. CSV90株の分解遺伝子群の構造と転写調節機構の解析を行った。

細菌による3-CBや2,4-Dなどの芳香族塩素化合物の代表的な好氣的分解経路は、これらの化合物がクロロカテコールにまで変換される前半の過程 (上流経路) と、クロロカテコールが完全分解される後半の過程 (修飾オルソ開裂経路) から成る (図1)。修飾オルソ開裂経路は、芳香族塩素化合物を完全分解するために重要な経路である。日本で分離された3-CB分解菌 *R. eutropha* NH9株の修飾オルソ開裂経路の遺伝子群は、オペロン様構造をなす分解酵素遺伝子群 *cbnABCD* と、その上流に双方向プロモーター (divergent promoter) 領域を介して逆向きに存在する、LysR-typeの調節因子の遺伝子 *cbnR* から成ることが判明した (図2)。さらに *cbnR-ABCD* 遺伝子群 (5.7kb) は、NH9株の分解プラスミド pENH91 (78kb) 上で、両側をそれぞれ約2.5kbの挿入配列 IS1600 に挟まれ、全体として約15kbの class I 型複合トランスポゾン Tn5707 として存在することが明らかになった。 *cbnR-ABCD* 遺伝子群は、オランダで分離された1,2,4-トリクロロベンゼン分解菌 *Pseudomonas* sp. P51株の分解プラスミド pP51 (110kb) 上

の3,4,6-トリクロロカテコール分解遺伝子群*tcbR-CDEF*とほぼ同一の配列を持つことから、修飾オルソ開裂経路遺伝子群の分化の過程でもごく最近水平伝達されたことが示唆された。両菌株が分解する化合物が異なるのは、保持している分解の上流経路が異なるためであった。ほぼ同じ修飾オルソ開裂経路の遺伝子群を使用しながら、生育する芳香族塩素化合物が異なることは、既存の分解遺伝子群モジュールを獲得して組み合わせることが、細菌の新たな分解経路形成の有効な戦略であることを示している。また、NH9株ではTn5707の両端のIS1600を介した相同組み換えにより、プラスミド上で分解遺伝子群の欠失や増幅が起こることが判明し、挿入配列が転移以外でも細菌の遺伝子群の再編成に寄与していることが示された。

インドで分離された2,4-D分解菌*Alcaligenes* sp. CSV90株の分解遺伝子群は、その分解プラスミドpMAB1(90kb)上に*tfdA-S-T-CDEF-B*遺伝子群として存在していることが判明した(図3)。この分解遺伝子群は、オーストラリアで分離された2,4-D分解菌*R. eutropha* JMP134株のプラスミドpJP4上の分解遺伝子群*tfdA-S-RD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}K-T'-CDEF-B*の対応する領域とほぼ同一の塩基配列を有しており、pJP4上の分解遺伝子群から第2クロロカテコールオペロン(*tfdRD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}K*)の部分が脱落した構造をとっていた。このことからこれらの2,4-D分解遺伝子群は、プロトタイプ(*tfdA?*-*tfdT-CDEF-B*遺伝子群→(ISJP4 composite transposonの挿入)→*tfdA-S-RD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}K-T'-CDEF-B*遺伝子群(JMP134株(pJP4))→(組み換えによる欠失(?))→*tfdA-S-T-CDEF-B*遺伝子群(CSV90株(pMAB1))、という過程で再編成を経てきたことが推測された。

これらの分解遺伝子群の発現調節機構を解明するために、まず、NH9株(pENH91)の*cbnABC*分解酵素遺伝子群について、*cbnA*プロモーター領域や前後の遺伝子から構築したレポーターアッセイ系による実験を行った。その結果、*cbnA*プロモーター活性の誘導には*cbnR*が必須であり、正の調節を行うことが判明した。また、安息香酸(Ben)や3-CBの分解経路におけるCbnA(chlorocatechol dioxygenase)による反応産物(*cis,cis*-ムコン酸(CCM)及び2-クロロ-*cis,cis*-ムコン酸(2CM)(図1))が*cbnA*プロモーターの真の発現誘導物質であると推定された。以上の点を、精製したCbnR、*cbnA*プロモーター、大腸菌RNAPolymerase、誘導物質候補の各種化学物質を用いた*in vitro* transcription実験により確認した。これまでに発現調節機構が詳細に解析されている類縁のカテコールオルソ開裂経路の分解遺伝子群*catR-BCA*(*Pseudomonas putida* RB1株)、及びクロロカテコール分解遺伝子群*clcR-ABDE*(*Pseudomonas putida* AC866(pAC27)株、*Pseudomonas* sp. B13株)では、それぞれの分解経路における中間代謝産物(前者はCCM、後者は2CM)1種類のみが主要な誘導物質であるのに対し、*cbnR-ABCD*分解遺伝子群ではこの両化合物が誘導物質であることが示された。一方、*in vitro*での結合の解析によりCbnRは*cbnA*の転写開始点の上流約-20から-80bpの60bp程の領域にLysR familyの調節系に特徴的なパターンで結合すること、及び*cbnA* promoter領域はCbnRの結合により78度曲がり、誘導物質CCMの添加によりこのBendingの角度が54度まで弛緩することが判明した。*catR-BCA*(RB1)分解遺伝子群及び*clcR-ABDE*(pAC27)分解遺伝子群も同様のプロモーター領域の折れ曲がり角度の変化を示すことなどから、これら3つの分解遺伝子群の転写活性化の基本的な機構は共通であると推察された。以上、CbnRによる*cbnA*プロモーターの転写活性化について、*in vivo*, *in vitro*で解析を行った結果、*catR-BCA*, *clcR-ABDE*各分解遺伝子群の発現調節機構との相違点、類似点が明らかになった。

次にCSV90株(pMAB1)の*tfdCDEF(-B)* 遺伝子群の発現調節機構を解析するためにレポー

ター実験を行った。その結果、TfdTには*tfdC*プロモーターを活性化する機能はないことが示唆され、一方、TfdSが2CMの存在下で*tfdC*プロモーターの発現を正に調節することが判明した。またTfdSは2CMの存在下で*tfdA*プロモーターの活性化も行うことが判明し、CSV90株ではTfdSが2つの制御単位に分かれた分解遺伝子群をそれぞれ正に制御していると考えられた。TfdSによるこれらのプロモーターの活性化は、CCMの存在下ではごく弱かった。*tfdT*(pMAB1)がレポーター実験で*tfdC*プロモーターの活性化を行わなかったことから、この遺伝子が、pMAB1上の2,4-D分解遺伝子群を形成した組み換えの結果生じた偽遺伝子である可能性が示唆された。そして、*tfdS*が近傍の*tfdA*の発現のみならず、離れたところに位置する*tfdC DEF(-B)*の発現も活性化することは、本来の調節因子が機能しない場合に、同族の調節因子によるクロストークが分解経路遺伝子の発現に寄与することが示された。

以上のLysR-type調節因子(CbnR, TfdS, ClcR, CatR)はいずれも、分解経路の中間産物（或いはそのアナログ）である2CMやCCMを認識して分解遺伝子群の発現を活性化する。これに対し、2,3,4-CB分解菌*Burkholderia* sp. NK8株は、Ben及び2-CBの分解中間産物として生じるカテコールをオルソ開裂経路により分解するが、その調節因子CbeRは分解中間産物ではなくBen, 3-CB, 4-CBそのものを認識して分解遺伝子群プロモーターの発現を活性化することがレポーター実験により判明した。またNK8株の3-及び4-クロロカテコール分解遺伝子群の発現調節因子TfcRは、レポーター実験により3-クロロカテコールを認識して分解遺伝子群の発現を活性化することが示唆された。このように芳香族塩素化合物分解遺伝子群の発現調節に関与するLysR-typeの調節因子は、その誘導物質の認識スペクトルが多様であることが明らかになった。一方、*cbn*, *clc*, *cat* 各オペロンの誘導物質の種類の違いは、調節因子の誘導物質認識部位の進化が、転写活性化の機構の進化とは独立に起こり得ることを示唆するものと考えられた。

本研究はクロロカテコールと2,4-Dの分解遺伝子群を対象としてその構造、発現調節機構を解明することで、細菌の芳香族塩素化合物分解能力獲得における遺伝子群の再編成の意義と、LysR-type調節因子による発現調節機構の役割を明らかにした。

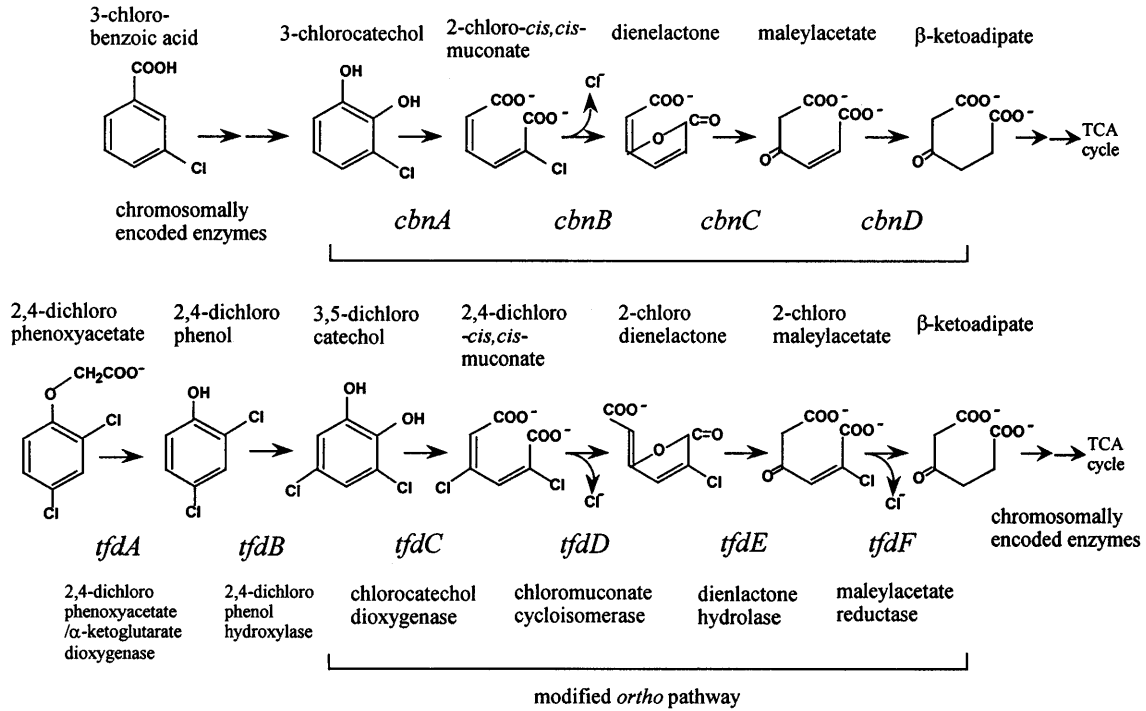


図1. 3-クロロ安息香酸と2,4-ジクロロフェノキシ酢酸の分解経路

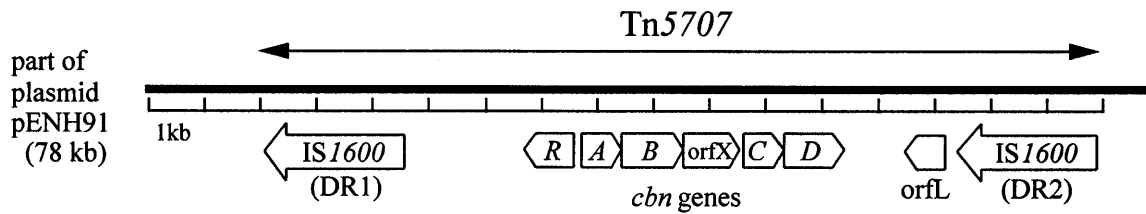


図2. 複合型トランスポゾン Tn5707 の模式図

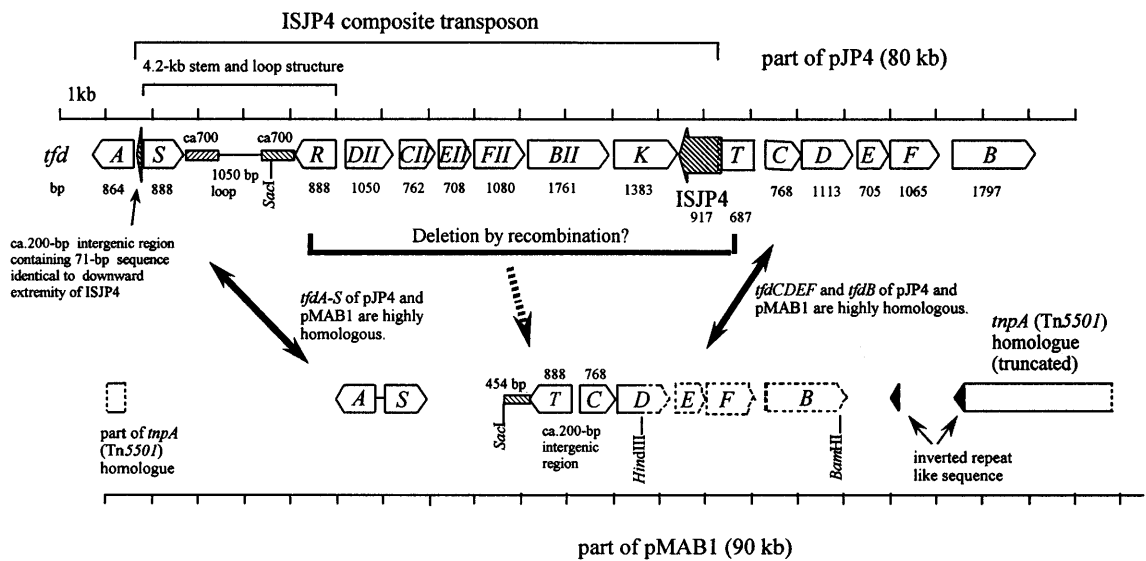


図3. プラスミド pJP4 と pMAB1 上の 2,4-D 分解遺伝子群の模式図