

論文の内容の要旨

論文題目 細菌におけるダイオキシン類分解系遺伝子群と
その周辺領域の解析

氏名 羽部 浩

近年特に大きな社会問題となっているダイオキシン汚染の bioremediation を目的として、ダイオキシン分解能を有する真菌や細菌等の微生物が取得され盛んに研究が行われている。細菌によるダイオキシンの分解に関しては、*Sphingomonas wittichii* RW1 株において、塩素化ダイオキシンの基本骨格をなす dibenzo-*p*-dioxin (DD) や dibenzofuran (DF) 分解代謝系が分子レベルで解析されている。その結果 DD/DF は、酸素原子に隣接する核間炭素原子への特異な初発酸化 (angular dioxygenation) を受けた後、ヘテロ環が自発的に環開裂して trihydroxy 体に変換され、その後メタ開裂、加水分解を経て代謝されていくことが明らかとなっている。我々の研究室においても、DF を唯一の炭素源・エネルギー源として生育可能な細菌 *Terrabacter* sp. DBF63 株の DF 分解系について解析を行い、2,2',3-trihydroxybiphenyl から salicylic acid への変換を行う *dbfBC* 遺伝子を既に単離していた。しかしながら、DD/DF 骨格の中でも強固なエーテル結合を特異的に開裂するのに重要な初発酸化酵素をコードする遺伝子の取得には成功していなかった。そこで本研究では、DBF63 株から dibenzofuran 4,4a-

dioxygenase (DFDO) をコードする遺伝子を取得し機能解析を行った。また当研究室では、DD/DF と類似の構造を有する carbazole (CAR) を資化する *Pseudomonas* sp. CA10 株の CAR 分解代謝系についても研究を行っており、DD/DF と類似な経路で代謝されることや、CAR 分解代謝系遺伝子群 (*car* 遺伝子群) が DD/DF 分解能を有していることも既に明らかにしている。*car* 遺伝子群がユニークな遺伝子構造をとることから、その周辺領域の構造についても興味を持たれており、本研究では CA10 株の *carAaAaBaBbCAcORF7Ad* 遺伝子群の周辺領域について詳細な解析を行った。

さらに、塩素化ダイオキシンと同様に強い毒性を示す coplanar PCB (Co-PCB) もダイオキシン類に含まれるが、Co-PCB の基本骨格をなす biphenyl の微生物分解についても当研究室では解析を行ってきた。その結果、biphenyl 資化菌から精製された分解系酵素が biphenyl だけでなく、単環芳香族化合物である cumene (isopropylbenzene) も分解可能であったことから、biphenyl 分解系酵素 (Bph) と cumene 分解系酵素 (Cum) は類似の酵素群であることが推測されていた。そこで本研究では、cumene 資化菌を単離し、*cum* 遺伝子を取得・解析することで、*bph* 遺伝子群との分子進化上の関連性について知見を得ることとした。

1. Dibenzofuran 資化菌 *Terrabacter* sp. DBF63 株の dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (DFDO) component をコードする遺伝子の単離と機能解析
DBF63 株から PCR 法により、DF 代謝に関与する初発酸化酵素 (DFDO) の oxygenase component をコードする遺伝子 (*dbfA1A2*) を取得した。DbfA1 は、現在までに angular dioxygenase の oxygenase component large subunit として報告されている CA10 株の *CarAa* や *Sphingomonas wittichii* RW1 株の *DxnA1* とは分子系統樹上で異なるグループに属しており、新規な angular dioxygenase であることが明らかとなった。また DFDO の基質特異性を検討した結果、DD や DF だけでなく数種類の 1~3 塩素化ダイオキシンも分解可能であることが示された。DFDO は CAR、xanthene、phenoxathiin といった基質に対しては angular dioxygenation を触媒せず、naphthalene のような多環芳香族炭化水素に対して *cis*-dihydroxylation を行わないことも示された。

2. Carbazole 資化菌 *Pseudomonas* sp. CA10 株の carbazole 代謝に関する酵素遺伝子群及びその周辺領域の解析

CA10 株において既に解析されていた *carAaAaBaBbCAcORF7Ad* 遺伝子群の周辺領域を単離・解析したところ、*carAd* 遺伝子のすぐ下流域に CAR の代謝中間体である 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid の代謝に関する酵素遺伝子群 (*carDFE*) が、*carAa* 遺伝子の約 21 kb 上流に anthranilic acid から catechol への変換に関与すると推測される酵素遺伝子群 (*antABC*) が存在することを明らかにした (図 1)。また、catechol の代謝に関する酵素遺伝子群 (*catRBCA*) が CA10 株の chromosome 上に存在し、*car* 及び *ant* 遺伝子群はメガプラスミド pCAR1 上に存在することも示された。以上の結果から、CA10 株の CAR 分解に関与すると考えられる全酵素遺伝子群の構造及び局在性を明らかにすることに成功した。さらに、*car* 及び *ant* 遺伝子群の構造を明らかにしていく過程で、4 つの互いに相同性の高い挿入配列 IS5*car*1~IS5*car*4 を同定した。これら IS とその周辺領域を詳細に解析したところ、*car* 遺伝子群が現在のユニークな遺伝子構造を形成するに至った遺伝子再構成の痕跡を数多く見出すこともできた。例えば、*antABC* 遺伝子を含む IS5*car*2 と IS5*car*3 に挟まれた領域が複合トランスポゾン様の構造をとっており、transposition によって現在の位置に転移してきたことが推測された。また、IS5*car*2 とそれに続いて存在する *antA* 遺伝子の 5'末端部分の one-ended transposition によって、IS5*car*1 とそれに続く ORF9 の 5'末端部分が形成されたことも推測された。さらに、ORF11 と ORF12 の周辺領域で遺伝子の duplication が起こった痕跡や、*carFE* 遺伝子が gene shuffling などにより後から挿入され、現在の *car* 遺伝子群を形成した可能性も示された。

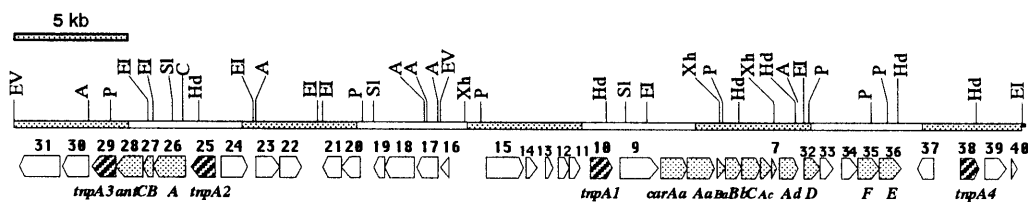


図 1. *car* 及び *ant* 遺伝子群とその周辺領域の遺伝子構造

3. Cumene 資化菌 *Pseudomonas fluorescens* IP01 株の cumene 代謝酵素遺伝子の単離と機能解析

土壌中より単離した cumene 資化菌 *Pseudomonas fluorescens* IP01 株から、indigo 生成を指標とした初発酸化酵素のショットガンクローニングを行い、cumene 分解代謝系遺伝子群 (*cumA1A2ORF3A3A4BC*) を取得した。この cumene 分解代謝系酵素が cumene から相当するメタ開裂物質 2-hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid への変換だけでなく、4,4'-dichlorobiphenyl を相当するメタ開裂物質へと分解することも示された。また、*cum* 遺伝子群は IP01 株の生育基質でもある toluene の代謝系遺伝子群 (*tod*) とは 47-64% 程度の相同性であったが、*bph* 遺伝子群とは 57-78% と相同性が高いことも明らかとなった。さらに *bph* 遺伝子群に隣接して存在する機能未知の ORF と相同性の高い ORF3 が *cum* 遺伝子群にも存在するなど、各 ORF の大きさや遺伝子構造も *bph* 遺伝子群と非常に類似していることが明らかとなった。

4. 総括と展望

本研究により世界で初めてグラム陽性細菌から angular dioxygenase の oxygenase component を単離することに成功した。*DbfA1A2* は塩素化ダイオキシンに対しても分解活性を有しているため、今後、本酵素の X 線結晶構造解析を行い反応部位周辺の三次元構造が明らかになれば、基質認識機構や反応機構について有用な知見が得られるものと期待される。また、その知見をタンパク質工学を用いた酵素の改変へとフィードバックすることで、さらに有用な分解酵素の創製も可能になるものと期待される。

本研究で CA10 株の *car* 及び *ant* 遺伝子群が、2つの IS に挟まれた複合トランスポゾン様構造をとっていることが明らかとなった。さらに *car* 遺伝子群はメガプラスミド pCAR1 上に局在していることも示された。これらの結果は、ダイオキシン分解系遺伝子群が“動く”因子上にコードされていることを示しており、実際に IS に挟まれた *car* 遺伝子群が欠失したり、*car* 遺伝子群をコードする pCAR1 と類似のプラスミドが異種微生物間を転移する現象も既に確認されている。今後、これら IS や pCAR1 が動くメカニズムを解明することは、ダイオキシンの bioaugmentation を高効率で行う技術を開発するうえでも重要であると思われる。