

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士課程入学
氏 名 鄭 鎮 成
指導教官名 大森 俊雄

論文題目

Genetic and functional analysis of fluorene- and dioxin-degrading system of
Terrabacter sp. strain DBF63
(*Terrabacter* sp. DBF63 株におけるフルオレン/ダイオキシン
分解系の解析)

序

近代における急速な産業活動の発展に伴い、それまで地球環境中には見出されなかった人為起源の難分解性化学物質が大量に環境中へと放出されてきた。その結果、水圏、大気圏、土壌圏といった地球上のあらゆる環境において汚染状況は深刻化しており、自然界の生物はもとより人類にもその影響が現れている。このような化合物のひとつにダイオキシン類と呼ばれる化合物群がある。ダイオキシン類は毒性が強い上、発癌性、変異原性を有するものが多く、特にベトナム戦争で使用された枯れ葉剤に含まれていた 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin は、人類史上最強の毒性・変異原性を有すると言われている。一方、ダイオキシン類とは別の環境汚染物質として、多環芳香族炭化水素 (PAHs) と呼ばれる一連の化合物群が知られている。PAHs は天然には石炭や原油など化石燃料中に存在するため、これらの燃焼により大気を通じて水環境や土壌中に拡散し、時にはタンカーの座礁事故などにより大量に水環境へと放出される。PAHs の中でも、ダイオキシン類と同様に発癌性や変異原性を有するものが存在するため、環境中での残留性や人体への影響が問題となっている。

近年、ダイオキシンや PAHs に関しては多くの物理化学的な処理方法が開発されつつあるが、コストが高くなるなどの問題もあり、それに代わりうる生物学的な修復法 (bioremediation) が有望な浄化技術として期待されている。汚染土壌中に土着の分解菌が存在しない場合は、他で単離された強力な分解菌を汚染現場に添加するのが最適な手法 (bioaugmentation) であると考えられており、多くの研究者が細菌や真菌類といったダイオキシン分解菌および PAHs 分解菌の単離・解析を行っている。

当研究室では、ダイオキシンのモデル化合物である dibenzofuran (DF) と PAHs のモデル化合物である fluorene (FN) の両方を唯一の炭素源・エネルギー源として生育可能な DBF63 株が、既に土壤サンプルから単離されている。本菌株は、DF を salicylic acid (SA)、gentisic acid (GA) を経由した代謝経路で資化し、FN を 9-fluorenol、9-fluorenone を経由した代謝経路で資化する。また、dibenzo-*p*-dioxin (DD) も共酸化することが示された。その後、DBF63 株はグラム陽性細菌の *Terrabacter* 属細菌であると同定

され、メタ開裂物質の黄色を指標としたショットガンクローニングにより 2,2',3-trihydroxybiphenyl (2,2',3-THB)から SA への変換に関与するメタ開裂酵素遺伝子(*dbfB*)及び加水分解酵素遺伝子(*dbfC*)の取得にも成功した。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重要な初発酸化酵素 dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (DFDO)をコードする遺伝子は *dbfBC* 遺伝子の周辺領域には存在しなかった。そこで、Rieske non-heme iron oxygenase 内に保存されている配列から調製したプライマーを用いて、PCR を行ったところ、DFDO の terminal oxygenase component をコードする *dbfA1A2* 遺伝子のクローニングに成功した。*dbfA1A2* 遺伝子を大腸菌内で発現させると、大腸菌由来の ferredoxin および ferredoxin reductase が電子伝達系として機能し、DFDO 活性を示す。また、*dbfA1A2* 遺伝子の周辺には、約 20 kb に渡って既知の芳香族分解系と相同性を示す複数個の ORF が存在していたが(図 1)、それらの機能は未知であった。

以上の様な背景から本博士論文研究ではまず、*dbfA1A2* 遺伝子群の周辺領域に存在する各 ORF の機能解析を行うことを目的とした。また *dbfA1A2* 遺伝子群の局在性と生育基質の違いによる分解系酵素遺伝子群の発現を調べた。加えて、DBF63 株および取得された DF 分解系酵素 *DbfA1A2BC* が chlorinated dibenzofurans (CDFs)や dibenzo-*p*-dioxins (CDDs)に対して分解活性を保持しているか調べた。

1. DBF63 株におけるフタル酸分解系酵素遺伝子群の解析

DBF63 株において *dbfA1A2* 遺伝子群の上流に存在した、芳香族化合物初発酸化酵素の oxygenase large subunit, oxygenase small subunit, ferredoxin, ferredoxin reductase をコードする遺伝子とそれぞれ相同性を示す 4 個の ORF (ORF13, 12, 9, 8)、脱水素酵素および脱炭酸酵素と相同性を示す ORF (それぞれ ORF10 と ORF7)をクローニングして大腸菌内で発現させ、フタル酸を基質とした変換反応を行った。プラスミド pDF203 (ORF13, 12, 10, 9, 8 を含む)で形質転換した大腸菌を用いて休止菌体反応による変換反応を試みた結果、フタル酸から 3,4-dihydroxyphthalate の生成が確認された。また ORF7 については、確実に大腸菌内で発現させるため、その上流に SD 配列を付加したプラスミド (pDFS205)を構築し、大腸菌内で pDF203 と共発現させたところ、フタル酸からプロトカテキン酸の生成が確認された。

以上の結果から、ORF13, 12, 9, 8は phthalate 3,4-dioxygenase の各コンポーネント (PhtA1, PhtA2, PhtA3, PhtA4) を、ORF10 は 3,4-dihydro-3,4-dihydroxyphthalate dehydrogenase (PhtB) を、ORF7 は 3,4-dihydroxyphthalate decarboxylase (PhtC)をコードすることが明らかとなった(図 1)。PhtA はフタル酸以外にも、*o*-chlorobenzoic acid も基質として酸化できた。一方、*phtC* 遺伝子の直下流に存在する ORF6 は、相同性検索の結果、フタル酸代謝系遺伝子の転写制御に関与するタンパク質をコードすることが推測された (*phtR*)。本博士論文研究の開始後に報告された *Arthrobacter keyseri* 12B 株の *pht* 遺伝子群の遺伝子構造と比較すると、*phtB* の位置が異なっていることや、*phtA1* 遺伝子では約 70%の相同性が見られるのに対し、*phtB* は 30%の相同性しか見られないなどの違いが示された¹⁾。

2. DBF63 株における FN 分解系酵素遺伝子群の解析

DBF63 株において *dbfA1A2* 遺伝子の周辺に存在した、FN 代謝系酵素群をコードすると推定される ORF4, 3, 15, 16, 17 について機能解析を行った。ORF4-*dbfA1A2*-ORF3-ORF15-ORF16-ORF17 を含む DNA 領域をクローニングし、大腸菌を用いた FN および 9-fluorenone の変換反応を行ったところ、いずれからでも FN の分解産物であるフタル酸の生成が確認された。相同性検索の結果、FN 代謝に関与するメタ開裂酵素および加水分解酵素と推測された ORF15 および ORF3 を削った ORF4-*dbfA1A2*-ORF16-ORF17 を含む DNA 領域をクローニングし、大腸菌を用いた FN および 9-fluorenone の変換反応を行っ

たところ、いずれからも FN の代謝中間体である 2'-carboxy-2,3-dihydroxybiphenyl (CDB) の lactone 化物 (8-hydroxy-3,4-benzomucoumarin) を生成することが示された。これらの結果は、short-chain dehydrogenase-reductase family と相同性を示す ORF4 および ORF17 が、1-hydro-1,1a-dihydroxy-9-fluorenone (DHF; 9-fluorenone の cis-diol 体) の五員環開裂に関与していることを示している。また、ORF4 遺伝子産物は、9-fluorenone から 9-fluorenone への変換活性も持っていることが示された。一方、メタ開裂酵素と相同性を示す ORF15 のみを大腸菌で発現させた場合には活性が検出されなかったが、ORF16 と共発現させた場合にメタ開裂活性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、DbfA1A2 は FN から 9-fluorenone への変換活性および 9-fluorenone から DHF への変換活性を有していること、ORF4 遺伝子産物 (FlnB) が 9-fluorenone から 9-fluorenone への変換活性を有していること、FlnB および ORF17 遺伝子産物 (FlnC) の 2 つのタンパク質が DHF から CDB への変換に関与していること、ORF15 遺伝子産物 (FlnD1) と ORF16 遺伝子産物が CDB のメタ開裂活性を有していること、ORF3 遺伝子産物 (FlnE) が CDB メタ開裂物質の加水分解活性を有していることが示された (図 1)。一方、*flnB* 遺伝子の直上流に存在する ORF5 は、相同性検索の結果から、FN 代謝系遺伝子の転写制御に関与するタンパク質をコードすることが推測された (*flnR*)。DBF63 株の *flnRdbfA1A2flnEDIORF16flnC* 遺伝子群 (*dbffln* 遺伝子群) は、FN 分解系遺伝子群としては世界で初めての報告例である。

3. DF・FN 分解系遺伝子群の発現とゲノム上における局在性

DBF63 株において解析された DF・FN 分解系酵素遺伝子群の発現について調べるため、RT-PCR 解析を行った。DF で生育させた DBF63 株の菌体から全 RNA を抽出し、*dbfA1A2*、*dbfBC* および *phtA3A4* 遺伝子をそれぞれ増幅するようなプライマーを用いて RT-PCR 解析を行ったところ、*dbfA1A2* と *dbfBC* 遺伝子の転写が確認されたが、*phtA3A4* 遺伝子の転写は確認されなかった。一方、FN で生育させた DBF63 株の菌体から全 RNA を抽出し、同様な実験を行ったところ、*dbfA1A2* と *phtA3A4* 遺伝子の転写が確認されたが、*dbfBC* 遺伝子の転写は確認されなかった。以上より、*dbfA1A2* および *dbfBC* 遺伝子は DF 代謝に関与しており、*dbfA1A2* および *phtA3A4* 遺伝子は FN 代謝に関与していることが明らかとなった²⁾。

また、DF・FN 両方の代謝に関与すると考えられる *dbfA1A2* 遺伝子および DF 代謝に関与する *dbfBC* 遺伝子の局在性についても調べた。DF で生育させた DBF63 株の全 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) に供した結果、染色体以外に、メガプラスミドと考えられる 2 本のバンドが確認された。*dbfA1A2* 遺伝子をプローブとしたサザン解析を行ったところ、160 kb のプラスミド (pDBF1) とそれより少し大きなプラスミド (pDBF2) の双方にシグナルが検出されたことから、*dbfA1A2* 遺伝子はプラスミド上にコードされていることが明らかとなった。一方、*dbfBC* 遺伝子をプローブとした場合には染色体にシグナルが検出されたことから、*dbfBC* 遺伝子は染色体上に存在すること示された²⁾。以上 RT-PCR 解析と PFGE の結果より、FN 代謝においては隣り合う 2 つのオペロンが機能しているのに対し、DF 代謝においては異なる遺伝子座に局在している少なくとも 2 種類の遺伝子に関与するという結果から、DBF63 株における DF 代謝系は、進化的に未成熟である可能性が示唆された。

4. DBF63 株の塩素化ダイオキシン分解能の検討

DBF63 株が、実際に環境汚染を引き起こしている塩素化ダイオキシンに対しても分解能を有しているか調べるため、DBF63 株による CDFs および CDDs の変換反応を試みた。また比較として、当研究

室保有の別のダイオキシン分解菌である carbazole (CAR) 資化菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株についても同様な実験を行った。DF で生育させた DBF63 株および CAR で生育させた CA10 株を用いて、1 から 3 個の塩素で置換されたダイオキシン類を基質とした休止菌体反応を行った結果、両株ともに分解が認められた。2-Chlorodibenzofuran (2-CDF)、2-chlorodibenzo-*p*-dioxin (2-CDD)、2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3-DCDD)からは分解産物として相当するクロロサリチル酸 (CSA)やクロロカテコール (CC)の生成が認められた。

一方、*dbfA1A2* 遺伝子を持した大腸菌を用いて同様な塩素化ダイオキシンの変換反応を行った。比較として、CA10 株由来の CAR 初発酸化酵素をコードする *carAaAcAd* 遺伝子を持した大腸菌についても実験を行った。その結果両者とも、2-CDF と 2,8-dichlorodibenzofuran を相当する trihydroxybiphenyl へと変換することが示された。また、2-CDD、2,3-DCDD および 1,2,3-TCDD も相当する trihydroxydiphenyl ether へと変換した。一方、2,7-DCDD に対しては *CarAaAcAd* のみが trihydroxydiphenyl ether への変換活性を示した。

以上の結果より、DBF63 株および DF 分解系酵素は、2,7-DCDD を除く 1 から 3 塩素化ダイオキシンに対して分解活性を保持していることが明らかとなり、今後 DBF63 株を使用したバイオレメディエーション技術の開発に興味をもたれた³⁾。

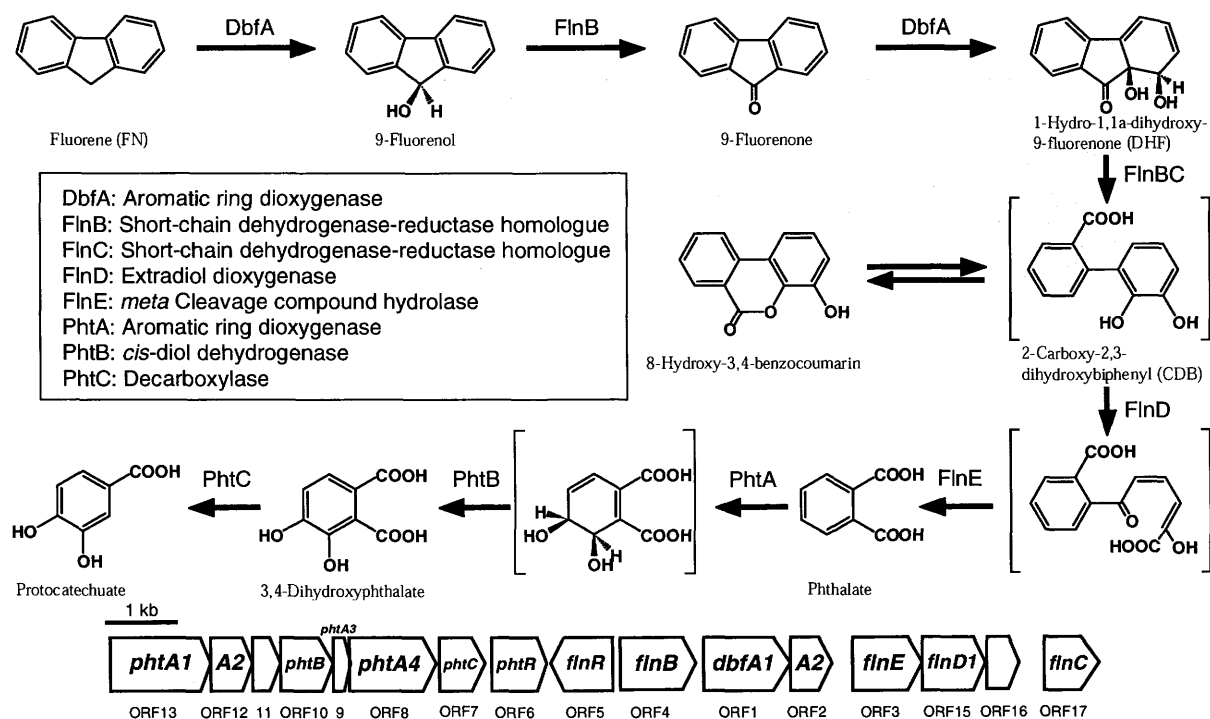


図 1. Proposed degradation pathway for FN and gene organization of *dbf/fln* and *pht* genes in *Terrabacter* sp. strain DBF63

参考文献

- Habe, H., Miyakoshi, M., Chung, J.-S. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., in press.
- Nojiri, H., Kamakura, M., Chung, J.-S. et al., 2002. Biochem. Biophys. Res. Commun. 296: 233-240.
- Habe, H., Chung, J.-S., Lee, J.-H., et al., 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3610-3617.