

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程入学
氏名 Onruthai Pinyakong
指導教官名 大森 俊雄

論文題目

Biochemical and genetic analyses of polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in sphingomonads

(*Sphingomonas* 属細菌の多環芳香族炭化水素分解に関する解析)

序

ベンゼン環が 2 個以上縮合した多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、天然には石炭や石油などの化石燃料中に存在し、これら留分としてのクレオソートやコールタール中に多く含まれる。一方、有機物の不完全燃焼によっても発生するため、化石燃料や廃棄物の燃焼により大気を通じて様々な環境へと拡散し、地球表層を広く汚染している。一般に PAHs は、芳香環の数が増加すると水溶性が低くなり、発癌性や変異原性を示すものも増加するため、環境中における残留性や人体への影響が懸念されている。本論文で PAHs モデル基質とした naphthalene, phenanthrene, acenaphthene, acenaphthylene もアメリカ環境保護局や欧州共同体により 16 priority PAHs の 1 つに指定されている。

環境中の PAHs を無害化するプロセスの 1 つとして、PAHs の微生物分解に関する研究が盛んに行われており、この 30 年間で、PAHs 分解菌が多数単離、解析されてきた。一般に好気性細菌における PAHs 分解においては、terminal oxygenase, ferredoxin, ferredoxin reductase からなるマルチコンポーネント酵素により PAHs の芳香環に二酸素原子添加反応が起こり、相当する *cis*-dihydrodiol 化合物が生成する。続いて *cis*-dihydrodiol 化合物は、脱水素酵素により相当する dihydroxy 化合物へと変換される。Dihydroxy 化合物は、環開裂酵素の作用により芳香環が開裂し、何段階かの反応を経てカテコールまで代謝される。さらにカテコールはメタ開裂もしくはオルト開裂経路により、TCA 回路の中間体へと代謝されていく。

PAHs 分解系遺伝子については、*Pseudomonas* 属細菌の naphthalene, phenanthrene 分解系遺伝子群 (*nah* 遺伝子) が最初に報告され、現在最も詳細に研究されている。最近では、*Burkholderia* sp. RP007 株の *phn* 遺伝子群や、*Nocardioides* sp. KP7 株の *phd* 遺伝子群、*Ralstonia* sp. U2 株の *nag* 遺伝子群、*Mycobacterium* sp. PYR-1 株の *nid* 遺伝子群、*Rhodococcus* sp. NCIMB12038 株の *nar* 遺伝子群など、多岐に渡る PAHs 分解菌から *nah* 遺伝子群とは全く異なる PAHs 分解系酵素遺伝子も数多く報告されている。

一方、*Sphingomonas* 属細菌も PAHs 分解において重要な役割を果たしており、naphthalene, phenanthrene, fluoranthene, fluorene など様々 PAHs を基質として利用可能な菌株が単離、解析されて

いる。近年これら細菌の遺伝子解析がなされ、芳香族化合物分解の各ステップに関与すると推測される遺伝子群が同一レプリコン上に散在していることや、*Pseudomonas* 属細菌などに見られる芳香族化合物分解系遺伝子とは中程度の相同性しか示さないことなどが明らかとなった。しかしながら、これら遺伝子群のシーケンス解析はなされても、発現様式や機能解析に関する研究はほとんど行われていない。さらに興味深いことに、*Sphingomonas* グループに属する PAHs 分解菌からは、PAHs 分解において重要な役割を果たす初発酸化酵素遺伝子が同定されていなかった。以上のような背景から、本論文研究では、1)phenanthrene 資化菌 *Sphingobium* sp. P2 株における phenanthrene 代謝経路を決定する、2)P2 株における phenanthrene 代謝系酵素遺伝子群を単離、解析する、3)acenaphthene 資化菌 *Sphingomonas* sp. A4 株における acenaphthene 代謝系酵素遺伝子群を単離、解析することを目的として研究を行った。

1. Phenanthrene 資化菌 *Sphingobium* sp. P2 株における新規な phenanthrene 代謝物の単離と代謝経路の特定

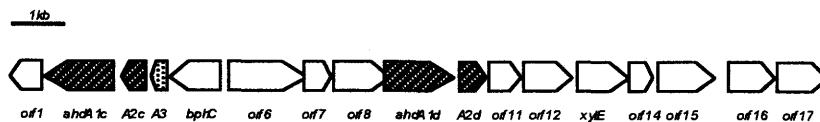
Sphingobium sp. P2 株は phenanthrene および naphthalene を唯一の炭素源、エネルギー源として生育可能な細菌であり、タイ国の油汚染土壌より単離された。P2 株における phenanthrene 代謝経路を特定するため、代謝産物の同定を行った。0.1%の phenanthrene を添加した 15 L の無機培地で P2 株を 4 日間培養後、培養液を酸性抽出し、TLC、シリカゲルカラム、HPLC などに供し、代謝物を精製した。GC-MS および ^1H , ^{13}C NMR 解析を行った結果、2 種類の新規な phenanthrene 代謝産物を同定することに成功した。1 つは、phenanthrene の 1,2-位が初発酸化、メタ開裂を受けた結果生成した 5,6-benzocoumarin であり、もう 1 つは 1,5-dihydroxy-2-naphthoic acid であることが明らかとなった。他には既知の phenanthrene 代謝物である 7,8-benzocoumarin, 1-hydroxy-2-naphthoic acid, coumarin が検出された。以上代謝産物の同定結果および P2 株がサリチル酸に生育することから、本菌株の phenanthrene 代謝経路は、1,2-位または 3,4-位が初発酸化され、メタ開裂反応を受けた後、サリチル酸を経て代謝されることが明らかとなった。これまで phenanthrene の主要代謝経路は、3,4-位が初発酸化された後、順次代謝されていく経路であったが、本研究で 7,8-benzocoumarin と同程度量の 5,6-benzocoumarin が検出されたことから、phenanthrene の 1,2-位が初発酸化されて代謝が進む経路も、P2 株においては主要な役割を果たしていることが示唆された¹⁾。

2. P2 株における phenanthrene 代謝系酵素遺伝子群の取得と解析

P2 株の phenanthrene 代謝系遺伝子を単離するため、トランスポゾン(Tn)挿入変異により、phenanthrene 資化能欠損変異株を単離した。Tn 挿入部位の周辺領域について塩基配列の解析を行ったところ、naphthalene および biphenyl 資化菌 *Novosphingobium aromaticivorans* F199 株由来の ferredoxin reductase とアミノ酸レベルで 71%の相同性を示す遺伝子 (*ahdA4* と命名) が Tn により破壊されていることが示された。さらにショットガンクローニングにより、P2 株から 2 種類のメタ開裂酵素遺伝子 (それぞれ *bphC* および *xylE* と命名) を取得した。*ahdA4*, *bphC*, *xylE* 各遺伝子の周辺領域をクローニングし、15.8-kb および 14-kb の領域についてそれぞれ塩基配列を決定したところ、28 個の ORF が存在した (Fig. 1)。相同配列の検索を行ったところ、これら ORF は F199 株のメガプラスミド pNL1 上に局在する芳香族化合物の分解に関与すると推測されている遺伝子群とアミノ酸レベルで 65-90%の相同性を示し、遺伝子構造も類似していることが明らかとなった。しかしながら F199 株において、これら遺伝子の

発現・制御様式や機能の解析についてはほとんど明らかにされていない。そこで P2 株において見出された 5 組の芳香族化合物初発酸化酵素の大、小サブユニットをコードする遺伝子（それぞれ *ahdA1*[a-e] および *ahdA2*[a-e] と命名）、それらと相補すると推測される 1 組の ferredoxin, ferredoxin reductase をコードする遺伝子（それぞれ *ahdA3* および *ahdA4* と命名）について RT-PCR 解析と機能解析を行った。Phenanthrene で生育させた P2 株菌体から全 RNA を抽出し、*ahdA1A2*[a-e]、*ahdA3* および *ahdA4* 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、*ahdA1A2*[c-e]、*ahdA3* および *ahdA4* 遺伝子の転写が確認されたが、*ahdA1A2*[a, b] 遺伝子の転写は確認されなかった。次に *ahdA1cA2c*, *ahdA1dA2d*, *ahdA1eA2e* 遺伝子について大腸菌を用いて発現させ、phenanthrene やその代謝中間体に対する変換活性を調べた。その結果、AhdA3 と AhdA4 を相補させることで、3 つの酸化酵素とも phenanthrene の中間代謝物であるサリチル酸をカテコールへと変換する活性が認められ、AhdA1[c-e]A2[c-e]A3A4 は全て salicylate 1-hydroxylase であることが明らかとなった。AhdA1cA2c および AhdA1dA2d は基質特異性が広く、メチル基や塩素で置換されたサリチル酸に対しても酸化活性を示し、相当するメチルカテコールおよびクロロカテコールを生成した。これまで報告されている salicylate 1-hydroxylase は、naphthalene 資化菌 *P. putida* G7 株由来の NahG など、1 つのタンパク質で活性を示す flavoprotein monooxygenase であったが、P2 株で見出された 3 つの salicylate 1-hydroxylase は、terminal oxygenase, ferredoxin, ferredoxin reductase の 3 コンポーネントからなる酵素であり、*Sphingomonas* 属細菌の PAHs 分解系では、サリチル酸からカテコールへの変換を行うのに、4 つのタンパク質が関与していることが示された。

(A)



(B)

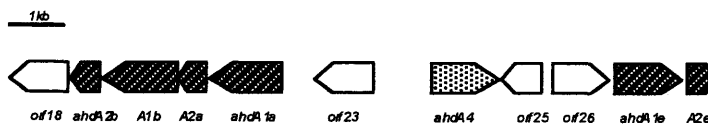


Fig. 1 The organization of genes on 15.8-kb (A) and 14-kb (B) DNA fragments of *Sphingobium* sp. P2

3. *Sphingomonas* sp. A4 株における acenaphthene 代謝酵素遺伝子群の取得と解析

Sphingomonas sp. A4 株は acenaphthene および acenaphthylene を唯一の炭素源、エネルギー源として生育可能な細菌であり、他の PAHs を資化することができない。Acenaphthene は、1-acenaphthenol および 1-acenaphthenone を経て分解され、acenaphthylene は、1,8-dicarboxynaphthalene を経て分解されることが既に明らかとなっている。1,8-dicarboxynaphthalene 以降の代謝経路を決めるため、0.1%の 1,8-

dicarboxynaphthalene を基質とした A4 株の培養液から代謝物を精製し、GC-MS に供した結果、新たに 3-hydroxyphthalic acid を同定した。

これまで他の研究グループによる acenaphthene 代謝系酵素遺伝子に関する知見は皆無であり、A4 株の acenaphthene 代謝系酵素遺伝子に関しては、既にショットガンクローニングにより、メタ開裂酵素遺伝子 (*arhC* と命名) のみが取得されていた。栄養培地で A4 株を継体培養することで単離された acenaphthene 資化能欠損変異株において *arhC* 遺伝子が欠失していたことから、ArhC が A4 株の acenaphthene 代謝に関与することが推測された。*arhC* 遺伝子の周辺領域について塩基配列を決定したところ、*arhC* 遺伝子の約 4.5-kb 下流に既知の PAHs 初発酸化酵素の大、小サブユニットをコードする遺伝子とアミノ酸レベルで 56% 以下の相同性を示す 2 つの ORF (それぞれ *arhA1* および *arhA2* と命名) が存在した。*arhA1A2* 遺伝子をサブクローニングしたのち大腸菌を用いて発現させ、acenaphthene、acenaphthylene をはじめとした各種 PAHs に対する変換活性を調べた。その結果、P2 株由来の ferredoxin (AhdA3) と ferredoxin reductase (AhdA4) を相補させることで、acenaphthene から 1-acenaphthenol への変換活性が認められ、反応液中からは 1-acenaphthenone も検出された。一方、acenaphthylene に対しては、GC-MS により基質の減少が確認されたものの、変換産物を同定するには至っていない。また ArhA1A2 の各種 PAHs に対する基質特異性を調べたところ、naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene を相当する *cis*-dihydrodiol 化合物へと変換することが明らかとなった。この ArhA1A2 は、*Sphingomonas* グループに属する PAHs 資化菌において、初めて機能解析までなされた PAHs 初発酸化酵素の terminal oxygenase component である。現在、*arhC* 遺伝子および *arhA1A2* 遺伝子破壊株の作成を試みるなど、これら遺伝子の acenaphthene、acenaphthylene 資化への関与、周辺領域の塩基配列に関して詳細な解析を行っている。

総括と展望

これまで *Sphingomonas* グループに属する PAHs 資化菌は多数単離されており、これら菌株の多くが、互いに類似のユニークな構造をとる芳香族化合物分解系遺伝子を保持していることが示されていた。しかし各遺伝子の機能解析がほとんどなされていないことを考えると、P2 株から 3 つの isofunctional な新規 salicylate 1-hydroxylase を同定したこと、および A4 株から新規 PAHs initial dioxygenase を同定したことは、意義深いと思われる。今後は、未だ知見のない acenaphthene 代謝系酵素遺伝子について詳細な解析を行うことで、微生物による PAHs 分解の新知見が得られるものと期待される。

1) Pinyakong et al., FEMS Microbiol Lett, **191**: 115-121 (2000).