学会賞受賞論文

(奨励賞)

農薬の微生物代謝とその分解酵素の進化的解析

田村 勝徳*

東京大学分子細胞生物学研究所

Microbial Pesticide Degradations and Evolutionary Analysis of Degrading Enzymes

Katsunori TAMURA

*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo,
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032*

はじめに

地球上に誕生した微生物は 30 数億年の間進化し続け、天然に存在する広範な芳香族化合物を基質として分解し利用してきた。その間に微生物間での遺伝子交換や代謝遺伝子群の再編成などにより、代謝経路やその制御機構のレンジを広げてきた。物質文明の基礎となった各種産業の発展は、こうした微生物を含む自然界の物質循環系にとって未経験の新しい構造を持つ多くの化合物を産出してきた。特に、農業の分野では夥しい数のハロゲン化有機化合物が人工的に合成され、食料生産の安定確保のために直接的あるいは間接的に圃場に投与され続けている。それらの難分解性化合物を利用し生育できる微生物は非常に限られており、分解能を示す微生物の単離および特徴付けや、分解経路の起源とその進化過程を解き明かすことは、難分解性化合物に対する環境保全を目的とした微生物機能の開発といった観点からも極めて重要かつ興味深い課題である。

ペントクロロニトロベンゼン (PCNB) は、難防除病害であるアブラナ科作物の根こぶ病などに卓効を示す土壌殺菌剤としてかつて圃場に大量散布されていた。本薬剤は、物理化学的に極めて安定で、一般に微生物分解に対しても耐性であることから、土壌中で長期間残留することが知られている^{1,2)}。このため、ケミカルハザードとして圃場を取り巻く生態系へ何らかの影響を及ぼすことが懸念されていた。

一方、ホルモン系除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は広葉雑草の防除に広く用いられているが、それ

らの圃場の土壌中では速やかに代謝分解される。分解微生物やその遺伝子に関してはこれまでに多くの研究報告があるが、自然界に類縁化合物が存在しないこと、代謝酵素の中で最初のステップを触媒する 2,4-D ジオキシゲナーゼは唯一 2,4-D の代謝に特異的な酵素であること³⁾ から、本酵素を含む分解経路の起源に関心がもたれた。

こうした背景から、本研究は 2 種類の芳香族塩化化合物を例に取り、PCNB 剤の土壌中における微生物代謝機構の解明および 2,4-D 分解経路の進化的な解析を行ったものである。

1. PCNB 分解微生物の分布と特性

PCNB は、難防除病害であるアブラナ科作物の根こぶ病、バレイショのそうか病、ナス、トマト、キュウリ、ハクサイ等の苗立枯病などの *Rhizoctonia* 属の病原菌に卓効を示すこと⁴⁾ から、土壌殺菌剤として毎年圃場に大量散布されていた。本薬剤は、物理化学的に極めて安定で、一般に微生物分解に対しても耐性であることから、多年に渡って圃場に残留することが知られている^{1,2)}。一方、毎年繰り返し散布されるために、分解微生物の集積等による根こぶ病菌に対する殺菌力の低下が問題となっていた⁵⁾。また、本剤の残留物や代謝分解産物が圃場を取り巻く土壌環境等の生態系に及ぼす影響が危惧されていた。PCNB の土壌中での分解について、微生物の関与が報告されているが^{1,2,6-8)}、それら分解能を持った微生物の単離や特徴付けに関する報告はなされていなかった。そこで、広範な環境中から採集した試料を用いて PCNB 分解活性を調査すると共に、分解微生物の分布と特性を検討した。

* 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

Table 1 PCNB degrading activity of soil samples.

Place	No. of samples ^{a)}	No. of samples with PCNB degradability ^{b)}
Koumi Town*	22	22 (100)
Minakami Town	4	3 (75)
Wako City	14	12 (86)
Shinrin-Koen Area	10	7 (70)
Kamogawa City	6	3 (50)
Nasu-Kogen Area	12	7 (58)
Furano Town	12	11 (92)
Yakushima Area	10	5 (50)
Tsumagoi Village*	24	22 (92)
Total	114	92 (81)

a) Samples were collected from diverse positions of each place.

b) PCNB degradation means that more than 20 % of PCNB was degraded.

* These places are cultivated fields where PCNB has been continually applied. All cultures were incubated under still conditions.

まず、PCNB 剤を毎年繰り返し散布している圃場から土壌を採集したほか、山間地域、海浜地域、湖沼地域、火山帯地域などの PCNB に曝されていないと考えられる種々の環境中から試料を採集し、それらの PCNB 分解能を試験した。培地は 0.1% の酵母エキスを含み最少塩培地を用い、PCNB を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した。5 ml の培地に約 1 g の試料を加え、28°C で 1 週間、暗黒下で振とう条件または静置条件で培養した後、残留した PCNB および代謝産物を *n*-ヘキサンで抽出し、その一定量を用いてガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) により定量分析した。その結果、PCNB の散布および汚染の有無に関わらず、供試した計 114 の試料中 92 の試料 (約 80%) で 20% 以上の PCNB の分解が認められた (Table 1)。

次に、PCNB の分解活性が認められた試料から主として細菌を単離し、さらに PCNB 分解能を検定したところ、群馬県水上町の山岳地帯から採取した土壌から、嫌気的条件下で効率的に PCNB を PCA に変換する I-41 株を選抜した。I-41 株は静置培養条件下で 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PCNB を 7 日間でほぼ完全に分解したが、振とう条件下では 20% 以下の分解に留まった。経時的には、本細菌の増殖は約 2 日間で定常期に達し、その後 PCNB の代謝量は徐々に増加した。7 日目には、添加した PCNB の約 70% に対応する PCA が検出された (Fig. 1)。また、I-41 株は細菌学的諸性状を調査したところ、*Pseudomonas aeruginosa* と同定された。

これらの結果から、PCNB を分解する微生物は PCNB の散布の有無に関わらず広範な土壌中に生息しているものと判断された。このことは、PCNB 分解菌の中でも強分解菌として単離された I-41 株が山岳地帯からの土壌に由来すること、本細菌が様々な土壌や水圏環境等に幅広く存在す

Fig. 1 Time course of bacterial population (A) and metabolism of PCNB to PCA by *P. aeruginosa* I-41 (B) under different culture conditions.

(A) The optical density (660 nm) of culture broth under shaking condition or still conditions. (B) Initial concentration of PCNB was 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and residual PCNB and produced PCA were extracted with *n*-hexane and analyzed by GC.

Fig. 2 Metabolic pathway of PCNB.

Each chemical is metabolized in 1) plant, 2) fish, 3) mammal, or 4) soil.

る *P. aeruginosa*⁹⁾ と同定されたことから支持される。さらに、1) PCNB の分解活性を示した殆どの土壌サンプルにおいて PCA が検出されたこと、2) I-41 株による PCNB の主要な代謝産物が PCA であったこと、3) 著者らの予備実験や他の研究グループの報告^{10,11)} において繰り返し PCNB を散布した土壌における主要な残留物は PCA であったこ

Table 2 Metabolism of PCNB and its related compounds by washed cells^{a)} of *P. aeruginosa* I-41.

Compounds (10 µg/ml)	Rate of metabolism (%)
Pentachloronitrobenzene	100
2,3,5,6-Tetrachloronitrobenzene	34
2,4,5-Trichloronitrobenzene	51
Pentachloroaniline	46
Pentachloroethoxyaniline	0
Pentachlorophenol	0
Hexachlorobenzene	0
Tetrachloro-isophthalonitrile	0

a) Bacterial cells of isolate I-41 were grown for 24 hr in MSY medium containing PCNB (1 µg/ml), collected by centrifugation, washed twice with sterilized water and suspended in MSY medium (OD₆₆₀ = 1.0), and PCNB or its related compounds were added (10 µg/ml). After 2 days incubation, each compound was analyzed.

とから、土壌環境中における PCNB の主要な微生物代謝経路は PCA への還元的変換であると結論付けられた^{12,13)} (Fig. 2).

また、I-41 株は PCNB の他、2,3,5,6-テトラクロロニトロベンゼン (2,3,5,6-TeCNB) および 2,4,5-トリクロロニトロベンゼン (2,4,5-TCNB) を各々 PCNB の場合の 34% および 51% の効率で代謝し、主な代謝産物として各々 2,3,5,6-テトラクロロアニリン (2,3,5,6-TeCA) および 2,4,5-トリクロロアニリン (2,4,5-TCA) を生じたのに加え、PCA を 46% の効率で代謝した。これに対して、関連化合物であるペンタクロロチオアニソール (PCTA)、ペンタクロロフェノール (PCP)、ヘキサクロロベンゼン (HCB) およびテトラクロロイソフタルニトリル (TPN) を全く代謝しなかった (Table 2).

I-41 株から無細胞抽出液を調製し、PCNB から PCA への変換が還元酵素反応によることを確認した。過去のニトロアリル還元酵素に関する報告¹⁴⁾にあるのと同様に、この PCNB を還元代謝する酵素はニトロアリル化合物に対してさほど高い基質特異性を持たないと考えられた。したがって、I-41 株による PCNB の還元反応はこの化合物に特異的であるわけではなくむしろ付随的な反応であるものと推察された。さらに、PCNB の PCA への変換は、糸状菌^{6,10)}や植物^{11,15-15)}、動物^{18,19)}においても観察されており、生物学的に非特異的な反応であると考えられた¹²⁾。

土壌微生物の増殖に及ぼす PCNB および PCA の影響を調べるために、I-41 株を用いて、培地に添加する PCNB の濃度が I-41 株の生育または PCNB の代謝に及ぼす効果および各種濃度の PCA が I-41 株の生育に及ぼす効果を検討した。その結果、培地に添加した 200 µg/ml 以上の PCNB は I-41 株による PCNB の代謝そのものは阻害しないが、I-41 株の増殖を著しく抑制することが明らかとなった (Fig. 3)。また、200 µg/ml 以上の PCA によって I-41 株の

Fig. 3 Effect of PCNB concentrations on growth rate (A) and PCNB metabolism (B) by *P. aeruginosa* I-41. (A) The optical density (660 nm) of culture broth under still conditions. Initial concentrations of PCNB are indicated.

Fig. 4 Effect of PCA concentrations on growth rate of *P. aeruginosa* I-41. The optical density (660 nm) of culture broth under still conditions. Initial concentrations of PCNB are indicated.

生育は著しく抑制された (Fig. 4)。PCA による I-41 株の生育阻害効果の機構は不明であるが、Ko & Farly¹⁾ は様々な微生物に対して PCA は生育阻害活性を持つことを報告しており、Marthy & Kaufman¹⁰⁾ は嫌気的条件下で PCA は土壌中の呼吸作用を強く阻害することを示している。これらの事実から、毎年大量に土壌散布されている圃場では、高濃度の PCNB やその代謝産物である PCA の蓄積が、本来の

防除対照である植物病原菌以外に土壤に生息する微生物の群集密度に何らかの影響を与える可能性が考えられた^{12,13)}。

一方、PCNB 剤を毎年繰り返し散布している長野県のキャベツ栽培圃場由来の土壤試料から、好気的条件下で PCNB を代謝する *Pseudomonas* 属細菌 N9002 株を単離した。本菌は振とう培養条件で 20 $\mu\text{g/ml}$ の PCNB を 7 日間で 80% 以上分解したが、培養液中に PCA の蓄積や予想される代謝産物である PCTA および PCP は検出されなかった。また、本菌は PCNB の他、PCA および PCTA を分解したが、PCP の分解能は認められなかった。本菌から調製した無細胞抽出液は PCNB、PCA および PCTA を代謝したことから、代謝経路に必要な複数の酵素が含まれていることが確認された。N9002 株による PCNB の分解経路に脱塩素反応が含まれるかどうかを検討するために、水銀チオシアネート発色法により培養液中に遊離した塩素イオンの検出を行ったところ、経時的な PCNB の減少に伴って遊離した塩素イオン量の増加が認められた (Fig. 5)。以上の結果から、N9002 株が新規の PCNB 代謝経路を有する可能性が

示唆され、その詳細な解明が今後期待される。

2. 2,4-D 分解経路の進化的解析

2,4-D はホルモン系合成除草剤で、主に広葉雑草を防除するために世界的に広く用いられている。本剤は土壤中で速やかに分解されるが、そのような土壤からはこれまでに多くの 2,4-D 分解菌が単離され、それらの系統的分類、代謝遺伝子群の解析や土壤中での個体群動態などの研究が行われてきた²⁰⁻²⁵⁾。中でも、*Ralstonia eutropha* JMP134 株は 2,4-D 分解菌研究のモデルとして最も研究の進んだ細菌の一つで、2,4-D 分解に必要な代謝遺伝子群 (*tfdA*~*tfdF*) および制御遺伝子 (*tfdS*, *tfdR*) を伝達性プラスミド pJP4 上に有することが知られている²⁶⁻³⁰⁾。さらに、このような伝達性プラスミドが 2,4-D 分解遺伝子の水平伝播に関与することが示されている³¹⁾。

2,4-D 代謝の最初のステップを担う *tfdA* 遺伝子は、2,4-D から 2,4-ジクロロフェノールへの変換を触媒するジオキシゲナーゼをコードする遺伝子で^{32,33)}、その後の代謝経路を担う他の *tfd* 遺伝子群とは異なり、進化的に関連のある遺伝子が他の代謝系からは見いだされていない。また、2,4-D が世に生まれて半世紀余であるが、現在までのところ自然界には 2,4-D に類縁な化合物の存在は知られていない。こうした背景から、2,4-D 分解菌が如何にして代謝経路を獲得してきたかを知ることはとりわけ興味深い。そこで 2,4-D 分解遺伝子の起源を探る目的で、かつて 2,4-D に全く曝されていないと考えられる原始土壤を試料に用いて 2,4-D 分解菌の探索を行い、分離された菌の性状を生理学および遺伝学的に調査するとともに、2,4-D 代謝遺伝子の伝達性について検討した。

世界各地から採集された天然土壤の中から注意深く 30 試料を選び、まず 2,4-D 分解活性を調査した。そのうち 7 試料に分解活性が認められ、その中で最も強い活性を示したハワイ火山性土壤から分解菌を単離することにした。土壤試料を 2,4-D を含む培地で 10 回以上集積培養した後、2,4-D の分解に伴う pH 指示薬の変色あるいは ¹⁴C-2,4-D の取り込みを指標にして分解菌を単離した。採取場所の異なる 3 つの試料からは REP-PCR 法により各々遺伝的背景が異なることが判明した 3 種類の細菌 (HW1, HWK12,

Fig. 5 Degradation of PCNB and release of chloric ion by *Pseudomonas* sp. N9002.

Initial concentration of PCNB was 50 μmol , and residual PCNB was extracted with *n*-hexane and analyzed by GC. The amount of chloric ion in the culture medium at each incubation time was measured by using a mercuric thiocyanate colorimetric method.

Table 3 2,4-D degrading isolates from Hawaiian pristine soil.

Strain	Origin	Morphology	REP-PCR* Type	<i>tfdA</i>	Phylogenetic position based on 16S rDNA
HW1	HW1	Short rod	I	YES	<i>Variovorax</i>
HW13	HW13	Long bent rod	II	NO	<i>Bradyrhizobium</i> or <i>Nitrobacter</i>
HWK12	HWK12	Long bent rod	III	NO	<i>Bradyrhizobium</i> or <i>Nitrobacter</i>

*REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction

HW13) が分離された³⁾ (Table 3). 菌の形態は HW1 株が短桿状, HWK12 株および HW13 株が湾曲した桿状で, *tfdA* に特異的なプライマーを用いた PCR では HW1 株からのみ期待された約 300 bp の断片が増幅された³⁾. なお, 土壌試料を用いた同様の PCR では HW1 株が分離された土壌からのみ増幅断片が検出されたことから, 土壌を採取した当初から試料中に *tfdA* 遺伝子が存在していたことを確認している. これら 3 種細菌はリボゾーム RNA の部分塩基配列に基づいて, 各々 HW1 株が *Variovorax* 属, HWK12 株および HW13 株が *Bradyrhizobium* 属あるいは *Nitrobacter* 属菌に分類された. さらに, HW1 株から増幅された約 300 bp の遺伝子断片の塩基配列は pJP4 由来の *tfdA* のそれに対して 98% の相同性を示したことから, 両者がほぼ同一の遺伝子であることが判明した³⁾.

次に, HW1 株を用いてさらに 2,4-D 代謝遺伝子の解析を行った. まず, pJP4 由来の *tfdA*~*tfdC* の遺伝子プローブを用いてサザン解析を行ったところ, HW1 株から抽出した DNA は *tfdA* とはハイブリッドを形成したが, その後の代謝経路を担う *tfdB* および *tfdC* とはハイブリッドを形成しなかった. HW1 株から *tfdA* を含む 3.0 kb の *Sma*I 断片を広宿主域プラスミドベクターにクローン化した後, *R. eutropha* JMP228 (pBH501aE) 株内で発現させ, 2,4-D の分解能を確認した. なお, JMP228 株は pJP4 を除去した JMP134 株のリファンピシン耐性変異株で, プラスミド pBH501aE は pJP4 の *tfdA* 遺伝子領域を部分的にカナマイシン耐性遺伝子 (*ntII*) カセットで置換することにより *tfdA* を不活化した変異体である³⁴⁾. また, HW1 株が持つ *tfdA* 遺伝子が他の細菌に転移し得るかどうかを明らかにするため, JMP228 株または JMP228 (pBH501aE) 株を受容菌として用いてプレート交配法により接合実験を行った. 各々の受容菌については, JMP228 株は一連の *tfd* 遺伝子群を相補するかどうか, JMP228 (pBH501aE) 株は *tfdA* 遺伝子のみを相補するかどうかを同時に検討するために供試したものである. その結果, 後者を受容菌に用いた場合のみ, 1 mM の 2,4-D およびリファンピシンを含む無機塩培地上で 5×10^{-7} , カナマイシンを添加した同培地上では 4×10^{-8} の頻度で 2,4-D 分解能を獲得した接合体が得られた. この結果から, HW1 株の *tfdA* 遺伝子が伝達性のプラスミドなどを介した接合伝達により JMP228 (pBH501aE) 株へ転移したものと考えられた. そこで, 常法により HW1 株からプラスミドの検出を試みたが確認できなかったため, パルスフィールドゲル電気泳動を行ったところ, 約 620 kb の巨大プラスミド様の DNA を有していることが判明した. このプラスミド様 DNA は pJP4 の *tfdA* プローブとハイブリッドを形成したが, *tfdB* および *tfdC* プローブとはハイブリッドを形成しなかったことから, HW1 株は *tfdA* 遺伝子のみをプラスミド上に保有していることが明

Fig. 6 (A) Detection of plasmid DNA from *Variovorax* sp. HW1 by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and (B) hybridization with *tfdA* probe.

A, The numbers of left side indicate the sizes of *Sccharomyces cerevisiae* DNA used as the molecular standard marker. HW1 culture was transferred for each indicated time, and was subjected to be analyzed by PFGE. The range of DNA separation was 100 kb–1.2 Mb. Hybridization was carried out under high stringency conditions.

らかになった (Fig. 6). さらに, 2,4-D 分解能を獲得した接合体を用いたサザン解析から, HW1 株の巨大プラスミドは接合体内で維持されておらず, *tfdA* は pBH501aE 上に位置していることが明らかとなった. また, これらのことを実証するために, HW1 株からクローン化した *tfdA* を含むプラスミド pBSH1 をエレクトロポレーション法で JMP228 株 (pBH501aE) に導入することによっても, 2,4-D 代謝能を持つ形質転換体が得られた. これら接合体および形質転換体は *tfdA* を pJP4 のそれと全く同位置に持つことが確認された. HW1 株の *tfdA* 遺伝子 ORF の上流と下流領域の塩基配列は pJP4 におけるそれらに対して 90% 以上の相同性を示したことから, *tfdA* が相同組換えにより pBH501aE の *ntII* カセットと置換したものと考えられた. 一方, *ntII* をプローブとしたサザン解析は, これら接合体および形質転換体はいずれも pBH501aE と同位置に *ntII* を持つプラスミドを同時に保有していることを示した. 以上より, HW1 株の遺伝子伝達には巨大プラスミドの接合伝達および引き続き起こる HW1 株の *tfdA* 遺伝子近傍の配列と pBH501aE 中の配列の間での相同的組み換えが関与していることが示唆された.

かつて 2,4-D に曝されたことのないと考えられるハワイ火山性土壌から分離された HW1 株が, 如何なる目的で 2,4-D 分解遺伝子である *tfdA* を有していたかは現在のところ全く不明であるが, 2,4-D が使用される以前からその分解遺伝子が既に自然界に存在していたことは確かである

う。さらに、原始土壌に生息する細菌が持つ *tfdA* が他の菌に伝達され得るという事実は、HW1 株のような細菌の 2,4-D 代謝遺伝子が現在圃場等に広く拡散し、これまでに多数分離されている 2,4-D 分解菌のその起源である可能性を強く示唆するものと考えられる³⁾。

おわりに

実際に、圃場に散布された薬剤が土壌中で如何なる運命を辿るのか、あるいは残留農薬が土壌微生物の群集密度にどのような影響を及ぼすかを正確に把握するためには、圃場レベルでの緻密な実験検討が必要であるが、本研究で得られた結果は、今後少なくとも PCNB 剤の土壌微生物による代謝分解の全容解明を進める上で重要な指針を与えるものと考えられる。これまでの過去の研究成果により、2,4-D 分解微生物やそれらの代謝遺伝子に関して体系的な理解が可能になった観があるが、2,4-D に曝された歴史を持たない原始土壌にその分解菌および代謝遺伝子の起源を求めるとい本研究での新たな切り口により、微生物進化の足跡を垣間見る機会が得られたものと思われる。これら PCNB の微生物分解機構に対する理解や、2,4-D 代謝経路の起源や伝搬性に関する知見は、微生物等の働きを利用して難分解性化学物質を分解処理するバイオリメディエーション技術の応用開発に向けた学術的基盤の整備に少なからず資するものと期待される。

本研究を遂行するにあたり、理化学研究所主任研究員 山口勇先生には、農薬の分解微生物などに関する貴重なご指導、ご鞭撻を賜りました。また、同主任研究員 工藤俊章先生、東京工業大学名誉教授 堀越弘毅先生、長岡技術科学大学教授 福田雅夫先生、同教授 故矢野圭二先生、ミシガン州立大学教授 J. M. Tiedje 先生、同助教授 L. J. Forney 先生には、微生物学などに関する様々なご指導、ご教示を賜りました。衷心より深く感謝申し上げます。旧通産省工業技術院主任研究員 鎌形洋一先生、海洋科学センター主任研究員 高見英人先生、現明治大学講師 前田理久先生、現パーデュー大学助教授 C. Nakatsu 先生、現トロント大学助教授 R. A. Fulthorpe 先生には共同研究を通して様々なご教示を頂きました。理化学研究所微生物制御研究室研究員 長谷川志氏には実際の研究に携わって頂きました。その他にも様々な方々から、ご援助ならびにご協力をして頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究は、旧科学技術庁新技術事業団微生物進化プロジェクトチームおよびミシガン州立大学微生物生態センターの共同研究プロジェクトとして行われたものです。ここに記して深謝の意を表します。

引用文献

- 1) W. H. Ko & J. D. Farley: *Phytopathology* **59**, 64 (1969)
- 2) T. Nakanishi: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **38**, 249 (1972)
- 3) Y. Kamagata, R. R. Fulthorpe, K. Tamura, H. Takami, L. J. Forney & J. M. Tiedje: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2266 (1997)
- 4) T. Nakanishi & H. Oku: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **36**, 67 (1970)

- 5) K. Suyama & H. Okazaki: Abstr.; 19th Annual Meeting of Pestic. Sci. Soc. Jpn. D111, 1994 (in Japanese)
- 6) C. I. Chacko, J. L. Lockwood & M. Zabik: *Science* **154**, 893 (1966)
- 7) T. Nakanishi & H. Oku: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **35**, 339 (1969)
- 8) T. Nakanishi & H. Oku: *Phytopathology* **59**, 1761 (1969)
- 9) N. R. Krieg & J. G. Holt: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 1, 8th Ed., The Williams & Wilkins Company, London, p. 164, 1984
- 10) N. B. Murthy & D. D. Kaufman: *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1151 (1978)
- 11) M. Ogiso & H. Tanabe: *J. Pesticide Sci.* **7**, 391 (1982)
- 12) K. Tamura, Y. Hasegawa, T. Kudo & I. Yamaguchi: *J. Pesticide Sci.* **20**, 145 (1995)
- 13) K. Tamura, Y. Hasegawa, T. Kudo & I. Yamaguchi: "Microbial Diversity and Genetics of Biodegradation," K. Horikoshi *et al.* Ed., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p.113, 1997
- 14) I. Yamashita: *Biochem. J.* **27**, 85 (1954)
- 15) S. Gorbach & U. Wagner: *J. Agric. Food Chem.* **15**, 654 (1967)
- 16) G. L. Lamoureux, J.-M. Gouot, D. G. Davis & D. G. Rusness: *J. Agric. Food Chem.* **29**, 996 (1981)
- 17) D. G. Rusness & G. L. Lamoureux: *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1070 (1980)
- 18) P. W. Aschbacher & V. J. Feil: *J. Agric. Food Chem.* **31**, 1150 (1983)
- 19) E. J. Kuchar, F. O. Geenty, W. P. Griffith & R. J. Thomas: *J. Agric. Food Chem.* **17**, 1237 (1969)
- 20) M. A. Bhat, M. Tsuda, K. Horieke, M. Nozaki, C. S. Vaidyanathan & T. Nakazawa: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 307 (1994)
- 21) G. R. Chaudry & G. H. Huang: *J. Bacteriol.* **170**, 3897 (1988)
- 22) J. O. Ka & J. M. Tiedje: *J. Bacteriol.* **145**, 1365 (1994)
- 23) J. O. Ka, W. E. Holben & J. M. Tiedje: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1106 (1994)
- 24) J. O. Ka, W. E. Holben & J. M. Tiedje: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1121 (1994)
- 25) A. A. Maë, R. O. Marits, N. R. Ausmees, V. M. Kõiv & A. L. Heinaru: *J. Gen. Microbiol.* **139**, 3165 (1993)
- 26) P. S. Amy, J. W. Schulke, L. M. Frazier & R. J. Seidler: *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1237 (1985)
- 27) R. H. Don & J. M. Pemberton: *J. Bacteriol.* **161**, 466 (1985)
- 28) R. H. Don, A. J. Weightman, H.-J. Knackmuss & K. N. Timmis: *J. Bacteriol.* **145**, 681 (1985)
- 29) B. Kaphammer & R. H. Olsen: *J. Bacteriol.* **172**, 5856 (1990).
- 30) B. Kaphammer B., J. J. Kukor & R. H. Olsen: *J. Bacteriol.* **172**, 2280 (1990)
- 31) R. H. Don & J. M. Pemberton: *J. Bacteriol.* **145**, 681 (1981)
- 32) F. Fukumori & R. P. Hausinger: *J. Bacteriol.* **175**, 2083 (1993)
- 33) F. Fukumori & R. P. Hausinger: *J. Biol. Chem.* **268**, 24311 (1993)
- 34) W. E. Holben, B. M. Schroeter, V. G. Calabrese, R. H. Olsen, J. K. Kukor, V. O. Biederbeck, A. E. Smith & J. M. Tiedje: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3941 (1992)

Society Awards 2001

(on high prospectiveness)

Microbial Pesticide Degradations and Evolutionary Analysis of Degrading Enzymes

Introduction

Although the major metabolic pathways of microorganisms evolved millions of years ago, molecular evolution has not ceased. Developments in the chemical industries over the past several decades have resulted in the synthesis of numerous artificial compounds and their release into the natural environment. In agriculture, for example, halogenated organic compounds have been applied in abundance to cultivated land as pesticides in order to obtain stability in crop yields. The introduction of xenobiotic chemicals to nature has created opportunities for the evolution of metabolic pathways that allow microorganisms either to exploit new carbon sources or to detoxify harmful compounds.

The pesticide pentachloronitrobenzene (PCNB) has been widely used as a fungicide, especially for the control of clubroot disease of cruciferous vegetables. This compound is physicochemically stable and generally resistant to microbial degradation, and it is thought to remain in soil for many years after its application. Given that large quantities of this fungicide have been repeatedly applied to cultivated fields during the last few decades, residual PCNB or its metabolites may affect nontarget soil microorganisms and result in ecological hazards. In addition, the synthetic herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has also been applied to crops over the past 5 decades for the control of broad-leaf weeds. Several microorganisms that are able to degrade 2,4-D have been isolated from soil with a history of exposure to this herbicide, and the catabolic genes of these isolates have been extensively investigated. Among the genes that contribute to 2,4-D catabolism, *tfdA*, which encodes an enzyme responsible for the first step of this process, is relatively specific to the 2,4-D degradation pathway. Given that no naturally occurring analogs of 2,4-D are known, it is of interest to determine the mechanism by which the ability to degrade 2,4-D developed in soil microorganisms.

In this study, the microbial degradation of PCNB in soil environments and the molecular evolution of the 2,4-D metabolic pathway were examined.

Distribution and Characterization of PCNB-degrading Microorganisms

Although several studies of the degradation of PCNB in soil have implicated soil microorganisms in this process, few such studies have described the characteristics of the PCNB-degrading microbes. We therefore screened for the presence of PCNB degraders in soil samples that were collected not only from cultivated fields exposed to PCNB but also from noncultivated areas including mountainous terrain, volcanic zones, and beach regions as well as industrial activated sludge. Each soil sample (1 g) was placed in 5 ml of mineral salt medium containing 0.1% yeast extract and PCNB (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and was incubated for 7 days at 28°C with or without shaking. Under nonagitated conditions, 92 out of a total of 114 samples mediated an extent of PCNB degradation of > 20%, suggesting that PCNB-degrading microorganisms were present in most of the soil environments irrespective of the previous application of PCNB. From a soil sample with a high PCNB degradation rate, a bacterial strain (I-41) was isolated as the most efficient degrader of PCNB and identified as *Pseudomonas aeruginosa*. Incubation of I-41 under nonagitated conditions with PCNB at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resulted in the degradation of almost all of the pesticide within 1 week; in contrast, only 18% of the PCNB was degraded under shaking conditions. Characterization of the time course of PCNB degradation by this bacterium revealed that bacterial growth achieved stationary phase within 2 days and that the breakdown of PCNB correlated with the increase in the bacterial population. In addition, pentachloroaniline (PCA) was detected in most soil samples that mediated PCNB degradation, and the principal metabolite of PCNB in I-41 was confirmed to be PCA. Together with previous observations indicating that PCA is the major metabolite of PCNB in soil samples from fields repeatedly subjected to PCNB application, our results suggest that the main pathway for PCNB degradation in soil environments is the reductive conversion of PCNB to PCA.

I-41 mediated the reduction not only of PCNB to PCA but also of tetrachloronitrobenzen (TeCNB) to tetrachloroaniline (TeCA) and of trichloronitrobenzen (TCNB) to trichloroaniline (TCA). The observation that a cell-

free extract of I-41 also mediated the reductive degradation of PCNB demonstrated that this process is the result of an enzyme-catalyzed reaction. The enzyme system responsible for the reduction of PCNB thus appears to possess a relatively low substrate specificity among nitroaryl compounds. Indeed, nitroaryl reductase systems have been shown to exhibit low substrate specificity. The reduction of PCNB by I-41 might thus be an incidental property of this bacterium rather than reflect the existence of a dedicated PCNB degradation pathway. Moreover, the degradation of PCNB to PCA has been observed in some fungi, plants, and animals, suggesting that catalysis of this reaction is a nonspecific biological property.

PCNB is a potent fungicide and is especially effective against *Plasmidiophora brassicae* and *Rhizoctonia solani*. However, PCNB at concentrations of $>200\text{ }\mu\text{g/ml}$ also markedly inhibited the growth of I-41, as did PCA at $200\text{ }\mu\text{g/ml}$. These observations suggest that high concentrations of PCNB or PCA might affect the population of soil microorganisms in addition to the target plant pathogens in fields repeatedly exposed to PCNB in large amounts.

Another PCNB-degrading bacterium, designated *Pseudomonas* sp. N9002, was isolated from a cabbage field in which PCNB had been applied annually for at least 5 years. This organism mediated the degradation of virtually all of the fungicide within 1 week when incubated under shaking conditions with PCNB at a concentration of $20\text{ }\mu\text{g/ml}$. Neither PCA, pentachloro-thioanisole (PCTA), nor pentachlorophenol (PCP) was detected during the degradation of PCNB by N9002, whereas the release of free chlorine ions was observed with the use of the colorimetric mercury thiocyanate method. These results suggest that N9002 degrades PCNB through an unknown mechanism that includes dechlorination.

Molecular Evolution of a 2,4-D Metabolic Pathway

Several microorganisms able to degrade 2,4-D have been isolated to date from soils with a history of exposure to this herbicide, and their catabolic genes have been extensively investigated. *Ralstonia eutropha* JMP134 is one of the best characterized 2,4-D degraders and has been shown to harbor a plasmid, pJP4, on which the catabolic genes (*tfdA* through *tfdF*) and corresponding regulatory genes (*tfdR* and *tfdS*) responsible for 2,4-D degradation are located. The *tfdA* gene encodes α -ketoglutarate-dependent 2,4-D dioxygenase (TfdA), which catalyzes the first step of 2,4-D metabolism. Unlike the other *tfd* catabolic genes, *tfdA* is relatively specific to 2,4-D degradation, and other sequences evolutionarily related to *tfdA* have not been detected. Therefore, little is known of the origin and essential

function of *tfdA* in natural environments.

Recently, 2,4-D-degrading activity has been detected in the soil of several pristine ecosystems that had not been exposed to 2,4-D or to other halogenated organic compounds. With the use of 2,4-D dye indicator medium or ^{14}C -labeled 2,4-D medium, a previously unidentified group of oligotrophic bacteria capable of degrading 2,4-D was thus isolated from enrichment cultures of volcanic soil derived from geographically remote regions of Hawaii. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequencing and characterization of the physiological properties of these bacteria revealed that isolate HW1 belongs to the genus *Variovorax* and that isolates HWK12 and HW13 possess 16S rDNA sequences that exhibit a high degree of similarity to those of *Bradyrhizobium* species. All of the isolates grew slowly on 2,4-D medium, with mean generation times of 16 to 30 hr, which are substantially longer than those of previously identified 2,4-D degraders. Polymerase chain reaction-mediated amplification and Southern hybridization analysis revealed that HW1 harbors a *tfdA* gene almost identical to that of pJP4 but does not possess genes homologous to *tfdB* or to *tfdC*. Cloning of a 3.0-kb *Sma*I fragment containing *tfdA* of HW1 in a broad-host range plasmid vector and introduction of the resulting plasmid into *R. eutropha* JMP228 (pBH501aE) resulted in complementation of the inability of this strain to degrade 2,4-D; JMP228 is a rifampicin-resistant derivative of JMP134 that has been cured of pJP4, and pBH501aE is a *tfdA*⁻ derivative of pJP4 in which the *tfdA* gene is disrupted by insertion of a kanamycin resistance gene cassette. Furthermore, the 2,4-D degradation phenotype (or, at least, TfdA activity) of HW1 was shown to be transmissible to JMP228 (pBH501aE), suggesting that the 2,4-D catabolic gene (or genes) is located on a conjugative plasmid like pJP4. Thus, HW1 appeared an appropriate bacterial strain for studies of the genetic origin of the 2,4-D degradation pathway and the assembly of 2,4-D catabolic genes.

Pulsed-field gel electrophoresis revealed that HW1 harbors a large plasmid ($\sim 620\text{ kb}$), on which *tfdA* is located. Experimental mating of HW1 and JMP228 strains showed that transconjugants with the ability to degrade 2,4-D were obtained (at a frequency of 5×10^{-7}) only with JMP228 (pBH501aE) as the recipient. Hybridization analysis demonstrated that the large plasmid was not maintained in the transconjugants and that the *tfdA* gene of these cells was located on pBH501aE. Electroporation of the cloned *tfdA* gene of HW1 into JMP228 (pBH501aE) also resulted in the generation of transformants with the ability to degrade 2,4-D. Analysis of both transconjugants and transformants confirmed that the *tfdA* gene was located on the pBH501aE at the position corresponding to that of *tfdA* in pJP4. These results suggest that the HW1 plasmid is conjugatively

transferred to JMP228 (pBH501aE) and that the *tfdA* gene of HW1 subsequently undergoes homologous recombination with pBH501aE. Furthermore, the presence in a pristine environment of a 2,4-D-degrading bacterium that harbors the canonical *tfdA* gene on a transmissible plasmid indicates that *tfdA* in soil microorganisms such as HW1 might be the origin of the gene in 2,4-D degraders present in 2,4-D-treated cultivated fields, although the intrinsic function of the gene in untreated environments remains to be determined.

Perspectives

Although the behavior of PCNB in nature and the effects of residual pesticide on the population dynamics of soil microorganisms require further investigation in different types of fields, our results provide important

insight into the microbial degradation of PCNB. Previous studies of the microbial degradation of 2,4-D have resulted in the identification of various 2,4-D degraders and their catabolic genes. Our strategy of characterizing 2,4-D-degrading microorganisms isolated from pristine environments may provide a rare opportunity to define recent events in the molecular evolution of new metabolic pathways for pesticide degradation. Furthermore, progress in our understanding both of the mechanisms of microbial degradation of PCNB in soil environments as well as of the molecular evolution of 2,4-D metabolic pathways should eventually lead to the development of bioremediation protocols for the treatment of soil or groundwater that is contaminated with these chlorinated aromatic compounds.