解 説

作物保護とバイオテクノロジー (その 3)* —環境汚染物質の微生物分解と遺伝子操作—

古 川 謙 介

工業技術院微生物工業技術研究所

(昭和 59 年 5 月 20 日受理)

Applications of Biotechnology to Plant Protection (3) Genetic Approach to the Biodegradation of Environmental Pollutants

Kensuke FURUKAWA

Fermentation Research Institute, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki 305, Japan

は じ め に

環境中への有害物質の導入と蓄積は有機水銀化合物、重金属、PCB、各種の農薬類、最近ではダイオキシンなどの例にみられるように、大きな環境問題をひき起こしてきた。これらの環境汚染物質の主要な問題点の一つは、その毒性やガン原性、催奇性のほかに、これらが難分解性で自然界に長い間滞まるという事実である。産業廃水処理においては、活性スラッジ等の馴養が常用されているが、これは廃水中に含有されている物質に対する微生物の選択と選択された微生物の遺伝的な変化(進化)をも含むと考えられている。自然界の微生物集団における新規な機能をもつ遺伝子の発生、進化の例として、5-chlorosalicylate を利用する *Bacillus brevis* が報告されている¹⁾。このグラム陽性菌は 5-chlorosalicylate 1,2-dioxygenase を産生するが、この酵素は salicylate には作用しない。Chakrabarty ら²⁾によって遺伝的手法で開発された 2,4,5-T 資化菌 *Pseudomonas cepacia* AC 1100 株は、塩素の置換していない phenoxyacetic acid や 2,4-D には生育がきわめて悪い。逆に 2,4-D 分解菌は 2,4,5-T を分解できない。ハロゲン化芳香族化合物のような人工化合物に対して特異的に作用する 1 セットの酵素系の進化のプロセスは、微生物がいかにして新規な代謝機能を獲得するか、また、そのような進化によっていかに難分解性物質が分解されていくのかという興味ある問題を提起する。

環境汚染物質分解菌の主要細菌は *Pseudomonas* 属細菌であり、その強力な酸化能は多彩な物質資化能、分解能を秘めている。たとえば *P. cepacia* の 1 菌株は試験した 146 化合物のうち 100 化合物以上を単一の炭素源、窒素源、あるいはイオウ源として利用できる^{3,4)}。

微生物の分子遺伝学は大腸菌を中心に進展し、これまでに膨大な遺伝解析の蓄積がなされ、組換え DNA 技術を含む応用遺伝学は大腸菌において最初に確立された。その後、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) などにおいても遺伝子操作技術が開発されたが、最近に至り *Pseudomonas* 属細菌においても着実に応用遺伝学が進展してきた。それにはおもに以下の三つの研究開発によるところが大きい。(1) 諸種のグラム陰性細菌において複製できる広宿主域プラスミドがみつかり、種の壁を越えた遺伝子の転移が可能となったこと。(2) transposon (Tn) や挿入エレメント (IS) を使用することによって、ゲノム遺伝子に挿入変異や欠失変異を導入することが可能となったこと。(3) *Pseudomonas* 属細菌における宿主ベクター系の開発が行なわれ、遺伝子操作を用いて目的とする遺伝子のクローニングが可能となったことなどである。本解説においては、環境汚染物質の分解に関与している微生物とその遺伝生化学的育種に関する研究の現状の一端を紹介したい。

1. 微生物による環境汚染物質の分解とプラスミド

(1) *Pseudomonas* 属細菌の遺伝学と分解系プラスミド

環境汚染物質の分解に関与している主要な微生物は *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*,

* (その 2) は「抵抗性作物の育種とバイオテクノロジー」(中田和男, 本誌 9, 355 (1984))

Nocardia, *Beijerinckia*, *Rhodopseudomonas* などであるが、このうち比較的よく遺伝学が研究されているのは *Pseudomonas* のみである。*Pseudomonas* 属細菌は、土壤中に広く分布するグラム陰性の桿菌できわめて酸化能が強く、GC 含量は 58~70% の範囲にある。このうち遺伝学、生化学の研究がなされているのは、緑膿菌と呼ばれる *P. aeruginosa* と螢光菌と呼ばれる一群で、この中には多彩な物質質化能をもつ *P. putida* が含まれている。*P. aeruginosa* PAO 株の染色体 DNA のサイズは 2.4×10^9 ダルトンと推定されているが、約 50 の栄養マーカーと同数くらいの代謝遺伝子が染色体上にマッピングされている⁵⁾。その遺伝子地図をみると、同じ代謝経路に属している酵素遺伝子および一つの機能単位を構築している酵素遺伝子はクラスターを形成しているが、アミノ酸などの生合成に関与している遺伝子は全体に分散している。Dean と Morgan⁶⁾ は、*P. putida* PPN の環状染色体地図を作成した。全体の遺伝子マーカーの順序は *P. aeruginosa* のそれとはだいぶ異なっている。安

息香酸、酢酸フェニル、マンデレート、ニコチン酸の代謝に関与している大きなクラスター遺伝子の領域内にくつかのアミノ酸合成遺伝子が配座しているが、このクラスター遺伝子の領域は全染色体 DNA の約 20% に達している。

核外遺伝子は *Pseudomonas* 属細菌において多数知られている。多くの薬剤耐性および金属耐性プラスミドは、おもに緑膿菌から見いだされている。いわゆる“分解系プラスミド”は 1972 年、Chakrabarty⁷⁾ により発見された SAL プラスミド（サリチル酸代謝に関与）がはじめてであり、その後 CAM⁸⁾、NAH⁹⁾、OCT¹⁰⁾、TOL¹¹⁾ などが相ついで報告された。分解系プラスミドの代表的なものを表 1 に示す。分解系プラスミドの多くは、接合伝達能を有し、分子量が 50 kb 以上のものが多く、数百 kb のものも見つかっている。XYL¹²⁾（キシレン代謝）あるいは NIC¹³⁾（ニコチン酸代謝）のような非接合性プラスミドでも fertility factor K および T により伝達されうる。分解系プラスミドのうち最もよく研究されてい

表 1 土壌細菌の分解系プラスミドにコードされている代謝経路例⁷¹⁾

Growth substrate	Principal metabolic product(s)	Plasmid	Original host
Toluene, <i>m</i> -xylene <i>p</i> -Xylene	Pyruvate + acetaldehyde Pyruvate + propionaldehyde (<i>meta</i> -cleavage)	TOL (=pWW0)	<i>P. putida</i>
Xylene, toluene	same as above (<i>meta</i> -cleavage)	XYL-K	<i>Pseudomonas</i> Pxy
Naphthalene	Salicylate → pyruvate + acetaldehyde (<i>meta</i> -cleavage)	NAH7	<i>P. putida</i>
Naphthalene	Salicylate → succinate + acetyl-CoA (<i>ortho</i> -cleavage)	pWW60-1	<i>P. putida</i>
Salicylate	Pyruvate + acetaldehyde (<i>meta</i> -cleavage)	SAL; pMWD1	<i>P. putida</i>
<i>p</i> -Cresol	<i>p</i> -Hydroxybenzoate → succinate + acetyl-CoA (<i>ortho</i> -cleavage)	pND50	<i>P. putida</i>
Camphor	Isobutyrate	CAM	<i>P. putida</i>
Nicotine, nicotinate	Maleamate + fumarate + succinate	NIC-T	<i>P. convexa</i>
<i>n</i> -Octane (C6–C10 alkane)	Alkane aldehyde	OCT	<i>P. putida</i>
Phenylacetate	Not known	pWW17	<i>P. putida</i>
3-Chlorobenzoate	Succinate + acetyl-CoA (<i>ortho</i> -cleavage)	'pB13'; pAC25	<i>Pseudomonas</i> sp. B13; <i>P. putida</i>
4-Chlorobiphenyl	4-Chlorobenzoate	pKF1	<i>Acinetobacter</i> sp. P6
2,4-Dichlorophenoxyacetate, 4-Chloro-2-methylphenoxy- acetate	Succinate + acetyl-CoA + glyoxylate (<i>ortho</i> -cleavage)	pJP1; pJP3	<i>Alcaligenes paradoxus</i>
2-Fluoroacetate	Glycolate	pUO1	<i>Moraxella</i> sp. B
2-Chloropropionate	Lactate	pUU204	<i>Pseudomonas</i> sp. E4
6-Aminohexanoate cyclic dimer	6-Aminohexanoate	pOAD2	<i>Flavobacterium</i> sp. K172
Parathion	<i>p</i> -Nitrophenol + diethylthiophosphate	pCS1	<i>P. diminuta</i>

るのは、キシレン/トルエンの代謝に関与している TOL プラスミドである。Williams グループ¹⁴⁾は TOL のコードしている酵素系および調節制御機構を詳細に研究した。*P. putida* mt-2 株は安息香酸を染色体支配のオルソ開裂経路か、プラスミド支配のメタ開裂経路かのどちらかで代謝するが、オルソ経路を利用する細胞の方がメタ開裂を経由する細胞より早く増殖するため、TOL プラスミドが消去されたり、あるいは TOL に大きな欠失 (TOL 機能をコードする 39 kb DNA 部位) が起きる現象が認められた。Downing と Broda¹⁵⁾は 115 kb の TOL の詳細な制限酵素地図を作成した。中沢ら¹⁶⁾は広宿主域薬剤耐性プラスミド RP4 と TOL の融合プラスミド、RP4-TOL を作成し、また大腸菌の系で TOL の二つの制御遺伝子を含めてすべての遺伝子をクローニングした¹⁷⁾。Timmis グループ¹⁸⁾は Tn 5 (Km^r) によるトランスポゾン変異を用いて TOL の遺伝子解析を行ないさらに *P. putida* を用いる宿主ベクター系において TOL 遺伝子のクローニングを行なった。トルエン分解に必須な領域を含む TOL の一部は薬剤耐性トランスポゾンと同様に他のプラスミドや *P. putida* の染色体へと転位する¹⁹⁾。NAH プラスミドは、ナフタレン分解に関与しているが、最近、Gunsalus グループ²⁰⁾により、その詳細な制限酵素切断地図が作成され、次いでナフタレン酸化に関与する遺伝子の 1 セットが *P. putida*²¹⁾ および *E. coli*²²⁾ においてクローニングされた。Chakrabarty ら²³⁾は CAM-OCT の融合プラスミドを UV 照射により作製したが、筆者らは SAL の全ゲノムに TOL のトランスポゾン部位 (57 kb) が挿入された SAL::TOL (pKF 439, 140 kb) を *in vivo* 遺伝子組換え手法により取得した²⁴⁾。SAL::TOL の遺伝子構造を図 1 に示す。この融合プラスミドは SAL の伝達機能で諸種の *Pseudomonas* 属細菌に接合伝達され、接合株は Xyl⁺ Tol⁺ Sal⁺ の性質を獲得する。

分解遺伝子の一部がプラスミドにより、また一部が染色体によりコードされている例も珍しくない。オクタンのオクタノアルデヒドへの転換は OCT プラスミド支配であるが、その後の酸化は *P. putida* および *P. aeruginosa* の染色体にコードされている¹⁰⁾。同様にカンファーは CAM プラスミドのコントロールのもとにイソプテレートへ酸化されるが、イソプテレートの代謝遺伝子は *P. putida* の染色体上にある⁹⁾。*P. putida* pMD 1 株ではナフタレンからサリチル酸への転換は染色体上にコードされているが、サリチル酸の代謝はプラスミド支配である⁷⁾。酢酸フェニルおよびニコチン酸の分解は、*P. putida* PPN では染色体遺伝子により支配されている

図 1 SAL::TOL 融合プラスミド (pKF 439)

が²⁵⁾、他の株ではそれぞれ pWW17²⁶⁾ および NIC-T¹³⁾ のプラスミドにコードされている。CAM⁹⁾、XYL-K¹²⁾ および NIC-T¹³⁾ は *P. putida* の染色体 DNA を可動化する。

P. aeruginosa は広い代謝経路をもっているし、またいくつかの分解系プラスミドは、この菌株に接合により伝達することができるにもかかわらず、自然界から分離した *P. aeruginosa* 株が分解系プラスミドを保有しているという報告はこれまで見当たらない²⁷⁾。むしろ *P. aeruginosa* からは、多くの薬剤耐性プラスミド、FP プラスミド (sex factor) および重金属耐性プラスミドが頻ぱんに見いだされている²⁸⁾。以上、*Pseudomonas* 属細菌を中心に見いだされている代表的な分解系プラスミドを概観したが、次節以下にいくつかの環境汚染物質の微生物分解とそれに関与しているプラスミドの研究例を紹介する。

(2) 有機水銀化合物の微生物分解と水銀耐性プラスミド

1968 年外村ら²⁹⁾により分離された *Pseudomonas rosea* K62 株は、有機水銀化合物の C-Hg 結合を切断し、生じた無機水銀を金属水銀 (Hg⁰) へと還元する。したがって K62 株によりフェニル水銀はベンゼンと Hg⁰、メチル水銀はメタンと Hg⁰、エチル水銀はエタンと Hg⁰ へと還元分解される。筆者ら^{30,31)}は有機水銀の分解に関与する酵素、すなわち C-Hg 結合を切断する S-Enz および Hg²⁺ → Hg⁰ を触媒するフラビン酵素 (MMR-Enz) を分離精製した。これらの両酵素と NADPH 生成酵素との再構成によって、有機水銀化合物の分解機作が図 2 に示すように明らかとなった。

Silver³²⁾や Summers ら³³⁾は、大腸菌、*Staphylococcus aureus* の水銀耐性機構がプラスミド支配であることを

解明し、その耐性機構を遺伝子レベルで詳細に検討した。緑膿菌の水銀耐性プラスミドは (1) FP 2 や FP 5 のような性因子によるもの、(2) R902, pMG1, pMG2, R3108 などの薬剤耐性プラスミド上に水銀耐性遺伝子をもつもの、(3) 水銀耐性遺伝子のみをもつ Hg-r や MER などの 3 グループに大別される²⁸⁾。Stanisichら³⁴⁾は緑膿菌 PAO の pVS1 プラスミドの水銀耐性遺伝子がトランスポゾン (Tn 501) であることを明らかにした。この Tn 5 の全塩基配列 (1747 塩基対) は Brown ら³⁵⁾

により決定され、その分子量は 58,661 と計算されている。Nakahara ら³⁶⁾は大腸菌の R100 プラスミドの水銀耐性遺伝子部位を ColE1 にクローン化し、さらに Tn 801 を挿入した各種の変異プラスミドを取得し水銀耐性遺伝子の解析を行なった。その結果、R100 の水銀耐性遺伝子は図 3 に示すように、*mer* オペロンのオペレーター・プロモーター領域と RNA 合成を制御する inducer protein の合成を支配する *mer* R, Hg²⁺ のとり込みを支配する *mer* T, そして mercury reductase の構造遺伝子の *mer* A の三つの部分から構成されていることを明らかにした³⁷⁾。Jackson と Summers ら³⁸⁾は、この *mer* オペロンにコードされているポリペプチドをミニセルを使って解析した。

(3) PCB の微生物分解とプラスミド

PCB はビフェニルに塩素を直接置換させて製造されるが、塩素のつく数 (0~10 個) と置換位置の違いにより理論的には 210 種の化合物が可能である。実際にはその約半数の化合物が確認されている。PCB 分解菌は環境中に広範に分布している。筆者ら³⁹⁾は *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, および *Pseudomonas* など多くの PCB 分解菌を分離したが、これらはいずれもビフェニルを単一炭素源として生育し諸種の PCB 成分を“cometabolism”により分解する。その生分解性は PCB 成分の塩素置換性に大きく依存している⁴⁰⁾。一般的に塩素数の少ないものほど分解は速いが、2,6-dichlorobiphenyl にみられるように、片方のリングの 2,6-位(オルソ位)に塩素が置換すると難分解性となる。表 2 に *Acinetobacter* 属 P6 株による 36 種類の PCB 成分の分解代謝様式をまとめて示している。細菌による PCB 分解の主経路は塩素置換の少ないリングへの酸素分子の導入とリングのメタ開裂を経由する塩化安息香酸への酸化分解である⁴¹⁾ (図 4 参照、表 2 のグループ i)。しかし塩素置換の特性により dihydroxy 化合物 (グループ iii) やメタ開裂物質 (グループ ii) が蓄積したり、2,4,6-trichlorobiphenyl のよう

図 2 *Pseudomonas rosea* K62 株による有機水銀化合物の分解反応機構^{30), 31)}

図 3 R100 の *mer* オペロンの遺伝子地図³⁷⁾

表 2 *Acinetobacter* 属細菌 P6 株による各種の PCB 成分の代謝様式⁴¹⁾

Group	Major product	PCB isomers
i	Chlorobenzoic acids	2-, 3-, 4-, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 3,5-, 2,2', 3,3', 4,4', 2,3,4-, 2,4,5-, 2,5,2', 3,4,2', 2,4,2',4', 3,4,3',4', 2,3,4,5-
ii	Meta-cleavage compounds	2,4', 2,4,4', 2,5,4'-
iii	Dihydroxy compounds	2,6-, 2,3,6-, 2,4,2',5', 2,5,2',5', 2,4,5,2',5'-
iv	Trihydroxy compound	2,4,6-
v	Unknown compounds	2,3,2',3', 2,3,2',5', 2,4,5,2',3'-
vi	No metabolite	2,3,5,6-, 2,6,2',6', 2,3,4,5,6-

図 4 PCB 分解菌と塩化安息香酸分解菌による 4-クロロビフェニルの完全分解経路⁴³⁾

に dihydroxy 化合物を経て trihydroxy 化合物が蓄積するもの (グループ iv), 2,3,2',3'-化合物のグループ v にみられるように著量の未同定物質が蓄積するものもある。

Chakrabarty ら⁴³⁾ は *Klebsiella* 細菌の 4-chlorobiphenyl の分解が、プラスミド (pAC 21) 関与であると報告したが、筆者ら⁴³⁾ は *Acinetobacter* P6 株の PCB 分解能 (PCB → 塩化安息香酸) が 53Mdal プラスミド (pKF 1) にコードされていることを認めた。ドイツの Knackmuss グループ⁴⁴⁾ および Chakrabarty グループ⁴⁵⁾ は後述するように 3-chlorobenzoic acid (3 Cba) 分解菌に TOL プラスミドを導入することにより 4-chlorobenzoic acid (4 Cba) および 3,5-dichlorobenzoic acid (3,5-Dcb) をも分解できる *P. putida* 株を造成した。筆者は Chakrabarty との共同研究により、*Acinetobacter* P6 株の PCB 分解プラスミド (PCB → chlorobenzoic acid をコード) を彼らの造成した *P. putida* AC866 株 (pAC 25: 4 Cba の完全分解をコード、染色体に TOL トランスポゾン) を導入することを試みたが成功に至っていない。しかしこの両菌株を組み合わせることにより、4-chlorobiphenyl は著量の塩素を遊離しながら完全分解された⁴³⁾。3,5-dichlorobiphenyl を用いたときも同様に 2 時間で理論値の 98% 以上の塩素が遊離した。P6 株と AC 866 株による 4-chlorobiphenyl の完全分解経路を図 4 に示すが 4-chlorobiphenyl は P6 株の pKF 1 によりコードされる諸酵素により 4 Cba へ、4 Cba は AC 866 株の染色体に組み込まれている TOL 機能により 4-chlorocatechol へ酸化され、次いで 4-chlorocatechol は同株のもつプラスミド pAC 27 の機能により脱塩素されフマル酸および酢酸へと代謝される。自然界における難分解性化合物の多くは、単独の微生物によって完全分解されるものは少なく、いくつかの微生物の共同作用によって分解代謝されていくものと考えられる。PCB の完全分解の例はその典型的なものの一つであろう。

(4) ビフェニル, キシレン/トルエン, サリチル酸同時資化菌 *P. paucimobilis* Q1 株

ビフェニル, キシレン/トルエン および サリチル酸の代謝は *Pseudomonas* 属細菌などにおいて、それぞれ pKF1, TOL, SAL のプラスミド支配である。われわれが土壌より分離した *P. paucimobilis* Q1 株はきわめて広い基質資化能をもち、上記物質に対してもよい生育を示し PCB を分解する⁴⁶⁾。しかも Q1 株のビフェニル, キシレン/トルエン, サリチル酸の代謝は密接に関連し合い (図 5), 共通の調節機構により制御されていることが明らかとなった。すなわちこれらの化合物は共通して安息香酸誘導体, カテコールへと酸化されメタ開裂をうける。Q1 株には 3 種類のプラスミドが存在するが、100 Mdal の pKF2 にビフェニル, キシレン/トルエン, サリチル酸の代謝オペロンが存在しているらしい。現在、これらの代謝遺伝子のクローニングを行なっているところである。pKF2 プラスミドは従来 *Pseudomonas* 属細菌で知られている TOL, SAL プラスミドおよび *Acinetobacter* 属 P6 株のビフェニル分解プラスミド (pKF 1) との DNA レベルでの相同性はまったく認められず新規な構造と機能を有するプラスミドと考えられる。

(5) 塩化安息香酸分解菌のプラスミドと育種

塩化安息香酸分解菌は多くの土壌細菌について報告されている。Knackmuss ら⁴⁴⁾ は 3 Cba 分解菌 *P. putida* B13 株に TOL を導入することにより 4 Cba および 3,5 Dcb を資化できる株を造成した。これは 3 Cba 分解菌の酵素は 4 Cba と 3,5 Dcb の chlorocatechol への酸化を触媒できないが、TOL 支配の toluate oxygenase は基質特異性が広く上記物質を酸化できる。Chatterjee ら⁵¹⁾ は 3 Cba 資化菌 *P. putida* AC 858 株から 3 Cba の完全分解に関与する pAC 25 (68 Mdal) を分離した。彼らは Knackmuss ら⁴⁴⁾ の方法に準じてケモスタットでの混合培養により TOL プラスミドを導入することにより 4 Cba および 3,5 Dcb 分解菌を得た。そして 4 Cba

図5 *Pseudomonas paucimobilis* Q1株によるビフェニル、キシレン/トルエン、サリチル酸の代謝⁴⁶⁾

分解菌 AC 866 株の染色体上に TOL の 57 kb DNA segment が組み込まれていること、さらに pAC 25 プラスミドは 7 kb の欠失した pAC 27 へ変化していること、また 3,5 Dcb 分解菌においてもプラスミド DNA の再編成が起きていることを報告している。また Knackmuss らの *P. putida* B13 株からも pAC 27 に類似したプラスミド pB 13 を分離した⁴⁷⁾。

(6) 2,4-D 分解プラスミド

Pemberton ら⁴⁸⁾は除草剤 2,4-D の分解菌 *Alcaligenes paradoxus* から 58 Mdal の pJP1 を分離した。これは IncP1 に属し伝達性があり、2,4-D の 2,4-dichlorophenol への酸化をコードしている。次いで彼らは *Alcaligenes* 属細菌より 2 種の 2,4-D 分解プラスミドを分離したが、pJP2 は 37 Mdal で 2,4-D と phenoxyacetic acid の分解を支配している。また pJP3 は 51 Mdal で伝達性があり 2,4-D のほかに 3 Cba の分解と水銀耐性をもコードしている⁴⁹⁾。

(7) “Plasmid assisted molecular breeding” と 2,4,5-T 分解菌

Chakrabarty ら⁵⁰⁾は微生物の分解能力を高める方法として “plasmid assisted molecular breeding” technique を提案している。この方法は自然界に行なわれているプラスミドの遺伝子の組換え、変異、進化をケモスタッド中で基質の選択圧をかけることにより行な

い、新しい機能を有する微生物を造成しようとする試みである。除草剤として使用された 2,4,5-T 分解菌 *P. cepacia* AC 1100 株は上記手法により分離された。土壌試料に諸種の分解系プラスミド、すなわち CAM, SAL, TOL, pAC 21, pAC 25 などの保有株をケモスタッド中で混合培養し、最初はそれぞれのプラスミド基質と少量の 2,4,5-T を炭素源として培養し、次第に 2,4,5-T の濃度をあげていった。約 6 カ月後に 2,4,5-T を単一の炭素源として生育する AC 1100 株が得られ、この株は 1.5 mg/ml の 2,4,5-T を 1 週間で 90% 以上分解しながら増殖した。さらに彼らは AC 1100 株を土壌中の 2,4,5-T (1 mg/g 土壌) に 5×10^7 /g の濃度で加えることにより、2,4,5-T は 1 週間で 99% 以上分解されることを報告している⁵¹⁾。

(8) ハロゲン化酢酸の脱ハロゲン化とプラスミド

外村ら⁵²⁾は *Moraxella* 属細菌より 2 種のハロゲン化酢酸脱ハロゲン化酵素 (H1 と H2) と水銀耐性をコードしている 43 Mdal の伝達性プラスミド pUO1 を見いだした。このプラスミドのコードする脱ハロゲン化反応は以下のとおりである。

(X: ハロゲン)

pUO1 は *Pseudomonas* や大腸菌にも伝達され形質が発現されるが、宿主菌の種類により欠失を起こす。また

pUO1 は薬剤耐性プラスミド RP4 と生体内で組換えを起こし、数種の組換えプラスミドが得られた。pUO1 の H1 と H2 酵素遺伝子は、*E. coli* C600-pBR322 系を用いてクローニングされた。大腸菌における両遺伝子の発現量は pUO1 よりハイブリッドプラスミドのほうが 5～10 倍高く、Tc プロモーター下でよく発現した。

(9) ナイロンオリゴマー分解プラスミド

岡田ら⁵³⁾は 6-ナイロン工場の廃棄物ナイロンオリゴマー (ϵ -アミノカプロン酸の環状および鎖状オリゴマー) を資化できる *Flavobacterium* sp. K172 株を分離した。この K172 株はナイロンオリゴマー資化性に関与する酵素 (E I と E II) を有し、その遺伝子はプラスミド pOAD 2 (29 Mdal) に配座している。E I と E II 遺伝子は pBR322 にクローニングされ大腸菌において酵素が生産された。E II 遺伝子と類似の塩基配列が pAD 2 の他の部分に散在していることがわかり、彼らは E II 酵素の進化について検討を行なっている。

2. トランスポゾン変異

トランスポゾンは movable genetic element の一つで、ある染色体あるいはプラスミドから他の染色体、プラスミドへと転移する遺伝子単位である。アンピシリン (Tn3)、カナマイシン (Tn5)、テトラサイクリン (Tn10) などの薬剤耐性をコードしているものがよく知られている。両端に逆向き、あるいは同じ向きの塩基配列のくり返し構造があり転移において重要な役割を演じている。転移する部位は一定でなく、遺伝子の内部にこれが挿入されると不活化が起き、付近の遺伝子に極性効果やゲノム再編成などの影響を及ぼす。土壌細菌の遺伝子解析に有効に使用されるトランスポゾンの一つに Tn5 (Km^r) がある。Beringer ら⁵⁴⁾は pPH1J1 (Gm^r プラスミド) に Mu フェージを導入し、まず pPH1J1::Mu を作製した。次いでこの Mu ゲノム中に Tn5 を導入した pPH1J1::Mu::Tn5 (pJB4J1) を作製した。この pJB4J1 は大腸菌では Mu フェージの制御機構が働いており、プラスミドレプリコンは複製されるが、ある種の土壌細菌においては複製できない。しかし、接合によりいったん宿主に入った pJB4J1 の Tn5 は、宿主株のプラスミドおよび染色体上に転移する。Tn5 の挿入部位によって諸種の栄養要求変異株や、ある機能蛋白の欠損した変異株がとれてくる。この “suicide plasmid” を使った Tn5 mutagenesis はこれまでに *Pseudomonas*⁵⁵⁾、*Agrobacterium*⁵⁶⁾、*Rhizobium*⁵⁴⁾、*Erwinia*⁵⁷⁾、*Acinetobacter*⁵⁸⁾ および *Caulobacter*⁵⁹⁾ 属細菌に適用された。*Agrobacterium tumefaciens*⁵⁶⁾ では、クラウンガール腫瘍よう生成および octopine 代謝に関与する遺伝子に Tn5 の挿入された変

異株が、*Erwinia carotovora*⁵⁷⁾ では諸種の栄養要求株が、*P. aeruginosa*⁵⁵⁾ では exoprotease 変異株がとられている。*Acinetobacter* sp.⁵⁸⁾ では染色体上に Tn5 が挿入される hot spot があるようで、10,000 株以上の Km^r 株中には栄養要求株はとれなかった。Tn5 のほかに Tn3 (Ap^r)、Tn10 (Tc^r)、Tn7 (Tp^r , Sm^r)、Tn501 (Hg^r) などがよく使われている。Tsuda ら⁶⁰⁾は Tn501 を使用して *P. aeruginosa* の鞭毛形成に関与する遺伝子の解析を行なった。

3. *Pseudomonas* 属細菌における宿主・ベクター系と代謝遺伝子のクローニング

Pseudomonas 属細菌における遺伝子クローニングに有用なプラスミドは、その宿主株に固有なプラスミドか、広宿主域をもつプラスミドが使用される。表 3 に *Pseudomonas* においてこれまでに開発されたプラスミドベクターの例を示す。Inc Q/P-4 グループの RSF1010, R1162 および R300B の類縁小型プラスミド (8.9 kb) は、きわめて広い宿主域を示し多くのグラム陰性菌、たとえば *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti*, *Acetobacter xylinum*, *Azotobacter vinelandi*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodospseudomonas spheroides* および *Methylophilus methylotrophus* に導入でき安定に保持される。これらは接合型プラスミド (RP4 など) により可動化され、ベクター作成に好都合のレプリコンでコピー数は約 20 である。Bagdasarian ら⁶¹⁾は RSF1010 を基本として、諸種の薬剤耐性マーカーおよび制限酵素切断部位を付与した諸種のプラスミドベクターを開発した。その一例を図 6 に示す。pKT210 は RSF1010 の *Pst* I 小フラグメントを S-a プラスミドの Cm^r 遺伝子を含む *Pst* I 3.6 kb とおきかえることにより作成され、*Sal* I, *Sst* I および *Hind* III サイトがクローニング実験に使用できる。pKT231 は RSF1010 に R6-5 のミニプラスミド pKT105 の Km^r を含む *Pst* I 4.6 kb 断片を挿入したものである。*Hind* III, *Xma* I, *Xho* I, *Cla* I, *Eco* RI および *Sst* I サイトをもち *Cla* I サイトを除き挿入失活が可能である。pKT230 は pACYC177 の Km^r を含む *Pst* I 部位を RSF1010 にクローニングすることにより得られた。このほか、 λcos を導入したプラスミド pKT247 や伝達性プラスミドにより可動化されない *mob*⁻ も作成されている。

Inc P1 接合型広宿主域プラスミドである RP1, RP4, RK2 および R68 (これらは同一かきわめて類似したプラスミドであると考えられている) から作成されたものもある。このうちよく使われているものとして RK2

図6 RSF1010を基本骨格としたプラスミドベクターの作成⁶¹⁾

由来の *tra⁻mob⁺ Tc^r* プラスミド pRK 290⁶²⁾ がある。20 kb と小型化され広宿主域をもつが、コピー数は 2~8 と少ない。Eco RI と Bgl II にクローニングサイトをもち pRK 213 により広くグラム陰性菌に可動化される。pRK 290 のコスミド誘導体は 15~31 kb^{63,64)} のサイズの DNA 断片をクローニングできる。pVS1 は多くの *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium tumefaciens* および *Rhizobium leguminosarum* へ可動化される⁶⁵⁾。30 kb のうち 3 kb 領域が宿主内におけるプラスミドの保持安定に必須である。表3にこれまでに開発された

Pseudomonas 属細菌におけるベクターを例示する。一方、宿主としては *P. aeruginosa* と *P. putida* において制限欠失株 (*res⁻*) がとられているし、形質転換法も確立されている⁵⁴⁾。また組換え不能 (*rec⁻*) 株も得られている。*P. aeruginosa* PAO 株は 43°C で静置培養することにより制限活性が弱まる⁶⁶⁾。Timmisらの開発した *P. putida* mt-2 KT 2440 株 (*res⁻, m⁺*) と RSF 1010 誘導ベクターは、*Pseudomonas* における HV1 クローニング系として 1982 年、NIH で承認された。最近いくつかの機能性ベクターも開発されている。中沢ら⁶⁷⁾ は RSF 1010 由

表 3 *Pseudomonas* 属細菌におけるクローニングベクター例⁷¹⁾

Vector	Replicon(s)	Size (kb)	Cloning sites	Selected marker	Insertional inactivation	Mobilization by
pKT210	RSF1010 (IncQ=IncP-4)	11.8	<i>Sst</i> I <i>Hind</i> III <i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I	Cm Cm, Sm Cm	Sm — —	RP1 or R64drd11
pKT231	RSF1010	13.0	<i>Sst</i> I <i>Hind</i> III, <i>Cla</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I <i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I	Km Sm Sm	Sm Km —	as for pKT210
pKT240	RSF1010	12.5	<i>Hind</i> III, <i>Cla</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I <i>Bam</i> HI <i>Sst</i> I <i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I	Cb Cb, Km Cb, Km Cb, Km	Km — Sm (low level) —	as for pKT210
pTB107	R300B (IncQ)	10	<i>Hind</i> III, <i>Cla</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I <i>Sst</i> I <i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I	Sm (Su) Km (Su) Km (Su)	Km Sm —	as for pKT210
pGSS8	R300B	9.5	<i>Sal</i> I, <i>Bam</i> HI <i>Sst</i> I <i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I	Sm Tc Tc	Tc Sm —	
pRO1614	Cryptic PAO plasmid, pBR322	6.2	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	Cb	Tc	
pME290	pVS1 (IncP, unclassified)	6.8	<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I <i>Pst</i> I	Cb Km	Km Cb	Mob ⁻
pRK290	RK2 (IncP-1)	20	<i>Eco</i> RI, <i>Bgl</i> II	Tc	—	pRK2013 (a ColE1 replicon with RK2 <i>tra</i> genes)
pVK101	pRK290	21.3	<i>Sal</i> I <i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI	Km Tc Km, Tc	Tc Km —	pRK2013
pVK102 (cosmid)	pRK290	23	<i>Sal</i> I <i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I	Km Tc	Tc Km	pRK2013
pLAFR1 (cosmid)	pRK290	21.6	<i>Eco</i> RI	Tc	—	pRK2013
pMM34 (cosmid)	RSF1010	13.8	<i>Bam</i> HI	Km	—	as for pKT210

来のハイブリッドプラスミド (pTS 1036) を作成し、さらにこの *Xho* I 部位に *xyl* E (catechol 2,3-oxygenase 遺伝子) を挿入したプロモーター検出用ベクター pTS 1045 を作成した。上流にプロモーター活性を有する DNA 断片を挿入すると *xyl* E 遺伝子の発現 (カテコール噴霧によるコロニーの黄変により検出) レベルからプロモーター活性を定量的に測定できる。細矢ら⁶⁸⁾ は β -gal 遺伝子を利用したプロモーター検出ベクター pOH 211 を作成し、大腸菌と *Pseudomonas* からそれぞれプロモーター活性を有する DNA 断片をスクリーニングし、それぞれの系で β -gal の発現から大腸菌と *Pseudomonas* 属細菌におけるプロモーター活性の比較を行った。

次に以上述べた広宿主域を使った土壌細菌遺伝子のクローニングの例を示すが、*Pseudomonas* 属細菌における宿主ベクター系は、比較的最近利用可能となったものが多く、クローニングの例はまだ多くはない。

(1) Bagdasarian と Timmis¹⁸⁾ は Tn 5 (Km^r) を使ったトランスポゾン変異を利用して TOL プラスミドの解析を行なったのち、*P. putida*/pKT 231 を用いて二つの制御遺伝子を含むすべてのトルエン代謝遺伝子のクローニングを行なった。中沢ら¹⁷⁾ も大腸菌において TOL の全遺伝子のクローニングを行なっている。次いで *xyl* E の全塩基配列を決定した。(2) Ditta ら⁶²⁾ は RK 2 由来の pRK 290 を用いて *N*₂ 固定細菌、*Rhizobium meliloti* の gene bank を大腸菌中に作製し、この中に

Klebsiella pneumoniae の *nif* (ニトロゲナーゼ遺伝子) と相同な遺伝子が含まれていることを明らかにした。

(3) 古賀と Gunsalus⁶⁹⁾ はカンファー分解プラスミド (CAM) のチトクロム P_{450} 遺伝子を pKT 240 を用いてクローニングし、その遺伝子解析を行なった。(4) Grum と Gunsalus は NAH 7 のナフタレン酸化に関与している二つのオペロンを pRK 290 および pKT 240 を用いてクローニングした。さらに制御遺伝子 *nah R* がナフタレン代謝遺伝子の発現に正の誘導の調節をしていることを明らかにした。(5) Chatterjee と Chakrabarty⁷⁰⁾ は 3 Cba 分解プラスミド, pAC 27 (110 kb) の制限酵素地図を作製した。次いで 3 Cba の分解遺伝子が一つの領域 (*Eco* RIA 断片) にクラスターを形成して配座することを pLAFRI ベクターにクローニングすることにより明らかにした。さらに彼らは 3 Cba 分解遺伝子が *P. putida* AC 812 (*rec A*) の染色体と容易に組換えを起こすことから、このクラスター遺伝子はトランスポゾンの性質を有している可能性を指摘した。

おわりに

大腸菌において開発された宿主ベクター系は広範な生物の遺伝子クローニングに対してきわめて有用である。しかし本来、大腸菌の代謝機能は“oxidative”でなく“fermentative”であり *Pseudomonas* 属細菌のそれとは大きく異なっている。したがって環境汚染物質の分解菌の育種を考える際大腸菌は適当でなく *Pseudomonas* 属細菌を中心とした土壌細菌の遺伝子操作系の開発が必要となる。

1983年の夏、米国シアトルにおいて“Genetic Control of Environmental Pollutants”と題する国際シンポジウムが開催されたが、その発表の多くは環境汚染物質の分解代謝における環境微生物の機能利用と遺伝育種に関するものであった。このシンポジウムの発表内容をみても、*Pseudomonas* 属細菌の遺伝学は、各種の分解系プラスミドの発見、トランスポゾンの利用、宿主ベクター系の開発などにより着実に進展している。微生物の代謝能力を遺伝子レベルで改変し、既存の代謝機能を高めたり、新規な代謝能力を付与することは、有害物質の分解処理のみにとどまらず諸種の化合物 (芳香族炭化水素など) から有用物質の生産を計る道が拓かれる。ともあれ、土壌細菌における代謝経路の遺伝子操作は緒についたばかりである。今後遺伝子操作した微生物を環境浄化に利用していくためには、技術的な問題のみにとどまらず、バイオハザードの問題なども含めて地道で着実な研究の進展が期待されている。

引用文献

- 1) R. Crawford, P. E. Olsen & T. D. Frick: *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 889 (1979)
- 2) J. J. Kilbane, D. K. Chatterjee, J. S. Karns, S. T. Kellogg & A. M. Chakrabarty: *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 72 (1982)
- 3) P. H. Clarke: *Antonie van Leeuwenhoek* **48**, 105 (1982)
- 4) R. Y. Stainer, N. J. Palleroni & M. Doudoroff: *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159 (1966)
- 5) B. W. Holloway, V. Krishnapillai & A. F. Morgan: *Microb. Rev.* **43**, 73 (1979)
- 6) H. F. Dean & A. F. Morgan: *J. Bacteriol.* **153**, 485 (1983)
- 7) A. M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.* **112**, 815 (1972)
- 8) J. G. Rheinwald, A. M. Chakrabarty & I. C. Gunsalus: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 885 (1973)
- 9) R. Farrell, I. C. Gunsalus, I. P. Crawford, J. B. Johnston & J. Ito: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**, 411 (1978)
- 10) M. Fennewald, W. Prevatt, R. Meyer & J. Shapiro: *Plasmid* **1**, 164 (1978)
- 11) P. A. Williams & K. Murray: *J. Bacteriol.* **120**, 416 (1974)
- 12) J. R. Mylroie, D. A. Friello, T. V. Siemens & A. M. Chakrabarty: *Mol. Gen. Genet.* **157**, 231 (1977)
- 13) R. Thacker & I. C. Gunsalus: *J. Bacteriol.* **137**, 697 (1979)
- 14) M. J. Worsey & P. A. Williams: *J. Bacteriol.* **130**, 1149 (1977)
- 15) R. Downing & P. Broda: *Mol. Gen. Genet.* **177**, 189 (1979)
- 16) T. Nakazawa, E. Hayashi, T. Yokota, Y. Ebina & A. Nakazawa: *J. Bacteriol.* **134**, 270 (1978)
- 17) S. Inoue, A. Nakazawa & T. Nakazawa: *J. Bacteriol.* **145**, 1137 (1981)
- 18) M. Bagdasarian & K. N. Timmis: “Current Topics in Microbiology and Immunology,” Vol. 96, Springer, Berlin, pp. 47–67, 1982
- 19) D. K. Chatterjee & A. M. Chakrabarty: *Mol. Gen. Genet.* **188**, 279 (1982)
- 20) K. M. Yen & I. C. Gunsalus: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 874 (1982)
- 21) A. D. Grund & I. C. Gunsalus: *J. Bacteriol.* **156**, 89 (1983)
- 22) M. A. Schell: *J. Bacteriol.* **153**, 822 (1983)
- 23) A. M. Chakrabarty: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1641 (1973)
- 24) 古川謙介・宮崎寿次・富塚 登: 日本農芸化学会昭和59年度大会講演要旨集, p. 246, 1984
- 25) B. W. Holloway, C. Crowther, H. Dean, J. Holmes & A. F. Morgan: “Drug Resistance in

- Bacteria," Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 231-242, 1982
- 26) R. W. Pickup, R. J. Lewis & P. A. Williams: *J. Gen. Microbiol.* **129**, 153 (1983)
 - 27) G. A. Jacoby: "Pseudomonas aeruginosa Clinical Manifestation of Infection and Current Therapy," Academic Press, New York, pp. 271-309, 1979
 - 28) 中原英臣: 蛋白質 核酸 酵素 **25**, 243 (1980)
 - 29) K. Tonomura, K. Maeda, F. Futai & T. Nakagami: *Nature* **217**, 644 (1968)
 - 30) K. Furukawa & K. Tonomura: *Agric. Biol. Chem.* **36**, 217 (1972)
 - 31) T. Tezuka & K. Tonomura: *J. Biochem.* **80**, 79 (1976)
 - 32) A. A. Weiss, S. D. Murphy & S. Silver: *J. Bacteriol.* **132**, 197 (1977)
 - 33) A. O. Summers & E. Lewis: *J. Bacteriol.* **113**, 1070 (1973)
 - 34) V. A. Stanisich, P. M. Bennett & M. H. Richmond: *J. Bacteriol.* **129**, 1227 (1977)
 - 35) N. L. Brown, S. J. Ford, R. D. Pridmore & D. C. Fritzinger: *Biochemistry* **22**, 4089 (1983)
 - 36) H. Nakahara, S. Silver, T. Miki & R. H. Rownd: *J. Bacteriol.* **140**, 161 (1979)
 - 37) A. O. Summers & S. Silver: *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 637 (1978)
 - 38) W. J. Jackson & A. O. Summers: *J. Bacteriol.* **149**, 191 (1982)
 - 39) K. Furukawa: "Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants," CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 33-58, 1982
 - 40) K. Furukawa, K. Tonomura & A. Kamibayashi: *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 223 (1978)
 - 41) K. Furukawa, N. Tomizuka & A. Kamibayashi: *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 301 (1979)
 - 42) P. F. Kamp & A. M. Chakrabarty: "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance," Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 275-285, 1979
 - 43) K. Furukawa & A. M. Chakrabarty: *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 619 (1982)
 - 44) W. Reineke & H. J. Knackmuss: *Nature* **277**, 385 (1979)
 - 45) D. K. Chatterjee, S. T. Kellogg, D. R. Watkins & A. M. Chakrabarty: "Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids," Plenum Pub. Co., New York, p. 519, 1981
 - 46) K. Furukawa, J. R. Simon & A. M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.* **154**, 1356 (1983)
 - 47) D. K. Chatterjee & A. M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.* **153**, 532 (1983)
 - 48) J. M. Pemberton & P. R. Fisher: *Nature* **268**, 732 (1977)
 - 49) R. H. Don & J. M. Pemberton: *J. Bacteriol.* **145**, 681 (1981)
 - 50) S. T. Kellogg, D. K. Chatterjee & A. M. Chakrabarty: *Science* **214**, 1133 (1981)
 - 51) J. J. Kilbane, D. K. Chatterjee & A. M. Chakrabarty: *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1697 (1983)
 - 52) H. Kawasaki, H. Yahara & K. Tonomura: *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1477 (1981)
 - 53) 岡田弘輔・根来誠司・木下晋一: 蛋白質 核酸 酵素 **27**, 451 (1982)
 - 54) J. E. Beringer, J. L. Beynon, A. V. Buchanan-Wollaston & A. W. B. Johnston: *Nature* **276**, 633 (1978)
 - 55) M. J. Stapleton, K. S. Jagger & R. L. Warren: *J. Bacteriol.* **157**, 7 (1984)
 - 56) D. J. Garfinkel & E. W. Nester: *J. Bacteriol.* **144**, 732 (1980)
 - 57) R. T. Zink, R. J. Kemble & A. K. Chatterjee: *J. Bacteriol.* **157**, 809 (1984)
 - 58) J. T. Singer & W. R. Finnerty: *J. Bacteriol.* **157**, 607 (1984)
 - 59) B. Ely & R. H. Croft: *J. Bacteriol.* **149**, 620 (1982)
 - 60) M. Tsuda & T. Iino: *J. Bacteriol.* **153**, 1008 (1983)
 - 61) M. Bagdasarian, R. Lurz, B. Rückert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey & K. N. Timmis: *Gene* **16**, 237 (1981)
 - 62) G. Ditta, S. Stanfield, D. Colbin & D. R. Helinski: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7347 (1980)
 - 63) A. M. Friedman, S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema & F. M. Ausubel: *Gene* **18**, 282 (1982)
 - 64) V. C. Knauf & E. W. Nester: *Plasmid* **8**, 45 (1982)
 - 65) V. A. Stanish, P. M. Bennett & M. H. Richmond: *J. Bacteriol.* **129**, 1227 (1977)
 - 66) Y. Sano & M. Kageyama: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **23**, 183 (1977)
 - 67) 中沢晶子: 第2回遺伝子工学基盤技術研究シンポジウム講演要旨集, p. 50, 1983
 - 68) H. Hosoya, Y. Otake, N. Tomizuka & K. Furukawa: *Agric. Biol. Chem.* (投稿中)
 - 69) 古賀秀雄・I. C. Gunsalus: 第6回微生物をめぐる分子生物学と薬学領域における応用面シンポジウム講演要旨集, p. 82, 1982
 - 70) D. K. Chatterjee & A. M. Chakrabarty: *Gene* **27**, 173 (1984)
 - 71) D. Hass: *Experientia* **39**, 1199 (1983)