ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 71, No. 9, pp. 910~913, 1997]

環境汚染物質を効率よく分解するハイブリッドシュードモナス菌†

古川 謙 介

(九州大学農学部)

Key words : *bph* operon ; hybrid strains ; chimeric biphenyl dioxygenases ; chlorinated environmental pollutants

はじめに

芳香族炭化水素の初期酸素添加に関与するオキシゲナーゼは基質へ酸素分子を導入する末端オキシゲナーゼと NADH からの電子伝達系に関与する複数のサブユニットタンパク質から構成されている。これらの酵素には共通したモチーフが存在し、アミノ酸配列に高い相同性が認められる。このことは微生物が環境中に供給される芳香族化合物を利用するために鍵となる酵素系を適応的に進化させた結果であろう。例えば、ビフェニルを資化する細菌として *Pseudomonas* を中心としたグラム陰性および *Rhodococcus* などのグラム陽性細菌が分離された。これらの細菌からビフェニル分解遺伝子が単離され、その構造と機能が解析されたが、ビフェニル代謝 *bph* オペロンの遺伝子の構成および各遺伝子の塩基配列はきわめて類似したものから、遺伝子のシャプリングや重複が生じ、構造に大きな差異が認められるものも存在する(本ミニレビューの新井/工藤氏による芳香族化合物分解性シュードモナス属細菌の多様性と進化の項参照)。これは *bph* 遺伝子が細菌間で転移する(した)こと、また長い歴史の中で機能を保持しながら構造変化が生じたことを意味する。一般的に芳香環オキシゲナーゼは基質特異性が広く、本来の基質以外にも諸種の芳香族炭化水素に対して酸素添加活性をもつ。我々の研究室では環境微生物の分解機能の適応的進化に着目し、ビフェニル資化シュードモナス菌に各種のオキシゲナーゼ遺伝子を導入、環境汚染物質を効率よく分解するハイブリッド株の開発に

成功した。

1. トルエン分解 *todC1* 遺伝子をビフェニル代謝 *bph* オペロンに組み込んだハイブリッド株

(1) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF 707 ビフェニル資化菌 *P. pseudoalcaligenes* KF 707 株の *bph* オペロン⁽¹⁾ とトルエン資化菌 *P. putida* F 1 株のトルエン代謝 *tod* オペロン⁽²⁾ はその構造と各遺伝子の塩基配列が類似している⁽³⁾。ビフェニルジオキシゲナーゼとトルエンジオキシゲナーゼは、共に 4 つのサブユニットから成る。すなわち、末端ジオキシゲナーゼを構成する大サブユニット(鉄・硫黄タンパク質で *bphA1/todC1* によりコードされる)と小サブユニット(*bphA2/todC2* によりコード)、NADH からの電子伝達系に関与するフェレドキシン(*bphA3/todB* によりコード)とフェレドキシン還元酵素(*bphA4/todA* によりコード)で、BphA 1 と BphA 2 はヘテロヘキサマー、TodC 1 と TodC 2 はヘテロテトラマーとして存在する。ビフェニルジオキシゲナーゼはビフェニルおよびビフェニル関連物質を酸化するが、ベンゼン/トルエンなどの単環には作用しない⁽⁴⁾。一方、トルエンジオキシゲナーゼは本来の基質であるベンゼン/トルエンのほか、ビフェニル、ナフタレンにも作用する⁽⁵⁾。*todC1* 遺伝子を *bphA1* の上流領域 *orf0* と下流領域 *bphA2A3A4* で挟み、スーパーベクター pSUPB 30 (Cm^r/Gm^r) に連結した pSUP-todC 1 を構築、KF 707 株に導入した。pSUP-todC 1 は *Pseudomonas* 菌では複製できないが、プラスミッド上の *orf0* あるいは *bphA2A3A4* 領域が KF 707 株の染色体 *bph* 相同領域と組換わったシングルクロスオーバー株と *orf0* と *bphA2A3A4* の両方で組換ったダブルクロスオーバー株が得られた。これらのハイブリッド株はいずれもビフェニル、ベンゼン/トルエンに生育できた(表 1)。更に興味あることに、環境汚染物質として知られるトリクロロエチレンを極めて効率良く分解する機能を獲得した⁽⁶⁾(図 1)。

† Engineering Hybrid Pseudomonads Capable of Efficient Degradation of Environmental Pollutants Kensuke FURUKAWA, (Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University)

表 1 ハイブリッド株の各種芳香族炭化水素資化性

Strain	Carbon source				
	BP	4-Mebp	DM	Tol	Ben
Wild type					
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF 707	⦿	⦿	⦿	—	—
<i>P. putida</i> KF 715	⦿	⦿	⦿	—	—
<i>P. putida</i> F 1	—	—	—	⦿	⦿
Single crossover					
<i>P. Pseudoalcaligenes</i> KF 707-S 1	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿
<i>P. putida</i> KF 715-S 3	⦿	⦿	⦿	⦿	+
Double crossover					
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF 707-D 2	⦿	+	—	⦿	⦿
<i>P. putida</i> KF 715-D 5	⦿	+	+	⦿	⦿

BP, ピフェニル；4-MeBP, 4-メチルピフェニル；DM, ジフェニルメタン；Tol, トルエン；Ben, ベンゼン

図 1 ハイブリッド株によるトリクロロエチレン (TCE) の分解

—▲—, *P. pseudoalcaligenes* KF 707; —△—, *P. putida* F 1; —◆—, KF 707-D 2 (トルエンで生育); —○—, KF 707-D 2 (コハク酸で生育); —■—, KF 707-D 2 (ピフェニルで生育)

(2) *P. putida* KF 715 ピフェニル資化菌 *P. putida* KF 715 株は KF 707 株と類似した *bph* オペロンをもつが, *bphC* (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase をコード) と *bphD* (ring meta-cleavage compound hydrolase をコード) 間に存在する *bphX* 領域 (2-hydroxy-penta-4-enoic acid の acetyl CoA への代謝をコード) 3.5 kbp が欠失している⁽⁷⁾. この株に上記の pSUP-todC 1 を導入したところ, 同様にシングルクロスオー

バー株およびダブルクロスオーバー株 (KF 715-D 5) が得られた. これらのハイブリッド株もトリクロロエチレンを効率良く分解し, その分解能は KF 707 株由来のハイブリッド株と同程度であった⁽⁸⁾. KF 715 株のダブルクロスオーバー株のハイブリッドオペロンは F 1 株由来の *todC1*, KF 707 株由来の *orf0* と *bphA2A3A4* の一部および KF 715 株自身の *bph* 遺伝子の 3 つのソースからなるが, 繰り返し培養でも極めて安定で *todC1* の脱落は認められなかった.

(3) その他のピフェニル資化菌 研究室保存のピフェニル資化細菌の *bph* オペロンはサザン解析から KF 707 株のそれと同一か極めて類似したもの, 制限酵素パターンは異なるが強い交雑を示すもの, 弱く交雑するもの, 全く交雑しないものに分類される⁽⁹⁾. これらのピフェニル資化菌に対して pSUP-todC 1 を導入した. 結果, KF 707 株 *bph* オペロンと類似した *bph* オペロンをもつ 7 株からシングルクロスオーバー株が得られた. これらはいずれもベンゼン/トルエンに対する資化能を獲得し, いずれもトリクロロエチレンを効率良く分解した.

2. キメラピフェニルジオキシゲナーゼをもつポリ塩化ピフェニル (PCB) 分解菌

(1) KF 707 株と LB 400 株による PCB の分解 これまで多くの研究機関でピフェニル資化菌が分離され, PCB の分解能が調べられたが, PCB の生分解性はクロルの置換性 (数と位置) により大きく異なる⁽⁹⁾. また, ピフェニル資化菌の PCB 分解能も菌株により大きく異なる⁽¹⁰⁾. その典型的な例が *P. pseudoalcaligenes* KF

707 株と *Burholderia cepacia* LB 400 株である⁽¹¹⁾。KF 707 株は北九州のビフェニル製造工場から分離されたが、塩素数 1~3 の PCB を分解するのみで、PCB 分解スペクトルは狭い。すなわち本菌は PCB をクロルの置換していない、あるいは少ない（通常 1 個）リングの 2,3-位に O_2 を導入し、メタ環開裂を経て塩化安息香酸へと分解する。一方、PCB に汚染された米国ニューヨーク州ハドソン川から分離された LB 400 株は PCB のクロル置換に応じて 2,3-あるいは 3,4-位へ O_2 を導入し、広範な PCB 分解スペクトルを示す⁽¹²⁾。しかし、KF 707 株と LB 400 株の *bph* オペロンの構造と、これがコードする酵素類のアミノ酸配列はきわめて類似しており、最大の違いはビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニット (BphA 1) に認められ、459 アミノ酸中 20 残基が異なる⁽³⁾。他の酵素タンパク質のアミノ酸の違いは 0~1 である。すなわち、PCB 分解活性の違いは BphA 1 の違いに起因する。

KF 707 株と LB 400 株による PCB の分解の特徴的な違いは 4,4'-クロロビフェニル (CB), 2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB に認められた。すなわち、KF 707 株は 4,4'-CB と 2,5,4'-CB から著量の環開裂黄色化合物を蓄積した。さらに 4,4'-CB から 4-クロル安息香酸を、2,5,4'-CB から微量の 2,5-ジクロル安息香酸を蓄積した。しかし、2,5,2',5'-CB は分解できなかった。一方、LB 400 株は 4,4'-CB をほとんど分解せず、2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB を容易に分解した。そこで 2,5,4'-CB について両菌株による分解様式を注意深く検討し

た。結果、KF 707 株のビフェニルジオキシゲナーゼは 2,5,4'-CB の 4'-クロルリングを認識して結合、2',3'-位に O_2 を導入するのに対し、LB 400 株のそれは 2,5-クロルリングを認識して結合、3,4-位へ O_2 を導入することが明らかとなった (図 2)。従って、KF 707 株は 4,4'-CB を分解し、2,5,2',5'-CB を分解できないのに対して、LB 400 株は逆に 4,4'-CB を分解できず、2,5,2',5'-CB を容易に 3,4-ジヒドロジオールへと酸化することが説明できる。

(2) キメラビフェニルジオキシゲナーゼの構築 KF 707 *bphA1* と LB 400 *bphA1* との間に共通に存在する 3 つの制限酵素サイトを利用して、4 つの DNA 断片 (I, II, III, IV) を作り、これらを組み合わせて諸種のキメラ *bphA1* を構築した。これらのキメラ *bphA1* を *bphA2A3A4* (KF 707) の上流に連結して大腸菌で発現させ、4,4'-CB, 2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB の分解を検討した。その結果、KF 707 *bphA1* 中の断片 III (この断片中に 8 つのアミノ酸の違いが存在) あるいは断片 IV (この断片中に 2 つのアミノ酸の違いが存在) を LB 400 のそれと交換したキメラ酵素は両方とも 4,4'-CB, 2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB 全てに対して分解活性が認められた⁽¹³⁾。

(3) 広範な PCB 分解活性をもつハイブリッド株 次に KF 707 *bphA1* (I, II)-LB 400 *bphA1* (III, IV) をスーサイドベクター pSUPB 30 (Cm^r, Gm^r) に連結、更に *lacZ* 遺伝子を導入したプラスミッド pRK 101 を構築、KF 707 株へ導入した。プラスミッド上のゲンタマ

図 2 *P. pseudoalcaligenes* KF 707 株と *B. cepacia* LB 400 株による 2,5,4'-トリクロロビフェニルの分解様式

イシン耐性を選択マーカーにせず、シングルクロスオーバー株を取得した。ついで LacZ 活性を指標に再度内部で組換えの生起したダブルクロスオーバー株を選択した。その結果、LB 400 *bphA1* の III および IV が KF 707 株の *bph* オペロン上に挿入されたハイブリッド株が数株取得された。これらの株のうち KF 707-D 34 株は 4,4'-CB, 2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB に対し高い分解活性が認められた。KF 707-D 34 株の *bphA1* の塩基配列を調べたところ、LB 400 株 *bphA1* の断片 IV 由来の 4 つの塩基置換が認められた。この塩基置換によって BphA 1 の 376 位のスレオニン (Thr) のみがアスパラギン (Asn) へと置換されていた。従って、この結果はビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニットのわずか 1 つのアミノ酸の置換が PCB 分解能を大きく拡大したことを示す。環境中には広くビフェニル資化菌が分布しているが、細菌間の PCB 分解能には大きな違いが認められる。しかし、これらの *bph* 遺伝子がきわめて類似している事実と併せて考えると、PCB 分解能の違いは *bphA1* のわずかなアミノ酸の違いによるのであろう。このことは実験室で *bphA1* を改変することでより強力な PCB 分解菌の育種が可能であることを示唆する。

3. ポリクロロエタンを分解するハイブリッド株

Pseudomonas putida 株の CAM-OCT プラスミッドにコードされているカンファーマモノオキシゲナーゼ (*camCAB* によりコード) は好氣的条件下では酸素分子を活性化し、基質を酸化するが、嫌氣的条件下ではペンタクロロエタンやヘキサクロロエタンなどの高度に塩素化された化合物に直接電子を与え、脱クロル化する⁽¹⁴⁾。そこで *camCAB* を広宿主域ベクター pTS 1036 に連結したプラスミッド pTS 1036-CAM を構築、これを *P. putida* KF 715 誘導株 (KF 715-D 5) に導入した。KF 7139 株は上記のように、*todC1* 遺伝子が KF 715 株染色体 *bph* オペロンの *bphA1* と置換され、トリクロロエチレンを高度に酸化分解できる。この株の静止菌体を調製 (O. D. 660 nm 1.0)、これをブチルゴム栓を付した 125 ml ガラス瓶に 10 ml とり、ついで 50 μ M ペンタクロロエタンを加え、最初は N₂ ガス存在下で嫌氣的に反応させると 2 h で完全にトリクロロエチレンへと脱

クロル化した。次に酸素を導入し、好氣的条件にシフトして振とうすると、生じたトリクロロエチレンはハイブリッドジオキシゲナーゼにより 5 h で完全分解した。

おわりに

現在、わが国をはじめ、米国、欧州諸国で汚染された環境を修復するバイオレメディエーションが注目を集めている。本稿に記載した PCB, トリクロロエチレン、フロンガスの一部に使用されているクロロエタン類は土壌や地下水など環境を広く汚染し、バイオレメディエーションの大きなターゲット物質である。環境を広い範囲で汚染した物質の分解は最終的には微生物の力に頼らざるを得ない。パワーアップしたシュードモナス菌の登場が近い将来実現することを期待したい。

- (1) K. Furukawa & T. Miyazaki : *J. Bacteriol.*, **166**, 392-398 (1986).
- (2) G. J. Zylstra & D. T. Gibson : *J. Biol. Chem.*, **264**, 14940-14946 (1989).
- (3) K. Taira, J. Hirose, S. Hayashida & K. Furukawa : *J. Biol. Chem.*, **267**, 4844-4853 (1992).
- (4) K. Furukawa, J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki & S. Hayashida : *J. Bacteriol.*, **175**, 5224-5232 (1993).
- (5) J. Hirose, A. Suyama, S. Hayashida & K. Furukawa : *Gene* **138**, 27-33 (1994).
- (6) A. Suyama, R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura & K. Furukawa : *J. Bacteriol.*, **178**, 4039-4046 (1996).
- (7) N. Hayase, K. Taira & K. Furukawa : *J. Bacteriol.*, **172**, 1160-1164 (1990).
- (8) K. Furukawa, N. Hayase, K. Taira & N. Tomizuka : *J. Bacteriol.*, **171**, 5467-5472 (1989).
- (9) K. Furukawa, in "Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants", ed. by A. M. Chakrabarty, CRC Press, Boca Raton, Fla. 1982, pp. 33-57.
- (10) D. L. Bedard, R. Unterman, L. H. Bopp, M. J. Brennan, M. L. Haberl & C. Jhonson : *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 761-768 (1986).
- (11) D. T. Gibson, D. L. Cruden, J. D. Haddock, G. J. Zylstra & J. M. Brand : *J. Bacteriol.*, **175**, 4561-4564 (1993).
- (12) J. D. Haddock, J. R. Horton & D. T. Gibson : *J. Bacteriol.*, **177**, 20-26 (1995).
- (13) N. Kimura, A. Nishi, M. Goto & K. Furukawa : *J. Bacteriol.*, **179**, 3936-3943 (1997).
- (14) J. I. Manchester & R. L. Ornstein : *Protein Engineering* **8**, 801-807 (1995).