環境を汚染する有機塩素系農薬 γ -Hexachlorocyclohexane の微生物代謝系の解明*

(2000 年度農芸化学奨励賞受賞)

永 田 裕 二

(東北大学・遺伝生態研究センター)

Key words: *Sphingomonas*; biodegradation; environmental pollutant; hexachlorocyclohexane; dehalogenase

1. はじめに

人類は化学工業を発達させ、さまざまな化合物を生み出し利用してきたが、その多くはそれまで自然界に存在しなかった非天然化合物（ゼノバイオティクス）であり、環境中の物質循環に組み込まれにくいと考えられる。実際、いくつかの化合物は環境中に蓄積し、特に人類をはじめ生態系に有害な影響を与える場合には深刻な環境問題をひき起こしている。こうした物質の中でも特に有機塩素化合物の多くは、変異原性に加えて内分泌かく乱作用をもつことが明らかになっており、その環境汚染は早急な解決が要請されている現代社会の深刻な問題のひとつである。一方、細菌・カビなどの微生物の中にはこのような非天然物質に対しても分解活性を示すものも存在する。しかし、一般的にこのような微生物の分解活性は環境全体からみれば微弱であり、実際の環境浄化のためには、これらの分解活性の本質を明らかにし、強化してやる必要がある。同時に、微生物がいかにして新規化合物に対する分解能力を獲得したのかという点は基礎学問的にも興味深い。

以上のような背景を踏まえて、本研究では、環境を汚染する人為起源難分解性物質として γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, 別名 γ -BHC, lindane) に注目した。本研究は、あるひとつの環境汚染物質の分解代

謝系のほぼ全容を明らかにしたものであるが、他の類似の物質の分解代謝系を研究する際のモデルケースとして重要であると考えている。また、後述するように γ -HCH 分解に関与する酵素（遺伝子）群は、他のさまざまな有機塩素化合物の分解を考えるうえでも鍵となるものが多い。詳細については英文の総説⁽¹⁾も参照されたい。

2. γ -HCH および γ -HCH 分解菌

γ -HCH は、第二次世界大戦前にアメリカで開発された、1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDT) と並ぶ代表的な人工の有機塩素系殺虫剤である。その作用機構は昆虫などのほしご状神経を麻痺させることはわかっているが、詳細は不明である。 γ -HCH は、殺虫スペクトルの広さ、効力の高さに加え、安価であることから一般家庭から農業まで広い範囲で使用されてきた。その後、人体への蓄積性と有害性（強い変異原性とガン原性）⁽²⁾、環境中での残留性が指摘され、1971 年以降わが国では全面的に使用が禁止されている。他の先進諸国でも現在では使用が禁止されているが、イギリス・オランダなど過去に大量に使用した地域では、依然残留汚染に悩まされている。また、インド・中国・旧ソ連などの地域では主に経済的理由から現在でもその使用が続けられている。さらに、低緯度の熱帯地域で使用された HCH のほとんどは上昇気流に乗って大気中に拡散し、高緯度地域に降り注いでいることが明らかになった。すなわち、現在でも HCH による環境汚染は地球的規模で拡がっており、早急に解決しなければならない問題を提起している^(3,4)。

HCH には理論上 9 つの立体異性体（図 1）が存在するが、化学合成できるのは 8 つであり、工業原体に含まれる割合が多いのは α -, β -, γ -, δ -体である。このう

* Study on Microbial Degradation of Organochlorine Pesticide, γ -Hexachlorocyclohexane, Which Causes Environmental Pollution
Yuji NAGATA (Institute of Genetic Ecology, Tohoku University)

図1 Hexachlorocyclohexane の立体異性体

ち、実際に殺虫効果をもつのは γ -体だけで、 γ -体を99%以上の純度に精製した製品は特にリンデン(lindane)と呼ばれているが、経済的に苦しい発展途上地域では γ -体を精製して利用するケースはまれであり、化学合成した混合物をそのまま使用することが多い。そのため、環境中にも γ -体以外に α -, β -, δ -体が放出され、環境汚染をひき起こしている。特に β -体は塩素原子がすべてエクアトリアル位置に存在するために化学的に最も安定であり、環境中での残留性も高い。すなわち、実際の環境浄化を考える場合にはこれらの異性体についても考慮する必要がある。

γ -HCH は嫌気的条件下では、主に *Clostridium* 属細菌などの嫌気微生物の作用により比較的速やかに分解されることが知られているが、好気的な畑土壌では残留性が高い。好気的な γ -HCH 分解に関しては、本研究以外にもいくつか報告例があるが、いずれも断片的である。 γ -HCH の微生物分解に関する一般的な総説は他を参照されたい⁽⁵⁾。

旧東京大学農学部農芸化学科の土壌学研究室において、農学部構内の試験圃場を利用し、毎年1回 γ -HCH を散布して、土壌での変動を追跡する実験が1974年より開始された。3年目より急激な分解が観察され、Senoo らは12年目の土壌より集積培養、単コロニー分離によって γ -HCH を好気的条件下で唯一の炭素源として生育する *Sphingomonas paucimobilis* SS86 (以前は *Pseudomonas* と分類されていたが、Yabuuchi らによって新たに *Sphingomonas paucimobilis* という分類カテゴリーが提唱された⁽⁶⁾) を分離した⁽⁷⁾。本菌は比較的短期間で γ -HCH 分解能を獲得した可能

性が考えられ、その分解代謝経路および遺伝子構造に興味をもたれた。そこで、われわれのグループは本菌に遺伝子マーカーとしてナリジキシ酸耐性能を付与した変異株 UT26⁽⁸⁾ を材料として、この菌の好気的条件下における γ -HCH 分解代謝経路について、分子生物学的・生化学的手法で解析を行った。

3. γ -HCH 分解代謝経路

UT26 による γ -HCH の初期分解過程は電子捕獲型検出器 (ECD) を備えたガスクロで検出可能である⁽⁸⁾。すなわち、5~10 ppm の γ -HCH を UT26 の菌体と反応させ、反応液を酢酸エチルで抽出したものについて分析を行うと、 γ -HCH が分解されて生じたと考えられるいくつかのピークが観察される。最初の代謝産物は、 γ -HCH の好気的代謝産物として他のグループによる報告もある γ -pentachlorocyclohexene と同定された⁽⁸⁾。以降の代謝産物の同定は、UT26 自身を使っても行った⁽⁹⁾ が、反応を触媒する酵素遺伝子が獲得され、大量の代謝産物の調製が可能となったことによって進展した。すなわち、実際は、代謝経路の解明は後述する遺伝子の獲得と平行して行われた。これまでにわれわれが明らかにした UT26 の γ -HCH の分解代謝経路の全容を図2に示す。本経路は、3種類の脱塩素反応(脱塩化水素反応、加水分解的脱塩素反応、還元脱塩素反応)を伴ってシクロヘキサン環から芳香環を形成し、ハイドロキノン型の物質が直接の環開裂基質となって分解されていくという、ユニークなものであった。環開裂に伴って脱塩素が起こる酸素添加反応も、広義の脱塩素反応であると考えことができ、これを加えると実に4種類のタイプの異なる脱塩素反応が γ -HCH の分解代謝に関与していることになる。有機塩素化合物の微生物分解の鍵反応となるのが脱塩素反応であること^(10~12) を考えると、UT26 は、有機塩素化合物分解に関して多彩な能力を有しているといえよう。

一方、本分解過程において、UT26 中でそれ以上分解されない dead-end 産物(図1中4, 6の物質)が生じることから、本分解経路はある意味では不完全な代謝経路であることも示唆された。 γ -HCH を唯一の炭素源とした場合の UT26 の生育が悪いのは、このような「無駄」が一因であると考え、*Pseudomonas* sp. strain P51⁽¹³⁾ のような1,2,4-TCB(図1中4の物質)資化菌に *linA* 遺伝子(後述)を導入したり、UT26 中

図2 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 の γ -HCH 推定分解経路
カッコ内の物質は不安定であり、直接の検出はできていない。

表1 *S. paucimobilis* UT26 由来の γ -HCH 分解関与遺伝子群

	Nucleotide (bp)	Amino acid residue	Molecular mass (kD)	G+C content (%)	Function	Expression in UT26	Reference
<i>linA</i>	468	156	17.3	53.9	Dehydrochlorinase	Constitutive	14
<i>linB</i>	888	296	33.1	62.5	Halohydrolyase	Constitutive	15
<i>linC</i>	750	250	25.6	64.3	Dehydrogenase	Constitutive	16
<i>linD</i>	1038	346	38.4	61.0	Reductive dechlorinase	Inducible	20
<i>linE</i>	963	321	36.0	60.1	Ring-cleavage oxygenase	Inducible	21
<i>linR</i>	909	303	33.6	61.3	LysR-type transcriptional regulator for <i>linD</i> and <i>linE</i>	?	Unpublished data

の LinB 活性 (後述) を強化したりすることによって、人為的に高効率 γ -HCH 資化菌を育種することも可能であると考えられる。

4. γ -HCH 分解代謝関与遺伝子群

本研究では遺伝子の獲得に、当該活性を直接追跡する方法を用いた。すなわち、大腸菌中に作製した UT26 のコスミドライブラリーをプロモーター構造や基質の取り込みなどの関係から、より活性が発現する可能性が高いと考えられる *Pseudomonas putida* PpY101 に接合伝達で移し、目的の活性を示すクロー

ンをガスクロ (ECD) で選択した⁽¹⁴⁾。不安定な中間代謝産物 (図1中3, 5の物質) を基質とする LinB 活性を追跡する際には、*linA* 遺伝子を導入し LinA 活性を発現する *P. putida* PpY101LA を宿主として用い、 γ -HCH を出発基質としてスクリーニングを行った⁽¹⁵⁾。現在までに、分解代謝に直接関与する5つの酵素遺伝子 (*linA*, *linB*, *linC*, *linD*, *linE*) と、ひとつの制御遺伝子 (*linR*) を獲得した (表1)。分解代謝系の上流に位置する遺伝子群 (*linA*, *linB*, *linC*) は UT26 のゲノムにおいて、互いに離れた場所に存在し、オペロン構造を

図3 *linD*, *linE* 遺伝子を含むオペロンの遺伝子構成
orf6 は、塩基配列を決定した領域で終了していないため、決定した範囲での相同性を示した。

図4 *S. paucimobilis* UT26 の γ -HCH 分解能獲得機構の仮説

ならず、構成的に発現している^(14~16)。細菌の一連の代謝反応に関与する遺伝子群はオペロンを形成し、共通の発現制御を受けているケースが多いこと⁽¹⁷⁾を考えると、UT26 の γ -HCH 分解の上流代謝系遺伝子群は、比較的特殊性が高い遺伝子構成であるといえる。特

に、初発分解反応に関与する脱塩化水素酵素遺伝子 (*linA*) は既知の遺伝子と相同性がなく、起源が不明であることに加えて、G+C 含量も他の *lin* 遺伝子および *S. paucimobilis* のタイプストレイン (65%)⁽¹⁸⁾ と比べて顕著に低く、極めて特殊性の高いものであると考

えられる。これに対して、下流の遺伝子群 (*linD*, *linE*) は、共通の転写制御因子 (LinR) の支配下にあるオペロンの一部として存在し (図 3), 発現制御系が備わった比較的確立された遺伝子であることが示唆された^(19~21)。ちなみに, *linD*, *linE* とともにオペロンを構成する他の ORF の機能は不明である。

以上の代謝関与遺伝子群の情報から, UT26 の γ -HCH 分解能獲得機構として, 次の仮説を考えている (図 4)。まず, 最初の特殊性の高い物質に対しては外来の遺伝子を利用し, 変換を行う。次に, 最初の変換により比較的特殊性が低くなった物質に対してはこの菌が元々有していた遺伝子にある程度改変することによって対応する。最終的には, 上記の過程により, 自らが代謝能力を有する物質にまで変換し, 元々有している遺伝子群をそのまま利用して代謝を行う。以上のような代謝系は, いわば進化の途上であると考えられることもでき, γ -HCH の分解代謝という点において適応が進めば, より確立された遺伝子構成に変化していく可能性もある。

ただし, 最近, *Sphingomonas* 属細菌は, ある種の芳香族化合物を分解する際に, 他の芳香族化合物を分解するのに必要な複数のオペロンを構成する遺伝子産物を組み合わせて利用していることが明らかになった^(22~24)。すなわち, *Sphingomonas* 属細菌は, 元々, 遺伝子構成, 発現制御に関して, 確立の程度が低い代わりに柔軟性をもっており, そのことが *Pseudomonas* 属細菌などに比べても, より多様な化合物に対する代謝能を有している理由のひとつであると考えられることもできる。

5. γ -HCH 分解代謝関与酵素群

(1) γ -HCH dehydrochlorinase (LinA)

FAST や BLAST などの通常の一次配列情報をもとにしたデータベース検索では, LinA と有意な相同性を示すアミノ酸配列は検出されない⁽¹⁴⁾。塩基配列レベルでも同様であり, *linA* 遺伝子の起源には大変興味をもたれる。前述のように, *linA* の G+C 含量は *S. paucimobilis* の遺伝子としては低いが, その周辺領域は約 60% の G+C 含量を示す (図 5b)。 *linA* 遺伝子

図 5 *linA* 周辺領域の制限酵素地図 (a) および G+C 含量 (b)

(a) P_{ORFUP} : ORFUP の推定プロモーター領域, P_{linA} : *linA* の推定プロモーター領域, T: *linA* の推定ターミネーター。 (b) G+C 含量の分布図は, GENETYX-Mac version 8.0 を用いて, Average span 50 で描画した。 *linA* のコーディング領域のみが周辺領域に比べて G+C 含量が低いのがわかる。

コーディング領域の前後にプロモーター、ターミネーターと推定される配列が存在し、mRNA の解析からこれらが機能していることが示唆されていることと併せて考えると、*linA* は、プラスミドやトランスポゾンなどで周辺領域とともに導入された遺伝子ではなく、何らかの機構で単独で UT26 のゲノムに飛び込んだものであると推測され、興味深い。

E. coli 中で大量発現し、精製した LinA は、 γ -HCH およびその関連化合物に対してのみ活性を示し、LinA の基質特異性がかなり狭いことが示された⁽²⁵⁾。同時に、 β -体に対しては活性を示さず、基質とする物質がすべて塩素と水素の trans and diaxial (TD) pair を有することから、LinA がこの立体構造を認識していることが予想された⁽²⁶⁾。その後、われわれは代謝産物の詳細な解析により、確かに LinA は基質の TD pair に対して脱塩化水素反応を行っていることを確認した。

脱塩化水素酵素は、基質分子から HCl を取り除き、炭素二重結合を導入する反応を触媒する酵素である^(10, 11)が、報告例が LinA を含めて 3 例しかなく、極めて特殊性の高い酵素である。イエバエ (*Musca domestica*) 由来の DDT dehydrochlorinase^(27, 28) と、*P. putida* 由来の 3-chloro-D-alanine dehydrochlorinase⁽²⁹⁾ は、それぞれ、glutathione (GSH), pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を反応に必要とするが、LinA はこのような補因子を必要とせず、タイプの異なる酵素であると考えられる。

最近、イギリスのコンピューターモデリングの専門家より、LinA が、一次配列上は保存されていないが立体構造が類似しているファミリー⁽³⁰⁾の一員であることが指摘された。このファミリーにはすでに実験的に立体構造が解かれている scytalone dehydratase⁽³¹⁾, steroid Δ -isomerase⁽³²⁾, nuclear transport factor 2⁽³³⁾, naphthalene 1,2-dioxygenase の β -subunit⁽³⁴⁾ が含まれるが、これらは、それぞれ異なる機能をもつ。LinA は、なかでも scytalone dehydratase と高い類似性を示し、ホモロジーモデリングにより立体構造モデルが提出された。それに基づき部位指定変異導入実験を行ったところ、モデルの正当性が確認されるとともに、LinA の活性には Asp25 と His73 のペアによるプロトンの引き抜きが必須であることが明らかになった⁽³⁵⁾。この Asp-His のペアによるプロト

ンの引き抜きは scytalone dehydratase の活性にも必須であり⁽³¹⁾, LinA が脱水酵素 (H-OH を引き抜く) から脱塩化水素酵素 (H-Cl を引き抜く) に進化したものである可能性が強く示唆された。

一方、われわれが単離した *linA* の情報をもとに、*linA* のホモログがフランス⁽³⁶⁾とインド (R. Lal 私信) で単離されている。フランスで PCR により新規の γ -HCH 分解菌より単離された *linA* ホモログは *linA* と全く同一のものであった⁽³⁶⁾。他の難分解性物質分解遺伝子にも見られる現象であるが、こうした比較的特殊性が高いと思われる遺伝子が、かなりの地理的距離を隔てて全く同じ遺伝子として存在していることは、その起源を考えるうえでも興味深い。一方、インドで *linA* をプローブとして単離されたものは、全く同一ではなく、アミノ酸レベルで 90.4% の相同性を示した (R. Lal 私信)。この遺伝子は β -体をも分解できる菌株⁽³⁷⁾から単離されたものであり、そのタンパク質産物がわれわれの LinA と異なり β -体をも変換できる可能性が示唆されている。

(2) 1,4-TCDN halidohydrolase (LinB)

LinB は既知の α/β -hydrolase fold enzymes と呼ばれる一群の加水分解酵素⁽³⁸⁾と有意な相同性を示し、なかでも加水分解的ハロアルカン脱ハロゲン酵素と比較的高い相同性 (29.3%) を示す⁽¹⁵⁾。実際、精製した LinB はさまざまなハロアルカン類を基質とし、LinB が基質特異性の広いハロアルカン脱ハロゲン酵素の一員であることが明らかになった⁽³⁹⁾。現在、LinB を含めて基質特異性の異なる 3 種類のハロアルカン脱ハロゲン酵素の解析が進められている。LinB が比較的高い基質を好むのに対して、*Xanthobacter autotrophicus* GJ10 由来の Dh1A^(40, 41) は、短鎖の基質を好む。*Rhodococcus* 由来の DhaA⁽⁴²⁾ は、LinB 同様、長鎖の基質を好むが、特異性が微妙に異なる。これらのハロアルカン脱ハロゲン酵素は、酵素の構造・機能相関の研究に適した材料であると考えられ、われわれのグループは LinB についてのタンパク質工学的研究を行っている^(43-45, 83)。 α/β -hydrolase ファミリーに属する酵素は、nucleophile-histidine-acid からなる catalytic triad が活性に必要である。ホモロジーモデリングと部位指定変異導入実験により、D108, H272, E132 が LinB の catalytic triad であることが明らかになった⁽⁴³⁾。さらに、結晶化⁽⁴⁴⁾および立体構造の解明

に成功し⁽⁸³⁾, LinB が立体構造が決定している既知のハロアルカンデハロゲナーゼ, DhlA⁽⁴⁶⁾, DhaA⁽⁴⁷⁾ と比較して, 特徴的な活性中心ポケット, および酵素の表層からそこへ至る通路の構造をしていることが明らかになった. これら 3 種類のハロアルカン脱ハロゲン酵素 DhlA, DhaA, LinB の基質特異性の違いは, 立体構造からも説明が付き⁽⁴⁸⁾, 今後の理論に基づいた基質特異性の改変・新規能力の付与にも期待がもたれる.

(3) 2,5-DDOL dehydrogenase (LinC)

LinC は short-chain alcohol dehydrogenase と呼ばれる脱水素酵素⁽⁴⁹⁾ の一員である. 反応に重要なアミノ酸残基も保存されており, 他の構成員同様, LinC も NAD^+ 依存的な脱水反応を触媒すると考えられる⁽¹⁶⁾. このタイプの脱水酵素は互いに 30% 前後の相同性を示し, 細菌から高等真核生物まで広く生物間で保存されている. 本酵素活性は, 生物が元々ポテンシャルとして有しており, さまざまな代謝系において基質特異性を変えることによって, つなぎの役割を果たしているようである.

大腸菌中で発現させると LinC 活性を示す遺伝子 (*linX*) が, *linA* の上流に存在することが明らかになった (図 5)⁽¹⁶⁾. *linX* と *linA* の間に存在する領域も ORF としては不完全であるが, DNA レベルで *linX* と高い相同性 (69%) を示す. UT26 中では, γ -HCH の代謝の際に *linX* は発現していないが⁽¹⁶⁾, LinC 活性のポテンシャルをもつ遺伝子が, *linA* の近傍に存在することは興味深い. γ -HCH 代謝に関する適応が進め

ば, やがてこのような遺伝子が *linA* とともにオペロンとして共通の発現制御を受けて, γ -HCH 代謝に関与するようになる可能性もあるのではないかと考えている.

(4) 2,5-DCHQ reductive dechlorinase (LinD)

LinD は還元的脱塩素酵素であり, 細菌由来のクラス theta の glutathione S-transferase (GST) と低い相同性を示す⁽²⁰⁾. GST は 4 つのクラス (alpha, beta, pi, theta) に分類されており, 細菌由来の既知の GST はすべてクラス theta に分類される⁽⁵⁰⁾. 実際, LinD を高発現させた *E. coli* の粗酵素抽出液に glutathione を添加すると活性が上昇することから, LinD も GST の一員であると考えられる⁽²⁰⁾.

最近, LinD は, pentachlorophenol (PCP) 分解に関与する *S. chlorophenolica* 由来の PcpC⁽⁵¹⁾ などとともに, 生物界に広く存在するチロシンの分解系に関与する maleylacetoacetate isomerase から進化した酵素である可能性が指摘された⁽⁵²⁾.

(5) CHQ 1,2-dioxygenase (LinE)

LinE は, 既知のメタ開裂酵素群と極めて低いレベルの相同性を示す⁽²¹⁾. ただし, それらが芳香環のオルト位の水酸基を認識し, 反応を行うのに対して, LinE はパラ位の水酸基を認識し環開裂を行う. LinE を高発現させた大腸菌の粗酵素抽出液を用いて, LinE の基質特異性を検討した (表 2). 代表的なメタ開裂酵素である XylE⁽⁵³⁾ が, カテコール系の基質に対してのみ活性を示すのに対して, LinE はハイドロキノン系の基質に対してのみ活性を示した⁽²¹⁾. このことは, LinE

表 2 LinE および XylE の基質特異性

基 質
LinE activity (U/mg protein)	3.98	1.55	N.D.	0.19	0.78	0.29	N.D.	N.D.
XylE activity (U/mg protein)	N.D.	N.D.	58.6	N.D.	N.D.	7.64	N.D.	N.D.

LinE および XylE を発現する大腸菌の粗酵素抽出液に, それぞれの基質を加えた際の酸素の消費量を測定した 1 例を示す. 複数の実験を行うと酵素の発現量の違いなどにより, 個々の実験により絶対値にばらつきは見られるが, 基質間の相対活性は同じ傾向を示す. LinE と XylE の活性の絶対値が大きく異なるのは, 主に可溶性画分の酵素の発現量の違いに由来するものと思われる. 1 U は, 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の酸素を消費する活性と定義した. N.D.: 検出限界以下.

が新規の環開裂酵素であることを示している。

ハイドロキノン型の化合物を直接の基質とする環開裂酵素の遺伝子レベルでの報告例は LinE が最初であるが、LinE と相同性を示す *S. chlorophenolica* 由来の pentachlorophenol (PCP) 分解に関与する酵素 PcpA も LinE と同様の環開裂活性をもつことをわれわれと他のグループが明らかにしており^(54~56)、ハイドロキノン型物質を直接の環開裂基質とする微生物についての報告^(57, 58) と併せて、自然界ではハイドロキノン経路が、研究例の多いカテコール経路とともに芳香族化合物の主要代謝経路のひとつであると思われる。linE 遺伝子の発現制御機構が存在することも、この経路が自然界で主要経路であることを支持する証拠であると考えている。

また、LinE と PcpA は、*P. putida* GJ31 由来の CbzE⁽⁵⁹⁾ とともに、水酸基と塩素基の間での環開裂反応を効率よく行う報告例の少ない酵素でもある⁽⁶⁰⁾。3-クロロカテコールを catechol 2,3-dioxygenase と反応させた場合、通常の酵素では、反応性の高い反応産物の acylchloride (図 2 の物質 11) が酵素を不活化させてしまい、それ以上反応が進まないが、CbzE は、これに対する耐性能を有しており、反応を効率的に進めることができる⁽⁵⁹⁾。耐性機構の詳細は不明であるが、これらの酵素が他の酵素と異なり、acylchloride の加水分解を積極的に進行機構を活性中心に有している可能性も指摘されている⁽⁶⁰⁾。

(6) LinR

LinR は、LysR-type の転写活性化因子 (LTTR)⁽⁶¹⁾ と有意な相同性を示す。LTTR は、カテコール⁽⁶²⁾、ナフタレン⁽⁶³⁾、クロロカテコール^(64~66) などの芳香族化合物の代謝にも関与しており、細菌の主要制御因子ファミリーのひとつである。LTTR の認識配列のコンセンサスである TN₁₁A 回文配列は、linE 遺伝子上流にも存在する。レポーターに lacZ 遺伝子を用いた大腸菌の系の実験により、LinR は、2,5-DCHQ, CHQ を認識し、linE 遺伝子上流の TN₁₁A 回文配列を含む領域のプロモーター活性を上昇させることが明らかになった⁽⁶⁷⁾。

6. γ -HCH 分解代謝関与酵素群の細胞内局在性の解析

γ -HCH 分解が実際に起こる細胞内の場についても興味をもたれたため、分解代謝関与酵素群の細胞内局

在性についての検討を行った。浸透圧ショック法により細胞内成分の分画を行ったところ、LinA, LinB 活性のそれぞれ 73%, 83% がペリプラズム画分から検出された⁽⁶⁸⁾。さらに、ウェスタン解析・免疫電顕法により、LinA, LinB タンパク質自身のほとんどがペリプラズム画分に存在することを確認した⁽⁶⁸⁾。 γ -HCH のようないわゆるゼノバイオティクスを分解する酵素がペリプラズムに存在することは理にかなっており、ペリプラズムの機能・重要性に対して新たな知見が加わった。ペリプラズムには比較的複雑な物質の分解代謝の初期過程に関与する酵素群が蓄積されていると考えることができ^(69, 70)、多様な代謝系を有するグラム陰性細菌のペリプラズムタンパク質を分析すれば、応用的に有用な新規の酵素が同定できる可能性もあるだろう。

一方、LinA, LinB には、Sec 分泌装置⁽⁷¹⁾ による内膜の通過に必要ないわゆるシグナル配列は存在せず、SDS-PAGE で認識できるほどのペプチド鎖の切断も起こっていない⁽⁶⁸⁾。さらに、ペリプラズム画分のタンパク質のアミノ酸配列を解読したところ、少なくとも N 末配列の切断は起こっていないことを確認した⁽⁶⁸⁾。グラム陰性細菌において、Sec 分泌装置非依存的な分泌経路はいくつか知られている^(70, 72) が、LinA, LinB は、それらの特徴も有しておらず、新規の分泌機構でペリプラズムへ移行していることが予想されている。同様の例は、*Serratia marcescens* のキチナーゼなどでも報告されており⁽⁷³⁾、基礎学問的にも興味深い知見を得たと考えている。

7. その他の関連研究

(1) 環境浄化への植物の利用

実際の環境汚染物質の除去への応用を考えた場合、環境中への拡散がまだ起こっていないもの、例えば、倉庫で保管されているポリ塩化ビフェニル (PCB) のように、高濃度で局所的に存在しているものの処理には、高効率分解菌を育種し、反応槽などで分解させる方法も有効であると考えられる⁽⁷⁴⁾。しかし、 γ -HCH のように環境中に比較的低濃度で拡散してしまったものの除去には、分解菌をばらまく方法は有効とは考えにくい。このような場合には、細菌由来の分解遺伝子を独立栄養生物である植物に導入し、持続的な環境浄化に応用することが考えられる⁽⁷⁵⁾。われわれは、そのモデルケースとして linA 遺伝子のタバコ植物への導入

を試みた。その結果、形質転換植物の作製、およびタバコ植物体内での LinA 活性の発現には成功した⁽⁷⁶⁾が、植物体の成長に伴い活性が消失するという現象がみられ、活性の安定発現が今後の課題として残った。

(2) PCB 分解遺伝子群の解析

γ -HCH 同様の環境汚染物質であり強い毒性をもつ PCB の分解菌、*Pseudomonas* sp. KKS102 の分解遺伝子群についても解析を行った^(74, 77~79)。KKS102 のビフェニル/PCB 分解に関与する遺伝子群は、クラスターを形成し、他の芳香族化合物（トルエン、ベンゼン、ナフタレンなど）の代謝遺伝子群と個々の遺伝子は高い相同性を示した^(77~79)。しかし、同じビフェニル/PCB 分解菌の *P. pseudoalcaligenes* KF707 や *Burkholderia cepacia* LB400 由来の *bph* 遺伝子群と比べても、KKS102 の *bph* 遺伝子群はオペロン内の遺伝子の並びが異なっており、遺伝子の伝播の前後に遺伝子の並び換えを含めた変異の蓄積が起こり、それぞれがある程度独自の進化を遂げてきたと考えることができる⁽⁷⁴⁾。さらに、発現制御機構に関しては、芳香族化合物代謝系のそれぞれの遺伝子群によってかなりのバリエーションがあり、発現制御機構は構造遺伝子の進化とは独立のものである可能性が示唆されている。最近、KKS102 の *bph* オペロンの発現制御機構について以下の点が明らかになった。1) *bph* オペロンの直下流に存在する LysR タイプの制御因子をコードする遺伝子 *bphR* は、*bph* オペロンの発現制御には関与していない⁽⁸⁰⁾。2) biphenyl ではなく、代謝中間産物のメタ開裂物質が直接の誘導基質となる⁽⁸¹⁾。3) *bph* オペロンの上流部に存在する GntR タイプの制御因子⁽⁸²⁾をコードしている遺伝子産物が負の制御因子として *bph* オペロンの発現誘導に関与している。

このほか、制御系の改変による高効率分解菌の育種を目的として、KKS102 の *bph* オペロンのプロモーター配列を改変し、*bph* 遺伝子群を構成的に発現する組換え体の作製なども行った。

8. おわりに

γ -HCH を分解する細菌の分解代謝経路、およびそれに関与する遺伝子群を明らかにすることによって、比較的最近、自然界にもたらされた物質に対する細菌の分解能獲得機構に関する考察を行うことができた。また、得られた遺伝子群は、それ自体が応用の可能性を秘めた有用な素材であり、新規性の高い LinA、

LinB については、チェコの研究者らとの共同研究で、コンピューターモデリング・部位指定変異導入・立体構造の決定などタンパク質工学的手法を用いた基礎反応機構の解明の研究にも着手した。以上、 γ -HCH を中心とした人為起源有機塩素系化合物による環境汚染に対するバイオレメディエーションの基礎を確立することができたと考えている。今後は、タンパク質工学的研究を含めた実際の環境浄化への応用への展開を行うとともに、さまざまな条件での継代培養を繰り返すことにより、UT26 の γ -HCH 分解関与遺伝子群の構成がどのように変化していくかという遺伝子動態の研究や、実際の環境中で γ -HCH 分解遺伝子の伝播が起こりうるかという遺伝生態学的な展開も考えている。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻細胞遺伝学研究室で行ったものであり、元東京大学教授の高木正道先生には、永年にわたりご指導ご鞭撻いただき心から感謝申し上げます。また、終始、有益なご指導とご支援いただきました、東京大学大学院の太田明德教授、同、堀内裕之助教授、長岡技術科学大学の福田雅夫教授には、厚く御礼申し上げます。また共同研究者の、チェコ・マサリク大学の Jiri Damborsky 博士、東京大学卒業生の今井亮三博士、酒井 聰氏、菊池裕博士、安河内祐二博士、大友 量博士、成家知樹氏、宮内啓介博士、二村晶子氏、曹圭亨博士、大坪嘉行氏、足立雄悟氏、森 亮樹氏、そして細胞遺伝学（旧放射線微生物学）研究室の方々に心から感謝いたします。最後に、本研究の創始的存在である東京大学名誉教授の矢野圭司先生に謹んで謝意を表したいと思います。本研究の一部は、文部省科学研究費の助成により行われました。記して感謝します。

- (1) Y. Nagata, K. Miyauchi, and M. Takagi: *J. Industrial Microbiology & Biotechnology*, **23**, 380-390 (1999).
- (2) S. P. Bhunya and G. B. Jena: *Mutation Research*, **272**, 175-181 (1992).
- (3) J. M. Blais, D. W. Schindler, D. C. G. Muir, L. E. Kimpe, D. B. Donald, and B. Rosenberg: *Nature*, **395**, 585-588 (1998).
- (4) H. Iwata, S. Tanabe, N. Sakai, and R. Tatsukawa: *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 1080-1098 (1993).
- (5) A. K. Johri, M. Dua, D. Tuteja, R. Saxena, D. M. Saxena, and R. Lal: *FEMS Microbiol. Rev.*, **19**, 69-84 (1996).
- (6) E. Yabuuchi, I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T.

- Ezaki, and H. Yamamoto: *Microbiol. Immunol.*, **34**, 99–119 (1990).
- (7) K. Senoo and H. Wada: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **35**, 79–87 (1989).
- (8) R. Imai, Y. Nagata, K. Senoo, H. Wada, M. Fukuda, M. Takagi, and K. Yano: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2015–2017 (1989).
- (9) S. Nagasawa, R. Kikuchi, Y. Nagata, M. Takagi, and M. Matsuo: *Chemosphere*, **26**, 1719–1728 (1993).
- (10) S. Fetzner and F. Lingens: *Microbiol. Rev.*, **58**, 641–685 (1994).
- (11) D. B. Janssen, F. Pries, and J. R. v. d. Ploeg: *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 163–191 (1994).
- (12) S. Fetzner: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 633–657 (1998).
- (13) J. R. van der Meer, A. R. W. v. Neerven, E. J. d. Vries, W. M. d. Vos, and A. J. B. Zehnder: *J. Bacteriol.*, **73**, 6–15 (1991).
- (14) R. Imai, Y. Nagata, M. Fukuda, M. Takagi, and K. Yano: *J. Bacteriol.*, **173**, 6811–6819 (1991).
- (15) Y. Nagata, T. Nariya, R. Ohtomo, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **175**, 6403–6410 (1993).
- (16) Y. Nagata, R. Ohtomo, K. Miyauchi, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **176**, 3117–3125 (1994).
- (17) J. R. van der Meer, W. M. d. Vos, S. Harayama, and A. J. B. Zehnder: *Microbiol. Rev.*, **56**, 677–694 (1992).
- (18) N. J. Palleroni: in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 1, ed. by N. R. Kreig and J. G. Holt, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, p. 198.
- (19) Y. Nagata, K. Miyauchi, S.-K. Suh, A. Futamura, and M. Takagi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 689–691 (1996).
- (20) K. Miyauchi, S.-K. Suh, Y. Nagata, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **180**, 1354–1359 (1998).
- (21) K. Miyauchi, Y. Adachi, Y. Nagata, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **181**, 6712–6719 (1999).
- (22) G. J. Zylstra and E. Kim: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 408–414 (1997).
- (23) J. Armengaud, B. Happe, and K. N. Timmis: *J. Bacteriol.*, **180**, 3954–3966 (1998).
- (24) M. F. Romine, L. C. Stillwell, K.-K. Wong, S. J. Thurston, E. C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J. K. Fredrickson, and J. D. Saffer: *J. Bacteriol.*, **181**, 1585–1602 (1999).
- (25) Y. Nagata, T. Hatta, R. Imai, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1582–1583 (1993).
- (26) S. Nagasawa, R. Kikuchi, Y. Nagata, M. Takagi, and M. Matsuo: *Chemosphere*, **26**, 1187–1201 (1993).
- (27) A. G. Clark and N. A. Shanaan: *Pesticide Biochem. Physiol.*, **22**, 249–261 (1984).
- (28) H. Lipke and C. W. Kearns: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2123–2132 (1959).
- (29) T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawasaki, H. Yamano, H. Hosono, Y. Tani, and H. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **257**, 13749–13756 (1982).
- (30) A. G. Murzin: *Current Opinion in Structural Biology*, **8**, 380–387 (1998).
- (31) T. Lundqvist, J. Rice, C. N. Hodge, G. S. Basarab, J. Pierce, and Y. Lindqvist: *Structure*, **2**, 937–944 (1994).
- (32) Z. R. Wu, S. Ebrahimian, M. E. Zawrotny, L. D. Thornburg, G. C. Perez-Alvarado, P. Brothers, R. M. Pollack, and M. F. Summers: *Science*, **276**, 415–418 (1997).
- (33) T. L. Bullock, W. D. Clarkson, H. M. Kent, and M. Stewart: *J. Mol. Biol.*, **260**, 422–431 (1996).
- (34) B. Kauppi, K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy: *Structure*, **6**, 571–586 (1998).
- (35) 永田裕二, 森 亮樹, J. Damborsky, A. G. Murzin, 高木正道, 太田明德: 日本農芸化学会 2000 年度大会講演要旨集, p. 321 (2000).
- (36) J. C. Thomas, F. Berger, M. Jacquier, D. Bernillon, F. Baud-Grasset, N. Truffaut, P. Normand, T. M. Vogel, and P. Simonet: *J. Bacteriol.*, **178**, 6049–6055 (1996).
- (37) S. K. Sahu, K. K. Patnaik, M. Sharmila, and N. Sethunathan: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3620–3622 (1990).
- (38) D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. L. Sussman, K. H. G. Verschuere, and A. Goldman: *Protein Engineering*, **5**, 197–211 (1992).
- (39) Y. Nagata, K. Miyauchi, J. Damborsky, K. Manova, A. Ansorgova, and M. Takagi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3707–3710 (1997).
- (40) S. Keuning, D. B. Janssen, and B. Witholt: *J. Bacteriol.*, **163**, 635–639 (1985).
- (41) D. B. Janssen, F. Pries, J. v. d. Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra, and B. Witholt: *J. Bacteriol.*, **171**, 6791–6799 (1989).
- (42) A. N. Kulakova, M. J. Larkin, and L. A. Kulakov: *Microbiology*, **143**, 109–115 (1997).
- (43) K. Hynkova, Y. Nagata, M. Takagi, and J. Damborsky: *FEBS lett.*, **446**, 177–181 (1999).
- (44) I. Smatanov, Y. Nagata, L. A. Svensson, M. Takagi, and J. Marek: *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, **D55**, 1231–1233 (1999).
- (45) Y. Nagata, K. Hynkova, J. Damborsky, and M.

- Takagi: *Protein Expression and Purification*, **17**, 299-304 (1999).
- (46) K. H. G. Verschueren, F. Siljée, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, and B. W. Dijkstra: *Nature*, **363**, 693-698 (1993).
- (47) J. Newman, T. S. Peat, R. Richard, L. Kan, P. E. Swanson, J. A. Affholter, I. H. Holmes, J. F. Schindler, C. J. Unkefer, and T. C. Terwilliger: *Biochemistry*, **38**, 16105-16114 (1999).
- (48) J. Damborsky and J. Koca: *Protein Eng.*, **12**, 989-998 (1999).
- (49) E. Neidle, C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik, and S. Harayama: *Eur. J. Biochem.*, **204**, 113-120 (1992).
- (50) S. Vuilleumier: *J. Bacteriol.*, **179**, 1431-1441 (1997).
- (51) C. S. Orser, J. Dutton, C. Lange, P. Jablonski, L. Xun, and M. Hargis: *J. Bacteriol.*, **175**, 2640-2644 (1993).
- (52) S. D. Copley: *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 261-265 (2000).
- (53) A. Kitayama, T. Achioku, T. Yanagawa, K. Kanou, M. Kikuchi, H. Ueda, E. Suzuki, H. Nishimura, T. Nagamune, and Y. Kawakami: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 217-223 (1996).
- (54) Y. Ohtsubo, K. Miyauchi, K. Kanda, T. Hatta, H. Kiyohara, T. Senda, Y. Nagata, Y. Mitsui, and M. Takagi: *FEBS Lett.*, **459**, 395-398 (1999).
- (55) L. Xu, K. Resing, S. L. Lawson, P. C. Babbitt, and S. D. Copley: *Biochemistry*, **38**, 7659-7669 (1999).
- (56) L. Xun, J. Bohuslavsek, and M. Cai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 322-325 (1999).
- (57) J. M. Darby, D. G. Taylor, and D. J. Hopper: *J. General Microbiol.*, **133**, 2137-2146 (1987).
- (58) J. C. Spain and D. T. Gibson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 812-819 (1991).
- (59) A. E. Mars, J. Kingma, S. R. Kaschabek, W. Reineke, and D. B. Janssen: *J. Bacteriol.*, **181**, 1309-318 (1999).
- (60) J. E. van Hylckama Vlieg, G. J. Poelarends, A. E. Mars, and D. Janssen: *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 257-262 (2000).
- (61) M. A. Schell: *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 597-626 (1993).
- (62) R. K. Rothmel, T. L. Aldrich, J. E. Houghton, W. M. Coco, L. N. Ornston, and A. M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.*, **172**, 922-931 (1990).
- (63) I. S. You, D. Ghosal, and I. C. Gunsalus: *J. Bacteriol.*, **170**, 5409-5415 (1988).
- (64) J. H. J. Leveau and J. R. v. d. Meer: *J. Bacteriol.*, **178**, 6824-6832 (1996).
- (65) S. M. McFall, S. A. Chugani, and A. M. Chakrabarty: *Gene*, **223**, 257-267 (1998).
- (66) N. Ogawa, S. M. McFall, T. J. Klem, K. Miyashita, and A. M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.*, **181**, 6697-6705 (1999).
- (67) 宮内啓介, 永田裕二, 高木正道: 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p. 222 (1998).
- (68) Y. Nagata, A. Futamura, K. Miyauchi, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **181**, 5409-5413 (1999).
- (69) T. J. Beveridge: *ASM News*, **61**, 125-130 (1995).
- (70) 永田裕二: 化学と生物, **38**, 214-216 (2000).
- (71) P. N. Danese and T. J. Silhavy: *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 59-94 (1998).
- (72) G. P. C. Salmond and P. J. Reeves: *TIBS*, **18**, 7-12 (1993).
- (73) M. B. Brurberg, V. G. H. Eijsink, A. J. Haandrikman, G. Venema, and I. F. Nes: *Microbiology*, **141**, 123-131 (1995).
- (74) 永田裕二, 金原和秀, 高木正道: 現代化学, No. 323, 2月号, 46-52 (1998).
- (75) 片山義博: 化学と生物, **37**, 224-226 (1999).
- (76) 永田裕二, J. S. Lee, I. K. Chung, K. H. Cho, 高木正道: 日本農芸化学会 1997 年度大会講演要旨集, p. 89 (1997).
- (77) Y. Kikuchi, Y. Nagata, M. Hinata, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **176**, 1689-1694 (1994).
- (78) Y. Kikuchi, Y. Yasukochi, Y. Nagata, M. Fukuda, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **176**, 4269-4276 (1994).
- (79) M. Fukuda, Y. Yasukochi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi, and K. Yano: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 850-856 (1994).
- (80) 大坪嘉行, 永田裕二, 志村 稔, 金原和秀, 高木正道: 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p. 222 (1998).
- (81) Y. Ohtsubo, Y. Nagata, K. Kimbara, M. Takagi, and A. Ohta: *Gene*, in press (2000).
- (82) K. Yoshida, Y. Fujita, and A. Sarai: *J. Mol. Biol.*, **231**, 167-174 (1993).
- (83) J. Marek, J. Vevodova, I. K. Smatanova, Y. Nagata, L. A. Svensson, J. Newman, M. Takagi, and J. Damborsky: *Biochemistry*, in press (2000).