

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00590

研究課題名(和文) 実用的なポリ塩化ビフェニルを分解する芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの創製

研究課題名(英文) Creation of novel aromatic-ring hydroxylating dioxygenase with extended substrate specificity toward polychlorinated biphenyls

研究代表者

櫻間 晴子 (Sakurama, Haruko)

京都学園大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号：90456426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)は、世界的にも認識されている環境汚染物質である。難分解性のPCBsに対して高分解性を示す芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの変異体酵素を得るために、Comamonas属由来の芳香環水酸化酵素を改変した。結果、基質特異性を改変した変異体酵素を数種類取得することに成功した。さらに、基質特異性が異なる2種類の芳香環水酸化酵素の発現系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Polychlorinated biphenyls (PCBs) have been recognized as serious environmental pollutants on a global scale. In order to obtain novel aromatic-ring hydroxylating dioxygenases that can degrade on more highly chlorinated PCBs congeners, we engineered the aromatic-ring hydroxylating dioxygenase from Comamonas by a site-directed mutagenesis, and have successfully obtained a few mutants with extended substrate specificity. In addition, we have established the expression system of the two genes of the aromatic-ring hydroxylating dioxygenase with distinct substrate specificities.

研究分野：環境学

キーワード：ポリ塩化ビフェニル 芳香環水酸化ジオキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) は極めて難分解性であり、多様な塩素置換体からなる同族体で構成されることが特徴的な物理化学的特性を有する環境汚染物質である。生体への影響もあることから、その廃絶が求められている。

申請者らが単離した好気性細菌である *Comomonas testosteroni* YAZ2 株は、PCBs 同族体に対する基質特異性が広く強力に分解する。当初、申請者らは、本菌を利用した微量 PCBs 無害化処理システムの開発に取り組んでおり、さらなる本システムの向上には、「5 塩素以上の高塩素化された PCBs を幅広く分解すること」が必要だと考えた。

本菌を含めた好気性細菌による PCBs 分解において、反応の鍵となるのは芳香環水酸化酵素の一種であるビフェニルジオキシゲナーゼ (BDO) である。BDO は、本分解反応の初発に働き、分子状酸素の 2 つの酸素原子を水酸基の形で cis 型に芳香環へ導入する反応を触媒する。BDO は多成分酵素であり、大サブユニット (BphA1) と小サブユニット (BphA2) の 2 種類で構成される末端ジオキシゲナーゼに加えて、フェレドキシン (BphA3) とフェレドキシン還元酵素 (BphA4) を含む電子伝達系から成る。活性部位に関しては、酸素添加反応に必要な非ヘム鉄 (Fe^{2+}) と電子伝達系から電子を受け取るための Rieske 型 $[2Fe-2S]$ クラスタを BphA1 に含む (Furukawa et al., J Bacteriol, 2004)。

これまでの BDO の基質特異性に関する研究は、PCBs 分解特性の異なる 2 つの細菌株、*Burkholderia xenovorans* LB400 株 (LB400 BDO) と *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株 (KF707 BDO) を取り上げ精力的な解析が行われている (Suenaga et al., JEM, 2002)。この結果からは、「菌株それぞれの基質特異性が BphA1 の僅かなアミノ酸残基の

違いに依存し制御される」ことが示唆された。他方、BphA1 と BphA2 のハイブリッド酵素を用いた検討では、「BphA2 も基質認識に関与している」ことが見出された (Hurtubise et al., J Bacteriol, 1998)。

2. 研究の目的

微量 PCBs 無害化処理システムの性能向上を目的として、幅広い高塩素化 PCB 異性体を高効率に分解できる BDO 変異体酵素を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *C. testosteroni* YAZ2 株由来 BDO (YAZ2 BDO) の基質特異性に関するアミノ酸残基の同定

YAZ2 BDO-高塩素化 PCB 複合体の推定構造を基に、基質特異性に関与するアミノ酸残基を推定した。基質特異性に関与するアミノ酸残基として、基質結合部位や他の BDO の変異体解析に関する論文で報告のあった部位を参考に考え、31 種類の変異体酵素を設計した。これらの発現プラスミドは、野生型酵素の遺伝子を挿入した発現プラスミドを鋳型に、QuickChange 法による部位特異的変異導入で作製した。これらのプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換し、変異体酵素を発現させた。各変異体酵素の基質特異性の変化の解析は、発現大腸菌の静止菌体を PCB 標品 (カネクロールシリーズ; KC-300 (3 塩素化 PCBs を主に含む) KC-500 (5 塩素化 PCBs を主に含む)) と反応させた後の残存 PCBs 量をガスクロマトグラフィー質量分析計により分析することで、複数の同族体の分解を一度に評価して行った。

(2) BDO の末端ジオキシゲナーゼを構成する小サブユニット (BphA2) の基質特異性への効果の検討

基質特異性が明らかに異なっている 2 種類の BDO (A と B と呼ぶ) の BphA1 と BphA2

を相互に交換したハイブリット酵素を考案した(A/B、B/Aと呼ぶ)。A/BはAのBphA1とBのBphA2を、B/AはBのBphA1とAのBphA2をもつ(表1参照)。これらのハイブリット酵素をコードした発現プラスミドを、制限酵素部位を利用して作製し、(1)と同様の方法で解析した。

(3) 3種類の芳香環水酸化酵素の検討

3種類の芳香環水酸化酵素(C、D、Eと呼ぶ)を検討することにした。これらの遺伝子のうち、1種類の酵素については単離し、その発現条件を検討した。また、残り2種類の酵素については人工的に合成した遺伝子を発現ベクターに組み込み、その発現条件を検討した。宿主の大腸菌として、BL21(DE3)株、BL21(DE3) pLysS株、Rosetta2(DE3)株を検討した。

(4) PCB分解活性の評価系の改良

水酸化PCBs標品に硫酸ジメチルと3N水酸化カリウム/エタノール(10%含水)を用いてメチル誘導体化とアルカリ分解を行い、ヘキサンに溶解させた。その溶出液をガスクロマトグラフィー質量分析計により分析した。

4. 研究成果

(1) YAZ2 BDOの基質特異性に関するアミノ酸残基の同定

37種類の1重変異体酵素を作製し、これらのPCBs分解特性を解析した。その結果、37種類の変異体酵素のうち、6種類の変異体酵素(F~Kと呼ぶ)のPCBs分解特性が変化した(図1)。どの変異体酵素もオルト位の4塩素化PCBsの分解率が向上した。さらに、変異体酵素FとHはパラ位の4と5塩素化PCBsの分解率が向上した。

興味深いことに、PCBs分解活性が一番高い変異体酵素Kは、他の変異体酵素と異なり、22'55'-PCBsの分解率が高くなり3,4ジオキシゲナーゼ活性獲得したことを示した。さら

に、変異体酵素Kは、5塩素以上の高塩素化されたPCBs異性体を多種類含むPCB標品であるKC-500に対して高い分解効率を示し、野生型(WT)より約4倍向上した(43.8%)。しかし、6塩素以上の高塩素化PCBsに作用せず、50%以上の高分解活性には至らなかった。

このように、元の酵素では分解できない、もしくは分解効率が低い4または5塩素化PCB異性体の一部を分解できる変異体酵素を取得することに成功した。しかし、どの変異体酵素も、6塩素以上の高塩素化PCBsには作用せず高い分解効率を獲得するには至らなかった。

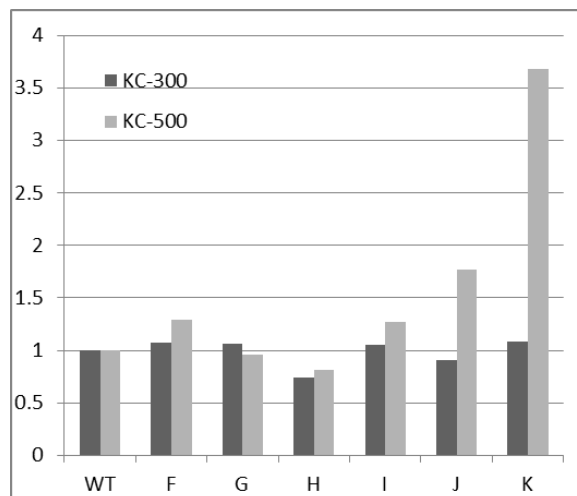


図1 PCBs分解特性が変化した変異体酵素
*野生型(WT)の分解率を1としたときの活性を示す。

(2) BDOの末端ジオキシゲナーゼを構成する小サブユニット(BphA2)の基質特異性への効果の検討

ハイブリット酵素A/Bは酵素Aと、ハイブリット酵素B/Aは酵素BとPCBs分解特性が似ていた(表1)。ハイブリット酵素A/Bは酵素Aと比べて、活性が低下し、特にKC-500において顕著であった。一方で、ハイブリット酵素B/Aは酵素Bと比べてほとんど変わらなかった。

これらのことから、酵素 A と B では、BphA2 による基質特異性の影響はほとんど受けず、活性部位を有する BphA1 の性質を反映していることが示唆された。よって、他の酵素のように、基質特異性が変化した興味深い酵素は得られなかった。BphA2 が基質特異性に影響を与えるのは他の要因も重要であるのかも知れない。

表 1 ハイブリット酵素の PCBs 分解活性

酵素名	サブユニット構成		PCBs 分解率(%)	
	bphA1	bphA2	KC-300	KC-500
A	A	A	79.1	12.7
B	B	B	92.1	76.6
A/B	A	B	69.8	3.4
B/A	B	A	90.6	72.9

(3) 3種類の芳香環水酸化酵素の検討

(1) で示したように、YAZ2 BDO の改変により基質特異性の拡大に成功したものの、6塩素以上の高塩素化 PCB に作用する変異体酵素は得られなかった。高塩素化 PCB を分解する酵素を得るためには、当初計画していた本酵素の解析を行うより他の酵素の変異体解析を試すことが有効であると考えた。

そこで、YAZ2 BDO とは基質特異性が異なる 3種類の芳香環水酸化酵素 (C、D、E) を検討することにした。3種類の候補遺伝子のうち、酵素 C と D については、BL21(DE3) 株を宿主としてピフェニル代謝活性を検出することができた。一方で、酵素 E についてはどの宿主においてもほとんど活性が検出できず、発現も確認できなかった。

そこで、活性が検出できた酵素 D において、変異体酵素 7種類作成した結果、5種類で活性が検出された。今後、PCBs 分解活性を測定する必要がある。

(4) PCB 分解活性の評価系の改良

これまでは、PCBs 分解活性は、親化合物

である残存 PCB 量を検出することにより行っていた。この場合、分解活性が弱いと、親化合物の減少はわずかであるために検出できない可能性が考えられる。そこで、活性が弱くても検出できるように、代謝産物を検出する系を検討しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

櫻間 晴子、遺伝子組換え微生物によるポリ塩化ビフェニル無害化に向けて、生物工学会誌 Vol. 93: 217 (2015)

https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9304/9304_biomedica_2.pdf

Mise, S., Haga, Y., Itoh, T., Kato, A., Fukuda, I., Goto, E., Yamamoto, K., Yabu, M., Matsumura, C., Nakano, T., Sakaki, T., and Inui, H. Structural determinants for the position of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) hydroxylation by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, Toxicological Sciences, 152(2), 340-348, 2016, Selected for the cover page
DOI: 10.1093/toxsci/kfw086

Navrátilová, V., Paloncýová, M., Berka, K., Mise, S., Haga, Y., Matsumura, C., Sakaki, T., Inui, H., and Otyepka, M. Molecular insights into the role of a distal F240A mutation that alters CYP1A1 activity towards persistent organic pollutants, Biochimica et Biophysica Acta General Subjects, 1861, 2852-2860, 2017
DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.08.002

乾秀之、高木陽子、中野武、第9回国際PCBワークショップの概要とPCBイムノセンサの発表、生物化学的測定研究会年報、21、pp.209-214、2017

〔学会発表〕(計 11 件)

Kawaguchi, K., Sakurama, H., Katayama, M. Akagi, J., Shinoda, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N. Aerobic toluene / biphenyl degradation genes in the denitrifying bacterium *Thauera* sp. strain DNT-1. The 9th International PCB Workshop; 2016 Oct9-13; Kobe.

後藤絵里香、羽賀雄紀、久保惇、伊藤俊将、笠井千枝、荘司長三、山本恵子、松村千里、中野武、乾秀之、デコイ分子を用いた *Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる CB118 の代謝とその構造基盤、第 25 回環境化学討論会、新潟、2016

Inui, H., Miwa C., Mise, S., Goto, E., Haga, Y., Matsumura, C., Nakano, T., and Sakaki, T. Enantioselective metabolism of chiral polychlorinated biphenyls by rat and human cytochrome P450 monooxygenases, The 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Vancouver, Canada, 2016

Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., and Inui, H. Structural basis of CB118 metabolism by cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium* with decoy molecules, The 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Vancouver, Canada, 2016

Inui, H., Haga, Y., Itoh, T., Goto, E., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., and Sakaki, T. Structural determinants of species differences on metabolism of dioxin-like polychlorinated biphenyls by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, The 9th International

PCB Workshop, Kobe, 2016

Goto E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., and Inui, H. Metabolic fates of CB118 by cytochrome P450 monooxygenase from soil bacterium under complex pollution and its structural basis, The 9th International PCB Workshop, Kobe, 2016

後藤絵里香、乾秀之、デコイ分子を用いた *Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる CB118 の代謝とその構造基盤、若手フロンティア研究会 2016、神戸、2016

乾秀之、微生物由来 P450 モノオキシゲナーゼによる PCB の代謝に影響を及ぼす有機フッ素化合物、第 13 回 PCB 講演会、大阪、2017

Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., and Inui, H. Structural basis of CB118 metabolism by bacterial cytochrome P450 monooxygenase and its mutants with perfluorocarboxylic acids, 37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Vancouver, Canada, 2017

Ito, T., Miwa, C., Haga, Y., Goto, E., Itoh, T., Yamamoto, K., Mise, S., Matsumura, C., Nakano, T., and Inui, H. Metabolism of chiral polychlorinated biphenyls by mammalian cytochrome P450 monooxygenases, 37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Vancouver, Canada, 2017

Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., and Inui, H. Possible metabolic fates of polychlorinated

biphenyls by soil bacterium under complex pollution and its structural basis, The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances, Nagoya, 2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

櫻間 晴子 (SAKURAMA HARUKO)
京都学園大学・バイオ環境学部・講師
研究者番号：90456426

(2)研究分担者

乾 秀之 (INUI HIDEYUKI)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授
研究者番号：90314509
(平成28年度より研究分担者)

原 富次郎 (HARA TOMIJIRO)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：70616193
(平成27年度のみ研究分担者)

高塚 由美子 (TAKATSUKA YUMIKO)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：70570810
(平成27年度のみ研究分担者)