

平成21年 4月17日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380054
 研究課題名（和文）未開拓遺伝子資源を利用した細菌の有機塩素系環境汚染物質浄化能力の総合的開発
 研究課題名（英文）Comprehensive development of bacterial ability for the degradation of chlorinated environmental pollutants using unexplored genetic sources
 研究代表者
 永田 裕二（NAGATA YUJI）
 東北大学・大学院生命科学研究所・准教授
 研究者番号：30237531

研究成果の概要：環境汚染が深刻な代表的な有機塩素系殺虫剤に焦点をあて、(i) 難培養性微生物の遺伝情報も含む未開拓な遺伝子資源から新規の分解酵素遺伝子の取得、(ii) 有機塩素系環境汚染物質分解の鍵酵素である脱ハロゲン酵素の機能改良、(iii) 直接の分解酵素以外で分解活性の発現に必須な細胞因子の同定、(iv) 有効な有機塩素系化合物の生分解システムの構築、を実施し、環境細菌が有する高度難分解性有機塩素系化合物の分解能力に関する重要な基礎的知見を得ると共に、実際の環境浄化へ結びつけるための基盤を整備した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物学

1. 研究開始当初の背景

Hexachlorocyclohexane (HCH) 各種異性体、DDT、ドリン剤などの有機塩素系殺虫剤による環境汚染は、先進諸国が使用を禁止している現在においても、残留汚染や一部地域で使用したものが地球レベルで拡散することにより、世界的に深刻な問題となっている。社会的な動きとしても「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)により、緊急に環境中における有害化学物質の動態を把握し、リスクを低減化することが求められている。しかし、こうした高度に難分解性の環境汚染物質の環境中での微生物に

よる分解過程に関する基礎情報は極めて限られており、未だ有効な解決策も見出されていない。

2. 研究の目的

本研究では、環境汚染が深刻な代表的な有機塩素系殺虫剤に焦点をあて、以下の項目を実施し、これらの研究を通じて、環境細菌が有する高度難分解性有機塩素系化合物の分解能力を正確に把握し、これを総合的に開発することで環境浄化へ結びつけることを目的とした。

(1) 難培養性微生物の遺伝情報も含む未開拓な遺伝子資源から新規の分解酵素遺伝子の取得

(2) 有機塩素系環境汚染物質分解の鍵酵素である脱ハロゲン酵素の機能改良

(3) 直接の分解酵素以外で分解活性の発現に必須な細胞因子の同定

(4) 有効な有機塩素系化合物の生分解システムの構築

3. 研究の方法

具体的には、申請者が研究を進めている有機塩素系農薬 HCH 分解菌 UT26 株と HCH 分解に関与する UT26 株由来の 2 種の脱ハロゲン酵素、脱塩化水素酵素 LinA とハロアルカン脱ハロゲン酵素 LinB を研究の軸として研究を展開した。LinA と LinB は、 γ -HCH 代謝に関与する脱ハロゲン酵素であるが、それぞれ DDT と β -HCH を変換できるなど、広範な有機塩素系化合物種を分解基質とする潜在能力を持つ酵素である。

(1) 難培養性微生物の遺伝情報も含む未開拓な遺伝子資源から新規の分解酵素遺伝子の取得：以下の方法を用いて LinA と LinB の構造的ならびに機能的ホモログを広く未開拓遺伝子資源から取得し、解析した。また、項目②と関連して、分解酵素遺伝子を担う可動性遺伝因子自体についても解析を行った。

- ① 環境遺伝子資源 (メタゲノム) の利用
- ② 可動性遺伝因子が担う遺伝情報の利用
- ③ 細菌ゲノム情報の利用

(2) 有機塩素系環境汚染物質分解の鍵酵素である脱ハロゲン酵素の機能改良：以下に挙げるタンパク質工学的手法を駆使して、LinA と LinB およびそのホモログの機能改良の基盤となる知見を得るための研究を実施した。

- ① 立体構造情報等を利用した理論的アプローチ
- ② ランダム変異導入による実験室内進化

(3) 直接の分解酵素以外で分解活性の発現に必須な細胞因子の同定：直接分解に関与する酵素だけでなく、発現制御・代謝バランス・基質の取り込み・有害な中間代謝産物の排出・酵素の局在化など、細菌細胞の分解代謝能力の発現に必要な様々な要因について検討を行った。

(4) 有効な有機塩素系化合物の生分解シス

テムの構築：上記研究の結果を総合し、実際に γ -HCH, DDT, β -HCH などの有機塩素系化合物の有効な生分解系を構築することを最終目標として、細菌細胞内に新規代謝経路を確立するための基盤となる研究を実施した。

4. 研究成果

各項目における主な研究成果は以下の通りである。

(1) 難培養性微生物の遺伝情報も含む未開拓な遺伝子資源から新規の分解酵素遺伝子の取得

① HCH 汚染土壌より、培養非依存的に *linB* 遺伝子を担うプラスミド pLB1 を取得し、その全塩基配列を決定したところ、pLB1 は新規性の高いプラスミドであることが明らかになった (図 1)。

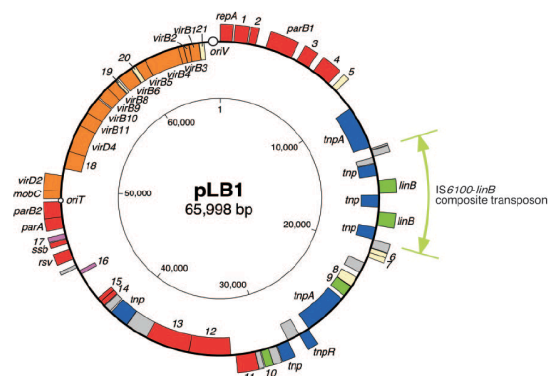


図 1. pLB1 の構造

② 有機塩素系殺虫剤 HCH 汚染土壌より単離した細菌 MI1205 株が保持する LinB-MI は、UT26 株由来の LinB-UT と 7 アミノ酸残基のみの違いにも関わらず、(i) β -HCH に対する顕著に強い分解活性、(ii) PCHL をさらに TCDDL にまで変換する活性、という LinB-UT にはない特性を有することが明らかになった (図 2)。

③ 環境汚染物質分解に関わるプラスミド pWW53 の全塩基配列を解読すると共に、可動性遺伝因子を介したプラスミドゲノムの構成原理を解明した。

④ 環境汚染物質分解に関わるプラスミド NAH7 上の *traD* オペロンが接合伝達の宿主特異性の決定に関与する因子であることを明らかにした。

⑤ カイメン共在細菌メタゲノムより新規ハロアルカンデハロゲナーゼ遺伝子を取得

した (図 3)。

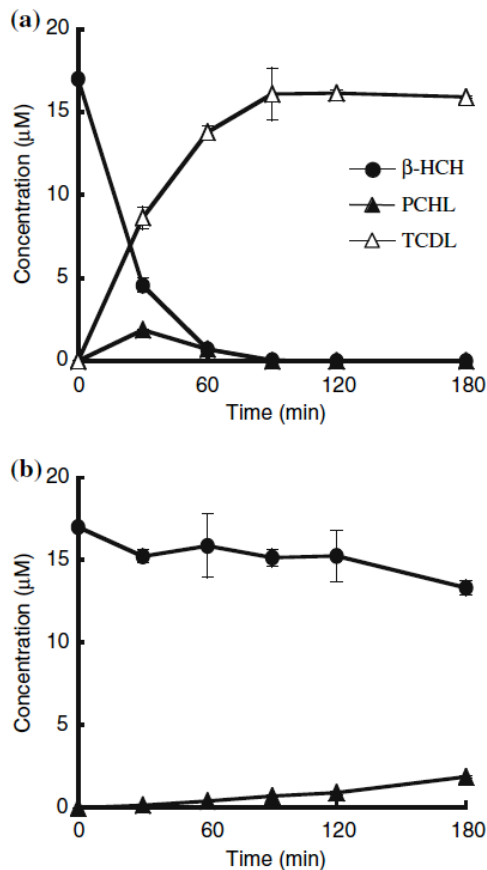


図 2. LinB-MI (a) と LinB-UT (b) の β -HCH 分解活性の違い

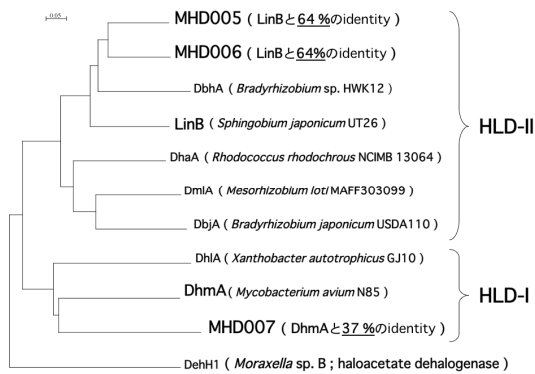


図 3. マリンメタゲノムから見出された新規のもの(MHD005-007)を含むハロアルカンデハロゲナーゼの系統樹

⑥ データベースの情報から LinB ホモログを複数取得した。

(2) 有機塩素系環境汚染物質分解の鍵酵素である脱ハロゲン酵素の機能改良

① 結核菌類縁菌由来の LinB ホモログ DhmA は、大腸菌中では良好に発現せず、解析が困難であったが、グラム陽性菌で DhmA を高発現させる系を構築し、反応に必須なアミノ酸残基の同定に成功した。

② LinB ホモログの DhaA のスロット部位の改変により、難分解性有機塩素化合物 1,2,3-trichloropropane (TCP) の分解活性が向上した変異酵素の取得に成功した (表 1)。

表 1. 1,2,3-TCP に対する活性が上昇した DhaA 変異体

Protein	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat} / K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]	rel. k_{cat} [mut/wt]	rel. K_M [mut/wt]	rel. k_{cat} / K_M [mut/wt]
WT	0.035 ± 0.002	0.98 ± 0.17	0.04	1.0	1.0	1.0
M2	0.141 ± 0.007	0.91 ± 0.13	0.15	4.0	0.9	3.8
M3	0.074 ± 0.003	0.98 ± 0.13	0.08	2.1	1.0	2.0
21	0.554 ± 0.028	1.24 ± 0.19	0.45	15.8	1.3	11.3
27	1.019 ± 0.031	1.09 ± 0.10	0.93	29.1	1.1	23.3
31	1.258 ± 0.050	1.19 ± 0.15	1.06	35.9	1.2	26.5

③ 理論的アプローチと進化工学的手法をうまく組み合わせることにより、DhaA の 1,2,3-TCP 分解活性を向上させることが可能であることを示した。

④ LinB が重要な環境汚染物質である 1,2,3-TCP に対して微弱な分解活性を有することを見出した。

⑤ LinB-MI の LinB-UT にはない特性を精製酵素を用いて確認し、さらに、活性の違いに重要なアミノ酸残基を同定した。

⑥ LinB-MI の立体構造を解明し、LinB-MI の LinB-UT の活性特性の違いについて、立体構造の観点から解析を行った。

⑦ 根粒菌由来の LinB ホモログである DbjA の結晶化、および立体構造解析に成功した (図 3)。

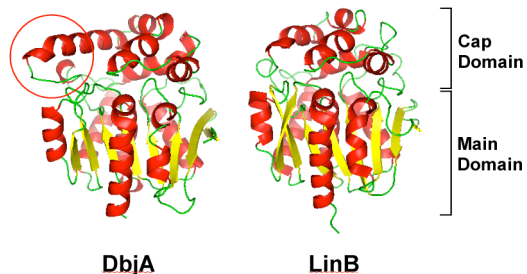


図 3. DbjA と LinB の立体構造の比較。DbjA 特異的な活性のために重要な要因である EB 配列部分を赤丸で囲った。

- ⑧ 根粒菌由来の LinB ホモログである DbeA の結晶化に成功した。
- ⑨ LinA の結晶構造解析に成功した(図4)。

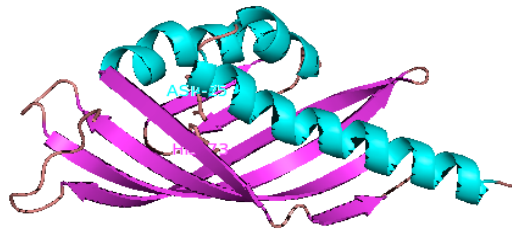


図4. LinA の立体構造

(3) 直接の分解酵素以外で分解活性の発現に必須な細胞因子の同定

- ① γ -HCH 分解菌 UT26 株の γ -HCH 資化能に必須な ABC トランスポーターホモログ LinKLMN を同定した(図5)。

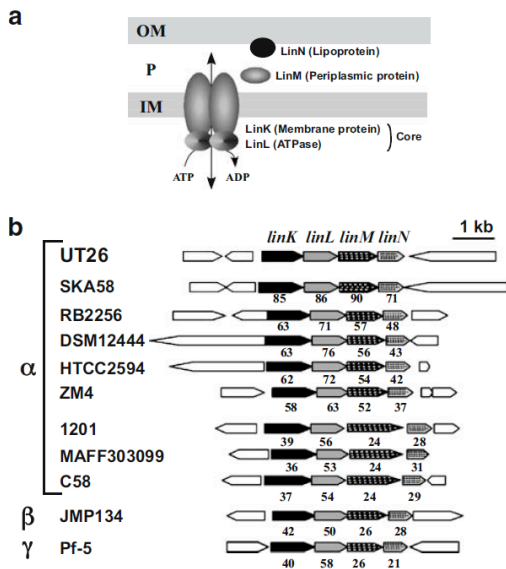


図5. γ -HCH 分解菌 UT26 株の γ -HCH 資化能に必須な ABC トランスポーターホモログ LinKLMN (a)。比較的高い相同性のものは UT26 近縁種のみに見出される (b)。

- ② 本 ABC トランスポーターホモログは、 γ -HCH 代謝の際に生じる毒性物質の耐性能に関与していることが判明した。
- ③ 本 ABC トランスポーターホモログが、外膜の性質を変えることにより、 γ -HCH 代謝の際に生じる毒性物質の耐性能に関与していることを解明した。
- ④ 各種物質代謝能の発現など、環境細菌の環境適応にグローバルレギュレーター Fur が

重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(4) 有効な有機塩素系化合物の生分解システムの構築

- ① ゲノムレベルで細菌細胞を理解するための手段として、DNA 配列比較ソフトウェア GenomeMatcher を開発した(図6)。

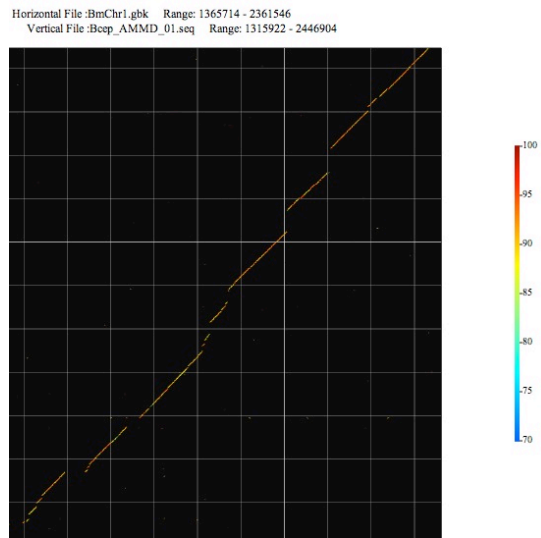


図6. GenomeMatcher のイメージ

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html>

(5) 総括

本研究を通じて、新規な反応特性を有する脱ハロゲン酵素を複数取得すると共に、既得酵素の立体構造および詳細な反応機構を解明し、酵素の機能改変に有用な手法を提示することにも成功した。また、直接の分解酵素以外で、細胞としての分解活性に必要な ABC トランスポーターホモログの存在を明らかにし、細菌細胞の分解活性発現のためにこのような因子が必要であることを具体的かつ明解に示した。残念ながら研究期間内に細菌細胞内に新規分解代謝経路を再構築することはできなかった。しかし、以上述べたその他の研究成果から、有効な有機塩素系化合物の生分解システムの構築のための基盤は十分に整備することができ、当初の目的はほぼ達成できたと考えている。

ここで述べた成果には、現時点ではまだ学会誌などに未発表のものも含まれるが、これらについては今後発表していく予定である。

今回の科学研究費の受領が研究代表者ら

の行っている研究をさらに進展させる上で多大な援助になったことはいうまでもなく、ここに心から感謝の意を表したい。また、本研究に携わった大学院学生および研究協力者の諸氏にもこの機会にあわせて謝意を表したい。

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 2 2 件) (全て査読有り)

- ①大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝 環境細菌ゲノムの構造と可塑性 - 難分解性化合物分解の総合職と専門職の場合 -. 化学と生物 **47** (1): 35-42 (2009)
- ② Prudnikova, T. T. Mozga, P. Rezacova, R. Chaloupkova, Y. Sato, Y. Nagata, J. Brynda, M. Kutý, J. Damborsky, and I. K. Smatanova. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel haloalkane dehalogenase DbeA from *Bradyrhizobium elkani* USDA94. Acta Crystallographica Section F **65**: 353-356 (2009)
- ③ 津田雅孝, 西山依里, 宮腰昌利, 湯原悟志, 永田裕二, 大坪嘉行 多重染色体性の *Burkholderia multivorans* のゲノム構造と土壌でのゲノム情報発現. 土と微生物. **62** (2): 93-97 (2008)
- ④ Ohtsubo, Y., W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. GenomeMatcher: A graphical user interface for DNA sequence comparison. BMC Bioinformatics **9**:376 (2008)
- ⑤ Miyazaki, R., Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. Characterization of the *traD* operon of naphthalene-catabolic plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer. J. Bacteriol. **190**: 6281-6289 (2008)
- ⑥ Shimoda, Y., H. Mitsui, H. Kamimatsuse, K. Minamisawa, E. Nishiyama, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Tsuda, S. Shinpo, A. Watanabe, M. Kohara, M. Yamada, Y. Nakamura, S. Tabata, and S. Sato. Construction of signature-tagged mutant library in *Mesorhizobium loti* as a powerful tool for functional genomics. DNA Research **15**: 297-308 (2008)
- ⑦ Fuchu, G., Y. Ohtsubo, M. Ito, R. Miyazaki, A. Ono, Y. Nagata, and M. Tsuda. Insertion sequence-based cassette PCR: cultivation-independent isolation of

γ -hexachlorocyclohexane-degrading genes from soil DNA. Appl. Microbiol. Biotechnol. **79**: 627-632 (2008)

- ⑧ Yuhara, S., H. Komatsu, H. Goto, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in *Burkholderia multivorans*. Microbiology **154**: 1763-1774 (2008)
- ⑨ Yano, H., C. E. Garruto, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, G. J. Zylstra, P. A. Williams, and M. Tsuda. Complete sequence determination combined with analysis of transposition/site-specific recombination events to explain genetic organization of IncP-7 TOL plasmid pWW53 and related mobile genetic elements. J. Mol. Biol. **369**: 11-26 (2007)
- ⑩ Endo, R., Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and Y. Nagata. Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for the utilization of γ -hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26. J. Bacteriol. **189**: 3712-3720 (2007)
- ⑪ Ito, M., Z. Prokop, M. Klavana, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, J. Damborsky, and Y. Nagata. Degradation of β -hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from γ -hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium* sp. MI1205. Arch Microbiol. **188**: 313-325 (2007)
- ⑫ Nagata, Y., R. Endo, M. Ito, Y. Ohtsubo and M. Tsuda. Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. Appl. Microbiol. and Biotechnol. **76**: 741-752 (2007)
- ⑬ Pavlova, M., Klavana, A. Jesenska, Z. Prokop, H. Konecna, T. Sato, M. Tsuda, Y. Nagata, and J. Damborsky. The identification of catalytic pentad in the haloalkane dehalogenase DhmA from *Mycobacterium avium* N85: reaction mechanism and molecular evolution. J. Struct. Biol. **157**: 384-392 (2007)
- ⑭ Ono, A., R. Miyazaki, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. Appl. Microbiol. Biotechnol. **74**: 501-510 (2007)

⑮ **Sato, Y., R. Natsume, M. Tsuda, J. Damborsky, Y. Nagata and T. Senda.** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a haloalkane dehalogenase DbjA from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Acta Cryst Section F **63**: 294-296 (2007)

⑯ **Monincova, M., Z. Prokop, J. Vevodova, Y. Nagata and J. Damborsky.** Weak activity of haloalkane dehalogenase LinB with 1,2,3-trichloropropane revealed by X-ray crystallography and microcalorimetry. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 2005-2008 (2007)

⑰ **津田雅孝、小野玲、宮崎亮、府中玄樹、永田裕二** 機能発現に基づく環境汚染物質分解酵素遺伝子の生態系からの直接的取得と解析 J. Environ. Biotechnol. **7 (2)**: 75-78 (2007)

⑱ **津田雅孝、西山依里、永田裕二、大坪嘉行** 自然環境で実際に機能する微生物遺伝子の遺伝学的手法による検索と解析 化学と生物 **45**: 557-563 (2007)

⑲ **Miyazaki, R., Y. Sato, M. Ito, Y. Ohtsubo, Y. Nagata and M. Tsuda.** Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid pLBI involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 6923-6933 (2006)

⑳ **Ohtsubo, Y., H. Goto, Y. Nagata, T. Kudo, and M. Tsuda.** Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading β -proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. Mol. Microbiol. **60**: 1563-1575 (2006)

㉑ **永田裕二、津田雅孝.** ハロアルカンデハロゲナーゼの構造と機能 J. Environ. Biotechnol. **6**: 87-92 (2006)

㉒ **小野玲、宮崎亮、永田裕二、津田雅孝.** 環境汚染物質を分解する酵素遺伝子の生態系からの直接的取得と解析. バイオインダストリー 11月号 **23 (11)**: 44-49 (2006)

[学会発表] (計73件)
(招待講演等、主な発表14件を記載)

① **Nagata, Y., Y. Ohtsubo, and M. Tsuda:** Adaptation and evolution of bacteria in natural environments. December 10-11, 2008. Memorial Symposium of the 24th International Prize for Biology -Ecology for the Changing World. Sendai, Japan

② **Nagata, Y., Y. Ohtsubo, and M. Tsuda:** Molecular genetic approaches for elucidating adaptive strategies of bacteria in soil. November 15, 2008. ISSM satellite symposium "Environmental genomics". Tokyo, Japan

③ **大坪嘉行、西山衣里、宮腰昌利、永田裕二、津田雅孝** 分子遺伝学的手法による細菌の土壤環境適応戦略の解明 2008年度日本生物工学会大会シンポジウム 仙台 2008年8月27-29日

④ **津田雅孝** 多重染色体性の *Burkholderia multivorans* のゲノム構造と土壌でのゲノム情報発現 日本土壌微生物学会 2008年度大会シンポジウム 静岡 2008年6月13-14日

⑤ **津田雅孝、小野玲、宮崎亮、府中玄樹、永田裕二** 機能発現に基づく環境汚染物質分解酵素遺伝子の生態系からの直接的取得と解析 第59回日本生物工学会大会シンポジウム「メタゲノム研究と環境バイオテクノロジー」 広島大学東広島キャンパス総合科学部 平成19年9月25-27日

⑥ **永田裕二、小野玲、宮崎亮、府中玄樹、大坪嘉行、津田雅孝** 培養非依存的手法による土壤環境からの環境汚染物質分解酵素遺伝子の取得 日本微生物生態学会第23回大会シンポジウムI: 微生物生態学における環境ゲノミクス 愛媛大学城北キャンパス 2007年9月15-18日

⑦ **津田雅孝** 環境での微生物ゲノム情報発現 2007年度日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会シンポジウム「ゲノムからの旅立ち」山口 2007年9月14-15日

⑧ **津田雅孝、西山依里、宮腰昌利、永田裕二、大坪嘉行** 生態系での細菌ゲノム情報発現 - 遺伝学的手法を用いた発現遺伝子群の探索- 極限環境微生物学会第8回シンポジウム 2007年7月3日 東京

⑨ **Miyazaki, R., Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Tsuda.** Characterization of the *traD* gene cluster involved in the conjugative transfer of naphthalene-catabolic plasmid NAH7. ASM Conference on *Pseudomonas* 2007 Seattle, Washington, USA. August 26-30, 2007

⑩ **Prokop, Z., Y. Sato, T. Mozga, P. Jerabek, R. Natsume, J. Florian, M. Tsuda, Y. Nagata, T. Senda, and J. Damborsky.** Haloalkane Dehalogenases Possess Two Different Structural Bases for Their Enantioselectivity. BIOTRANS

2007 - 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations Oviedo, Spain. July 8-13, 2007

⑪ **Ono, A., Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Tsuda.** Functional screening of genes for aromatic ring-hydroxylating oxygenases from soil metagenomic libraries Metagenomics 2007 San Diego, California, USA. June 11-13, 2007

⑫ **永田裕二** 細菌由来の脱ハロゲン酵素の構造-機能相関と応用への展望 平成18年度日本生物工学会北日本支部七タシンポジウム「新しいバイオ技術の創製を目指して」2006年8月5日 仙台

⑬ **Endo, R., Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and Y. Nagata.** Novel ABC-type transporter genes essential for the γ -hexachlorocyclohexane utilization in *Sphingobium japonicum* UT26. International Symposium on Environmental Biotechnology. July 9 to 13, 2006. Leipzig, Germany.

⑭ **Nagata, Y., M. Ito, R. Miyazaki, G. Fuchu, Y. Ohtsubo, and M. Tsuda.** Direct isolation of genes and a plasmid for the degradation of γ -hexachlorocyclohexane from contaminated soil. International Symposium on Environmental Biotechnology. July 9 to 13, 2006. Leipzig, Germany.

[図書] (計2件) (全て査読有り)

① **永田裕二、津田雅孝** 難培養性細菌も研究対象とするメタゲノム解析「バイオフィルムの基礎と制御」pp 103-111 株式会社エヌ・ティー・エス (2008) 2月4日発行

② **津田雅孝、永田裕二、大坪嘉行** 土壌環境細菌の比較ゲノム 「比較ゲノム学から読み解く生命システムー基本概念から最新ゲノム情報まで (細胞工学 別冊)」

pp.166-172 (2007)

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田裕二 (NAGATA YUJI)
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：30237531

(2)研究分担者

津田雅孝 (TSUDA MASATAKA)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：90172022

(3)研究協力者

・大坪嘉行 (OHTSUBO YOSHIYUKI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教

・Jiri Damborsky
マサリク大学 (チェコ共和国)・教授

・千田俊哉 (SENDA TOSHIYA)
産業技術総合研究所・主任研究員

・田之倉優 (TANOKURA MASARU)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

・竹山春子 (TAKEYAMA HARUKO)
早稲田大学・理工学術院・教授

(4)研究に携わった大学院学生

・小野玲
・佐藤優花里
・遠藤諒
・伊藤通浩
・宮崎亮
・矢野大和
・湯原悟志
・田端理朗
・西山依里
・府中玄樹