

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580077
 研究課題名（和文） 芳香族化合物分解好熱菌の代謝酵素群のネットワーク形成に関する研究
 研究課題名（英文） Building up a network of degradation enzymes in a thermophilic bacterium that degrade aromatic compounds
 研究代表者
 金原 和秀（KINBARA KAZUHIDE）
 岡山大学・資源生物科学研究所・准教授
 研究者番号：30225122

研究成果の概要：

芳香族化合物を分解する微生物は、その能力を進化の過程で獲得してきたものと考えられている。本研究では、これまで解析された例が少ない好熱性細菌に着目し、ナフタレン代謝酵素遺伝子群の解析を行うことを目的とした。その結果、遺伝子の単離とナフタレンによる誘導性を見出すことが出来た。しかし、ナフタレンを代謝する過程で生理活性が著しく低下することが分かり、酵素機能と代謝ネットワークの詳細を解析するにはいたらなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：芳香族化合物、好熱性細菌、分解、代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

微生物による人為起源の環境汚染物質の分解は、地球環境の保全に重要な役目を果たしている。こうした自然界に存在しない物質を分解する微生物の能力は、適応進化の結果獲得されたものと考えられており、その生物学上の重要性から研究がなされてきた。

これまで、様々な人為起源の環境汚染物質

の微生物分解に関して、分解菌の単離とその代謝酵素ならびに関連酵素遺伝子群の解析が行われている。それらの基礎研究の進展により、有害な化学物質を分解する微生物の能力は、遺伝子の変異の蓄積、ならびに接合伝達可能なプラスミドや、トランスポゾンのような可動性の遺伝因子による再編を経て獲得されたものと考えられている。しかし、そ

の能力を獲得するにいたる過程の詳細に関しては明らかではない。

われわれは、芳香族化合物分解菌をこれまでで多数単離し、ポリ塩化ビフェニル(PCB)、ナフタレンなど有害な環境汚染物質の分解に関して多くの知見を公表している。特に、環境ホルモン作用のある PCB ならびに排ガス中に含まれる多環式芳香族化合物であるナフタレンを分解する好熱性細菌 *Bacillus* sp. JF8 株を研究対象とし、1) PCB 分解系酵素遺伝子群はプラスミド上にあり、ナフタレン分解系酵素遺伝子群は染色体上にある、2) フェノール代謝系酵素遺伝子群と高い相同性を持つ遺伝子群がある、3) 芳香環の開裂を触媒するメタ開裂酵素は少なくとも4種類あり、そのうちの2つは活性中心に2価の Mn を有する、4) 遺伝子解析から予想される酵素のアミノ酸配列は、これまで得られている芳香族化合物代謝関連酵素群とは異なり、進化的に異なることが示唆された、5) 代謝に必要な酵素遺伝子の一部がオペロンから欠落し、他のオペロンに分散して存在する、などを明らかにしている。PCB ならびに多環式芳香族化合物を同時に分解可能な微生物は極めて稀であり、特に好熱性細菌で単離された例は無い。また、基質に対する代謝酵素が、複数のオペロン上に分散して存在しており、分解代謝が完全に行われるためには、分散している酵素遺伝子群の同調した発現が必要不可欠であると考えられる。このように、酵素遺伝子群の構成が不完全な系は、分解能力を獲得する過程を調べる研究対象として最適であり、「複数得られている構成が不完全な酵素遺伝子群の関連を調べ、それらの機能的な相関(代謝ネットワークの形成)を調べることで、微生物が新たな分解能力を獲得していく過程を解明する」手がかりになるものと思われ、独創的な研究であると期待できる。

また、代謝ネットワークを形成していく進化は、微生物が地球誕生から進化してきた過程に係わる問題でもあり、地球上における微生物の適応進化の解明につながるものと期待できる。

2. 研究の目的

以上の背景と意義を踏まえ、本研究ではまず、

1) プロテオミクス解析により、ナフタレン分解時の発現遺伝子群の解析を行い、基質特異的な発現を解析する。また、2) ナフタレン代謝系のメタ開裂酵素に着目し、単離された代謝系の酵素活性と基質特異性を解析する。それと同時に3) それら遺伝子群の発現の有無ならびに誘導性を明らかにする。さらに、4) 代謝に関与する酵素系と遺伝子群の相関関係を解明する。最終的には、得られた成果を総合し、代謝ネットワークの形成を考察することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) JF8 株の分解関連タンパク質のプロテオミクス解析

(1.1) 二次元電気泳動による分解関連タンパク質の検索

予備的な実験として、環開裂酵素の一部はビフェニルならびにナフタレンで誘導されることが分かっている。本研究では、無機培地にナフタレンを基質として添加し、それに JF8 株を高温条件(60°C)で生育させて細胞抽出液を調整する。次に、無機培地にコハク酸を炭素源として添加して生育させたコントロールと比較して、発現量に差があるタンパク質を、二次元電気泳動装置を用いて検索する。

(1.2) MALDI-TOF/TOF MS を用いたタンパク質の同定

(1.1)で差が出たタンパク質をゲルから取

り出し、トリプシンなどのプロテアーゼで消化した後、MALDI-TOF/TOF MS 用の試料を調整する。次に、試料を MALDI-TOF/TOF MS 装置

(Bruker Daltonics 社製) に導入し、質量分析ならびにアミノ酸配列決定によりタンパク質の同定を行う。

(1.3) タンパク質の検索

(1.2) で同定したタンパク質がこれまでに単離されたものであれば、それを以下の酵素機能解析、代謝ネットワーク解析で代謝に関連する機能のネットワークを解析する。得られた配列が、これまでに無いものであれば、アミノ酸配列の解析結果から合成したオリゴヌクレオチドを用いて、PCR ならびにサザン解析等により酵素遺伝子の JF8 株からの単離を試みる。

(2) 酵素機能解析

(2.1) 酵素活性測定

JF8 株をナフタレンで生育させ、集菌して得た静止菌体にメタ開裂の基質である中間代謝産物 1,2-dihydroxy naphthalene (1,2-DHNP) を添加して反応させ、増殖の有無とメタ開裂酵素の活性測定を行う。

(2.2) 生理活性測定

ナフタレン分解により生じる代謝中間産物が、分解菌に与える影響を調べるため、ナフタレン存在下での微生物の生理活性の変化を、生細胞と死細胞を特異的に染色する蛍光試薬を用いて観察し、代謝酵素のネットワークが細胞に与える影響を調べた。

生理活性の測定には、微生物細胞のコロニー形成をフィルター上で直接観察する方法を用いて行った。JF8 株を、ナフタレンとその中間代謝産物の存在下で培養し、形成したコロニーを生細胞染色色素 (緑色) と死細胞染色色素 (赤色) で二重染色した。染色したフィルター上のコロニーを、レーザーキャ

ニングサイトメータと蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(3) 遺伝子構造解析

(3.1) 分解遺伝子の単離

予備的な実験結果として、ナフタレン分解系上流遺伝子群は染色体上に存在することが示唆されている。本研究では、これまで単離されていない上流遺伝子のうち、脱水素酵素をコードする遺伝子を単離解析する。

(3.2) 制御系の解析

予備的な実験結果として、PCB 分解上流遺伝子群はビフェニルによって誘導されること、ナフタレン分解上流遺伝子群の一部はナフタレンによって誘導されることが分かっている。そこで、(3.1) で得られた分解系酵素遺伝子の発現制御を、ナフタレンを基質として RT-PCR を用いて調べ、発現のネットワークを解析する。

(4) 代謝ネットワークの解析

(4.1) 代謝産物の同定

これまで不明である、メタ開裂以降の代謝経路を明らかにするため、単離したメタ開裂以降の酵素遺伝子群を大腸菌に導入し、得られる代謝産物を、質量検出器付きガスクロマトグラフィーを用いて解析する。また、類似化合物の代謝産物を用いて、触媒する部位の推定を行う。

(4.2) ネットワークの解析

タンパク質の検索、活性測定、代謝産物の結果、ならびに発現制御の解析を踏まえて、分解に関与する酵素触媒のネットワークならびに遺伝子群の相関を考察する。

4. 研究成果

(1) JF8 株の分解関連タンパク質のプロテオミクス解析

ナフタレンにより発現誘導されるタンパク質を解析するため、二次元電気泳動を用いたプロテオミクス解析を試みた。その結果、ナフタレンを与えた菌体で特異的に誘導されるタンパク質のスポットを得ることが出来た。得られたタンパク質のスポットをトリプシン分解し、抽出したペプチドに対してMALDI TOF/MS解析を行ったが、ナフタレン分解関連酵素の同定には至らなかった。これは、得られたアミノ酸配列の情報が既知の情報と異なるためであると考えられた。

(2) 酵素機能解析

メタ開裂を受ける中間代謝産物である1,2-dihydroxynaphthaleneを基質として生育を調べたところ、ほとんど生育が認められなかった。そこで代謝系の働きを調べるため、ナフタレン存在下での微生物の生理活性の変化を観察した。まず、代謝による細胞増殖の変化を調べたところ、JF8株はビフェニルとナフタレンを唯一の炭素源として生育することができるが、これらの基質を与えると、コロニーの生育速度の低下と、コロニー中の死細胞の増加が観察された。特に、ナフタレンを基質とした場合、コロニー形成初期におけるコロニー中の細胞は、ほとんどが死細胞であった。以上の結果から、JF8株は、これまでナフタレンやビフェニルを分解する中温菌で観察された、基質の分解に伴う生理活性の変化より、強い感受性を示すことが示唆された。これらの結果から、JF8株は、ナフタレンを分解資化するが、それにより生理活性が著しく影響を受け、遺伝子の発現や酵素反応による代謝産物の同定が困難である可能性が考えられた。

(3) 遺伝子構造解析

ナフタレン分解上流経路酵素遺伝子群を詳細に解析するため、ナフタレン分解に関与する酵素のうち *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase (NahB) を精製し、NahB をコードする遺伝子断片を単離した。相同性解析の結果、NahB は、既知の芳香族化合物代謝オペロン中の脱水素酵素とは異なる種類の脱水素酵素であることを明らかにした。

RT-PCR 解析より、*nahB* の上流にある初発酸化酵素をコードする *nahAc* がナフタレン誘導性であることが明らかになった。

(4) 代謝ネットワークの解析

ナフタレン分解に関与すると考えられる遺伝子群が単離されたが、メタ開裂以降の代謝経路は明らかではない。そこで、ナフタレン分解下流経路酵素遺伝子群 *nahC*、*bphD*-like (*nahE*)、*dhyD* (*nahF*)、*mocA* (*nahH* or *nahG*) を導入した大腸菌に、メタ開裂の基質である中間代謝産物 1,2-dihydroxynaphthalene を基質として与え、生成する代謝産物を GC/MS で追跡した。しかし、代謝産物を見出すには至らなかった。

本研究の結果、*Bacillus* sp. JF8 のナフタレン代謝酵素遺伝子群は、上流経路に必要な酵素遺伝子がオペロン上に全てそろっておらず (*NahAc*、*NahAd*、*NahB* のみ)、下流経路においても必要な酵素遺伝子がそろっていないことが分かった (2-hydroxymuconic semialdehyde の変換酵素)。また、下流経路関連酵素遺伝子群に上流経路の酵素遺伝子である *nahC* が含まれるなど、配置に未完成なところがあり、オペロン中の遺伝子の配置がまだ完了していない可能性が考えられた。

現在の芳香族化合物の代謝経路は、少なくとも三つのコンポーネントの modular fusion によって進化してきたと考えられている。主モジュールはメタ開裂経路オペロンで、これ

が二つ目の遺伝子モジュール(サリチル酸やフェノールをカテコールに変換する)と融合し、いまでは下流経路を形成している。上流経路オペロンは、より後の段階で獲得された第三のモジュールと予想されている。最後に制御因子がゲノムから移動して、正しい発現ができるように修飾されたと考えられている。しかし、単離したナフタレン分解遺伝子群は、オペロン構造が不完全であり、これまでに報告されているものに比べ、未整理の状態であると考えられた。不完全なメタ開裂経路オペロンと不完全な上流経路オペロンであるが、これらはナフタレンで発現が誘導されることが確認されたため、制御因子もすでに存在していると考えられた。また、ナフタレンを炭素源として生育することができることから、ナフタレン代謝に必要な遺伝子は菌体内には揃っていることが示唆された。以上のことから、*Bacillus* sp. JF8 のナフタレン代謝酵素遺伝子群は、これまで提唱されている代謝経路遺伝子群とは異なる進化の仕方をしてきた可能性が考えられた。

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 1 件)

①金原和秀、環境微生物の生き様を探る。化学と生物, 45: 869-875(2007). 査読無しレビュー

[学会発表] (計 5 件)

①Kimbara, K., Iijima, S., Kanesaka, T., and Tani A. Detection and assessment of physiological activity of thermophilic bacteria during aromatic compounds degradation. JSPS-NRCT Asian Core Program Joint Seminar, Bangkok, Thailand, March 20-21, 2009

②金原和秀・田中昭行・松井一泰・新谷正巳・野尻秀昭: 環境細菌 DNA のダイナミズム。細菌研究会、長津田、2008年6月14日。

③Kimbara, K., and Mori, I. C. Detection and assessment of physiological change and cellular oxidation of bacteria by aromatic

compounds and metals, 13th International Symposium on Toxicity Assessment, Toyama, Japan, August 19-24, 2007.

④金坂貴志, 下村有美, 河合富佐子, 金原和秀. 芳香族化合物が好熱菌の生育に及ぼす影響の解析. 日本農芸化学会中四国支部第 17 回講演会, 2007.1.27, 香川.

⑤.Miyazawa, D., Hatta, T. and Kimbara, K. Characterization of genes for naphthalene degradation in the thermophilic naphthalene and PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8, The 5th JSPS-NRCT Joint Seminar, Pattaya, Thailand, November 7-10, 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金原 和秀 (KIMBARA KAZUhide)

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授

研究者番号: 30225122

(2) 研究分担者

谷 明生 (TANI AKIO)

岡山大学・資源生物科学研究所・助教

研究者番号: 00335621