

機関番号：31302

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780059

研究課題名 (和文) PCB 分解遺伝子群の発現を調節する新規転写ネットワークの解明

研究課題名 (英文) A novel network regulating the expression of PCB degradation genes.

研究代表者

宮内 啓介 (MIYAUCHI KEISUKE)

東北学院大学・工学部・准教授

研究者番号：20324014

研究成果の概要 (和文)：

ポリ塩化ビフェニル分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 においては、ビフェニル存在下でその分解遺伝子群発現のスイッチがオンになるが、下流の代謝産物存在下ではスイッチをオンにする機構が抑制される。本研究では、この抑制の原因物質がカテコールであることを明らかにした。カテコールの代謝をスムーズにおこなうように改変することによって、常に分解遺伝子が発現し、安定した分解能を得られるようになると思われる。

研究成果の概要 (英文)：

The expression of polychlorinated biphenyls degradation genes in a PCB degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1, is activated in the existence of biphenyl. This activation is repressed in the existence of intermediate metabolites which appear in the downstream pathway. In this study, we revealed that catechol is the metabolite which causes this repression. By making the metabolism flux from catechol smoothly, a PCB degrader which gives the constant degradation activity can be constructed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：PCB、転写制御、*Rhodococcus*、カタボライト抑制

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は難分解性の化学物質で、環境汚染物質として知られており、その浄化に対して早急な対策が必要とされている。PCB の処理方法の一つとして、微生物の分解能を用いた方法 (バイオレメディエーション) が注目されており、筆者らは、PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 (以下 RHA1 株) を材料として、その PCB 分解機構に

ついて研究をおこなってきた。申請者らの研究によって、1) RHA1 株のビフェニル (PCB の基本骨格) 分解機構とそれに関与する遺伝子群 (図参照)、2) ビフェニルによる分解遺伝子群の転写誘導機構 (図参照)、3) RHA1 株がビフェニル以外にもベンゼン、トルエン等の芳香族化合物を炭素源として生育可能であり、様々な芳香族化合物による複合汚染にも対応可能であること、等が明らかとなっ

たが、分解遺伝子群の転写制御機構の詳細や PCB 以外の芳香族化合物の分解に関与する遺伝子群の全容等、未解明の点が数多く存在している。そのような状況の中、2006 年に RHA1 株の全ゲノム配列 (9.7 Mb、染色体+3 本の線状プラスミド) が決定され、それを用いたマイクロアレイ等の解析手法が利用可能になったことによって、本菌の PCB 分解機構の完全解明のみならず、様々な汚染物質に対する遺伝子群の応答や実際の汚染環境における本菌の挙動の理解に向けた研究基盤がようやく完成した。

一方、RHA1 株を用いて PCB を分解する際には、PCB 分解酵素遺伝子群の転写を常に誘導して、分解タンパク質を十分量生産させることが必要である。RHA1 株の PCB 分解酵素遺伝子群のうち、上流の 4 つの反応を担う酵素遺伝子群の発現は、PCB の基本骨格であるビフェニル存在下で BphS と BphT からなる二成分制御系によって誘導されるが、RHA1 株をビフェニル存在下で培養したとき、培養後期に PCB 分解遺伝子 (*bphAa* 遺伝子) の転写が抑制されることが見いだされている。転写抑制の原因物質がビフェニル代謝の中間産物である可能性を考え、分解中間産物である安息香酸 (図参照) とビフェニルの共存下で RHA1 株を生育させたところ、*bphAa* 遺伝子の転写は、培養初期から抑制された。このことから、*bphAa* プロモーターの転写抑制は、安息香酸あるいはその代謝産物が関与して起こっていることが強く示唆された。

2. 研究の目的

RHA1 株における安息香酸による PCB 分解遺伝子群の転写活性化抑制の原因物質、制御機構等の全体像を明らかにし、分解能を常に発揮できる菌の育種に向けた基礎的知識を収集する。

3. 研究の方法

PCB 分解遺伝子群の転写活性はルシフェラーゼをレポーター遺伝子として用いたレポータープラスミドを使用して測定した。プロモーターとしては最初の分解反応に関与する *bphAa* 遺伝子のプロモーター領域を用い、これをルシフェラーゼの上流に挿入した。

転写活性化抑制の原因物質を明らかにするために、代謝遺伝子の破壊株を作製し、それを研究に用いた。破壊株の作製には相同組換えと *sacB* 遺伝子を用いたカウンターセクションを用い、目的遺伝子を欠失させた。欠失の確認には PCR およびサザンハイブリダイゼーションを用いた。

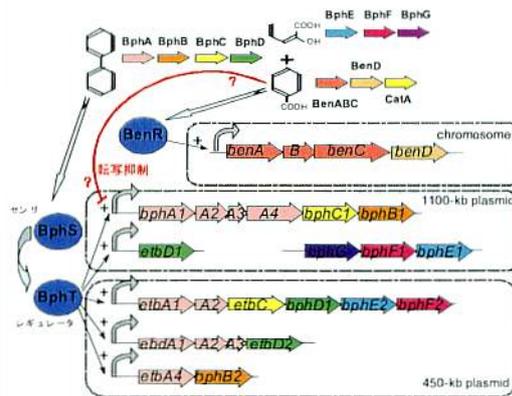
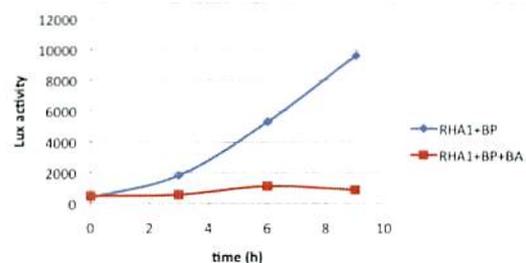


図 RHA1 株によるビフェニル分解経路と分解遺伝子群、及び分解遺伝子群の転写制御機構。各分解ステップを司る遺伝子群はゲノム中に複数存在する (矢印と同じ色の遺伝子群)。上流分解遺伝子群は二成分制御系 (BphS/BphT) に、安息香酸分解遺伝子群は BenR タンパク質によって制御されている。

4. 研究成果

(1) *bphAa* プロモーターの転写パターン

bphAa 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に組み込んだレポータープラスミド pKLAFl を RHA1 株に導入し、1/5LB 培地、1/5LB 培地+ビフェニル (BP)、1/5LB 培地+BP+安息香酸 (BA) で培養し、プロモーター活性を 3 時間ごとに測定した。その結果、1/5LB 培地のみでは測定期間を通じて一定の低い活性、1/5LB+BP では 3 時間目から活性の上昇がみられた。1/5LB+BP+BA では 9 時間程度まで活性化が抑えられ、以前得られた知見通り、BA またはその分解産物が転写活性化を抑制していることが強く示唆された。



(2) 抑制原因物質の同定

BA 以下の代謝に関与している *benA*, *benD*, *catA*, *catB* の遺伝子破壊株を作製した。各破壊株は BA を単一炭素源として生育できず (野生株である RHA1 は生育可能)、BA 存在下で生育させたとき、それぞれの遺伝子産物が触媒する反応の手前の物質を蓄積すると考えられる。それぞれの破壊株に pKLAFl を導入し、

(1) と同じ条件で培養・測定をおこなった。その結果、*benA* 破壊株、*benD* 破壊株では活性化抑制が解除された、すなわち、上記 2 つの破壊株で蓄積している BA およびそれが水

酸化された物質は、抑制の原因物質ではないことが強く示唆された。*catA* 破壊株では、1/5LB+BP、1/5LB +BP+ BA での活性は常に抑えられ、1/5LBでの活性とほぼ同じであった。このことから、抑制の原因物質は *catA* 破壊株で蓄積しているカテコールであることが示唆された。BP のみを加えた系において生成・蓄積されるカテコールは微量であると考えられるため、カテコールによる抑制は非常に強いことが考えられる。カテコールは菌体に対して毒性を示す可能性が考えられるため、転写の抑制ではなく、菌体の活性が落ちている可能性が考えられるが、菌液の濁度は上昇しているため、毒性のためではないと考えられる。また、用いるプロモーター領域を、BphSBphT の支配下にない *benR* プロモーターに変えて同様の実験を行ったところ、BP、BP+BA どちらの条件でも活性の抑制は観察されなかったため、この現象は BphS、BphT という二成分制御系の支配下にあるプロモーターに特異的な現象であることが強く示唆された。*catB* 破壊株での結果は野生株である RHA1 とほぼ同じであった。*catB* 株においては、蓄積すると考えられる *cis*、*cis*- μ コン酸に加えて、その手前のカテコールも若干量蓄積している可能性が示唆された。RHA1 において BA による転写活性化の抑制が観察されるのは、カテコールの分解が遅いためカテコールの蓄積が起こっているためと考えられる。カテコール分解遺伝子を外部から導入したり、プロモーターを強化することでカテコール分解をスムーズにおこなう株を育種することによって、安定して分解能を発揮することのできる菌株を作製することが可能になると考えられる。

(3) 転写活性化抑制機構の解析

本研究で観察される現象はカタボライト抑制の一種であると考えられる。すなわち、下流の代謝産物である安息香酸（カテコール）を分解する間、上流の分解遺伝子の転写を抑制する、という機構である。近年、カタボライト抑制に関わる因子である Crc タンパク質とその調製に関与する small RNA である *creZ* に関して研究が進んでいる。RHA1 のゲノム配列を解析した結果、RHA1 は *cre* 遺伝子のホモログを 4 つ (ro00291、ro02178、ro03883、ro06240) 保持していることが明らかになった。カテコールによる *bphAa* 転写活性化抑制にこれら *cre* ホモログが関与しているかを明らかにするため、4 つの *cre* ホモログの破壊株を作製した。最終的には 4 つ全てを破壊した 4 重破壊株 (*cre* 破壊株) を作製し、実験に用いた。*cre* 破壊株に pKLA1 を導入して、BP または BP と BA 存在下で *bphAa* プロモーター活性を測定した結果、野生株の RHA1 とほぼ同じ活性の変化を示した。このこ

とから、4 つの *cre* ホモログはカテコールによる転写活性化の抑制に関与していないことが強く示唆された。新規のメカニズムによる転写制御系が考えられ、非常に興味深い。

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 件)

1. Araki N, Niikura Y, Miyauchi K, Kasai D, Masai E, Fukuda M. Glucose-mediated transcriptional repression of PCB/biphenyl catabolic genes in *Rhodococcus jostii* RHA1. J Mol Microbiol Biotechnol. 査読有, 20, 2010, 53-62

2. Takeda, H., Shimodaira, J., Yukawa, K., Hara, N., Kasai, D., Miyauchi, K., Masai, E., Fukuda, M. Dual Two-Component Regulatory Systems Are Involved in Aromatic Compound Degradation in a Polychlorinated-Biphenyl Degradation. *Rhodococcus jostii* RHA1. Journal of Bacteriology. 査読有, 192, 2010, 4741-4751

[学会発表] (計 7 件)

1. 伊藤 拓, 伊藤 匡, 遠藤 銀朗, 福田 雅夫, 宮内 啓介, PCB分解菌における分解遺伝子の転写抑制原因物質の同定, 日本農芸化学会 2011年度大会, 2011. 03. 26, 京都女子大学

2. J. Shimodaira, K. Miyauchi, H. Takeda, D. Kasai, E. Masai, M. Fukuda, Regulatory mechanism of biphenyl/PCB-degradation gene transcription in *Rhodococcus jostii* RHA1. IBS2010, 2010. 09. 14-18, Rimini, Italy

3. 伊藤拓, 宮内啓介, 遠藤銀朗, 福田雅夫, *Rhodococcus jostii* RHA1 における PCB 分解遺伝子群転写抑制の原因物質の解明とメカニズムの解析, 環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会, 2010. 6. 21, 東北大学

4. T. Ito, H. Sagae, K. Nakazawa, T. Sugiuchi, S. Ara, G. Endo, K. Miyauchi, M. Fukuda, Catabolite Repression of Biphenyl Degradation Genes in PCB Degradation. *Rhodococcus jostii* RHA1, ASM General Meeting 2010, 2010. 5. 25, San Diego

5. 伊藤拓, 宮内啓介, 遠藤銀朗, 福田雅夫, *Rhodococcus jostii* RHA1 における PCB 分解遺伝子群転写抑制の原因物質の解明, 日本農芸化学会, 2010. 3. 28, 東京大学

6. 伊藤拓、宮内啓介、遠藤銀朗、福田雅夫、PCB分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における分解遺伝子群転写抑制に関与する物質の同定、土木学会、2009. 9. 4、福岡大学

7. 寒河江秀和、中澤皓次郎、伊藤拓、宮内啓介、遠藤銀朗、福田雅夫、PCB分解菌 *Rhodococcus jostii* における安息香酸存在下でのPCB分解遺伝子群転写制御機構の解析、土木学会東北支部大会、2009. 3. 7、東北学院大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 啓介 (MIYAUCHI KEISUKE)
東北学院大学・工学部・准教授
研究者番号：20324014

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：