

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年 2月28日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580118

研究課題名（和文）嫌気ベンゼン分解の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular analysis of anaerobic benzene degradation

研究代表者

笠井 由紀（KASAI YUKI）

北里大学・海洋バイオテクノロジー釜石研究所・上級研究員

研究者番号：20416572

研究成果の概要（和文）：嫌気ベンゼン分解菌 DN11 株を使って、嫌気ベンゼン分解経路とそれに係る遺伝子の同定・解析を行った。中間代謝産物の解析から DN11 株はベンゼンをトルエンに変換する経路で分解することが示唆された。ベンゼンで発現誘導を受ける遺伝子を解析し、嫌気トルエン分解遺伝子群の近傍にメチル化酵素遺伝子を検出した。この遺伝子が大腸菌で発現させベンゼンと反応させるとトルエンと考えられるピークが検出された。

研究成果の概要（英文）：Intermediates formed during anaerobic benzene degradation by *Azoarcus* sp. DN11 was identified by gas chromatography/mass spectrometry. The data support initial methylation of benzene to toluene, followed by transformation to benzoate. Benzene-induced gene expression analysis suggested that there was a new methyltransferase gene near an anaerobic toluene degradation gene cluster. The overexpressed recombinant methyltransferase converted benzene to a metabolite that has the same retention time with toluene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素化学

1. 研究開始当初の背景

(1) ベンゼンはガソリンなどに含まれる最も単純な構造の芳香族炭化水素である。ガソリンスタンドや石油化学工場等の地下貯蔵タンクの破損事故で環境中に流出し土壌や地下水汚染を引き起こす。毒性が強く発がん性物質であることから速やかな浄化が望まれるが、ベンゼンで汚染された環境は嫌気状態になるため分解され難くなり、長期間残留

することが知られている。嫌気環境下でのベンゼン分解経路については複数の環境サンプルを使って解析されており、嫌気ベンゼン分解の初反応として、水酸化、カルボキシル化、メチル化が提案されていた。

(2) ガソリン汚染地下水から単離された硝酸還元菌 *Azoarcus* sp. DN11 株は嫌気環境下でベンゼン、トルエン、キシレンを分解・資

化能を持つ。ベンゼンで汚染した地下水の浄化(バイオレメディエーション)へ適用可能であることから、大手ゼネコンで DN11 株を使った浄化法実用化の研究がすすめられた。

DN11 株は世界で2例目の嫌気ベンゼン分解単離菌であったので、この株を用いれば嫌気ベンゼン分解の分子機構が解明されると考えられた。そこで、ゲノム解析を行い約 4.9Mb の塩基配列を決定し、約 6,000 の推定遺伝子を確認した。またプロテオミクス解析を行って、嫌気条件下でベンゼンにより発現誘導を受けるタンパク質の存在を確認した。

2. 研究の目的

嫌気ベンゼン分解菌 *Azoarcus* sp. DN11 株を使用して、嫌気ベンゼン分解経路の解明及び嫌気ベンゼン分解に関与する遺伝子の解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 嫌気ベンゼン分解中間代謝産物の解析
嫌気条件下でベンゼンと DN11 株を培養し、その培養液を酢酸エチルで抽出後、シリル化誘導体を作成し質量分析器付ガスクロマトグラフ (GCMS) で解析する。検出された中間代謝産物から嫌気ベンゼン分解経路を推測する。

(2) ベンゼン分解の候補遺伝子の探索
嫌気ベンゼン分解に伴って発現する遺伝子を Substrate-induced Gene Expression (SIGEX) 法及び cDNA サブトラクション法で解析する。SIGEX 法では Green Fluorescence protein (GFP) 発現ベクターを利用して DN11 株のゲノム DNA ライブラリーを作成し、ベンゼン添加時に GFP 発現が誘導される大腸菌クローンをフローサイトメーターで選択・回収し挿入断片の塩基配列を解析する。

cDNA サブトラクション法では、嫌気条件下で安息香酸またはベンゼンで培養した DN11 株から RNA を抽出し、cDNA を合成、ベンゼン RNA をテスト、安息香酸 RNA をドライバーとしてサブトラクションを行いベンゼンに特異的な cDNA クローンを選抜しその塩基配列を解析する。

SIGEX 法および cDNA サブトラクション法で得られた結果を DN11 株ゲノムデータベースと照らし合わせ、嫌気ベンゼン分解に関与すると考えられる遺伝子を同定する。

(3) 候補遺伝子の異種発現と機能解析

(2) の解析でベンゼン分解への関連が示唆された遺伝子の全長を PCR により増幅し、大腸菌の発現解析用ベクターにクローニングする。得られた大腸菌の形質転換体を遺伝子発

現誘導条件下で培養し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で導入遺伝子の発現を確認すると共に、ベンゼンの変換反応を FID 付ガスクロマトグラフィーにより解析する。また発現遺伝子の酵素活性を蛍光マイクロプレートリーダーにより測定する。

4. 研究成果

(1) 嫌気ベンゼン分解中間代謝産物の解析
嫌気ベンゼン分解が起きている DN11 株の培養上清を GCMS で解析したところ、benzylsuccinate と安息香酸が検出された。Benzylsuccinate 及び安息香酸は嫌気トルエン分解の中間代謝産物であることから、DN11 株の嫌気ベンゼン分解経路はベンゼンのメチル化によりトルエンが生成される経路であることが示唆された(図 1)。

DN11 株のゲノム解析より、DN11 株には嫌気トルエン分解に関与する遺伝子群が 2 セット (A; CR000087 - CR000119, B; CR001641 - CR001667) 同定されている。従って、ベンゼンからトルエンへの初期反応に関与する遺伝子が同定できれば、嫌気ベンゼン分解経路に関与する遺伝子群が特定できると考えられる。

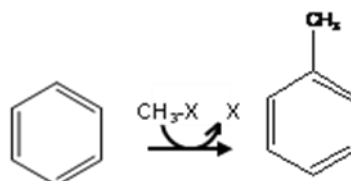


図1 ベンゼンメチル化

(2) SIGEX 法によるベンゼン誘導遺伝子解析

DN11 株のゲノム DNA を制限酵素で 3-5kb に断片化した後、GFP 発現ベクターに連結してゲノムライブラリーを作成した。ライブラリーの挿入断片に偏りのないことは制限酵素切断パターンを解析して確認した。非特異的に GFP を発現するクローンをフローサイトメーターで選択・除去し、残った細胞液にベンゼンを添加して培養し、GFP 発現が誘導された大腸菌クローンをフローサイトメーターで選択・回収した。挿入断片配列の両端の塩基配列を解析し、DN11 株ゲノム配列データベースと照らし合わせ挿入断片及びその近傍に存在する推定遺伝子の内、発現誘導を受けたと考えられる遺伝子の特定を行った。その結果、好気芳香族炭化水素分解系遺伝子、嫌気トルエン分解系遺伝子群 (A; CR000087 - CR000119)、嫌気安息香酸分解系遺伝子群、

膜タンパク質遺伝子及び転写調節因子遺伝子が検出された。

(3) cDNA サブトラクション法によるベンゼン誘導遺伝子解析

嫌気条件下でベンゼンまたは安息香酸で培養した DN11 株から RNA を抽出し、cDNA を合成、ベンゼン RNA をデスター、安息香酸 RNA をドライバーとしてサブトラクションを行った。得られた cDNA クローンの塩基配列を解析した結果、嫌気トルエン分解遺伝子、好気ベンゼン分解遺伝子、転写調節因子遺伝子が検出された。SIGEX および cDNA サブトラクションの結果を DN11 株ゲノム配列データベースと照らし合わせたところ、嫌気トルエン分解遺伝子群 A に近接して存在するメチルトランスフェラーゼ遺伝子 (CR000122) が嫌気ベンゼン分解の初期反応の候補遺伝子として特定された。

(4) メチルトランスフェラーゼ遺伝子の異種発現

CR000122 遺伝子とその他いくつかのメチルトランスフェラーゼ遺伝子を候補遺伝子として、両端に制限酵素認識配列を導入するように PCR 増幅、発現ベクター pET28 にクローニングし、大腸菌内で発現誘導を行った。発現タンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、予測されるサイズのバンドが確認されたが、不溶画分に留まっていることが示唆された。そこで低温誘導発現ベクター pColdIII にクローニングしシャペロンプラスミドを保有する大腸菌で発現誘導を行うことで発現タンパク質を可溶化させることに成功した (図 2)。

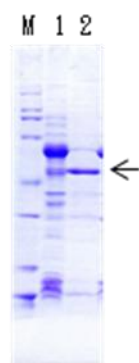


図 2 SDS-PAGE

M, マーカー; 1, 可溶画分; 2, 全タンパク質

(5) ガスクロマトグラフィーによるベンゼン変換解析

メチルトランスフェラーゼ CR000122 遺伝子

を発現させた大腸菌の細胞粗抽出液に S-adenosylmethionine (SAM) とベンゼンを添加して反応させ、ヘッドスペース成分をガスクロマトグラフィーで解析したところ、トルエンと同じリテンションタイムを持つピークが新たに出現することが確認された (図 3)。このピークがトルエンであるかは GCMS 等で確認する必要がある。

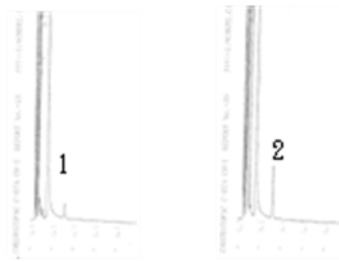


図 3 ガスクロマトグラフィー解析

1, トルエン

2, 酵素反応で新たに生成したピーク

(6) メチルトランスフェラーゼ酵素活性解析

メチルトランスフェラーゼ CR000122 遺伝子が発現させた大腸菌の粗抽出液にベンゼンを添加し SAM 依存的なメチルトランスフェラーゼ活性を蛍光法 (380ex/520em) で測定した。その結果、メチルトランスフェラーゼ CR000122 を発現しない大腸菌粗抽出液と比較して、蛍光強度が 1.6~2.9 倍上昇した。このことから、CR000122 がベンゼンにメチル基を添加する活性を持つと考えられた。今後は

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 笠井由紀、微生物を利用した石油汚染環境浄化、日本生物工学会北日本支部シンポジウム、2011 年 12 月 3 日、岩手県民情報交流センター(岩手県)
- ② 笠井由紀、嫌気ベンゼン分解菌 *Azoarcus* sp. DN11 株のベンゼン分解遺伝子解析、日本ゲノム微生物学会、2011 年 3 月 15 日、東北大学
- ③ 笠井由紀、嫌気ベンゼン分解菌 *Azoarcus* sp. DN11 株のゲノム解析、日本微生物生態学会、2010 年 11 月 22 日、広島大学

〔図書〕(計1件)

- ① 笠井由紀、Caister Academic Press、
Microbial bioremediation of non-metals
chapter11 Molecular technologies for
analysis of petroleum bioremediation、2011
年、279 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：ベンゼン分解菌の検出方法
発明者：片山美津留、高畑陽、笠井由紀
権利者：大成建設株式会社
種類：特許
番号：特願 2011-168311
出願年月日：2011年8月1日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 由紀 (KASAI YUKI)
北里大学・海洋バイオテクノロジー釜石研
究所・上級研究員
研究者番号：20416572

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：