

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25年5月6日現在

機関番号：37502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580382

研究課題名（和文）環境浄化微生物の進化と退化の分子基盤研究

研究課題名（英文）Molecular Bases of evolution and degeneration of microbes involved in degradation of environmental pollutants

研究代表者

古川 謙介（FURUKAWA KENSUKE）

別府大学 食物栄養科学部 教授

研究者番号：90221556

研究成果の概要（和文）：

世界的に深刻な環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニル（PCB）、有機水銀、および有機ハロゲン化合物菌の分解遺伝子群を対象として、その機能の進化と退化を分子生態学的側面から検討した。その結果、接合型トランスポゾン *bph-sal* エレメント、有機水銀分解遺伝子群および脱ハロゲン遺伝子群が環境に応じて分解機能を拡大したり、逆に分解機能を喪失する現象が明らかとなった。これらの現象にはゲノムの再編成にかかわるさまざまな因子が関与していた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated dynamism of genes involved in the degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs), organomercurials, and chlorinated ethenes. We revealed that dynamic rearrangements of a conjugative *bph-sal* element in PCB-degrading bacteria, *mer* genes in mercury-resistant marine bacteria and dehalogenase genes in organohalide-respiring bacteria, and that various mobile elements were highly involved in the rearrangements.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：生物環境、環境浄化微生物、分解遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ビフェニル資化菌は深刻な環境汚染物質である PCB を分解することから、世界の多くの研究者によって数多く分離された。我々は世界に先がけて PCB 分解の遺伝生化学的研究を展開し、その分解が初期酸素添加酵素の大サブユニットの基質認識に依存することを明らかにした。ついで進化分子工学を活用して取得した進化酵素遺伝子を大腸菌で発現さ

せた。また、ビフェニル分解遺伝子（*bph*）とサリチル酸分解遺伝子（*sal*）が巨大な接合型トランスポゾン（*bph-sal* エレメント）に存在することを見出した。しかし、この因子はきわめて不安定でビフェニル、あるいはサリチル酸を資化できない変異株が出現した。

水俣湾には工場から排出された水銀が底質に高濃度に存在していた時点（1983年）で高濃度の水銀に耐性な海洋細菌が高い

割合で存在していた。しかし、汚染水銀を含む底質が浚渫された1990年以降は水銀耐性菌の割合が急減し、水銀耐性の異なる多様な細菌が出現した。

脱ハロゲン呼吸細菌はハロゲン化合物を最終電子受容体として生体エネルギーを得て生育する偏性嫌気性細菌である。我々はクロロエテン脱塩素化細菌 *Desulfitobacterium hafniense* Y51 株を分離し、脱塩素化に関与する酵素、遺伝子 (*pce*) を明らかにした。しかし、Y51 株の *pce* 遺伝子群はきわめて不安定で脱塩素化能力を喪失した変異株が高頻度に出現した。

上記のように環境汚染物質分解菌の機能はその環境によって変わりやすく、分解遺伝子が動的に再編成を受けていることが示唆された。本研究では、分解系遺伝子の変化を分子レベルで解明し、理解する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では以下の3項目を明らかにすることを目的とした。

諸種ビフェニル資化菌の *bph-sal* エレメントに焦点をあて、この因子のビフェニル資化菌における分布、機能、再編成および *bph* 遺伝子の宿主依存的な発現機構を明らかにする。

水俣湾から分離した水銀耐性の弱い細菌について *mer* 遺伝子を解析し、退化現象を明らかにする。

諸種有機塩素化合物の脱塩素化に関与する偏性嫌気性細菌を対象に脱塩素化遺伝子の安定性、欠失現象を明らかにする。

3. 研究の方法

研究室保存ビフェニル資化菌12株についてゲノムDNAを抽出、8塩基認識制限酵素 *SpeI* で消化、パルスフィールド電気泳動、*bph-sal* エレメント中に存在する *bphA1*, *saIA*, *int*-DNA をプローブとしてサザン解析を行うことで、*bph-sal* エレメントの分布を調べる。また、*P. putida* KF715 株の全ゲノムDNAのコスミドライブラリーを作成して、*bph-sal* 中にあるDNAの再編成に関与する因子を探索する。進化工学的手法で取得した進化 *bphA1* 遺伝子を野生株のそれと置換した進化株を造成するため、自殺ベクターを用いた相同組換えを利用する。

水銀弱耐性菌のゲノム中の *mer* 遺伝子を解析するため、先に分離した水俣湾海洋細菌の水銀還元酵素遺伝子 (*merA*)、および有機水銀分解リアーゼ遺伝子 (*merB*) をプローブとしてゲノムサザンを行う。

諸種のクロロエテン脱塩素化細菌について *pce* 遺伝子群を挟み込む挿入配列 (IS) の解析、*pce* 遺伝子の動的再編成を解明、また、クロロフォルムの脱塩素化細菌に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

bph-sal エレメントは *P. putida* KF715 株に存在するビフェニル代謝遺伝子群 (*bph*) とサリチル酸代謝遺伝子群 (*sal*) を含む約90-kbの巨大な接合型トランスポゾンである。本因子はKF715株を分離した当初はきわめて高頻度に接合伝達し、受容菌 (*P. putida*) にビフェニルとサリチル酸の資化能を付与した。*bph-sal* エレメントの構造と機能を明らかにするために、KF715株全ゲノムのコスミドライブラリーを作製し解析した。その結果、*bph* 遺伝子群は *bphR1-bphA1-bphA2-bphA3-bphA4-bphB-bphC-bphD* を含む8.7-kb、*bphD* の約10-kb下流に *bphR2* が存在し、そのすぐ下流128-bpに *saIA-saIB-saIC-saID-saIE-saIF-saIG-saIH-saII-saIJ* を含む9.2-kbの *sal* 遺伝子群が存在した。*P. pseudoalcaligenes* KF707株には *bphC* と *bphD* の間に *bphX0-bphX1-bphX2-bphX3* が存在する。この *bphX* 遺伝子群はビフェニル環開裂物質をアセチルCoAに代謝する酵素群をコードしている。しかし、KF715株には大部分の *bphX* 領域が欠落していた。KF715株の *bph* 遺伝子群の0.4-kb上流には *P. putida* B13の *cIc* エレメント中に存在するインテグラーゼと類似の配列が認められた。その上流にIS30、さらにその上流には *Pseudomonas alcaligenes* のグループIIイントロンと相同な配列が存在した。*bph* 遺伝子群と *sal* 遺伝子群の間の役10-kbにはIS1380、IS5、その他2つのトランスポザナーゼ類似配列が認められた。*sal* 遺伝子群の上流には上記とは別のグループIIイントロンの類似配列が存在した。*sal* 遺伝子群の10-kb下流にはIS1328と相同な配列が存在した。

KF715株からは以下に示す4つのタイプの欠失変異株が出現した (*ben* は安息香酸資化遺伝子)。

変異型 I: Δ *bph* 遺伝子群 / Δ *sal* 遺伝子群、資化性 Bph⁻, Sal⁻, Ben⁺

変異型 II: Δ *bph* 遺伝子群、資化性 Bph⁻, Sal⁺, Ben⁻

変異型 III: Δ *sal* 遺伝子群、資化性 Bph⁺, Sal⁻, Ben⁺

変異型 IV: Δ *ben* 遺伝子群、資化性 Bph⁺, Sal⁺, Ben⁻

上記のうち、変異型 I と変異型 II が高い頻度で出現した。

KF715株と接合伝達によって *bph-sal* が伝達した *P. putida* AC30 (*bph-sal*) 株、および *P. putida* KT2440 (*bph-sal*) 株は KF715 株と同様、不安定で上記変異株 I と II が高頻度で出現した。また、*bph-sal* の DNA を保有する *E. coli* コスミドも継代培養で欠失し、不安定であった。

研究室保存ビフェニル資化菌 12 株について *bph-sal* エレメントの有無を検証した。KF715 株の *bphA1*, *salA*, *int* の DNA をプローブとしてゲノムサザン解析の結果、調べた 12 株のうち、3 つ全てのプローブと交雑した菌株は 7 株であった。しかも 3 つの DNA プローブは同一の *SpeI* 断片に交雑した。この結果から上記 7 株に KF715 株の *bph-sal* エレメントと類似の因子が存在することがあきらかとなった。

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. aeruginosa* KF702 株は類似した *bph-sal* エレメントを保有している。本研究では KF707 株と KF702 株について *bph* 遺伝子群の発現制御について検討した。両菌株の *bph* 遺伝子群はきわめて類似しているにもかかわらず、その転写様式が違っていた。このことから、水平伝達した *bph* 遺伝子群は宿主依存的な転写制御を受けていることが判明した。

我々は先に PCB 分解機能の異なる 2 つのビフェニル菌株、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *Burkholderia xenovorans* LB400 株の *bphA1* 遺伝子間で DNA シャフリングを行い、基質特異性の向上した進化 *bphA1* を取得した。本研究ではこれらの進化 *bphA1* を KF707 株の野生型 *bphA1* と置換した進化株を造成した。この中には親株の KF707 株と LB400 株が資化できないベンゼン、トルエンの資化機能を獲得した進化株、エチルベンゼン、イソプロピルベンゼンなどのアルキルベンゼンに旺盛に増殖する進化株が得られた。

(2) 水俣湾の水銀弱耐性菌

国立水俣病総合研究所では長期にわたり水俣湾の水銀汚染と耐性菌の出現について研究が行われた。これによると高濃度に水銀で汚染された水俣湾底質では塩化第二水銀 40 ppm に対して生育する耐性菌が 1983 年には 38%認められたが、高濃度水銀を含む底質が浚渫された 2003 年には耐性菌の出現頻度は 0.1%に低下した。本研究では水俣湾から採取した水銀に弱い耐性を示す細菌に着目して水銀遺伝子 (*mer*) を解析した。

採取した弱水銀耐性菌 8 株は 16SrDNA 解析の結果、2 株が *Bacillus* 属細菌、6 株は *Vibrio* 属細菌であった。先に水俣湾から分離した水銀耐性菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 株のリアーゼ遺伝子 *merB* (有機水銀の C-Hg 結合を切断酵素をコード) と水銀イオン還元酵素 *merA* を DNA プローブをしてサザン解析を行った。上記 8 菌株のゲノム DNA の制限酵素 *EcoRV* 断片に対して *merB* プローブで 5 株で明確なシグナルが検出された。上記 5 株からは M-1 株 *merB* 内部の DNA 配列を PCR と塩基配列により確認した。*merB* を有する 5 株のうち、4 株は酢酸フェニル水銀 (PMA) を分解して生じるベンゼンが検出

された。しかし、*merB* を有する 1 株は PMA 分解活性が検出できなかった。次に *merA* をプローブとして用いると、1 株に弱いシグナルが認められたが、7 株では交雑しなかった。M-1 株の MerA 抗体を用いたウェスタン解析の結果、いずれの菌株の菌体抽出液からもシグナルが検出されなかった。上記のように水俣湾に水銀が高濃度に滞留していた時には、水俣湾の海洋細菌は水銀に対し高い耐性を獲得し、水銀が浚渫された後は *mer* 遺伝子群が欠落したり、*mer* 遺伝子に変異が導入されて、水銀に対する耐性機能が低下あるいは喪失したものと考察される。

(3) 脱ハロゲン呼吸細菌

我々は先に、テトラクロロエテン (PCE) を *cis*-ジクロロエテンへと脱塩素化する *Desulfitobacterium hafniense* Y51 株を分離し、脱ハロゲンに関与する酵素、遺伝子などの研究を行った。Y51 株の脱ハロゲン遺伝子群は *pceA-pceB-pceC-pceT* からなるが、この 4 つの *pce* 遺伝子群の直ぐ上流と下流に同一の挿入配列 (IS) が存在する。Y51 株を繰り返し培養すると 2 つのタイプの欠失株が高頻度で出現する。一つは *pce* 遺伝子群を保有したまま、脱塩素化能を無くした株、もう一つは *pce* 遺伝子群が完全に欠落した株である。調べた結果、前者は *pce* 遺伝子群の上流にある IS が欠失しており、この IS の中に *pce* 遺伝子群の転写プロモータの一部が存在するため、その欠落により、*pce* 遺伝子群の転写が生じなかった。後者の欠損株は *pce* 遺伝子群の上流と下流に存在する相同な IS 間で相同組換えが生起して、*pce* 遺伝子群が抜け落ちていた。頻度的には後者の欠損株が数倍多く生じた。クロロフォルムは極低濃度 (1 μ M) で Y51 株の生育を著しく阻害するばかりでなく、*pce* 遺伝子群の欠失を促進した。興味深いことに *pce* 欠損株はクロロフォルムの阻害を受けず、1 mM の高濃度でも正常に生育した。本研究では諸種の脱ハロゲン呼吸細菌の再編成に着目して進化、退化の観点から研究を行った。クロロフェノール脱ハロゲン細菌、*Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-1 株と *D. hafniense* DCB2 株の 2 株、およびクロロエテン脱ハロゲン細菌、*D. hafniense* TCE 株についてクロロフォルムの影響を調べた。その結果、JW/IU-1 株と DCB2 株は 100 μ M クロロフォルムの存在下で、生育が著しく阻害され、デハロゲナーゼ遺伝子の転写が抑制された。一方、TCE1 株では Y51 株と同様、クロロフォルムの存在で *pce* 遺伝子群が高頻度に欠落した。現在、クロロフォルムが如何にして脱ハロゲン呼吸細菌の生育を阻害したり、遺伝子を欠失させるのか、そのメカニズムを研究している。

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10件)

1. 古川謙介 環境バイオ 分解菌の新機能を探る 化学と生物 査読有 51(1): 998-1002 (2013)
2. Hayashi, T., Kato, T. and Furukawa, K. Respiratory chain analysis of *Zymomonas mobilis* mutants producing high levels of ethanol. Appl. Environ. Microbiol. 査読有 78(16): 5622-5629 (2012)
3. 林 毅、古川謙介 呼吸低下株は好気エタノール発酵能と耐熱性を同時に獲得する *Zymomonas mobilis* 呼吸欠損株の新しい機能 化学と生物 査読有 50(11): 780-782 (2012)
4. 古川謙介 環境微生物の新規機能の探索と開発 J. Environ. Biotechnol. 12(2): 97-112 (2012)
5. 古川謙介 *Pseudomonas* 物語 日本生物工学会誌 査読有 89: 549-552 (2011)
6. Futagami, T., Nakao, S., Kido, Y., Oka, T., Kajiura, Y., Takahashi, H., Omori, T., Furukawa, K. and Goto, M. Putative stress sensors WscA and WscB are involved in hypo-osmotic and acidic pH stress in *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cell, 査読有 10:1504-1515 (2011)
7. Ohmori, T., Morita, H., Tanaka, M., Miyauchi, K., Kasai, D., Furukawa, K., Miyashita, K., Ogawa, N., Masai, E. and Fukuda, M. Development of a strain for efficient degradation of polychlorinated biphenyls by patchwork assembly of degradation pathways. J. Biosci. Biotechnol. 査読有 111(4): 437-442 (2011)
8. Hayashi, T., Furuta, Y. and Furukawa, K. Respiration deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and enhanced fermentation under aerobic and high temperature condition. J. Biosci. Bioeng. 査読有 111(4): 414-419 (2011)
9. Ohmori, T., Morita, H., Tanaka, M., Tomoi, T., Miyauchi, K., Kasai, D., Furukawa, K., Masai, E. and Fukuda, M. Expression in *Escherichia coli* of biphenyl 2,3-dioxygenase genes from a gram-positive polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有 75(1): 26-33 (2011)
10. Suenaga, H., Nonaka, H., Fujihara, H., Goto, M. and Furukawa, K. Hybrid pseudomonads engineered by two step homologous recombination acquire novel degradation abilities toward aromatics and polychlorinated biphenyls. App. Microbiol. Biotechnol. 査読有 88:915-923 (2010)

[学会発表] (計12件)

1. 古川謙介 Evolutionary engineering of dioxygenases for degradation of environmental pollutants and for synthesis of novel compounds. The 4th International Symposium on Environmental & Renewal Energy (ISERE2012) Pusan, Korea (2012. 12. 14)
2. 加藤剛士、林 毅、古川謙介 *Zymomonas mobilis* 高エタノール生産呼吸欠損株は NADH 脱水素酵素欠損株である 第19回日本生物工学会九州支部大分大会 別府 (2012. 12. 1)
3. 新谷 大、藤原絵美、丸岡生行、古寺美保子、梶原康博、高下秀春、浅田貴美子、古川謙介 自然界から分離した有用醸造公募の特性について 第19回日本生物工学会九州支部大分大会 別府 (2012. 12. 1)
4. 加藤剛士、林 毅、古川謙介 呼吸欠損 *Zymomonas mobilis* RDM 変異株の呼吸鎖変異とエタノール生産の関係性に関する研究 平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 鹿児島 (2012. 9. 29)
5. 古川謙介 環境微生物の新規な機能探索と開発 環境バイオテクノロジー学会2012年度大会 京都 (2012. 6. 26)
6. 林 毅、加藤剛士、古川謙介 高エタノール生産 *Zymomonas mobilis* 変異株の呼吸鎖の解析 平成24年度日本農芸化学会大会 京都 (2012. 3. 23)
7. 藤原秀彦、古川謙介 環境中から分離した酵母からの *Saccharomyces cerevisiae* の高効率二次スクリーニング法の開発 平成24年度日本農芸化学会大会 京都 (2012. 3. 23)
8. 福光裕宣、古川謙介、福田雅夫他 Ferredoxin 及び Ferredoxin reductase をコードする *bphA3* 及び *bphA4* の融合と融合酵素の機能解析 平成24年度日本農芸化学会大会 京都 (2012. 3. 23)
9. 児玉 崇、廣瀬 遵、古川謙介他 変異型ビフェニルジオキシゲナーゼの酵素-基質ドッキング解析 平成23年日本生物工学会西日本支部・中四国支部合同大会 宮崎市 (2011. 9. 6)
10. 林 毅、古川謙介 呼吸欠損ザイモモナ

ス菌は好気エタノール発酵能と高温耐性を獲得する 第62回日本生物工学会大会 宮崎市 (2010.10.29)

11. 廣瀬 遵、上野雅人、古川謙介他 キメラ型ビフェニルジオキシゲナーゼによる安息香酸エチルの変換 第62回日本生物工学会大会 宮崎市 (2010.10.29)
12. 古川謙介 酸素添加酵素 (ジオキシゲナーゼ) の進化工学と分解菌の育種 酵素・補酵素研究会 北九州 (2010.9.10)

[図書] (計1件)

1. Futagami, T., Goto, M. and Furukawa, K. Genetic system of organohalide-respiring bacteria. In "Biodegradative Bacteria" 査読有 Nojiri, H., Tsuda, M., Fukuda, M. & Kamagata, Y. (Eds). In press Springer (2013)

[その他]

ホームページ等

<http://www.beppu-u.ac.jp/course/nutrition/ferment/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 謙介 (FURUKAWA KENSUKE)
別府大学・食物栄養科学部・教授
研究者番号：90221556

(2) 研究分担者

林 毅 (HAYASI TAKESI)
別府大学・食物栄養科学部・准教授
研究者番号：40399811

藤原 秀彦 (FUJIHARA HIDEHIKO)
別府大学・食物栄養科学部・准教授