

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580121

研究課題名(和文) PCB分解遺伝子群の転写活性化を抑制する新規制御機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of a novel transcriptional repression mechanism of PCB degradation genes

研究代表者

宮内 啓介 (Miyuchi, Keisuke)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：20324014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニル(PCB)分解菌*Rhodococcus jostii* RHA1のPCB分解遺伝子群の転写は生育基質であるビフェニル存在下で活性化されるが、分解の中間代謝産物である安息香酸が同時に存在すると、転写活性化は抑制される。本研究では、この新規転写抑制機構について研究を行った。その結果、抑制に關与する物質はさらに下流の代謝産物であるカテコールであることを明らかにし、カテコール分解遺伝子を高発現させることで抑制の解除、および生育能の上昇が見られることが明らかとなった。カタボライト抑制に關与することが知られている*crp*遺伝子は本制御には關与していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In *Rhodococcus jostii* RHA1, known as a polychlorinated biphenyl (PCB) degrader, the transcription of biphenyl degradation genes is up-regulated in the presence of biphenyl, while it is repressed by the coexistence of benzoate which is one of the intermediate compounds of biphenyl degradation. In this study, the mechanism of this repression was investigated. It was revealed that it is catechol, a downstream compound of benzoate degradation, that causes the repression of the transcription of biphenyl degradation genes, and the overexpression of the catechol degradation gene (*catA*) in RHA1 canceled the repression and enhanced the growth of RHA1 on biphenyl. Genes which have been known to be responsible for the catabolite repression, *crp*, was proved not to participate in this repression.

研究分野：分子微生物学

キーワード：転写制御 カタボライト抑制 細菌 *Rhodococcus* ポリ塩化ビフェニル

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、申請者は、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、2) ビフェニルによる分解遺伝子群の転写誘導機構、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。

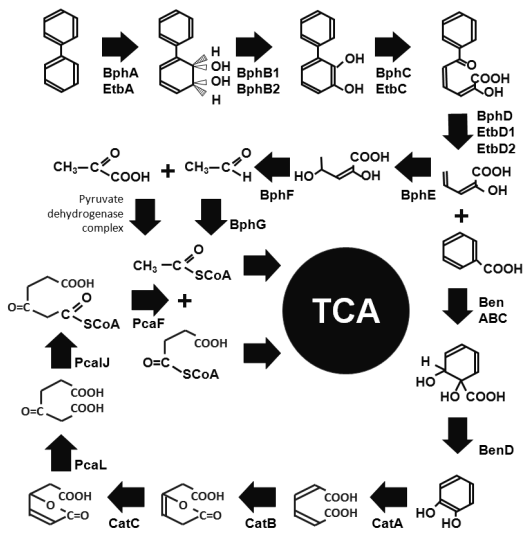


図 RHA1 株におけるビフェニル分解経路と各反応に関与するタンパク質

2. 研究の目的

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 BphS1 と BphT1 からなる二成分制御系によって誘導されるが、申請者は最近、ビフェ

ニルの代謝産物である安息香酸存在下では、PCB 分解遺伝子 (*bphAa* 遺伝子) のビフェニルによる転写活性化が抑制されることを見いだした。本研究では、この新規の転写制御メカニズムの全容を明らかにすることを目的として研究を行うこととした。

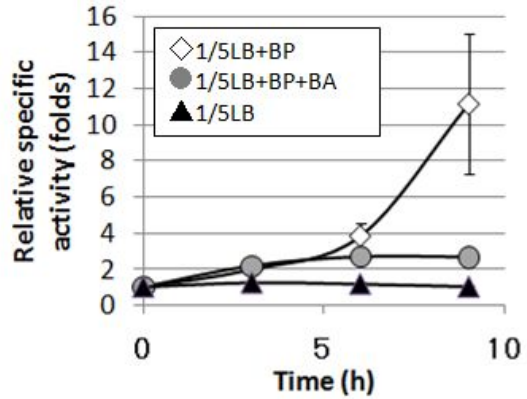


図 ビフェニル (BP) および BP と安息香酸 (BA) 存在下における *bphAa* 遺伝子の転写活性

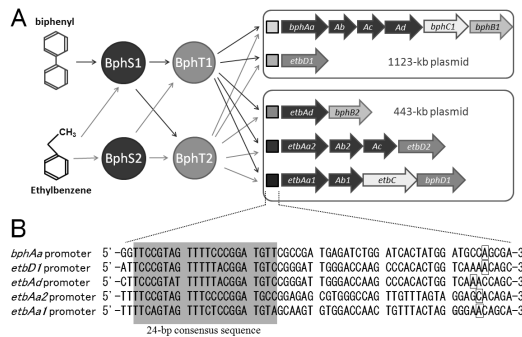


図 (A) BphS / BphT 二成分制御系を介したビフェニル分解遺伝子群の転写制御および (B) 各プロモーター領域に存在するコンセンサス配列

3. 研究の方法

ビフェニル分解遺伝子群の転写を観察するために、分解遺伝子群のプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミドを用いた。また、必要に応じて菌体から RNA を回収して、逆転写-定量 PCR 法を用いて転写量を測定した。遺伝子破壊は相同組換えを利用しておこない、破壊は PCR とサザン解析で確認した。

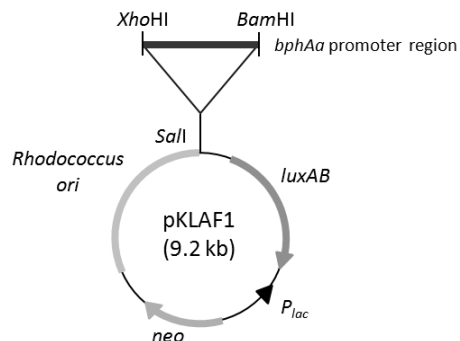


図 本研究で用いたレポータープラスミド pKLAf1 (*bphAa* プロモーター領域を含む)

#### 4. 研究成果

RHA1 株にピフェニルを与えると *bphAa* 遺伝子 (*bphAa* 分解の最初の反応を触媒する酵素遺伝子) の転写が活性化し、そこに安息香酸を加えると転写活性化が抑制されるが、この現象が *bphAa* 遺伝子特有のものなのか、ゲノム上に分散して存在する他のピフェニル分解遺伝子群においても同じ現象が起きるのかを、レポータープラスミドを用いて調べた。その結果、他の4つのプロモーター領域においても同様の現象 (安息香酸存在下におけるピフェニルによる転写活性化の抑制と、カテコール蓄積株における転写の大幅な抑制 (図)) が観察され、安息香酸による転写活性化の抑制という現象が、RHA1 株のピフェニル分解遺伝子群全体に関わるものであることが明らかとなった。

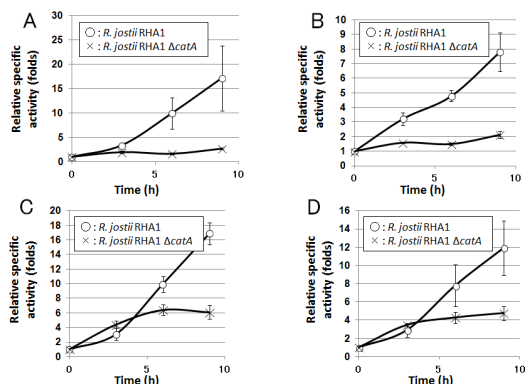


図 ピフェニル存在下で培養したときの RHA1 株および *catA* 破壊株 (カテコールを蓄積する) におけるピフェニル分解遺伝子群の転写活性 (A) *etbD1* (B) *etbAd* (C) *etbAa1* (D) *etbAa2*

RHA1 株の安息香酸以降の代謝に関する分解遺伝子の破壊株を用いた解析により、抑制に関与する物質はカテコールであることが明らかとなった。そこで、RHA1 株のカテコール分解遺伝子 *catA1* を RHA1 株に導入して発現させ、カテコールを分解させることによって転写活性化の抑制が解除されるかを解析した。その結果、*catA1* を高発現させることで転写活性化の抑制が解除されることが明らかとなった。さらに、無機塩培地にピフェニルのみを炭素源として加えた培地で生育させたとき、野生株にベクターを導入したものより、*catA1* を導入した株のほうがよい生育を示すことも確認された。栄養培地を用いたときは生育に差がみられないことから、*catA1* 導入株はカテコールを素早く分解することによって生育に正の影響を及ぼしたと考えられる。生育培地中のカテコールを除くことで生育能が上昇する、という知見は、実際に PCB を分解させる際においても活かされ

ると考えられる。同様の生育上昇は、ピフェニル分解遺伝子の転写制御因子である *bphS1bphT1* 遺伝子を導入した際にも観察された。

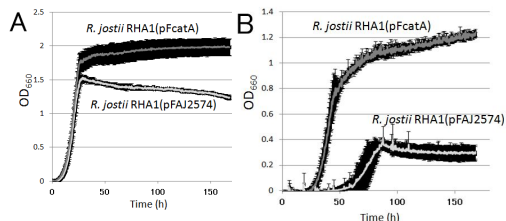


図 *R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) (ベクターコントロール) と *R. jostii* RHA1 (pFcatA) (*catA1* 高発現株) の生育比較。標準偏差を縦方向の線で表した。A: 1/5LB 培地 B: M9 培地+ピフェニル (終濃度 10 mM)

RHA1 株における安息香酸以降の分解遺伝子群について、その誘導基質を明らかにした。安息香酸分解遺伝子群 *benABCK* の転写は、安息香酸存在下で誘導されることが明らかになっていたが、安息香酸を分解しない *benA* 破壊株においても同様の誘導が観察されたため、安息香酸の下流の代謝産物ではなく、安息香酸そのものが誘導基質であることが強く示唆された。また、同様に下流代謝遺伝子の破壊株とレポータープラスミドを用いた解析によって、カテコール代謝遺伝子群 *catABC* の誘導基質はカテコールの分解産物である *cis,cis*-muconate であることが示唆された。

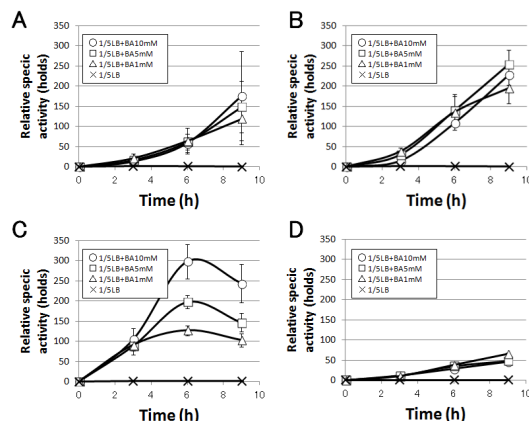


図 各遺伝子破壊株における *benA* プロモーター活性に対する安息香酸 (BA) の影響。*benA* 遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミドを各菌株に導入し、安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値 / OD<sub>600</sub> を測定した。A, *benA* 破壊株; B, *benD* 破壊株; C, *catA* 破壊株; D *catB* 破壊株

本研究で注目した転写制御に関与している可能性がある遺伝子をゲノム情報から探索し、その関与の可能性を検討した。まず、

二成分制御系の調節に関与する遺伝子の候補として脱リン酸酵素と相同性を示す ro03605 を選定し、ro03605 の転写量をピフェニルおよび安息香酸存在下で調べた。その結果、本遺伝子の転写量に特に変化は見られなかった。また、ro03605 および他の細菌でカタボライト抑制に関与している Crp タンパク質遺伝子と相同性を示す ro04321 を RHA1 株中で高発現させて、ピフェニル分解遺伝子の転写に変化をもたらすか観察した。その結果、両遺伝子を RHA1 株中で高発現させてもピフェニル分解遺伝子の転写活性化パターンに変化は見られなかった。

以上本研究により、PCB 分解菌である RHA1 株において、ピフェニル分解の中間代謝産物であるカテコールが存在することでピフェニル分解遺伝子群の転写活性化が押さえられること、本転写制御メカニズムは既知の Crp タンパク質を介したカタボライト抑制とは異なっていることが明らかとなった。また、安息香酸以降の代謝に関与する遺伝子群の転写誘導基質も明らかとなった。カテコールを分解遺伝子の高発現によって取り除く、あるいは正の転写制御因子を高発現させることでピフェニルを炭素源とした際の生育の上昇が観察される、という現象は、本菌を用いて実際に PCB 分解を行う際に有用な知見となる。転写制御に関与する遺伝子群に関してはその同定に至らなかったため、今後さらなる研究が必要である。

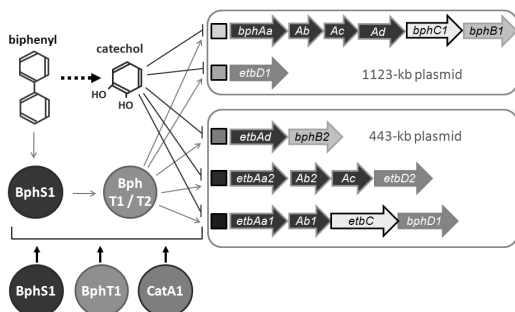


図 本研究で得られた知見のモデル図。カテコールは、BphST 支配下のピフェニル分解遺伝子群のピフェニルによる転写活性化を抑制する。catA1、bphS1/bphT1 をそれぞれ高発現することで、ピフェニル単一炭素源での生育を向上できる。

## 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 2 件)

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における BphS / BphT 支配下遺伝子群の発現への中間分解産物カテコールの影響  
伊藤 拓, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介.  
J. Environ. Biotech. 査読有, 14. 57-63

(2014)

カテコール分解遺伝子導入による PCB 分解菌の分解遺伝子群転写活性の強化  
伊藤拓, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介  
土木学会論文集 G (環境) 査読有, vol. 69, 111485-111493 (2013)

[学会発表](計 4 件)

PCB 分解菌におけるカテコール分解遺伝子の転写制御  
伊藤 拓, 工藤 大祐, 福田 雅夫, 遠藤 銀朗, 宮内 啓介  
環境微生物系合同大会 2014(2014 年 10 月 22 日)

PCB 分解菌の PCB 分解遺伝子転写抑制に関する因子の探索  
佐藤俊哉, 伊藤 拓, 福田雅夫, 遠藤銀朗, 宮内啓介  
平成 25 年度土木学会東北支部技術研究発表会(2014 年 3 月 8 日)

カテコール分解遺伝子導入による PCB 分解菌の分解遺伝子群転写活性の強化  
伊藤拓, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介  
環境工学研究フォーラム(2013 年 11 月 19 日)

*Rhodococcus jostii* RHA1 におけるカテコール分解遺伝子の導入による PCB 分解遺伝子群転写活性の強化  
伊藤 拓, 遠藤 銀朗, 福田 雅夫, 宮内 啓介  
2013 年度農芸化学会(2013 年 3 月 25 日)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 啓介 (MIYAUCHI, Keisuke)  
東北学院大学・工学部環境建設工学科・教授  
研究者番号：20324014

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：