

平成 21 年 3 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780060
 研究課題名 (和文)
 スフィンゴモナス属細菌のポリエチレングリコール分解メガプラスミドの環境中挙動
 研究課題名 (英文) Environmental behavior of polyethylene glycol-degradative megaplasmid of *Sphingomonads*
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

人工化合物であるポリエチレングリコール(PEG)の有力な分解菌である *Sphingomonas* 属細菌は PEG 分解遺伝子をプラスミドにコードしている。このプラスミドは接合伝達で他の菌にも移ることが示唆されているが、その宿主特異性などは明らかではない。本研究では PEG 分解菌が持つプラスミドの環境中での挙動を解析するにあたり基礎的な知見を蓄積し、PEG の完全分解に関わる遺伝子群を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	0	2,800,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：6102

キーワード：ポリエチレングリコール、*Sphingomonas* 属細菌、プラスミド

1. 研究開始当初の背景

洗剤などの原料として大量に生産・消費されるポリエチレングリコール (PEG) は、親水性があるために使用後は排水として大量廃棄されている。PEG は人工的な合成化合物であり、約 40 年程度の使用の歴史がある。環境中には効率的に PEG を分解する微生物が存在する。すなわち、これらの微生物は人工の

化合物を特異的に分解する遺伝子を持っている。天然に存在しない化合物を分解するためには、既存の天然物に対する酵素を変異させ、人工物に適応させる必要がある。この適応の課程において、重要な働きを持つのが核外 DNA、すなわちプラスミドである。プラスミドにコードされている遺伝子は核の遺伝子よりも変異が早く、かつトランスポゾンな

どを通じて異なる宿主間や核 DNA 間を頻繁に移動することにより、分解に必要な関連する遺伝子を寄せ集めていると考えられている。

PEG を分解できる代表的な微生物は *Sphingomonas* 属細菌である。本菌は数百 kb のメガプラスミドを保持し、その中に PEG 分解遺伝子群をコードしている。PEG のみならず農薬などの人工物に対しても、*Sphingomonas* 属細菌が有力な分解菌として分離される。プラスミドを持つ本属細菌は非常に多く、一般にこれらプラスミドは巨大で、芳香族化合物など多岐にわたる化合物を分解するための遺伝子を保持している。本属細菌が多様な化合物の分解性を示すのは、これらプラスミドの存在によるところが大きいと考えられるが、これらプラスミドの宿主特異性や、環境中での挙動には不明な点が多い。その機構を明らかにすることにより、本属細菌をバイオレメディエーションに直接応用する、またはプラスミドの宿主として投入して、土着微生物に分解機能を付与するという応用法が考えられる。

また、PEG 分解遺伝子はオペロンを形成し、*pegBCDAER* という構造を持つ。このうち *pegA* は PEG の初期酸化酵素すなわち PEG 脱水素酵素をコードする。*pegC* は *PegA* により生成された PEG-アルデヒドの脱水素酵素をコードする。*pegE* は *PegC* により生成される PEG-カルボン酸に補酵素 A を結合させる PEG-carboxylate-CoA ligase をコードすることがわかっている。*pegR* は *pegB* のプロモーター領域に結合し、オペロンを正に制御していることがわかっているが、他の遺伝子 (*pegB, D*) についてはその機能が不明である。さらにこのオペロンだけでは PEG の完全分解には至らないため、他にも PEG 分解に関与する遺伝子の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では PEG 分解性 *Sphingomonas* 属細菌を、PEG 汚染されている排水をモデルとした系に投入した際の、プラスミドに依存した PEG 分解能の他の菌への伝播やその様式を解析することにより、実際の環境中での汚染浄化の微生物生態を解析することと、PEG 分解遺伝子群による PEG 分解メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PEG の分解遺伝子は数百 kb の巨大プラスミドにコードされている。このプラスミドが他の宿主に移った際に、プラスミドを追跡するために、マーカーとなる遺伝子が必要である。そこで、蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) でラベルするために、PEG 分解遺伝子の領域に GFP 遺伝子を導入したベクターを構築した。本ベクターの一部または全体を親株に形質転換したが、GFP 発現株は得られなかった。形質転換効率が極端に低いことが考えられたので、抗生物質耐性遺伝子の導入や培地成分、生育のタイミング、エレクトロポレーション法での条件の検討を行った。

(2) PEG 分解オペロンの下流をクローニングしたところ、グルタチオン S 転移酵素 (GST)、FAD 含有酸化還元酵素と相同性のある遺伝子が見つかった。そこでこれらの遺伝子を大腸菌で発現させ、発現タンパク質が PEG 分解に関与するかを検討した。

(3) PEG 分解菌 *Sphingopyxis macrogoltabida* 103 株において、PEG 分解遺伝子をコードする巨大プラスミド以外に 4.3 kb の小さなプラスミドを発見した。本プラスミドをクローニングし塩基配列を決定した。また、本プラスミドが 103 株において複製されるために必要な遺伝子領域を検討するため、大腸菌とのシャトルベクターを構築した。他の属の菌にシャトルベクターを導入し、その保持性を検討し

た。さらに、PCR法によりプラスミドにコードされているそれぞれの遺伝子を欠損したシャトルベクターを構築し、103株における保持性を検討することにより、複製に必要な遺伝子領域を特定した。

4. 研究成果

(1) PEG分解遺伝子をコードする巨大プラスミドに、プラスミドの存在を示すレポーターとしてGFP遺伝子を導入することができなかった。これは本株の形質転換効率が低いか、ターゲットとした遺伝子領域が生育に重要な領域であったか、またはGFPの発現による細胞への悪影響というような理由が考えられた。後述するが小さいプラスミドが細胞内に導入され、保持されることがわかったので、外来DNAの導入は可能であるが、相同組み替え効率が低いことが考えられた。形質転換に用いる菌の培養条件（温度、組成）や、GFPの代わりに抗生物質耐性遺伝子を用いた相同組み替えを試みたが、意図する形質転換体は得られなかったため、相同組み換え効率が非常に低いことが示唆された。

(2) PEG分解オペロンの下流にコードされるGSTは、28 kDaのダイマーであり、細胞質に局在する。本酵素はオペロンにコードされる酵素(PegA, C, E)によるPEGの代謝中間体、PEGカルボン酸-CoAに結合することがわかった。GSTは基質を別の物質へ変換することはなかったため、GSTはPEGカルボン酸の強酸性を緩和するための酵素であると考えられた。

FAD含有酸化還元酵素は64 kDaのホモテトラマーで、ペリプラズムに局在する。反応はPMS（またはMTT）とDCIPに依存していた。DCIPの還元量と精製するグリオキシル酸のモル比が当量であった。すなわち、本酵素は同じく中間体のPEGカルボン酸を脱水素し、グリオキシル酸を遊離させ、1ユニット短いPEGを生成

することを明らかにした。Methoxy酢酸、Ethoxy酢酸には反応しないので、PEGカルボン酸のような長鎖の基質にしか反応しない。

これら両遺伝子は上流のPEGオペロンの転写がPEGで誘導されるのに対し、炭素源がグルコースの時も発現しているため、構成的に転写されていると考えられる。またこれら遺伝子は他のPEG分解菌にもPEGオペロンの下流に存在することから、PEGの分解に関与していると考えられる。これらの遺伝子の作用によってPEGの分解は完全なサイクルとなる。すなわち、PEGの完全分解に必要な遺伝子を解明した。

PEGオペロンを正に制御するPegRタンパク質そのものはGalRタイプのタンパク質により負に制御されていることが分かっているが、GalR遺伝子はPEGオペロンの周辺には存在しないため、PEGオペロンをコードするプラスミドのどこかか、ゲノムDNAにコードされていると考えられる。

(3) 103株に見いだした小さいプラスミドをクロラムフェニコール耐性遺伝子を持つPHSG398に連結しクローニングした。構造を決定したところ、*repA*および*resolvase*遺伝子のみがコードされており、一部に繰り返し配列が見いだされた。二つの遺伝子のそれぞれを欠損したシャトルベクターは103株において保持されず、両遺伝子がプラスミドの保持に必要であることがわかった。*S. terrae*および*S. macroglabida* 203株に導入した際には低頻度で保持された。シャトルベクターを*Comamonas testosteroni*および*Burkholderia multivorans*に同様に導入したが、形質転換体は得られなかったため、本プラスミドは宿主特異性が高いと考えられた。本ベクターは*lac*プロモーターとマルチクローニングサイトを持つので、*Sphingomonas*属細菌でタンパク質を発現させるためのベクターとしての応用が可能である。

以上の結果から、PEG分解プラスミドの環境中での伝播を解析するに当たって、当初予定していた方法ではプラスミドを適切にラベルすることができなかつたため、その方法についてさらなる検討が必要であることが分かった。相同組み換え効率が低いことが原因であると考えられることから、相同組み換えを効率的に起こさせるために、ターゲットとする遺伝子領域の選択や、相同配列の長さなどを検討する必要があると考えられる。一方でPEG分解に関与する遺伝子を二つ特定し、その代謝上での重要性を明らかにした。特にFAD含有酸化還元酵素はPEGカルボン酸を切断し、1ユニット短いPEGを生成することから、PEGの分解において鍵となる重要なステップである。本酵素遺伝子が他のPEG分解菌のPEGオペロンの下流に存在することからもその重要性が伺える。103株に見いだした小さいプラスミドは特に重要な遺伝子をコードしていないため潜在的 (Cryptic) プラスミドであると考えられるが、大腸菌とのシャトルベクターを構築できたので、このベクターを用いて103株においてタンパク質発現系を構築したり、当初の目的であるPEG分解プラスミドに相同組み換えを起こさせるための一次的遺伝子キャリアとしても応用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① (査読有り) Somyoonsap, P., Tani, A., Charoenpanich, J., Minami, T., Kimbara, K., Kawai, F., Involvement of PEG-carboxylate dehydrogenase and glutathione S-transferase in PEG metabolism by *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103., Appl. Microbiol. Biotechnol., 81(3):473-84. (2008)
- ② (査読有り) Tani, A., Somyoonsap, P.,

Minami, T., Kimbara, K. & Kawai, F. Polyethylene glycol (PEG)-carboxylate-CoA synthetase is involved in PEG metabolism in *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103. Arch Microbiol 189, 407-410. 2008

- ③ (査読無しレビュー) 谷 明生、河合富佐子、*Sphingopyxis*属細菌によるポリエチレングリコール (PEG) 分解機構、生物工学会誌 Vol185 (6), 267-269, 2007

[学会発表] (計2件)

- ① A. Tani, J. Charoenpanich, P. Somyoonsap, W. Rimwangtragool, K. Kimbara, F. Kawai, Xenobiotic polymer degradation by Sphingomonads. JSPS-NRCT Core university program on Development of thermotolerant microbial resources and their applications, Thailand, 2007. 10. 18-20, Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- ② P. Somyoonsap, A. Tani, K. Kimbara, F. Kawai, The physiological role of glutathione-S-transferase in the downstream of peg operon in *Sphingopyxis macrogoltabida* 日本生物工学会大会 平成19年9月25日 (火) ~27日 (木) 広島大学東広島キャンパス総合科学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

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
河合富佐子 (KAWAI Fusako)
京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル研究センター特任教授
研究者番号：60118007