

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651063

研究課題名（和文） クロロエテン類センサーキナーゼの構造・機能解明とバイオレメディエーションへの応用

研究課題名（英文） Structural and functional studies on Chloroethene sensor kinase and its application for bioremediation

研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：20224248

研究成果の概要（和文）：クロロエテン類は工場跡などにおける地下水・土壌の主要な汚染物質の一つであり、その簡便な検出や除去方法の開発は重要な課題である。本研究では、クロロエテン類完全分解活性を有する微生物コンソーシアより得たメタゲノムをから、既知のデハロココイデス属細菌由来クロロエテン類センサーキナーゼの遺伝子配列をもとにセンサーキナーゼ遺伝子を単離して組換え体発現系を構築し、その構造とクロロエテン類センシング能を解析した。

研究成果の概要（英文）：Chloroethene is one of the most serious pollutants of soil and underground water, and the construction of its detection and removal systems is a very important problem to be solved. In this study, genes of chloroethene sensor kinase were amplified by PCR with a primers set designed based on amino acid sequences of the known chloroethene sensor kinase using a metagenome prepared from a consortium dechlorinating chloroethene to ethene as a template. The obtained sensor kinase was expressed in *Escherichia coli* and their structures and function were studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：ヒスチジンキナーゼ、PAS ドメイン、2成分系伝達システム、クロロエテン、バイオレメディエーション

## 1. 研究開始当初の背景

築地市場の移転問題にみられるように、揮発性有機化合物(VOC)による土壌や地下水の汚染は大きな問題である。VOCの一つであるクロロエテン類はドライクリーニング洗剤や金属機械部品、半導体等の脱脂洗剤などに広く使用されており、土壌・地下水の主要な汚染源の一つとなっている。クロロエテン類の化学的検出はガスクロマトグラフィーなどで行われるが、オンサイトで分析を行う場合、より簡便な分析法の開発が重要である。近年、汚染源に存在する微生物の分解能力を

利用するバイオレメディエーションは低コストで効率的な浄化技術として注目されている。この方法では複数の難培養性絶対嫌気性菌の協調作用によって脱塩素化が行われるため、浄化サイトに存在する微生物の種類と量をモニターする手法の開発が重要である。これらの課題の解決のために、本研究課題では、微生物がもつクロロエテン類センサータンパク質を利用することを考えた。クロロエテン類を完全脱塩素化できる唯一の微生物は *Dehalococcoides* 属細菌である。これまでに、*Dehalococcoides ethenogenes*

Strain 195, *Dehalococcoides* sp. BAV1, *Dehalococcoides* VS が同定され、それぞれのゲノム解析がなされている。ゲノム解析の結果から、脱塩素化酵素遺伝子に隣接して、微生物に普遍的なシグナル伝達系である Two component 系遺伝子が存在することが明らかとなった。すなわち、各クロロエテン類化合物を特異的に結合するセンサーヒスチジンキナーゼ (SHK) が存在し、対応するクロロエテン類を結合して活性化して Response Regulator (RR) にリン酸基を転移させて DNA への結合を誘導することで、脱塩素化酵素の発現が誘導されることがわかった。これらの SHK はクロロエテン類を特異的かつ高感度に検出するため、その作用機構の解明は極めて重要である。しかし、*Dehalococcoides* 属細菌に関する研究はゲノムワイドの解析と微生物レベルの応用研究が多く、クロロエテン類 SHK に関する分子レベルの研究はこれまで報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Dehalococcoides* 属細菌由来クロロエテン類 SHK の遺伝子をクローニングして組換え体として大量調製し、構造生物学的な解析を行うことにより、その立体構造と機能、両者の相互作用を明らかにすることを目的とした。クロロエテン類をセンシング可能な SHK を発現できた際には、大腸菌の SHK とのキメラタンパク質によるクロロエテン類検出センサーを開発する。また、クロロエテン類 SHK は *Dehalococcoides* 属細菌に特異的に発現しているため、*Dehalococcoides* 属細菌の存在量を検出する良いターゲットになると考えられる。そこで、得られたクロロエテン類 SHK のキャラクタリゼーションができた場合には、センサードメインを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、*Dehalococcoides* 属細菌の免疫学的検出法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) クロロエテン類センサーヒスチジンキナーゼ (SHK) の遺伝子クローニングと組換え体の発現

*Dehalococcoides* 属細菌の単離培養は困難なため、実際にバイオレメディエーションが行われている汚染地から獲得した微生物コンソーシアより抽出したメタゲノムを鋳型として PCR を行った。これまでに *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195, *Dehalococcoides* sp. BAV1, *Dehalococcoides* VS 株のゲノム配列が決定されており、各株のゲノム中にはそれぞれ 10 種類以上のデハロゲナーゼ遺伝子とその発現制御を行う SHK 遺伝子が存在する。そこで、本研究では、①上記 3 株間で相同性が高い SHK である DET0301

と② *Dehalococcoides* sp. BAV1 株でビニルクロライドを分解するデハロゲナーゼと同定されている BvcA のセンサーキナーゼ遺伝子 (BAV-SHK) をターゲットとして、遺伝子をクローニングすることにした。DET301-SHK, BAV-SHK の塩基配列を基にプライマーを設計し、クロロエテン類完全分解活性を有し、*Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 に近縁な株を有すると考えられるコンソーシア獲得したメタゲノムを鋳型として PCR を行い、SHK 遺伝子を増幅させた。得られた遺伝子の塩基配列は DNA シークエンスによって確認し、各遺伝子を pET ベクターに挿入し、大腸菌による発現系を構築した。また、各 SHK においては、他の SHK タンパク質のアミノ酸配列との相同性をもとに、センサードメインとキナーゼドメインに分け、それぞれ単独での大腸菌発現系を構築した。

(2) SHK, SHK ドメインの精製

(1) で作製した全長 SHK ならびにセンサードメイン、キナーゼドメインの組換え体発現と精製を試みた。それぞれの遺伝子発現系に対して、宿主株の種類、培養温度、誘導条件、培地組成等の培養条件を検討し、可溶性画分への発現を試みた。可溶性画分に発現しない場合には、封入体として発現させた後、尿素によって可溶化し、尿素存在下でクロマトグラフィーによって精製後、透析によって尿素を除去して立体構造を形成させた。

(3) 各組換えタンパク質の生化学的的特性の解析

精製した組換え体タンパク質について必要な生化学的的特性を解析した。分子量・多量体形成の解析にはサイズ排除クロマトグラフィー-他角度光散乱法 (SEC-MALS)、二次構造解析には CD スペクトルを用いた。センサードメインについては対応するクロロエテン化合物との親和性を解析した。また、ヒスチジンキナーゼドメインについては触媒活性を調べた。

## 4. 研究成果

(1) クロロエテン類センサーヒスチジンキナーゼ (SHK) の遺伝子クローニングと組換え体の発現

① DET301-SHK の発現系構築

*Dehalococcoides* 属 BAV1 株・VS 株・CBDB1 株・GT 株と高い相同性 (いずれもアミノ酸配列レベルで 98% 以上) を有する *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 由来 DET301 をもとにプライマーを設計し、クロロエテン類完全分解活性を有する微生物コンソーシアから得たメタゲノムを鋳型として PCR を行った。得られた DNA 断片の塩基配列を決定したところ、DET301 と遺伝子レベルで 99.5%、アミノ酸レベルで 100% の相同性を示した。DET301-SHK はセンサードメイン

ンに PAS、PAC ドメインという、二成分制御系で広汎に見られるリガンド結合ドメインを有し、キナーゼドメインには、リン酸化されるヒスチジン残基を含む H-box、触媒ドメインの中には金属が結合する N-box、ATP 結合に關与する G1、F、G2-box が存在する。



図 1. DET301-SHK のアミノ酸配列。枠で囲まれた領域は右側に示すドメインを示す。

得られた DET301-SHK 遺伝子を pET23 のマルチクローニングサイトに導入し、大腸菌による発現系を構築したが、試みたいずれの条件においても、可溶性画分への発現は見られなかった。そこで、センサードメインとキナーゼドメインを分割した発現ベクターを構築した。精製を簡便に行うため、それぞれの N 末端領域には His-tag 配列を挿入した。それぞれを発現させたところ、キナーゼドメインは封入体として発現したが、センサードメインは可溶性画分への発現が確認された。

## ② BAV1-SHK の発現系構築

*Dehalococcoides* sp. BAV1 のビニルクロライドのデハロゲナーゼ遺伝子である *BvcA* (DehaBAV1\_0847) のすぐ下流に存在する SHK 遺伝子 DehaBAV1\_0848 のアミノ酸配列を基にプライマーを合成し、上述のメタゲノムを鋳型に PCR を行った。得られた DNA 断片は DehaBAV1\_0848 と塩基配列レベルで 100% の同一性を示した。得られた BAV1-SHK 遺伝子を pET23 のマルチクローニングサイトに導入し、大腸菌による発現系を構築したが、試みたいずれの条件においても、可溶性画分への発現は見られなかった。そこで、センサードメインとキナーゼドメインを分割し、それぞれ N 末端に His-tag を付加した発現ベクターを構築し、大腸菌による発現を試みたが、いずれの場合にも封入体として発現し、可溶性画分への発現は見られなかった。

## (2) SHK、SHK ドメインの精製

### ① DET301-SHK の精製

可溶性に発現した DET301-SHK センサードメインの精製を行った。DET301-SHK センサードメインを発現させた大腸菌を超音波破碎後、不溶性画分を遠心分離し、上清を Ni キレーティングカラムに吸着させ、イミダゾール濃度 50-100 mM の直線勾配で溶出させ、

SDS-PAGE でほぼ単一バンドになるまで精製した。収量は菌体 2.0 g から 22 mg であった。

### ② BAV1-SHK の精製

センサードメイン、キナーゼドメインともに封入体として発現させた後、8M 尿素で可溶化し、尿素存在下で Ni キレーティングアフィニティクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE でほぼ単一バンドとなるまで精製した。収量はセンサードメインでは菌体 3.3 g から 3.9 mg、キナーゼドメインでは菌体 3.3 g から 6.8 mg であった。

## (3) 各組換えタンパク質の生化学的特性の解析

### ① DET301-SHK センサードメインの構造と機能解析

DET301-SHK センサードメインの会合状態を SEC-MALS によって解析した(図 2)。

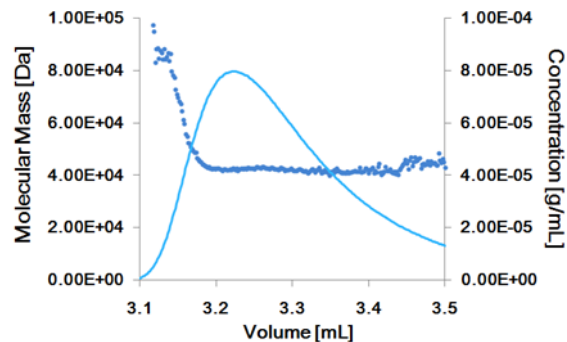


図 2. DET301-SHK センサードメインの SEC-MALS による解析。図の実線は DET301-SHK センサードメインの溶出曲線を示し、●は溶質の平均分子量の分布を示す。

DET301-SHK センサードメインの分子量は溶出ピーク全体にわたって均一であり、このことは DET301-SHK センサードメインが同一の会合状態をとることを示している。また、その分子量は 44 kDa であり、モノマーの分子量が 22 kDa であることから、DET301-SHK センサードメインは 2 量体を形成していることが明らかとなった。

次に、クロロエテン類との相互作用を解析した。センサードメインにテトラクロロエテン、トリクロロエテン、1,2-*cis*-ジクロロエテン、ビニルクロライドを DET301-SHK センサードメインの溶液に加え、トリプトファンの蛍光スペクトル変化を測定した。その結果、いずれの場合にも、トリプトファンの蛍光スペクトル強度が減少した(図 3)。これはクロロエテン類の添加によってセンサードメインのコンフォメーション変化が生じたことを示している。そこで、次に 1,2-*cis*-ジクロロエテンを 0.25、0.41、0.58、0.83 mM になるように加えたところ、加えた 1,2-*cis*-ジクロロエテン量に対応してトリプトファンの蛍光スペクトル強度が減少した(図 4)。以上のことから、DET301-SHK センサードメインはいずれのクロロエテン類も結合し、コンフォ

メーション変化を起こすことが示唆された。

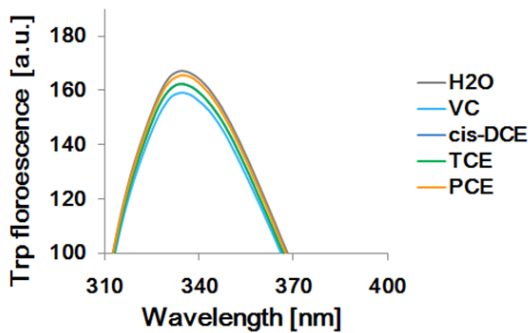


図 3. クロロエテン類の添加による DET301-SHK センサードメインの蛍光スペクトル変化。0.25mg/mL の DET301-SHK センサードメインに飽和クロロエテン溶液 1  $\mu$ L を添加し、295nm で励起し、長 310~500nm で測定した。蛍光分光光度計としては FP-6500 (JASCO 社) を用いた。

#### ② BAV1-SHK の構造と機能解析

センサードメインに関しては、DET301-SHK センサードメインと同様にトリプトファン の蛍光スペクトルによる測定したが、クロロエテン類の添加による吸収変化は見られなかった。また、キナーゼドメインの ATPase 活性を測定したところ、検出できなかった。

#### (4) 結論と今後の展望

本研究では、2 種類のクロロエテン類センサーキナーゼ遺伝子をクローニングし、全長およびセンサードメインとキナーゼドメインの大腸菌による発現系を構築した。そのうち、*Dehalococcoides* 属細菌に共通する DET301 センサーキナーゼのセンサードメインを可溶性画分に発現させ、種々のクロロエテン類を認識することを示した。残念ながら、500mM NaCl という高塩濃度条件でしか溶解せず、結晶化には至らなかった。しかし、本研

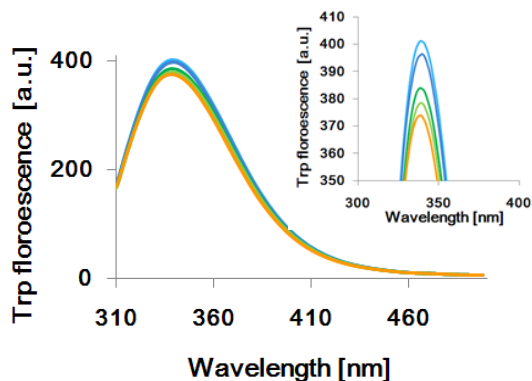


図 4. *cis*-ジクロロエテンの添加による DET301-SHK センサードメインの蛍光スペクトル変化。1.0 mg/mL の DET301-SHK センサードメインに終濃度が 0.25、0.41、0.58、0.83 mM となるように *cis*-ジクロロエテンを添加し、295nm で励起し、長 310~500nm で測定した。蛍光分光光度計としては FP-6500 (JASCO 社) を用いた。

究は *Dehalococcoides* 属細菌由来タンパク質を初めて組換え体として大量調製することに成功した例であり、かつ、クロロエテン類認識能を明らかにした点で重要である。今後、可溶化条件の更なる検討を行い、結晶構造解析を行うことにより、クロロエテン類センサーキナーゼを分子レベルで解明することが期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 3 件)

① M. Yohda, M. Kitajima, M. Iwamoto, N. Tamura, J. Shibasaki, S. Koike, M. Nishimura: Development of bacterial consortia enriched with a novel *Dehalococcoides* sp. that dechlorinates trichloroethene to ethene, 8th International Conference Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, 2012 年 5 月 22 日, Monterey, California, USA

② 武知文音、荒木智、前田悠貴、北嶋瑞樹、山中保明、野口恵一、尾高雅文、養王田正文: *Dehalococcoides* 属細菌由来クロロエテン類センサーキナーゼの発現と機能解析、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月 28 日、東京都小金井市、東京農工大学

③ 武知文音、荒木智、前田悠貴、北嶋瑞樹、山中保明、野口恵一、尾高雅文、養王田正文: *Dehalococcoides* 属最近由来クロロエテン類センサーキナーゼの発現と機能解析、生物学若手研究者の集い 夏のセミナー 2011、2011 年 7 月 16 日、山梨県笛吹市、春日井びゅうほてる

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号: 20224248

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

養王田 正文 (YOHDA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号: 50250105

野口 恵一 (NOGUCHI KEIICHI)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号: 00251588