

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：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510108

研究課題名(和文) 環境浄化システムで利用するビスフェノール類化合物分解菌の分子育種に関する研究

研究課題名(英文) Molecular improvement and application of *Sphingomonas bisphenolicum* strain A01 on the degradation activities of environmental pollutants.

研究代表者

松村 吉信 (Matsumura, Yoshinobu)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：40268313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は我々の研究室で単離したビスフェノール分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株の環境汚染浄化能の有効活用を目的とした。本株はビスフェノールAなどのフェノール類、ビフェニル類、有機塩素化合物などを分解する多機能な環境浄化株ではあるが、その能力は培養中に消失することがある。これは遺伝情報の不安定性と環境浄化酵素の不安定性に由来する。今回、A01株のドラフトシーケンスを明らかにし、複数のトランスポザージ遺伝子が遺伝上の不安定性に関与していることが明らかとなった。また、様々な環境汚染物質分解遺伝子が解読され、ビスフェノールA非分解株を分解株に育種することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the effective application of *Sphingomonas bisphenolicum* strain A01 and molecular improvement of its abilities. Strain A01 was isolated in our laboratory as a bisphenol A degradative bacterium and also degraded phenol, biphenyl, and organic halogen compounds. It is proposed that these talents of strain A01 is useful for bioremediation of polluted soil and water environments. Strain A01, however, easily lacked some these talents during the cultivation, because of its genomic instability and/or enzymatic oxidative instability of cytochrome P450 which was involved in degradation of pollutants. In this study, the draft sequence of strain A01 genome was determined and it was also clear that some transposon gene regions were involved in the genomic instability. Many genes encoded to bioremediation enzymes were identified, and it was successful that A01L recombinants by parts of these genes recovered their BPA degradation activities, although A01L could not degrade BPA.

研究分野：微生物学

キーワード：bioremediation nbisphenol A *Sphingomonas* sp. cytochrome P450 transposon genome structure
遺伝子組換え体 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、以前から環境ホルモン分解菌の単離とそれら菌株の特性解析を行ってきた。その中で、特に環境ホルモン活性の高いビスフェノール A (BPA) を分解し、炭素源およびエネルギー源として活用できる *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の単離に成功している。本株の特徴として、水飽和濃度の BPA (115 mg・L) を栄養豊富な環境下では 12 時間以内に、炭素/エネルギー源を BPA のみにした環境下では 120 時間以内に、HPLC 分析で検出限界以下にまで分解することが可能であった。このような特徴はこれまでに単離された BPA 分解菌の中では高分解活性型に分類される。さらに、AO1 株による BPA 代謝過程の解析から複数の代謝中間体を回収し、質量分析や NMR 解析をとおしてこれらの構造を解析した結果、BPA 分解の初発反応で BPA の水酸化が生じていることを究明し、この情報をもとに BPA 分解初発反応を触媒する cytochrome P450、フェレドキシン、フェレドキシンレダクターゼの精製に成功し、これら 3 者の内、cytochrome P450 とフェレドキシンの組合せが水酸化反応に重要となることを明らかにした。これら 3 者の酵素を合わせて cytochrome P450 monooxygenase システムと名付けている。さらに、これらの酵素のアミノ酸配列情報をもとに、cytochrome P450 とフェレドキシンの構造遺伝子のクローニングに成功している。このような分子レベルの研究結果とは別に、AO1 株の BPA 以外の合成化合物分解能調査も行った結果、AO1 株が多くのフェノール系化合物やビフェニル系化合物、一部の塩素系有機化合物をも分解可能であった。また、研究室で BPA 汚染土壌を作製し、AO1 株の環境浄化能を検証した結果、高い BPA 浄化能と BPA 浄化後の AO1 細胞の速い消失が確認された。以上を踏まえると、AO1 株は単独で合成化合物に汚染した環境の浄化に活用できるとともに、生態系に大きな負荷や影響を及ぼさないことを示した。このように AO1 株が環境浄化にとって有用な菌株であることは疑いのない事実ではあるものの、大きな問題点も抱えている。AO1 株の合成化合物分解能は、細胞ごとにあるいは培養ごとに大きく変化し、一部の培養時にはこの能力が消失することも経験している。つまり、AO1 株の欠点としてその高い分解能が非常に不安定である点が挙げられる。これまでの研究で予想される不安定要因は 2 つあり、(1) cytochrome P450 monooxygenase システムをコードする遺伝子の不安定性と (2) cytochrome P450 monooxygenase システムの酵素的不安定性がある。前者において、cytochrome P450 遺伝子 (*bisdB*) とフェレドキシン遺伝子 (*bisdA*) はオペロンを形成し、AO1 株の内蔵性プラスミド pBAR1 にコードされていた。この遺伝子の両側には *tnpA* タイプのトラン

スポゾンが逆平行に配置されている。この構造が *bisdAB* 遺伝子領域の不安定性を助長していると予想される。また、*bisdAB* 領域の欠失が確認された一部の pBAR1 について、その欠失領域を予備調査した結果、欠失領域は *bisdAB* 領域を越え、非常に大きな領域の欠失も確認された。これらの結果は pBAR1 にコードされているその他の遺伝子が *bisdAB* 領域の不安定性に関わっているとも予想される。後者の酵素不安定性においては、本酵素システム精製時に、その活性が非常に早く失活することを経験している。特に酸化(酸素)に対する抵抗性が低いと考えられた。このような 2 つの不安定要因の解消は AO1 株の利用において重要となっている。

2. 研究の目的

研究室では、環境ホルモンを含む様々な芳香族系合成化合物の環境汚染浄化システムの構築を目的としている。その中で、つくば市の田畑土壌で単離された *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株がビスフェノール A (BPA) をエネルギー源や炭素源として利用していることを見出し、本株が環境汚染浄化システムに適用可能であることを示している。これまでの研究で、AO1 株の BPA 代謝経路や BPA 以外の合成化合物分解能を調査し、様々な合成化合物を効率良く分解する能力を有していることは明らかとなっているが、その代謝系で最も重要となる cytochrome P450 monooxygenase システムをコードする遺伝子 (*bidAB*) が非常に不安定であり、実際に *bisdAB* が欠失し BPA 分解能を失った AO1L 株を培養中より単離している。このため、AO1 株の活用には AO1 株の遺伝子不安定性の解消が必要となる。また、cytochrome P450 monooxygenase システムを精製する過程で本酵素が容易に酸化失活することも見出していることから、cytochrome P450 monooxygenase システムの大量発現系の構築も必要であると考えられた。そこで本研究では、これら AO1 株が有する実用化に向けた欠点を克服するために、AO1 株の全ゲノム構造を明らかにし、*bidAB* 遺伝子領域の不安定性の要因を解明し、AO1 株の分子育種に取り組むこととした。また、*bidAB* 遺伝子をコードするプラスミド pBAR1 の遺伝子構造情報を基に、組換え型 (小型化) pBAR1 を構築し、*bidAB* 遺伝子および合成化合物分解に必要な pBAR1 由来遺伝子の安定性向上とその発現量の上昇を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株と培養条件

BPA 分解菌株 *S. bisphenolicum* AO1 株および BPA 非分解自然突然変異株 AO1L 株を用いて研究を進めた。また、組換えプラスミドの作製には、*Escherichia coli* HST02 株 (タカラバイオ社) および DH10B™ T1^r SA 株 (インビトロジェン社) を用いた。プラスミドには

大腸菌用クローニングベクターとして pUC19 (Ap^r) *Sphingomonas* 属 - *E. coli* シャトルベクターとして広宿主域ベクター-pJN105 (Gm^r, ParaBAD) を用いた。さらに、*bisdA*, *bisdB*, *bisdAB-bisdF-had-adh-lsd* 大量発現用組換えプラスミドとして、それぞれ、pJN105-His-bisdA、pJN105-His-bisdB、pJN105-*bisdAB-bisdF-had-adh-lsd* を構築して使用した。なお、pJN105-His-bisdA と pJN105-His-bisdB はそれぞれ *bisdAB* 遺伝子の上流に His-タグを連結した。

培地には L 培地 (10 g·L⁻¹ Bacto tryptone, 5 g·L⁻¹ Bacto yeast extract, 5 g·L⁻¹ NaCl, pH7.3 with NaOH) を基本培地として用いた。*Sphingomonas* 属細菌を培養する場合は 30、*E. coli* を培養する場合は 37 とした。液体培養では 100~160rpm の振盪培養とした。固形培地を使用する場合は 1.5% 寒天を添加した。必要に応じて、115 μg·mL⁻¹ BPA または 10 μg·mL⁻¹ ゲンタマイシン、100 μg·mL⁻¹ アンピシリンを添加した。アラビノース添加による ParaBAD からの遺伝子の発現誘導では、A₆₀₀=0.3 に培養が達した時点で終濃度 50 mM L-アラビノースを添加して培養を続けた。

(2) 遺伝子組換え体の作製

Sphingomonas 属細菌および *E. coli* の形質転換はエレクトロポレーション法を用いた。対数増殖期まで培養した細胞を集菌・洗浄後、10% グルセロール溶液に懸濁した。このエレクトロコンピテント細胞に DNA を氷中で混合後、0.1 cm 電極幅のキュベットで Eporater (Eppendorf 社) の 14 kV·cm⁻¹ の条件で印加した。その後、L 液体培地で 1.5 時間培養後、抗生物質入りの培地で組換え体を培養して取得した。

(3) 細胞からの DNA の回収と精製

細胞からのゲノム DNA の回収は Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega 社)、プラスミドの回収は Genopure Plasmid Midi Kit (Roche 社) を用いた。*E. coli* での組換えプラスミドの回収には Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega 社) を主に使用した。制限酵素後の DNA 断片の回収にはアガロースゲル電気泳動後、DNA 断片を 100 ppm の GelRed Nucleic acid gel stain 溶液 (Wako 社) で染色し、Safe Imager blue light transilluminator (Invitrogen 社) あるいは 365nm の紫外線で観察し、目的断片を含むゲルを回収後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) で精製した。20kb 以上の長鎖 DNA はパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で分離して、臭化エチジウムで DNA を染色後、Imager blue light transilluminator で観察した。DNA 回収は耐熱性 - アガラーゼを用いてアガロースゲルより回収した。

(4) PCR 法による DNA 断片の増幅

T-gradient サーマルサイクラー (Biometra 社) を、耐熱性 DNA ポリメラーゼには Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New

England Biolabs 社) を使用した。反応条件や反応液組成はプロトコルに従った。プライマーセットは増幅 DNA の塩基配列よりデザインし、オリゴ DNA の合成を受託した。必要に応じて、増幅 DNA は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) で精製した。

(5) その他の DNA 操作

DNA の連結には DNA ligase または In-Fusion HD Cloning Kit (TakaraBio 社) を用いた。DNA 切断には各種制限酵素を用いた。DNA の定量は Qubit® dsDNA BR assay kit (Life Technologies 社) を用いた。

(6) 次世代シーケンサーによる全ゲノム塩基配列決定

Illumina 社の MiSeq および Roche 社の GS FLX+ System で解読を行った。MiSeq では Nextera XT DNA Sample Prep Kit と MiSeq Reagent Kits v2 (300 bp) を用いた。GS FLX+ System では BGI JAPAN 社の De novo シーケンス解析サービスを用いた。得られた DNA 断片塩基配列情報は Newblar (Roche 社) あるいは CLC genomics workbench (CLC 社) でアッセンブルし、GenoFinisher (東北大学遺伝情報動態研究室) でフィニシング操作を行った。遺伝子構造の描写には MacVector (MacVector 社) を用いた。

(7) 細胞内タンパク質の分析

培養細胞を遠心分離処理 (4,00 x g, 10 分間, 4℃) で集菌し、50mM Tris-HCl (pH8.0) で洗浄後、ガラスビーズ法 (0.1mm ガラスビーズを使用し、4℃、4,500 rpm で 2 分間の攪拌処理) で細胞破碎し、その上清を細胞内画分、不溶性部分を細胞膜画分とした。タンパク質の分析は 4.5% アクリルアミド濃縮ゲル-12% アクリルアミド分離ゲルの SDS-PAGE 法で行った。タンパク質の染色は CBB R259 染色法で行った。なお、タンパク質濃度の測定は Qubit® protein assay kit (Life Technologies 社) を用いた。

(8) BPA 分解活性測定と BPA 定量法

休止細胞の BPA 分解活性は、培養細胞 (終濃度 A₆₀₀=4.0) をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、115 μg·mL⁻¹ を含む 50mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液に懸濁し、30℃ で 30 分間の分解反応を行う。氷中で分解反応を停止させ、BPA を酢酸エチル抽出し、遠心エバポレーターで乾固後、20% アセトニトリルに溶解した。本サンプルの BPA 量は C18-AQ カラムによる超高速液体クロマトグラムシステム (UHPLC) で、280nm の吸光量 (ピーク面積) で定量した。BPA の溶出は 20-100% アセトニトリルの直線の濃度勾配法で溶出させた。BPA 分解活性は BPA 分解速度を指標とした。

4. 研究成果

(1) A01 株の全ゲノム塩基配列決定

A01 株のゲノム構造の解析は、すでに当研究室でクローニングしていた *bisdAB* 領域を中心に行ってきたが、この領域が構造上非常に不安定であることが判明し、その構造の不

安定性の解消が必要となっていた。そこで、A01株の全ゲノムの塩基配列の決定を次世代シーケンサーで試みた。用いたシーケンサーはIllumina社のMiSeqシステムとRoche社のGS FLK+システムである。塩基配列解読後のアッセムブリーにはCLC genomics Newblerを用いたが、その後のフィニシングに用いるGenoFinisherがNewblerのデータしか扱えなかったため、アッセムブリーには主にNewblerを用いた。その結果、MiSeqの解読では総塩基数5,105,684bpで319個のコンティグが得られ、GS FLK+システムの解読では総塩基数5,100,996bpの98個のコンティグに集約された。また、両方のデータを加味してアッセムブリーした結果、総塩基数5,123,207bpで170個のコンティグに集約された。以上の結果より、ドラフトシーケンス結果としての解析にはGS FLK+システム単独でのアッセムブリー結果を用いることにした。

まず、Open reading frame (ORF) 検索を試みた。300bp以上のORFを検索したところ、23,017個のORFが確認され、Swiss-Protタンパク質データベースで相同性が確認されたORFは19,135個であった。一方ですでにゲノム構造が解明されている大腸菌では、総塩基数が約5Mbで遺伝子数は約5,000個と報告され、今回のA01株での結果が他のバクテリアに比べて非常に遺伝子数が多い。これは推定した遺伝子の多くが本来の遺伝子として機能していないものと予想された。そこで、今回の解析で1.8kb以上の914個のORFについてアノテーションを行ったところ、175個の遺伝子でデータベース上のアミノ酸配列との相同性が30%以上を示し、これらはA01株で遺伝子として機能しているものと推察された。また、300bp以上のORFを対象にDNA稼働に関連する遺伝子を検索したところ、接合伝達に関わる遺伝子が62個、トランスポザーゼ遺伝子が145個存在しており、遺伝子全体の少なくとも1%以上を占めているものと予想された。これは、大腸菌で確認されているトランスポザーゼが1~8個であるのに対して非常に多いものとなっている。A01株の遺伝子不安定性に大きく関与しているのかもしれない。

(2) プラスミド pBAR1 の遺伝子構造について

これまでの研究で4種類の内在性プラスミドの一つであるpBAR1にBPA分解酵素である*bisdAB*がコードされていることが明らかとなっている。そこで今回得られたゲノム断片配列を用いてpBAR1の全塩基配列の決定をGenoFinisherを用いて試みた。すでに一部領域が従来型のシーケンサーを用いて決定されていたため、その配列との統合も同時に行った。その結果、総塩基数が80,317bpであることが明らかとなった。また、pBAR1をPFGEで分離精製後、複数の領域でPCR増幅を試みた結果、塩基配列から予想される大きさと同じ大きさの増幅断片が確認されたことから、pBAR1の全塩基配列が決定された

ものと確認された。そこで、この配列を用いて遺伝子の推定を行った。データベースにはNCBIのnon-redundant protein sequencesデータベースを用いて、相同性30%以上を基準でORFの機能推定を行った。その結果、67個の遺伝子の機能が推定された(表1)。これらの中には、すでに明らかとなっているBPA水酸化酵素である*bisdAB*や、BPA分解に関わるアルデヒド脱水素酵素遺伝子(*adh*)、リグノスチルベン酸化酵素(*lsd*)、4-ヒドロキシ安息香酸酸化酵素、脱塩素酵素である塩素酸脱塩素酵素(*had*)が確認され、pBAR1が環境汚染物質分解に重要となるプラスミドであることが確認された。一方で、接合伝達に関わる遺伝子が21個、トランスポザーゼ遺伝子が14個確認された。なお、全ゲノム中で確認された大半の接合伝達に関わる遺伝子はpBAR1で確認され、pBAR1が接合伝達によって獲得されたものであると強く示唆された。また、トランスポザーゼ遺伝子の多くが塩基配列上の相同性が高いものが多く、この状態がpBAR1の遺伝子不安定性に関与しているものと推察された。

次に、A01L株との配列比較を行った。A01L株の全ゲノム塩基配列決定はMiSeqを用い、A01株のpBAR1にマッピングした。その結果、4箇所欠失が確認され、A01L株のpBAR1には、表1のNo1-2遺伝子、No.10遺伝子、No.23-40遺伝子、No.45-46遺伝子が欠失していた。このため、A01L株ではほとんどの環境汚染物質分解遺伝子が欠落していた。さらに、欠落部位の両端を解析するとその多くが、塩基配列上相同性の高いトランスポザーゼ遺伝子であり、A01株のDNA断片欠失にトランスポザーゼ遺伝子が強く関わっていることが示唆された。

(3) pBAR1 以外の内在性プラスミドの確認

PFGEにより、A01株のプラスミド確認を行った。その結果、250kbプラスミド、100kbプラスミド、80kbプラスミド、pBAR1が確認された。pBAR1以外のプラスミド断片を取得するため、それぞれのDNA断片の回収とクローニングを試みたが、目的のクローニング断片は得られず、pBAR1以外のプラスミドの塩基配列は決定できなかった。

(4) *bisdABF-had-adh-lsd* 組換え体によるBPA分解の向上に向けた研究

大腸菌を宿主として様々な方法を用いて*bisdAB*の大量発現を試みたが、活性型の酵素を発現させることはできなかった。そこで、宿主にA01株とA01L株を用い、*bisdABF-had-adh-lsd*の大量発現とBPA分解能を評価した。ベクターにはpJN105、遺伝子断片の連結にはIn-fusion cloning法を用いた。その結果、BPA非分解株であるA01Lを宿主とした場合、BPA分解能の復活が確認されたが、A01株でのBPA分解能の向上はほとんど認められなかった。今後、それぞれの遺伝子に含まれるプロモーターの改変が必要であろう。

表 1 pBAR1 の推定遺伝子一覧

No.	Gene	Locus	Putative function	Source	Identity (%)
1	<i>bisdA</i>	1:138	ferredoxin	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	100
2	<i>bidB</i>	393:1664	cytochrome P450 monooxygenase	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	98
3	<i>tnpA2a</i>	c1766:2560	transposase of IS6100	Gamma-proteobacteria	100
4	<i>tnpA7</i>	c2570:2923	transposase (partial)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100
5	<i>orf3</i>	3197:3571	hypothetical	<i>S. japonicum</i> BiD32	99
6	<i>orf4</i>	3568:3795	Xre-family transcriptional regulator (partial)	Proteobacteria	75
7	<i>orf5</i>	3896:4138	hypothetical	<i>Sphingobium</i> sp.	100
8	<i>orf6</i>	4131:4430	hypothetical	<i>Sphingobium</i> sp.	100
9	<i>trbN</i>	c4451:5566	muramidase TrbN (partial)	<i>S. japonicum</i>	100
10	<i>trbL</i>	c5566:7281	conjugal transfer protein TrbL	<i>S. japonicum</i>	86
11	<i>trbJ</i>	c7484:8239	conjugal transfer protein TrbJ	<i>S. japonicum</i>	100
12	<i>trbI</i>	c8265:9632	conjugal transfer protein TrbI	<i>S. japonicum</i>	98
13	<i>orf14</i>	c9645:10199	conjugal transfer protein TrbH	<i>S. japonicum</i>	99
14	<i>trbG</i>	c10421:11404	conjugal transfer protein TrbG	Sphingomonadaceae	87
15	<i>trbF</i>	c11421:12141	conjugal transfer protein TrbF (partial)	Sphingomonadaceae	99
16	<i>trbE</i>	c12128:14707	conjugal transfer protein TrbE	<i>S. japonicum</i>	97
17	<i>trbD</i>	c14704:15036	conjugal transfer protein TrbD	<i>Sphingobium</i> sp.	99
18	<i>trbC</i>	c15055:15435	conjugal transfer protein TrbC (partial)	<i>Sphingobium</i> sp.	99
19	<i>trbB</i>	c15449:16414	conjugal transfer protein TrbB	<i>S. japonicum</i>	91
20	<i>trbA</i>	c16521:16998	conjugal transfer protein TrbA	<i>Sphingobium</i> sp.	98
21	<i>tnpA3</i>	17650:20559	transposase Tn3 family protein	Sphingomonadaceae	100
22	<i>tnpR</i>	20561:21588	resolvase domain containing protein	<i>Sphingomonas wittichii</i>	93
23	<i>tnpA6</i>	21575:22549	transposase (partial)	<i>Sphingobium lactosutens</i>	94
24	<i>had1</i>	c22959:23831	haloacid dehalogenase-like hydrolase	<i>Sphingobium</i>	100
25	<i>pyc1</i>	c23831:25315	pyruvate carboxylase	<i>Sphingobium</i> sp.	100
26	<i>cps1</i>	c25308:26645	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding	<i>Sphingobium</i> sp.	100
27	<i>orf15</i>	c26642:27115	biotin carboxyl carrier protein	<i>S. japonicum</i> BiD32	99
28	<i>orf2</i>	c27112:28344	hypothetical	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	99
29	<i>orf1</i>	c28401:29288	3-keto-5-amino-hexanoate cleavage protein	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	99
30	<i>orf12</i>	c29285:29728	4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	100
31	<i>orf13</i>	c29777:30460	hypothetical	<i>S. japonicum</i>	99
32	<i>adh1</i>	c30500:31897	aldehyde dehydrogenase	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	100
33	<i>orf7</i>	c31957:32307	hypothetical	<i>Sphingobium</i> sp.	100
34	<i>lsd1</i>	c32304:33743	lignostilbene- α,β -dioxygenase	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	100
35	<i>orf8</i>	c34661:35062	transposase (partial)	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	81
36	<i>araC1</i>	c36151:37026	transcriptional regulator, AraC family	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	100
37	<i>bisdF</i>	37158:38339	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	<i>Sphingobium</i> sp. YL23	100
38	<i>int1</i>	c39202:40350	integrase-like protein	<i>Sphingobium</i> sp.	94
39	<i>tnpA2a</i>	c41342:42136	transposase of IS6100	Gamma-proteobacteria	100
40	<i>gmc1</i>	42184:42768	choline dehydrogenase (partial)	<i>S. japonicum</i>	100
41	<i>orf10</i>	c42757:43059	hypothetical	<i>S. japonicum</i>	98
42	<i>istB1</i>	c43168:43881	putative transposase	<i>Donghicola xiamenensis</i>	100
43	<i>tnpA4</i>	c43948:45189	putative transposase (partial)	<i>S. japonicum</i>	100
44	<i>tnpA5</i>	c45278:46045	transposase of IS6100	<i>Sphingobium wenxiniae</i>	95
45	<i>orf11</i>	46227:48737	TonB-dependent receptor	<i>S. japonicum</i>	100
46	<i>tnpA2b</i>	49032:49754	transposase of IS6100 (partial)	<i>Sphingomonas</i> sp. DC-6	100
47	<i>mpr</i>	50247:40981	zinc metalloprotease	<i>S. japonicum</i>	96
48	<i>orf12</i>	51684:52817	hypothetical	<i>S. japonicum</i>	93
49	<i>dam</i>	52885:53670	DNA methylase	<i>S. japonicum</i>	89
50	<i>orf13</i>	c54360:54656	hypothetical	<i>Sphingobium</i> sp.	81
51	<i>dnaG</i>	c55035:58394	DNA primase dnaG	<i>S. japonicum</i>	100
52	<i>traE</i>	c58661:60841	conjugal transfer protein	<i>S. japonicum</i>	100
53	<i>traG</i>	c61376c63268	conjugal transfer protein TraG	<i>S. japonicum</i>	100
54	<i>traI</i>	c63290:65689	conjugal transfer protein TraI	<i>S. japonicum</i>	97
55	<i>traJ</i>	c65625:66194	conjugal transfer protein TraJ	<i>S. japonicum</i>	67
56	<i>traL</i>	66709:67434	conjugal transfer protein TraL	<i>S. japonicum</i>	100
57	<i>traN</i>	c67905:68561	conjugal transfer protein TraN	<i>S. japonicum</i>	96
58	<i>parB</i>	c68655:69767	chromosome (plasmid) partitioning protein ParB	<i>S. japonicum</i>	91
59	<i>parA</i>	c69680:0465	chromosome (plasmid) partitioning protein ParA	<i>S. japonicum</i>	95
60	<i>korA</i>	c70423:0887	KorA protein	<i>Sphingobium</i> sp.	64
61	<i>klcA</i>	c71518:71982	antirestriction protein KlcA	<i>Sphingobium</i> sp.	88
62	<i>orf14</i>	c72271:73038	hypothetical	<i>Sphingobium</i> sp.	100
63	<i>tnpR</i>	c73661:74668	resolvase domain containing protein	<i>S. wittichii</i> RW1	93
64	<i>tnpA3</i>	c74670:77597	transposase Tn3 family protein	Sphingomonadaceae	100
65	<i>trbA</i>	78331:78708	conjugal transfer protein TrbA	<i>Sphingobium</i> sp.	98
66	<i>trbB</i>	78815:79171	conjugal transfer protein TrbB (partial)	<i>Sphingobium xenophagum</i>	94
67	<i>tnpA1</i>	73181:79924	transposase of IS6100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98

c.は相補鎖を示す。*bisdA* 領域を1番、*bisdB* 領域を2番として、塩基配列順に遺伝子を並べた。赤は環境汚染物質分解関連遺伝子、青は接合伝達関連遺伝子、緑は転移因子関連遺伝子、黄色はその他、灰色は機能未知遺伝子を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, José Ma Garcia-Arenzana, Y. Matsumura, M. Khodabandeh. Biodegradation of bisphenol A by the newly isolated *Enterobacter gergoviae* strain BYK-7 enhanced using genetic manipulation. RSC Advances, 査読有り, 5巻, 2015, 29563-29572.

DOI:10.1039/C5RA01818H

Y. Mstsumura, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori. Bioremediation of bisphenol-A polluted soil by *Sphingomonas bisphenolicum* A01 and the microbial community existing in the soil. Biocontrol Sci., 査読あり, 20巻, 2015, 35-42.

DOI:10.4265/bio.20.35.

松村吉信. *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株を用いたフェノール系化合物の生分解・生産と技術, 64巻, 2012, 66-70.

<http://seisan.server-shared.com/644/644-66.pdf>

〔学会発表〕(計7件)

中川直也、木場悟、松村吉信. *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株におけるビスフェノール A (BPA) 分解遺伝子の探索と BPA 分解能の安定化に向けた研究. 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会、2015/3/27、岡山大学(岡山県・岡山市).

木場悟、中川直也、松村吉信. *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株のゲノム構造解析とビスフェノール A 分解遺伝子組換え体による芳香族化合物分解能の調査. 第 66 回日本生物工学会大会、2014/9/11、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

木場悟、石田哲、松村吉信. Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株のゲノム配列の解析と A01 組換え体による BPA 分解能調査. 日本農芸化学会 2014 年度(平成 26 年度)大会、2014/3/28、明治大学(神奈川県・川崎市).

木場悟、石田哲、松村吉信. ビスフェノール A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株のゲノム構造解析. 第 65 回日本生物工学会大会、2013/9/20、広島国際会議場(広島県・広島市).

木場悟、上村真央、奥野将司、小田佳孝、土戸昇平、松村吉信. ビスフェノール A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株のゲノム構造解析. 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、2013/9/11、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・吹田市).

木場悟、上村真央、奥野将司、小田佳孝、松村吉信. *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株のゲノム構造解析. 日本農芸化学会 2013 年度(平成 25 年度)大会、2013/3/26、東北大学(宮城県・仙台市).

木場悟、上村真央、奥野将司、松村吉信. *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株のフェノール系化合物分解に関わるプラスミド pBAR1 の重要性. 第 64 回日本生物工学会大会、2012/10/24、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

http://biocontrol.life-bio.kansai-u.ac.jp/Microbial_Ecology/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

松村 吉信 (MATSUMURA, Yoshinobu)
関西大学・化学生命工学部・准教授
研究者番号: 40268313

(2)研究協力者

木場 悟 (KOBAYASHI, Satoru)
関西大学大学院・理工学研究科・大学院生

中川 直也 (NAKAGAWA, Naoya)
関西大学・化学生命工学部・大学生

石田 哲 (ISHIDA, Satoshi)
関西大学・化学生命工学部・大学生