

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18310050  
 研究課題名（和文） 貧栄養環境下でのPCB汚染除去のための新規光合成微生物の創出  
 研究課題名（英文） Creation of novel photosynthetic microorganism for degradation of PCB in oligotrophic environment  
 研究代表者  
 木村 成伸（KIMURA SHIGENOBU）  
 茨城大学・工学部・教授  
 研究者番号：90291608

研究成果の概要： 水や土壌中などに残留するポリ塩化ビフェニル（PCB）の汚染除去には、ビフェニル分解微生物を用いた生物的環境浄化が有効である。本研究では、PCB分解細菌 *Pseudomonas* sp. KKS102株の分解酵素系タンパク質 BphA1～A4 遺伝子を光合成微生物であるシアノバクテリア（ラン藻）に組み込んで、これまで困難であった貧栄養環境下でも光エネルギーを用いてビフェニル化合物を分解できる新規光合成微生物を創出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

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：環境修復技術、バイオレメディエーション、PCB、シアノバクテリア、光合成、タンパク質工学、基質特異性、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル（PCB）は残留性・毒性の高い環境汚染物質であり、中でも分子の平面性が高いコプラナーPCBは、毒性の強いダイオキシン類でもあることから、その分解・浄化の研究と実用化が求められている。現在保管・管理されているPCB等については熱分解をはじめとするさまざまな処理方法が開発されているが、土壌中など、環境中に低濃度で広く残留しているPCBの分解にはこれらの物理的、化学的処理法よりも、微生物を用いたバイオレメディエーション（生物的環境浄化）が有効な方法であると考えられ

ており、さまざまな芳香族化合物分解微生物が発見され、改良が進められている（図1）。

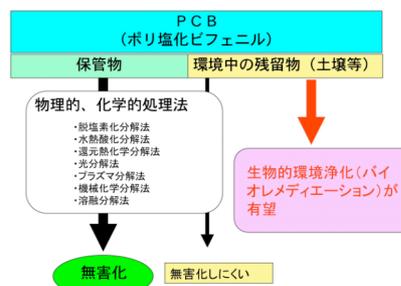


図1. PCBの処理法

土壌細菌の一種である *Pseudomonas* sp. KKS102 株は、PCB 分解細菌のひとつで、ビフェニル化合物分解酵素系をもつ (図 2)。

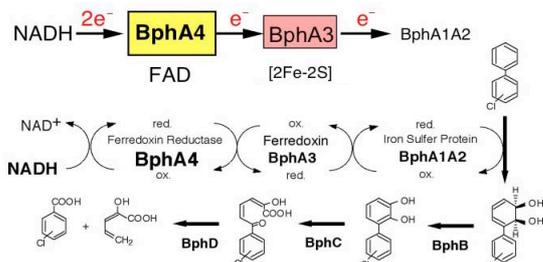


図 2 *Pseudomonas* sp. KKS102 株によるビフェニル化合物の分解経路と NADH からの特異的電子供給系

この分解系で PCB はジオキシゲナーゼ複合体 (BphA1A2) によるビフェニル骨格への酸素添加反応 (水酸化) に始まる一連の反応によって酸化分解される。最初の BphA1A2 による酸素添加反応には NADH からの電子の供給が不可欠であり、電子は NADH 特異的電子伝達系フラビン酵素である BphA4、Rieske 型フェレドキシンである BphA3 を経て BphA1A2 に供給される。NADH は生体内では主にグルコース (ブドウ糖) などを分解して TCA 回路などで生産される。したがって、糖などの炭素源に乏しい貧栄養環境下では PCB 分解効率が低く、低濃度の PCB 分解のためにわざわざ外部から炭素源を供給して分解を進めなければならないという問題があり、この問題の解決は貧栄養環境下での効率的な生物的環境浄化の実用化に向けての重要なキーポイントのひとつである。

## 2. 研究の目的

生体内で電子を供給する還元剤としては、NADH に分子構造がよく似た NADPH があり、NADPH は光合成系で多量に生み出される。そこで、ビフェニル化合物分解酵素系を NADPH 依存的に作り変えて、シアノバクテリア (ラン藻) や光合成細菌に導入できれば、炭素源の少ない環境下でも光エネルギーを利用して効率よく PCB 等のビフェニル化合物を分解できる生物的環境浄化システムが構築できると考えられる。また、このような生理的電子供与体に対する基質特異性の人為的改変によって光合成系と微生物の芳香族化合物分解系との連結が実現できれば、類似の電子伝達系を持つ微生物由来のベンゼン、トルエン、ナフタレン等の芳香族化合物分解系を光合成細菌内で機能させることも原理的には可能となり、将来的には PCB 等のビフェニル化合物のみならず、他の芳香族化合物汚染のバイオレメディエーションや、立体特異的なジオキシゲナーゼ反応を利用した精

密化学合成などへの応用も期待される。

このような全体構想の下、本研究では、*Pseudomonas* sp. KKS102 株の NADH 特異的な BphA4 を蛋白工学的的手法により NADPH 依存的に作りかえることによって NADPH 依存的なビフェニル化合物分解酵素系を構築し、シアノバクテリア (ラン藻) や光合成細菌に組み込んで、貧栄養環境下でも光エネルギーを用いて効率的に PCB 等のビフェニル化合物を分解できる新規光合成細菌株を創出することを目的とした (図 3)。

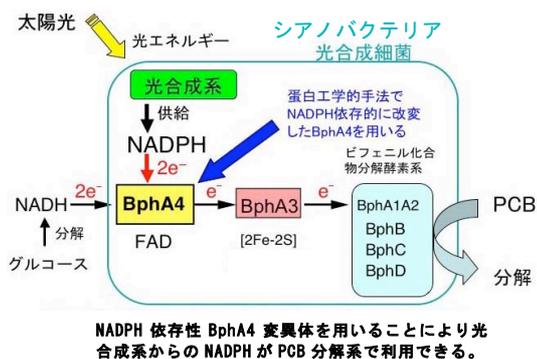


図 3 新規光合成細菌 (ラン藻) 株での光エネルギーを利用した PCB 分解 (概念図)

## 3. 研究の方法

### (1) BphA4、BphA3 の立体構造解析

蛋白工学的的手法によって NADH 特異的な BphA4 を NADPH 依存的に作りかえ、改良を進めるために必要な基礎データを得るために、BphA4 単独の精密立体構造、基質である NADH と BphA4 との複合体、BphA4 の特異的電子受容体タンパクである BphA3、および BphA4-BphA3 複合体の結晶化と X 線結晶構造解析を以下の方法で行った。

結晶化には、大腸菌を宿主として大量発現・精製した遺伝子組換え型 BphA4 および BphA3 を用いた。結晶化条件のスクリーニングは、Crystal Screen I & II (Hampton Research 社) および Wizard I & II (Emerald Bioresearch 社) を用いた初期スクリーニング結果を踏まえて、ハンギングドロップ蒸気拡散法 (好気条件下) およびシッティングドロップ蒸気拡散法 (嫌気条件下) で行った。NAD(H)-BphA4 複合体の結晶化はソーキング法で、BphA4-BphA3 複合体の結晶化は酸素を除去したグローブボックス内での NADH で還元した BphA4 と酸化型 BphA3 との嫌氣的共結晶化によって行った。

X 線結晶強度データは、高エネルギー加速器研究機構 (Photon Factory) で収集し、CCP4 suite を用いた分子置換法で構造決定を行った。BphA4-BphA3 複合体の双晶結晶構造の精密化には解析プログラム SHELXL を用いた。

## (2) NADPH 依存的 BphA4 変異体の作製

NADPH 依存的 BphA4 変異体の作製は、BphA4 の NADH 結合部位の立体構造と、NADH と NADPH との分子構造の差に基づいて、BphA4 の 175 番目と 177 番目のアミノ酸残基 (Glu175 と Gln177) に着目して 2 つの方法で行った。

一つは、Glu175 と Gln177 をそれぞれ特定のアミノ酸残基に系統的に置換した変異体を設計して作製して精製し、NADPH 依存的変異体を得る方法である (図 4)。

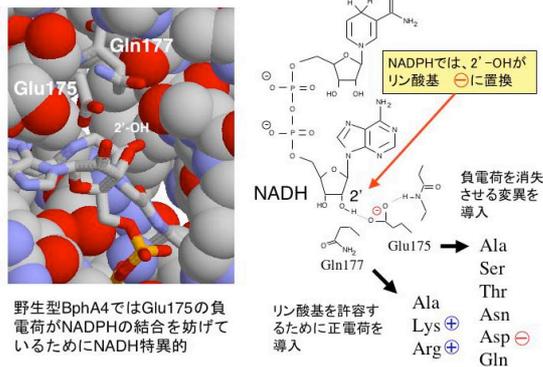


図 4 BphA4 の NADH 結合部位の立体構造 (左) とアミノ酸残基置換 (右)

もう一つは、Glu175 と Gln177 両方のアミノ酸残基をそれぞれ 20 種類のアミノ酸残基にランダムに置換する変異を導入し、400 通りの組み合わせを持つ変異体の中から NADPH 依存的変異体をスクリーニングする (選びだす) 方法である。

変異体 BphA4 遺伝子の作製は、PCR を用いた部位特異的変異導入法によって行った。変異体 BphA4 は、野生型 BphA4 (WT) の場合と同様な方法で大腸菌 JM109 株を宿主として遺伝子を大量発現させ、精製した。

ランダム変異導入では、変異導入部位に対応する塩基部分に A、T、G、C、4 種の混合塩基を用いた変異導入用プライマーを用いて発現用プラスミドを構築した。混合プラスミドで大腸菌 JM109 株を形質転換して得たシングルコロニーを 96 穴のマイクロプレート上で培養して発現誘導をかけた後、界面活性剤で溶出して抽出物を得た。NADH および NADPH を添加したときの抽出物のフェリシアン化カリウムの還元活性をマイクロプレートリーダーを用いて測定することによって、NADPH 依存的 BphA4 変異体発現株をスクリーニングした。得られた大腸菌株が保持するプラスミドの塩基配列を解析して導入されたアミノ酸残基置換を同定するとともに、変異体 BphA4 を精製した。

BphA4 の基質 (NAD(P)H) 特異性の変化は、フェリシアン化カリウムの還元反応における NAD(P)H に対するみかけの酵素動力学的パラメーター ( $K_m$ 、 $k_{cat}$ ) をミカエリスの式に従って算出して評価した。基質特異性は、NADH と NADPH に対する触媒効率  $((k_{cat}/K_m)^{NADH}$  および  $(k_{cat}/K_m)^{NADPH}$ ) の比、 $(k_{cat}/K_m)^{NADH/NADPH} = (k_{cat}/K_m)^{NADH} / (k_{cat}/K_m)^{NADPH}$  を求めて基質特異性の尺度とした。なお、この値が 1 よりも大きいときには NADH 特異的、1 よりも小さいときには NADPH 特異的であることを意味する。

## (3) シアノバクテリアへの BphA 遺伝子導入と導入遺伝子の発現確認

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株由来光依存的 *psbE* 遺伝子プロモーターのみを含む発現プラスミド pVE123、*psbE* プロモーター制御下に *Pseudomonas* sp. KKS102 株由来野生型 BphA1~BphA4 遺伝子を配置した発現プラスミド pVEA1234、pVEA1234 の BphA4 遺伝子の代わりに E175Q/Q177K 変異体 BphA4 遺伝子、E175C/Q177G 変異体 BphA4 遺伝子をそれぞれ持つ発現プラスミド pVEA1234QK および pVEA1234CG、並びに pVEA1234 の BphA4 遺伝子を欠失し、*psbE* プロモーター制御下に BphA1~BphA3 遺伝子のみを配置した発現プラスミド pVEA123 を PCR を用いて構築した。

*Synechocystis* sp. PCC6803 株への BphA4 遺伝子の導入は、pVZ 系プラスミドを用い、プラスミド R751 を保持する大腸菌との接合伝達を利用する Zinchenko らの方法によって行い、弱光条件下、BG11 培地で培養し、クロラムフェニコール耐性を持つ形質転換株を選抜した。

## (4) 変異導入シアノバクテリアの光依存的ビフェニル分解活性の測定

変異導入シアノバクテリア形質転換体をビフェニル存在下で培養し、培養液中のビフェニルの減少量を測定した。遠心して集めた菌体を、660 nm における吸光度 ( $A_{660}$ ) が 4 になるように BG11 培地に懸濁した。懸濁液 500  $\mu$ l をガラス瓶に入れ、35  $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  の光照射下 30°C で 15 分間前培養を行い、50 nmol のビフェニルを加えて培養を続けた後、3 M の塩酸を 3.5  $\mu$ l 加えて反応を停止させた。内部標準として 50 nmol のフェナントレンを加えて塩化ナトリウム存在下酢酸エチルで抽出し、硫酸ナトリウムで脱水処理後、上清を減圧乾固した。固形物を酢酸エチルに溶解し、ガスクロマトグラフィーにかけ、ビフェニルの残存量を定量した。また、BphA1A2 のジオキシゲナーゼ活性によって生成する水酸化ビ

フェニルは、トリメチルシリル (TMS) 化後、ガスクロマトグラフィーで分析した。TMS 誘導体は、マススペクトルによって同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) BphA4 および BphA3 の立体構造

NADPH 依存的電子伝達系構築の基礎データを得るために、野生型 BphA4 と、その生理的電子受容体タンパクである BphA3 について、その酸化型と還元型、および BphA3-BphA4 複合体の結晶化と X線結晶構造解析を行った。その結果、NADH-野生型 BphA4 複合体の解析結果から、野生型 BphA4 の NADH 結合部位の詳細な立体構造と、NADH の二リン酸部分が BphA4 との結合に重要であることが示唆された。また、BphA3-BphA4 複合体の結晶構造から、BphA4 から BphA3 への電子伝達経路が推定できた。BphA4 の基質特異性変換のための変異導入部位は BphA3-BphA4 間の接触部位から離れており、変異が BphA3 の特異的認識と BphA3 への特異的電子伝達機能に及ぼす影響が小さいことが示唆された (図 5)。

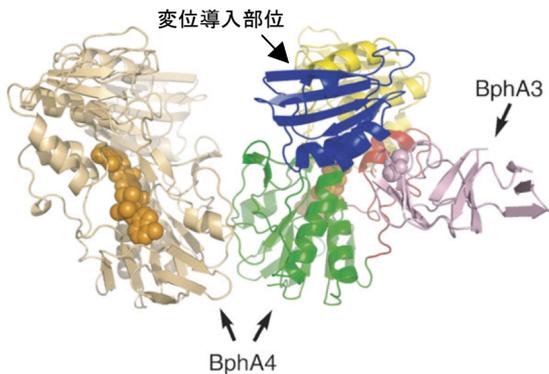


図 5 BphA4-BphA3 複合体の立体構造

##### (2) NADPH 依存的 BphA4 変異体の作製

野生型 BphA4 と NADH との複合体の立体構造解析の結果から、NADH 分子中のリボースの 2'-水酸基水素結合を形成することが明らかとなった Glu175 と、その近傍に位置する Gln177 を系統的に他のアミノ酸に置換した変異体の NADH と NADPH に対する酵素活性の特異性を図 6 に示す。

Glu175 を Glu と同様に負電荷の側鎖を持つアスパラギン酸 (Asp) に置換した変異体 (E175D) は、野生型 (WT) と同様 NADH 特異的であったが、Glu175 を側鎖に電荷を持たない、アミノ酸であるアラニン、トレオニン、アスパラギン、グルタミンにそれぞれ単独で置換した変異体 (それぞれ、A175A, T, N, Q) は、NADH と NADPH に対して同程度の酵素活性を示した。このことから、BphA4 の

Glu175 側鎖の負電荷が NADH に対する特異性に重要であり、野生型 BphA4 の NADH 特異性は、NADPH のリボース部分の 2'-リン酸基と Glu175 側鎖負電荷同士の静電的反発による NADPH の排除の結果であることが明らかとなった。また、この結果は、この静電的反発の除去が、BphA4 を NADPH 依存性に変換する上で有効であることを示す結果である。

これに対して、NADPH のリボース部分の 2'-リン酸基を静電的につなぎ止めることを意図して Gln177 を正電荷側鎖を持つアルギニン、リシンにそれぞれ置換した変異体 (Q177R, K) の特異性は、WT やアラニン変異体 (Q177A) の場合と同程度であった。ところが、175 位の電荷を消失させたうえで、175 位をリシンに置換すると、NADPH 依存性が高まる傾向がみられた。

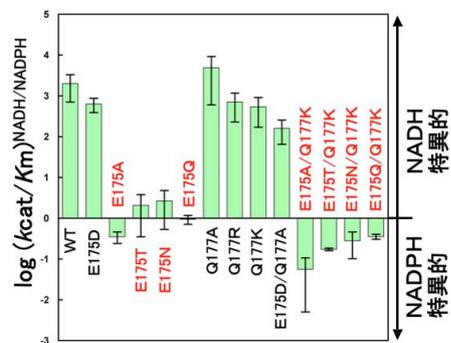


図 6 Glu175、Gln177 置換変異体の基質特異性

さらに NADPH 特異的な BphA4 変異体を得るために、175 位と 177 位アミノ酸残基にランダム変異導入を行い、96 穴マイクロプレートを用いた NADPH 依存的変異体発現株のスクリーニング系を構築して、変異体の選抜を行った。その結果、1,867 クローンの変異体発現株から、野生型の基質特異性を約 3,000 倍逆転した NADPH 依存的 E175C/Q177G 変異体を得ることに成功した。この変異体は NADH よりも約 20 倍 NADPH 特異的であった。

##### (3) シアノバクテリアへの BphA 遺伝子導入と光依存的ビフェニル分解活性の確認

BphA4, BphA3, BphA1A2 遺伝子をシアノバクテリアの光合成関連 *psbE* 遺伝子のプロモータ制御下に共発現するプラスミドを、自律的複製可能なプラスミド pVZ321 を用いて作製して、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株に導入した。得られた形質体内での光依存的 BphA 遺伝子群の発現と BphA 遺伝子産物の菌体内蓄積を BphA1~A4 特異的抗体を用いて確認した。BphA4 遺伝子として

NADPH 依存性の E175Q/Q177K 遺伝子を用いることにより、照射下、糖類を含まない貧栄養条件下で培養した菌体がビフェニルの酸化分解活性を示すことが確認できた (図 7)。この結果は、当初の目的通り、NADPH 依存性の BphA4 と BphA3, BphA1A2 をシアノバクテリアに組み込むことによって、貧栄養環境下でも光エネルギーを用いて PCB 等のビフェニル化合物を分解できることを初めて明らかにした結果であり、本研究の目的である新規光合成細菌株が創出できたことを意味している。

しかしながら、意外にも BphA4 遺伝子なしで、野生型の BphA3, BphA1A2 のみを組み込んだシアノバクテリアが高いビフェニル分解活性を示した。この結果は、シアノバクテリア内に BphA3 または BphA1A2 への電子供給系が存在することを示唆しており、極めて興味深い結果である。

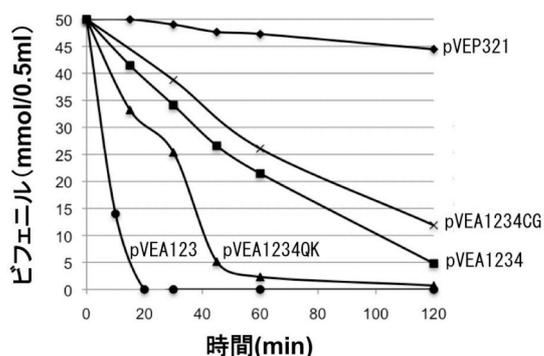


図 7 BphA 遺伝子導入シアノバクテリアによる培地中のビフェニル分解活性

以上のように、本研究ではシアノバクテリアを宿主に用いることによって貧栄養環境下でもビフェニルを分解できる新規光合成微生物を創出することができた。今後、PCB のみならず、貧栄養環境下での他の芳香族性環境汚染物質の生物的環境浄化への応用と展開が期待される。

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Senda, T., Senda, M., Kimura, S., Ishida, T. Redox control of protein conformation in flavoproteins. *Antioxid Redox Signal.* **11**, 1741-1766 (2009) 査読有
2. 千田美紀, 木村成伸, 福田雅夫, 石田哲夫, 千田俊哉, 反応中間体構造から明らかになった電子伝達タンパク質間の酸化還元依存性の親和性調節機構, *日本結晶学会誌*, **50**, 341-347 (2008) 査読無
3. 千田美紀, 木村成伸, 福田雅夫, 石田哲夫, 千田俊哉, 電子伝達タンパク質間の酸化還

元状態依存的親和性調節機構, *化学と生物*, **46**, 689-696 (2008) 査読無

4. Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., Senda, T. Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin. *J.Mol.Biol.* **373**, 382-400 (2007) 査読有
5. Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Senda, T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the electron-transfer complex of Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin and NADH-dependent ferredoxin reductase derived from *Acidovorax* sp. strain KKS102. *Acta Crystallogr.Sect.F*, **63**, 520-523 (2007) 査読有
6. Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Senda, T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the reduced Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin derived from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *Acta Crystallogr.Sect.F*, **63**, 311-314 (2007) 査読有
7. Senda, M., Kimura, S., Kishigami, S., Senda, T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin component of biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *Acta Crystallogr.Sect.F*, **62**, 590-592 (2006) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Nishizawa, A., Muramatsu, D., Kishigami, S., Kashino, Y., Senda, M., Senda, T., Fukuda, M., Kimura, S. Enzymatic properties of NADH/NADPH-specificity inverted BphA4 mutants from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 2008.12.12, 神戸市神戸ポートアイランド
2. 森重政, 村松大輔, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 部位特異的ランダム変異導入による NADPH 依存性の BphA4 変異体の作製, 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 2008.12.12, 神戸市神戸ポートアイランド
3. 千田美紀, 木村成伸, 福田雅夫, 石田哲夫, 千田俊哉, 電子伝達反応に伴って生じる FAD の構造変化が電子伝達タンパク質間の親和性を調節する, 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 2008.12.11, 神戸市神戸ポートアイランド
4. Senda, M., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., Senda, T. Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between ferredoxin reductase and ferredoxin. XXI

Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008), 2008.08.28. Grand Cube Osaka, Osaka

5. 森重政, 村松大輔, 西澤明人, 千田俊哉, 千田美紀, 福田雅夫, 木村成伸, 部位特異的ランダム変異導入による NADPH 依存的 BphA4 の選抜, 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 2008.06.10, 東京都江戸川区タワーホール船堀
6. Nishizawa, A., Muramatsu, D., Kimura, S., Kishigami, S., Senda, M., Senda, T., Fukuda, M., Inversion of NADH/NADPH-specificity of BphA4 from *Pseudomonas* sp. strain KKS102 by substitutions of Glu175 and Gln177. 16th Symposium on Flavins and Flavoproteins 2008, 2008.06.09. Palacio de Congressos, Jaca, Spain.
7. Senda, M., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., Senda, T. Molecular Mechanism of the redox-dependent interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and NADH/NAD<sup>+</sup>. 16th Symposium on Flavins and Flavoproteins 2008, 2008.06.09. Palacio de Congressos, Jaca, Spain.
8. 村松大輔, 岸上晋也, 上村卓哉, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, Glu<sup>175</sup> および Gln<sup>177</sup> の系統的置換による *Pseudomonas* sp. KKS102 株由来 BphA4 の NADH/NADPH 特異性の逆転, 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007) 2007.12.15. 横浜市パシフィコ横浜

[図書] (計 2 件)

1. Nishizawa, A., Muramatsu, D., Kishigami, S., Senda, M., Senda, T., Fukuda, M., and Kimura, S. Inversion of NADH/NADPH-specificity of BphA4 from *Pseudomonas* sp. strain KKS102 by substitutions of Glu<sup>175</sup> and Gln<sup>177</sup>. in *Flavins and Flavoproteins 2008* (Fargo, S., Gomez-Moreno, C., Medina, M. eds) pp.273-278, Prensas Universitarias de Zaragoza, Spain (2008)
2. Senda, M., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., and Senda, T. Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin. in *Flavins and Flavoproteins 2008* (Fargo, S., Gomez-Moreno, C., Medina, M. eds) pp.113-118, Prensas Universitarias de Zaragoza, Spain (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (1 件)

名称: 芳香族化合物分解能を有する光合成生物および芳香族化合物の分解方法

発明者: 木村成伸, 西澤明人, 菓子野康浩, 福田雅夫

権利者: 国立大学法人茨城大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2009-133311

出願年月日: 平成 19 年 6 月 2 日

国内外の別: 国内出願

[その他]

研究代表者情報

<http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/websearch/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 成伸 (KIMURA SHIGENOBU)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号: 90291608

(2) 連携研究者

千田 俊哉 (SENDA TOSHIYA)

産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・主任研究員

研究者番号: 30272868

菓子野 康浩 (KAHINO YASUHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号: 20221872

(3) 研究協力者

福田 雅夫 (FUKUDA MASAO)

長岡技術科学大学・工学部・教授

研究者番号: 20134512

西澤 明人 (NISHIZAWA AKITO)

茨城大学・産学連携イノベーション創成機構・非常勤研究員

研究者番号: 30466643