

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380050

研究課題名（和文） 環境汚染物質分解酵素系転写制御分子機構の解明と改変

研究課題名（英文） Characterization and modification of molecular mechanism for transcriptional regulation of the degradation enzyme system of an environmental pollutant

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）： 環境汚染物質ポリ塩化ビフェニル（PCB）の分解酵素が PCB 自体で誘導される分解菌の開発をめざし、強力分解菌ロドコッカス・ジョスティー RHA1 株で分解酵素誘導にかかわる 2 組の二成分制御系転写制御因子 BphS1T1 と BphS2T2 について転写制御機構の解明を行い、誘導基質存在下での BphS による BphT のリン酸化、分解酵素遺伝子群プロモータ領域に保存される 24 塩基の新たな共通配列を見いだした。更に 24 塩基配列が転写誘導に必須かつ十分な機能を有していることを明らかにし、BphT を含む転写複合体が結合する配列であると推定した。

研究成果の概要（英文）： *Rhodococcus jostii* RHA1 is a strong degrader of the environmental pollutant, polychlorinated biphenyls (PCBs). Induction of its degradation enzymes requires an inducing substrate and is conducted by a couple of two-component transcriptional regulators, BphS1T1 and BphS2T2. Mechanism of transcriptional regulation of BphS1T1 and BphS2T2 were examined to develop a strain whose PCB-degradation enzymes are induced by PCBs themselves. Phosphorylation of BphT (BphT1/T2) in the presence of the inducing substrate was indicated. A novel 24-bp consensus sequence was shared among the degradation enzyme gene operon promoters and had necessary and sufficient function for transcriptional induction by BphST, suggesting that the 24-bp sequence serves the binding site for the transcriptional complex including BphT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 強力ポリ塩化ビフェニル（PCB）分解菌ロドコッカス・ジョスティー (*Rhodococcus jostii*) RHA1 株はビフェニル分解酵素系による共代謝により PCB を分解するが、ビフェニル

ル分解上流酵素系を構成する 4 つの分解ステップにおいてそれぞれ複数の酵素が関与している。

(2) 上流酵素系の分解酵素遺伝子が 5 つのオ

ペロン (bphAa, bph) に分布しており、また、多様な芳香環化合物で分解酵素が誘導されるが、この誘導は二成分制御系に属する BphS1T1 と BphS2T2 の 2 組の転写制御因子による正の制御に由来することが明らかになっている。

2. 研究の目的

(1) 環境汚染物質である分解酵素が PCB 自体で誘導される分解菌の開発をめざし、分解菌 *R. jostii* RHA1 における分解酵素誘導にかかわる転写制御機構解明と誘導性の改変を目標として以下の事項を調べた。

- ① 二成分制御系で報告のあるセンサーキナーゼ (BphS1/S2 が相当) による応答レギュレーター (BphT1/T2 が相当) のリン酸化が BphST の制御にどのように関わるか。
- ② BphS1T1 と BphS2T2 の 2 組の制御因子の違いと相互作用。
- ③ BphS において基質特異性にかかわる領域。
- ④ BphST の制御を受ける分解酵素遺伝子群のオペロンのプロモーター領域に転写因子の結合に関連する共通の配列があるかどうか、また、共通の配列があればその機能は何か。

3. 研究の方法

(1) BphST 制御へのリン酸化の関与： BphST のシグナル伝達で予想される BphT のリン酸化は、培養菌体の粗精製タンパク質をリン酸化タンパク質の移動度低下が起こるフォスタグ電気泳動後、抗 BphT 抗体を用いたウェスタンブロット法により BphT のバンドを特異的に検出して調べた。転写活性化へのリン酸化の関与は、誘導基質や BphS の有無によるリン酸化と bphAa プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したリポーターシステムで測定した転写強度を比較して調べた。

(2) BphS1T1 と BphS2T2 の違いと相互作用： BphS1 及び BphS2 を挿入したプラスミドと bphAa プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したリポーターシステムをロドコッカス宿主ロドコッカス・エリスロポリス IAM1399 株に導入し、ルシフェラーゼ活性で示される転写強度を測定して BphS1 及び BphS2 の誘導基質特異性を調べた。また BphS1T2 及び BphS2T1 のハイブリッド遺伝子を挿入したプラスミドと上述のリポーターシステムをロドコッカス宿主に導入し、BphS1 及び BphS2 と BphT1 及び BphT2 の相互作用を調べた。

(3) BphS の基質特異性にかかわる領域： BphS1 及び BphS2 の両遺伝子で共通の制限酵素部位で、BphS1 及び BphS2 の N 末領域のアミノ酸配列を置換したハイブリッド遺伝子を構築して BphT を含むプラスミドに挿入し、前述のリポーターシステムと共にロドコッカス宿主に導入し、ビフェニルに対する誘導性の有無を調べた。

(4) プロモーター領域の共通配列： BphST の制御を受ける分解酵素遺伝子プロモーター領域の配列をマルチプルライメントにかけて共通配列を特定した。見いだした共通配列について点変異を網羅的に導入した配列を bphAa プロモーターの該当配列と置換した後、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したリポーターシステムにより転写活性を測定して点変異の効果を調べた。また BphST の制御を受けない安息香酸ジオキシゲナーゼ遺伝子の上流配列を共通配列に置換して共通配列単独の機能を調べた。共通配列への BphT の結合を調べるため、His タグ配列を N 末端に付加した HisBphT1 遺伝子を構築し、大腸菌で発現させて Ni カラムを用いて精製した。精製した HisBphT1 は共通配列を含む DNA 断片と一緒に保持した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いたゲルシフトアッセイにより結合性を調べた。細胞内での共通配列への転写複合体の結合は In-vivo フットプリンティング法により調べた。共通配列に結合する転写複合体タンパク質の回収は当初、抗 BphT 抗体を用いた免疫沈降法を試みた。最終的には共通配列を含む DNA を結合した磁気ビーズを用いて共通配列 DNA に結合するタンパク質を回収し、回収したタンパク質を二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して調べた。

4. 研究成果

(1) BphST 制御へのリン酸化の関与： BphT のリン酸化はビフェニルで誘導をかけた場合にのみ認められ、BphS 欠失株ではリン酸化は見られなかった。BphT が BphS と誘導基質に依存してリン酸化されて転写を活性化することが明らかになった。一方、BphS 欠失株でも一定の転写活性化が認められ、BphT 単独でも弱い転写活性化能があることが判明した (図 1)。BphS 欠失株ではリン酸化は見られなかったことから、リン酸化されていない BphT に弱い転写活性化能があると推測される。

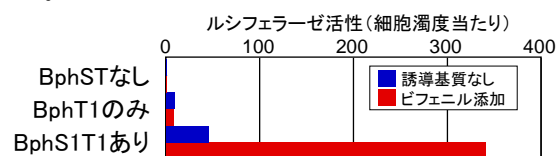


図1. BphT及びBphSTによる転写活性化

(2) BphS1T1 と BphS2T2 の違いと相互作用：BphS1T1 と BphS2T2 は共にベンゼンやトルエン、エチルベンゼン、キシレン類、クメン、シメンなどの多様なアルキルベンゼン類、塩化ベンゼン類で誘導性を示した。一方、ビフェニルでは BphS1T1 でのみ誘導性が認められ、BphS2T2 は誘導性を示さなかった。また、塩化ビフェニルでは誘導性は見られなかった。BphS1T2 のハイブリッドはビフェニルでもエチルベンゼンでも誘導性を示し、BphS2T1 のハイブリッドはエチルベンゼンで誘導性を示したがビフェニルでは誘導性が見られなかった。以上の結果から①誘導基質特異性は BphS に由来すること、②BphS1 と BphS2 は幅広い芳香族化合物に対して極めて似た誘導基質特異性を示すこと、③BphS1 のみがビフェニル誘導性を持つこと、④BphS1→BphT1 及び BphS2→BphT1 でも情報伝達のクロストークが起こり BphS1/S2 と BphT1/T2 の間の相互作用に特異性が低いことが明らかになった。リン酸化にかかわる結果を含め、BphS1T1 及び BphS2T2 について得られた結果を図2にまとめた。BphT1 及び BphT2 の遺伝子を共に不活化した二重破壊株を構築して誘導性を示した芳香族化合物に対する生育能を調べたところ、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、イソプロピルベンゼン、*o*-キシレン、ビフェニルで生育能が失われていた。これらの基質に対する代謝能は BphS1T1 及び BphS2T2 による誘導される酵素群によりもたらされることが明らかになった。BphS1T1 及び BphS2T2 は幅広い芳香族化合物の代謝を支配していることが示唆された。

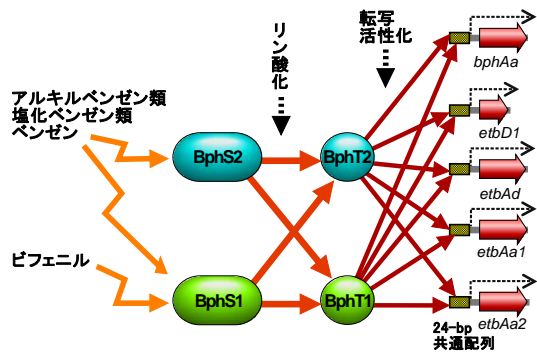


図2. BphS1T1及びBphS2T2による分解酵素遺伝子オペロンにかかわる転写制御機構

(3) BphS の基質特異性にかかわる領域：BphS1 及び BphS2 の N 末領域のアミノ酸配列を MunI で置換しても誘導基質特異性に変化はなかったが、BamHI 及び EcoRI で置換すると BphS1 の N 末領域を持つ BphS2 ハイブリッドはビフェニル誘導性を獲得し、BphS2 の N 末領域を持つ BphS1 ハイブリッドはフェニル誘導性を失った。この結果から MunI と BamHI に挟まれた領域が基質特異性決定に重要な役割を持つと推定された (図3)。

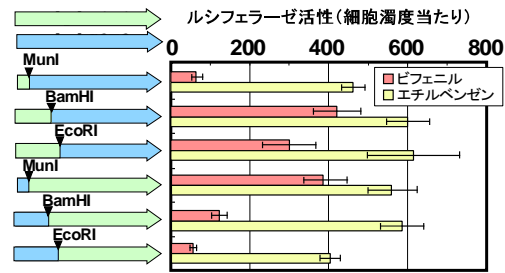


図3. BphS1及びBphS2のN末領域置換ハイブリッドタンパク質の誘導基質特異性

(4) プロモーター領域の共通配列：5つのオペロンの比較から転写開始点から平均33塩基上流に18塩基の共通配列が存在する事を見いだした。この共通配列は RHA1 株や類縁菌の類似分解酵素遺伝子クラスターの上流領域にも見られ、それらを含めてアラインメントしたところ共通配列は24塩基であることが示唆された (図4)。

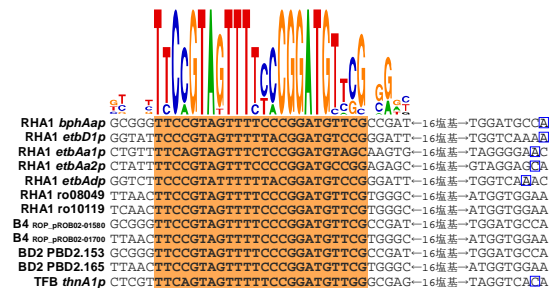


図4. 24塩基共通配列(太字)を含む配列のアラインメントとウェブロゴ表示(配列上)

右端の青枠は転写開始点を示し、菌株は以下の通り、RHA1, *R. jostii* RHA1株; B4, *R. opacus* B4株; BD2, *R. erythropolis* BD2株; TFB, *Rhodococcus* sp. TFB株

この24塩基のDNA配列に点変異を導入して転写活性の変化を調べたところ、誘導時だけでなく非誘導時の転写活性にも大きな変化が生じた。24塩基配列の内、特に上流側は誘導性に、転写開始点に近い下流側は転写活性自体に影響する傾向が認められ、24塩基配列の上流側と下流側で機能が異なることが示唆された。また24塩基の前後の配列の変異は転写活性に影響しなかった。この24塩基DNA配列自体が誘導基質存在下でのBphTによる転写誘導だけでなく、誘導基質非存在下でのBphTによる基礎レベルの転写活性化やBphTに依存しない転写活性にも関与していることが明らかになった。

プロモーター領域を欠失した安息香酸ジオキシゲナーゼ遺伝子上流に24塩基配列を連結して転写活性を調べたところ、BphSTによる転写誘導と誘導基質非存在下でのBphTによる基礎レベルの転写活性化に24塩基配列が必要十分であることが示唆された。

さらに、有害の農薬 DDT の環境中の分解産物である 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chloro-

phenyl)ethylene (DDE) 分解菌ヤニバクター (*Janibacter*) 属 TYM3221 株の DDE 分解酵素系遺伝子オペロンにも 24 塩基配列を見いだし、RHA1 株の BphS1T1 が転写誘導をもたらすことを見いだした。

ゲルシフトアッセイで 24 塩基共通配列への BphT の特異的結合は認められず、BphT は転写複合体を介して 24 塩基配列と相互作用すると予想された。BphT と誘導基質非存在下で 24 塩基配列における In-vivo フットプリンティングを行ったところ、フットプリンティングのパターンが BphT を保持する細胞と BphT を欠失した細胞とで明確に変化し、誘導基質存在下ではさらに異なるパターンとなった。この結果より、BphT あるいは転写複合体は誘導基質非存在下でも 24 塩基配列に結合して基礎レベルの転写活性化をもたらし、誘導基質存在下では結合のパターンが更に変化して高い転写活性を誘導することが示唆された。

以上の結果から、24 塩基共通配列が BphT を含む転写複合体と相互作用して転写活性化をもたらす、BphT の有無と BphT のリン酸化によりもたらされる転写複合体と 24 塩基共通配列との結合性=相互作用の強さに応じて転写活性化の強度が変わると推測された (図 5)。

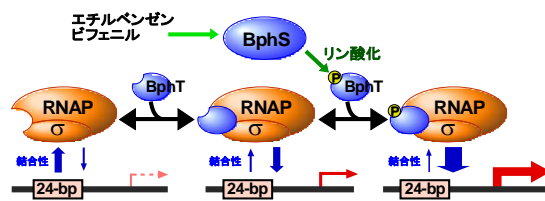


図5. BphST1による転写制御機構

抗 BphT 抗体を用いた免疫沈降法では BphT と転写複合体を形成する転写に関わるタンパク質を回収することは出来なかった。そこで 24 塩基共通配列を含む DNA を結合した磁気ビーズを用いてタンパク質を回収し、二次元ポロアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。RHA1 株と BphT1T2 を欠失した変異株と比較したところ、BphT 存在下に特異的に出現するタンパク質が認められた。これらのタンパク質に転写に関わるタンパク質が含まれると期待される。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① H. Takeda, J. Shimodaira, K. Yukawa, N. Hara, D. Kasai, K. Miyauchi, E. Masai, M. Fukuda, Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound

degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1, *J. Bacteriol.*, 査読有, Vol. 192, No. 18, 2010, pp.4741-4751.

DOI: 10.1128/JB.00429-10.

- ② J. Shimodaira, Y. Furusawa, Y. Miyazawa, D. Kasai, K. Miyauchi, E. Masai, M. Fukuda, The 24-bp consensus sequence responsible for regulation of the BphS1T1 two-component system in a hybrid promoter, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol. 113, No. 3, 2012, pp.279-285.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.021.

- ③ P.A.T. Nguyen, T.H.T. Trinh, Y. Fukumitsu, J. Shimodaira, K. Miyauchi, M. Tokuda, D. Kasai, E. Masai, M. Fukuda, Gene cluster and regulation system for 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE) degradation in *Janibacter* sp. TYM3221, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol. 116, No. 1, 2013, pp.91-100.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.007.

[学会発表] (計 13 件)

- ① M. Fukuda, Development of a PCB degrading microorganism, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012), 2012 年 09 月 18 日, Daegu (Korea)

- ② M. Fukuda, J. Shimodaira, K. Miyauchi, H. Takeda, D. Kasai, E. Masai, Induction mechanism of biphenyl/PCB-degradation pathway in a *Rhodococcus* degrader, Environmental Microbiology and Biotechnology in the frame of the Knowledge-Based Bio and Green Economy (EMB2012), 2012 年 4 月 10 日, Bologna (Italy).

- ③ J. Shimodaira, Y. Miyazawa, Y. Furusawa, H. Takeda, D. Kasai, K. Miyauchi, E. Masai, M. Fukuda, The essential sequence for transcriptional regulation of biphenyl/polychlorinated biphenyls-degradation gene promoters in *Rhodococcus jostii* RHA1, International Union of Microbiological Societies (IUMS 2011), 2011 年 09 月 06 日, 札幌

- ④ P.A.T. Nguyen, Y. Sato, T. Iwasaki, K. Miyauchi, D. Kasai, E. Masai, M. Fukuda, Characterization of 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethylene (DDE) degradation enzyme system in the strain *Janibacter* sp. TYM3221, International Union of Microbiological Societies (IUMS 2011), 2011 年 09 月 06 日, 札幌

- ⑤ J. Shimodaira, Y. Miyazawa, Y. Furusawa, H. Takeda, D. Kasai, K. Miyauchi, E. Masai,

M. Fukuda, Regulatory mechanism of biphenyl/PCB-degradation gene transcription in *Rhodococcus jostii* RHA1, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2010), 2010年09月14日, Rimini (Italy)

[その他]

ホームページ等

<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~fukuda-1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

笠井 大輔 (Kasai Daisuke)

長岡技術科学大学・工学部・助教

研究者番号：80452085

(3) 連携研究者

なし