

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850067

研究課題名(和文) 微生物が獲得したフッ素代謝能力の解明と応用

研究課題名(英文) Analysis and application of microbial acquired fluorometabolism

研究代表者

岩井 伯隆 (Iwai, Noritaka)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：80376938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究担当者らは、天然には存在しないフッ素化合物ベンゾトリフルオリドを分解・脱フッ素化する微生物、ロドコッカス属細菌を発見し、そのフッ素化合物代謝機構について調べてきた。この菌は、イソプロピルベンゼン代謝クラスターとよく似た遺伝子群btf遺伝子を保有し、これらの遺伝子が脱フッ素化に関与していることを明らかにしてきた。詳細な解析の結果、ベンゾトリフルオリドの脱フッ素化はBtfAとBtfB反応によるカテコール化と塩基性環境による自発的な脱フッ素化によることが明らかとなった。また、酸性条件下でBtfC反応を導入することでカテコールから新しいフッ素化合物へ変換できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We discovered *Rhodococcus* sp. 065240, which degrades the benzotrifluoride through defluorination. As a result of molecular biological analysis, it was found that this strain possesses btf gene cluster, which is similar to isopropyl benzene degradation cluster. Those genes were related to benzotrifluoride defluorination that suggested by experiments of btf genes deletion mutant. Confirmation of using heterologous btf genes expression in *Corynebacterium glutamicum* found that oxidation reaction of benzotrifluoride which catalyzed by BtfA and BtfB, produced trifluoromethyl catechol. Then, basic condition of culture seems to lead spontaneous defluorination of catechol compound. Therefore, it was suggested that applying btfC gene under acidic condition with btfAB not only suppresses defluorination but also transforms benzotrifluoride to new fluorometabolite.

研究分野：応用生物化学

キーワード：フッ素化合物 芳香族代謝 ロドコッカス属細菌 環境微生物

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、環境問題や資源問題の観点から、フッ素化合物を生分解し無機のフッ化物イオンへと変換できる微生物の探索を進めてきた。その中で、ロドコッカス属細菌やストレプトミセス属細菌に芳香族系のフッ素化合物を分解できる能力を見出した。特にロドコッカス属細菌では、フッ素が多置換したベンゾトリフルオリド(トリフルオロメチルベンゼン)を分解・脱フッ素化する能力を見出した。

フッ素化合物を脱フッ素化する酵素の報告例はほとんどなく、そのメカニズムも不明であることから、ロドコッカス属細菌における脱フッ素化反応を触媒する酵素の解明を目指した。トリフルオロメチルベンゼンを分解の基質として、ロドコッカス属細菌の培養液に添加することで、数種類のタンパク質の発現が誘導されることを、タンパク質の二次元電気泳動解析結果から見出した。このタンパク質それぞれのスポットを質量分析(MALDI-TOF-MAS)で解析した結果、イソプロピルベンゼン代謝に関連する酵素ホモログを複数見出した。

### 2. 研究の目的

「微生物が獲得したフッ素代謝能力の解明と応用」は、これまで有機化学的手法によってのみ合成されてきたフッ素化合物について、生物機能を利用することで、合成困難な骨格構造にフッ素を導入した新しいフッ素化合物の創製法を確立することを目的とする。特に、芳香族代謝経路のような環境微生物が独自に持つ代謝経路を応用することで、トリフルオロメチル化したカテコール類やムコン酸、ラクタム化合物などを生成し、新しい生理活性化合物の開発に寄与できる構造を創出する。また、代謝途中のケト有機酸を利用することで、フッ素導入された新しいアミノ酸など合成困難な含フッ素生体材料の合成法を開発する。ベンゾトリフルオリドを脱フッ素化できる微生物として見いだされたロドコッカス属細菌は、芳香族代謝関連遺伝子群をベンゾトリフルオリド添加時に発現しており、この遺伝子産物がフッ素化合物の代謝に関連していることが示唆された。本研究では、この遺伝子の詳細な解析を足掛かりにフッ素化合物の生体による認識および反応のメカニズムを明らかにし、上記目的の達成を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ベンゾトリフルオリド代謝遺伝子 *btf* クラスターの同定

タンパク質の二次元電気泳動結果から見出したベンゾトリフルオリド代謝に関連する候補タンパク質について、相同遺伝子配列をもとにプライマーを作成し、PCRによる遺伝子の増幅を行った。増幅したDNA配列につ

いては塩基配列の決定とクローニングを進めた。

#### (2) 脱フッ素化欠損変異株の分離と遺伝子破壊株の作製による、フッ素化合物代謝遺伝子の特定

紫外線照射によりDNA変異を誘導したロドコッカス属細菌のスクリーニングを行い、脱フッ素化能を失った株を分離した。この株の *btf* クラスター遺伝子配列をシークエンスし、変異点の解析を行った。また、*btf* 遺伝子によるベンゾトリフルオリド脱フッ素化能の相補試験を行った。ロドコッカス属細菌について、自殺遺伝子による二回相同組換えを利用した遺伝子破壊技術の構築を行い、脱フッ素化に関与すると考えられた *btf* 遺伝子について破壊株の構築を行った。また、ゲノムの分離・精製を進め、次世代シーケンサーによるゲノム配列の解読を行った。

#### (3) 異種発現系を用いた、酵素反応の追跡と反応産物の同定

ロドコッカス属細菌の近縁種でかつ、フッ素化合物を代謝できないコリネ型細菌を宿主として、*btf* 遺伝子の組換え発現株を構築し、各酵素反応の進行を追跡し、それぞれの酵素反応産物を単離・精製した。さらにその化合物の核磁気共鳴スペクトルや質量分析を行い、構造を同定した。

### 4. 研究成果

(1) タンパク質の二次元電気泳動解析を行うことで、ベンゾトリフルオリド存在下に誘導されるタンパク質としてイソプロピルベンゼン代謝酵素と相同性の高いタンパク質を複数見出してきた。この結果にもとづき、イソプロピルベンゼン代謝クラスターとして報告されている遺伝子全て(4反応に関わる代謝遺伝子7種、検出制御遺伝子2種、合計9遺伝子)について、プライマーを作成しPCRによる遺伝子の増幅を試み、全ての遺伝子のホモログをロドコッカス属細菌が有していることを明らかにした。(図1)塩基配列およびアミノ酸配列に差異が認められたことから本遺伝子を *btf* 遺伝子と命名し、その機能解析を進めるためにそれぞれの発現プラスミドを構築した。

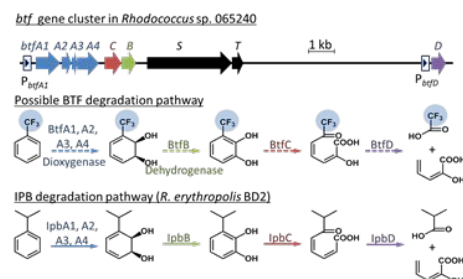


図1: *btf* 遺伝子クラスター

一番上段は *btf* 遺伝子の配座、中段は推定される反応機構、下段は相同性の高いイソプロピルベンゼン遺伝子代謝経路

(2) 紫外線照射により構築したロドコッカス属細菌の変異株集団から、顕著に脱フッ素化能を失った株を一株分離した。この株は *btf* クラスターの発現制御に関わる二成分制御系遺伝子 *btfT* 内に点変異が見いだされた。プラスミドによる *btfT* 相補試験の結果、脱フッ素化能は回復し、*btf* クラスターが脱フッ素化に参与していることが強く示唆された。

近縁のコリネ型細菌で自殺遺伝子として機能することが知られている *sucB* 遺伝子を用いた二回相同組換え法をロドコッカス属細菌に応用し、遺伝子破壊技術を構築した。その結果、*btfA* (*A1, A2, A3, A4*)、*B*、*C*、*D* 遺伝子それぞれの破壊株を構築することに成功した。これらの株を用いた脱フッ素化試験から、脱フッ素化には *btfA* (*A1, A2, A3, A4*) および *btfB* が強く関与していることが明らかとなった。(図2)

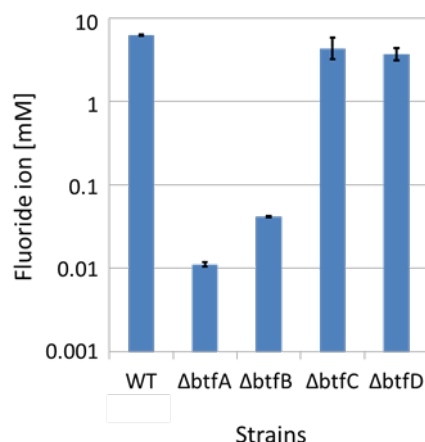


図2 : *btf* 遺伝子破壊による脱フッ素化試験  
縦軸は培養液中のフッ化物イオン濃度を示し、ベンゾトリフルオリドの分解度合いを表す。WT は野生株、株はそれぞれの遺伝子破壊株を用いた結果を示す。

ロドコッカス属細菌のゲノムを分離・精製し、次世代シーケンサーによる全ゲノムの塩基配列をシーケンスした。ドラフトゲノムシーケンス結果から、確かに *btf* 遺伝子の存在が確認された。また、他にも芳香族代謝に関連する遺伝子が *btf* クラスターを含めてゲノム内に 28 カ所に散在し、複数の芳香族代謝遺伝子がベンゾトリフルオリド代謝に参与する可能性も示唆された。図2の結果において、*btfC* や *btfD* の欠損株でも脱フッ素化が進行した理由として、相同的に機能する遺伝子の存在の可能性もあることから、ベンゾトリフルオリド代謝能を持たない宿主を用いた異種発現や試験管内酵素反応による反応の確認が必要であると考えられた。

(3) ゲノム配列情報からロドコッカス属細菌が複数の芳香族代謝遺伝子をコードしていることが分かり、ベンゾトリフルオリド代謝における *btf* 遺伝子の役割を明確にするた

めに、ベンゾトリフルオリド代謝能を持たないコリネ型細菌を用いた *btf* 遺伝子の異種発現による反応解析を進めた。その結果、*btfA* (*A1, A2, A3, A4*) 遺伝子発現株では、ベンゾトリフルオリドが反応し、高速液体クロマトグラフィーにより単一のピークの上昇が認められた。この物質を精製し核磁気共鳴スペクトルの測定と質量分析を行った結果、図1に示した反応通りベンゾトリフルオリドを酸化したジヒドロジエン化合物であることが明らかとなった。また、この化合物を基質として用いて、*btfB* 遺伝子発現株を用いる事でカテコール化合物への変換が確認された。また、長時間の培養によってカテコール化合物は効率よく脱フッ素化されることも明らかになった。単離したカテコール化合物は菌体非存在下においても塩基性条件下では脱フッ素化されることが明らかとなり、ベンゾトリフルオリドの脱フッ素化は、*btfAB* によるカテコール化と培養液の塩基性環境による自発的な脱フッ素化によって引き起こされることが示唆された。また、酸性条件下ではカテコールの脱フッ素化が抑えられることから、*btfC* の導入が脱フッ素化効率を下げることから、*btfC* はベンゾトリフルオリドを脱フッ素化させずに新しいフッ素化合物へと変換できる酵素であることが明らかとなった。

以上から、本研究「微生物が獲得したフッ素代謝能力の解明と応用」では、天然には存在しないベンゾトリフルオリドを基質として代謝することができる新しい遺伝子クラスター *btf* 遺伝子クラスターを見出し、フッ素化合物を脱フッ素化する方法として *btfAB* によるカテコール化と塩基性環境が重要であることを見出した。また、新しいフッ素化合物を創出する系として *btfABC* や *btfABCD* を用いた変換系が有効であることを示唆した。

## 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 1 件)

Yano K, Wachi M, Tsuchida S, Kitazume T, Iwai N, Degradation of benzotrifluoride via the dioxygenase pathway in *Rhodococcus* sp. 065240, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、2015 79(3):496-504

〔学会発表〕(計 9 件)

佐々野 晴花、矢野 憲一、岩井 伯隆、和地 正明、コリネ型細菌を用いたロドコッカス属細胞由来 *btf* 遺伝子群によるベンゾトリフルオリドの脱フッ素化機構の解析、日本農芸化学会大会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17~20 日、京都女子大学(京都府)

佐々野 晴花、矢野 憲一、岩井 伯隆、和地 正明、Elucidation of defluorination

pathway of benzotrifluoride by heterologous expression of the *Rhodococcus btf* genes in *Corynebacterium glutamicum*, 韓国生化学会ポストゲノム研究国際会議合同大会、2016年8月22~23日、慶州(韓国)

佐々野 晴花、矢野 憲一、岩井 伯隆、和地 正明、有機フッ素化合物分解遺伝子の異種発現と機能解析、第14回微生物研究会、2015年10月31日、明治大学(神奈川県 生田)

佐々野 晴花、矢野 憲一、岩井 伯隆、和地 正明、有機フッ素化合物分解遺伝子の異種発現と機能解析、第67回日本生物工学会大会、2015年10月26~28日、城山観光ホテル(鹿児島県)

矢野 憲一、岩井 伯隆、和地 正明、ベンゾトリフルオリドを新規フッ素化合物へと変換する微生物の解析、ゲノム微生物学会、2015年3月6日、神戸大学(兵庫)

Kenichi Yano, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi、BIODEGRADATION OF BENZOTRIFLUORIDE AND TRIFLUOROPROPIONIC ACID BY *Rhodococcus* sp、2014 International Symposium on Advanced Biological Engineering and Sciences (ISABES' 2014)、2014年9月2日~3日、精華大学(北京・中国)

岩井 伯隆、矢野 憲一、渡辺 洋介、北爪 智哉、和地 正明、ロドコッカス属細菌によるフッ素化合物の代謝、日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学(神奈川)

岩井 伯隆、矢野 憲一、渡辺 洋介、北爪 智哉、和地 正明、ロドコッカス属細菌を用いたフッ素化合物の分解と新規物質生産、微生物研究会、2013年10月5日、東京電機大学(東京)

岩井 伯隆、矢野 憲一、渡辺 洋介、北爪 智哉、和地 正明、ロドコッカス属細菌を用いたフッ素化合物の分解と新規物質生産、日本生物工学会、2013年9月19日、広島国際会議場(広島)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩井 伯隆 (IWAI, Noritaka)  
東京工業大学・生命理工学院・助教  
研究者番号：80376938

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究

なし

##### (4) 研究協力者

和地 正明 (WACHI, Masaaki)  
山崎 孝 (YAMAZAKI, Takashi)