

平成 29 年 2 月 24 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550066

研究課題名(和文)自然界に拡散しない環境修復機能強化型の人工細菌育種

研究課題名(英文) Biocontainment of genetically modified bacterium by programmed bacterial cell death.

研究代表者

原 富次郎 (HARA, TOMIJIRO)

山形大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70616193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、内分泌攪乱物質として著名なポリ塩化ビフェニル類(PCBs)を特徴的に分解するコマモナス・テストステロニYAZ2株(YAZ2株)のゲノム情報をモチーフに、PCBs分解性を強化し、且つ生物学的封じ込み機能を付加した人工細菌株の育種を目標におこなった。細菌のゲノム配列を高速で解析できる次世代シーケンシング法とパイオインフォマティクス技術を採用し、YAZ2株のゲノム配列を解析した。その結果、遺伝子構造を明らかにしたとともに、細菌の細胞死に関連する遺伝子情報を複数取得した。また、取得したゲノム配列情報を基に、YAZ2株と同様なPCB分解性を安定的に示す組換え大腸菌株の作製に初めて成功した。

研究成果の概要(英文)：We tried to create new bacterium by molecular breeding approach in this research program. It was based on the whole genome sequence of *Comamonas testosteroni* YAZ2 strain (YAZ2 strain), which is a strong Polychlorinated biphenyls degrader. In particular we intended giving the ability of biocontainment to the new bacterium. Here, we report that YAZ2 strain has two replicons that has been designated one chromosome (5.45 Mbp) and one circular plasmid (0.9 Mbp), and It was analyzed by Next-generation DNA sequencing method and bio-informatics technology. In addition, we were took the genes associated with several bacterial cell death factor have been located on the replicons. On the other hand, based on the genes of YAZ2 strain, we have firstly succeeded to create new engineering *Escherichia coli* derivative strain that degrades PCB, as well as wild-type YAZ2 strain. Now, we are continuing to breed engineered PCB degraders that have functional biocontainment.

研究分野：微生物学

キーワード：コマモナス・テストステロニYAZ2株 分子育種 生物学的封じ込み プログラム細菌細胞死 環境修復  
ポリ塩化ビフェニル

## 1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル (PCB) に代表される有機塩素化合物による環境汚染問題は、近未来の持続可能な社会形成において「極めて重要な課題」である。今日でも PCB に汚染した土壌や河川が数多く残っており、これらから浚渫した汚泥も保管されたままで、「有効な浄化法」がない。

Lunt らによるビフェニル分解細菌発見の報告<sup>1)</sup>をきっかけに、国内外で数多くの PCB 分解微生物が単離された。分解の初発反応で重要な役割を演じるビフェニル・ジオキシゲナーゼ (BDO) を特徴とする酸化分解機構も明らかとなったが、単独の細菌種が産生する BDO で 209 種類にも及ぶ PCB 同族体すべてを分解することは、基質選択性の上から困難なことも示された。

研究代表者らは 200 株の BDO 発現細菌の中から、高い PCB 分解活性を有し、基質選択性も異なる BDO を発現するコマモナス属とロドコッカス属の細菌 5 株を選抜した。両細菌株を複合して PCB の分解を試みた結果、コマモナス属とロドコッカス属の細菌株の複合比が 8 対 1 で最も高い分解活性を示すが、1 対 1 では活性低下を来すことが判り、「細菌種の複合比調節で、PCB 分解活性を正にも負にも制御できる」ことを見出した<sup>2)</sup>。一方で、コマモナス属細菌はビフェニル分解過程で溶菌し「自己死する」ことを観察するとともに、分解反応中に酸素が大量に消費されることも見出した。複合細菌群による PCB 分解制御には「生理的要因」も関係すると予想し、自然環境条件下にも通じる課題として企業とも連携して検討を進めていた。

## 2. 研究の目的

自然環境の修復において、微生物の中でもシュードモナス属の近縁細菌種の役割は極めて大きい。しかしながら、野生に存在する細菌が単独種で示す能力では、PCB などの難分解性汚染物質の浄化効率に限界があり、生物浄化技術の実用上の課題が指摘されてきた。そこで、これを解決するには遺伝子改変により細菌を強化する選択が容易であるが、自然環境への拡散による生物多様性への影響が懸念されるため、これを解決する有効な技術や手段がない。

本研究は、分子育種により、細菌の PCB 分解特性を強化するのみならず、自然環境への非拡散性を有した人工細菌の創生を目的とする。最終的には、汚染原位置に存在する野生型の PCB 分解細菌との協働的浄化も可能となるよう、細菌間の生理特性も理解した上で「低酸素条件下」で自己死するプログラムを構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) PCB 分解細菌の全ゲノム解析

人工細菌を分子育種するためには、様々な微生物から、機能的なタンパク質などの遺伝

子情報を取得することが初めの一步となる。そこで本解析では、研究代表者が山形県米沢市の環境から取得した、コマモナス・テストステロニ YAZ2 株 (YAZ2 株) を用いた。YAZ2 株は五塩素置換型までの PCB 同族体を良好に分解することを特徴とする好気性の桿菌である<sup>3)</sup>。本研究では YAZ2 株のゲノム情報をモチーフにし、PCB 分解性を持ったプログラム自己死型の大腸菌株を分子育種するため、次世代シーケンス法とパイオインフォマティクス技術を用いて、YAZ2 株の全ゲノム配列の解析を試みた。

ゲノム配列の分析には、次世代シーケンサーであるイルミナ社の HiSeq を使用した。研究開始当初は、ロッシュ・ダイアグノスティック社の GS Junior を使用したが試薬に重大なトラブルが生じたため、急遽 HiSeq へ機種変更した。シーケンス分析は北海道システムサイエンス社でおこなった。本分析はイルミナ社のプロトコルに従った。また、続けるのシーケンスのデータ解析はピッツ社でおこなった。リードデータのアセンブリには Velvet (ver. 1.2.10) を使用した。次に Gap filling として、上位二つのコンティグに多数のギャップを認めため、Paired-end リードを用いて、それらの連結もしくは縮小を試みた。さらに Scaffolding として、アセンブリで得られている Mate-pair ライブラリのリードを再マップした結果からコンティグを跨ぐペアを抽出し、そのブリッジが十分量ある場合は両コンティグが隣接すると推定した。リードデータのドラフトアセンブリ終了後、タンパク質の同定や機能を推定するアノテーション解析をおこなった。データ解析には DDBJ が提供する MiGAP を使用した。

### (2) YAZ2 株由来 BDO を発現する大腸菌株の作製

異なる属種の遺伝子を機能的に再構築する人工細菌の分子育種を目的とする本研究では、とりわけコマモナス属由来の機能遺伝子が大腸菌で機能発現する必要があるため、YAZ2 株の BDO を発現し、YAZ2 株同様の PCB 分解性を示す遺伝子組換え大腸菌株の作製を試みた。

上記(1)の実験で得たゲノム情報から、YAZ2 株の Bph オペロン上では BphA1A2A3 と BphA4 は離れた位置に存在することが判ったため、プラスミド pEA1A2A3A4(Y2)の構築は二段階でおこなった。DBO は大サブユニット (BhpA1) と小サブユニット (BhpA2) の末端ジオキシゲナーゼに加え、フェレドキシン (BhpA3) フェレドキシンリダクターゼ (BhpA4) で構成される多成分酵素である。

最初に、YAZ2 株菌体の熱抽出物を鋳型とし、以下に記載した Primer1 と Primer 2 を組み合わせた PCR をおこない、YAZ2 株の BphA1A2A3 をコードする領域、およびそ

の上流域を含む約2.5kbpのDNA断片を増幅した。得られたDNA断片をXbaIとNdeIで切断した後、ゲル抽出法で精製し、プラスミドベクター pET-15b (ノバジェン社)のXbaI NdeI切断部位へ挿入し、中間プラスミド pEA1A2A3(Y2)を得た。

次に、YAZ2株のBphA4をコードする約1.3kbpのDNA断片は、YAZ2株菌体の熱抽出物を鋳型とし、Primer3とPrimer4を組み合わせたPCRでDNA断片を得た。Primer1からPrimer4までの各配列は以下の通りである。

・Primer1:

5'-ATGCATTCTAGACCGGGCCTTTTAATGTTGGCA-3'

・Primer2:

5'-ATGCATCATATGTCAGGCATGCAGCGCGGCTGCA-3'

・Primer3:

5'-TGCATGCCTGACATATGAGTCGTCGAGTAACCTACTA-3'

・Primer4:

5'-GTTAGCAGCCGGATCCTACGACTGCGGGGCATGCGCATT-3'

最終的に、NdeIおよびBamHIで切断した上記中間プラスミド pEA1A2A3(Y2)へ、得られたBphA4のDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit(クロンテック社)を用いてクローニングし、YAZ2株の野生型BphA1A2A3A4(Y2)発現用プラスミド pEA1A2A3A4(Y2)を得た。

続いて、キメラ型大サブユニットを持つBDOであるBphA1(LY)A2A3A4(Y2)発現用プラスミドの構築をおこなった。具体的には、YAZ2株のBDO大サブユニットBphA1(Y2)を発現させるため、BphA1(Y2)のN末端側部分のアミノ酸を、適当な長さで対応するバークホルデリア・ゼノボランス LB400株(LB400株)由来のBphA1(LB400)の配列と置き換えた複合体BphA1サブユニット(BphA1(LY))を作製した。さらに詳細は、YAZ2株とLB400株のBphA1サブユニットアミノ酸配列の比較から、両者が一致するとともに遺伝子配列の同一性も高い、YAZ2株のアミノ酸残基番号で149~154残基の領域におけるキメラタンパク質の製作を考えた。このN末端側の約150アミノ酸領域には、BDOの酵素活性に重要なFeSクラスター結合部位が含まれるものの、ピフェニルやPCBの結合部位にあたるアミノ酸配列は含まれていないため、基質への結合性や特異性に与える影響は僅かだと想定した。

LB400株のBphA1A2遺伝子とその上流域46bpを含む約2,100bpのDNA配列を固相法で有機化学合成し、クローニングベクターpUC57(サーモフィッシュャー・サイエンティフィック社)へ挿入したプラスミド

pUC57-bphA1A2(LB400)を作製した。これを鋳型とし、以下に記載したPrimer5とPrimer6の組合せでPCRをおこない、LB400株のBphA1のN末端部分153アミノ酸残基をコードする領域、およびその上流域を含む約520bpのDNA断片を得た。一方、YAZ2株のBphA1の、149アミノ酸残基以降およびBphA2A3をコードする約2kbpのDNA断片を、YAZ2株のBphA1A2A3A4発現用に構築したプラスミド pEA1A2A3A4(Y2)(プラスミドDNAベクターはノバジェン社のpET-15bを使用した。)を鋳型とし、Primer7と8との組合せによりPCRで増幅して得た。Primer5からPrimer8までの各配列は以下の通りである。

・Primer5:

5'-ACAATTCCCCTCTAGATATTTTTTCCGCCCTGCCAAG-3'

・Primer6:

5'-AAGCCGCAGTCGCCTTCTTTCTTG-3'

・Primer7:

5'-AGGCGACTGCGGCTTCGACA-3'

・Primer8:

5'-ACTCGACGACTCATATGTCAGGCAT-3'

次に、プラスミド pEA1A2A3A4(Y2)をXbaIおよびNdeIで切断し、BphA4(Y2)遺伝子のみを含む線状化プラスミドを準備した。最後に、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて、この線状化プラスミドに先の2種類のPCR増幅DNA断片を使ってマルチクローニングした。本法によって、目的とするキメラ型BphA1を持つBphA1(LY)A2A3A4(Y2)発現用プラスミド pEA1(LY)A2A3A4(Y2)を得た。

以上作製したプラスミド pEA1A2A3A4(Y2)、あるいは pEA1(LY)A2A3A4(Y2)で形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を、アンピシリンを添加した2×YT液体培地を用いて30℃で培養し、濁度660nm=3.0で最終濃度0.1mMのIPTGを添加する直前(0時間)と、それぞれの形質転換株でPCB分解活性が最も高くなる、IPTGを添加してから1時間後(pEA1A2A3A4(Y2)の場合)または2時間後(pEA1(LY)A2A3A4(Y2)の場合)に、各菌体を回収した。採取した菌体を緩衝液に懸濁した後、SDSとメルカプトエタノール存在化で100、5分間処理し、得られた溶液中の菌体総タンパク質をゲル濃度12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PCB分解細菌の全ゲノム解析

本研究ではYAZ2株のゲノム情報をモチーフにした、PCB分解性を有し、プログラム自己死も誘発する大腸菌株を分子育種するため、次世代シーケンシング法とバイオインフォマティクス技術を用いてYAZ2株のゲノム配

列の決定を試みた。その結果は、YAZ2 株の全ゲノム配列である 6.35Mbp のうち 99.9% のシーケンス解析を終了した。残りの 0.1% に相当する、ギャップ数で 4、DNA 長の合計で約 10kbp のゲノム配列については、各ギャップの特徴的な構造が原因で、シーケンス分析が上手く進まずに未解読となった。全ゲノムの決定まであと少しなので、引き続き他の方法で分析できないかどうか検討を重ねている。

以上から、現時点の YAZ2 株のドラフトシーケンスデータを基に、本菌株のゲノム構造は、5.45Mbp の染色体と 0.9Mbp の環状プラスミドから構成されることが明らかとなった。また、YAZ2 株のゲノム情報には、PCB 分解に働く BDO を始めとする PCB 分解酵素群の遺伝子配列を含むオペロン構造 (Bph オペロン) と共に、細菌自己死のトリガーとなる 8 つの遺伝子と、細菌自己死そのものに関与する 4 つの遺伝子が保存されていた。今後は、これらの遺伝子を全て組み合わせることで 32 株の人工プログラム自己死を誘発するクローン大腸菌株を作製し、本研究の計画通り、低酸素下で自己死を惹起するかどうかを確認したい。

最終的に得られた YAZ2 株のゲノム配列は、全てオープンソースとして公的なデータベースへ公開したい。その理由は以下の通りである。現在、PCB 分解性を持ったコマモナス属細菌株として、YAZ2 株に先駆けて全ゲノム情報を公開しているものは、コマモナス・テストステロニ TK102 株 (TK102 株) のみである<sup>4)</sup>。TK102 株と YAZ2 株の Bph オペロン配列を比較した結果、YAZ2 株と TK102 株の Bph オペロン構造は大きく異なっていることから、PCB 分解細菌の多様性の点において、YAZ2 株の全ゲノム情報が公開されることで、本研究領域のさらなる学術的発展が期待されると考えた。

## (2) YAZ2 株由来 BDO を発現する大腸菌株の作製

上記のクローン大腸菌群では、属種の異なる YAZ2 株由来の遺伝子が機能することが前提となるため、取り掛かりに YAZ2 株の BDO を発現する組換え大腸菌株の作製を試みた。

その結果、分子量約 51.5kDa の BphA1 タンパク質は、野生型酵素遺伝子を有する組換え体 BL21(DE3)/ pEA1A2A3A4(Y2) では IPTG 添加の前後においてほとんど差がなくその発現量は著しく少ないが、キメラタンパク質をコードする組換え体 BL21(DE3)/ pEA1(LY)A2A3A4(Y2) では、IPTG の添加によって有意に発現量が増加した。また、BL21(DE3)/ pEA1(LY)A2A3A4(Y2) は、市販 PCB だったカネクロール KC300 を被験物質に用いた実験で、野生型の YAZ2 株由来 BDO と同様の PCB 分解特性を示すことを確認した<sup>5)</sup>。

BDO をキメラ型とした理由は、上記の結

果から判るように、コマモナス・テストステロニ YAZ2 株の Bph オペロン遺伝子が、系統樹上、大腸菌と近縁でないため、そのまま大腸菌株に YAZ2 株の Bph オペロンをそのまま組み換えても BDO が高発現しないためである。よって本研究では、YAZ2 株より大腸菌の近縁種にあたる LB400 株の遺伝子情報をキメラ BDO の作製へ利用した。本成果と同様の報告は他からまだ無い。つまり本研究では、コマモナス属細菌由来の BDO を大腸菌株で安定かつ大量に発現させることに初めて成功した。

これまでに、研究代表者らは、LB400 株由来 BDO の遺伝子組換え大腸菌株を作製し、プラスミド DNA を理化学研究所バイオリソースセンターへ寄託した (寄託番号: RDD13061)。今回、新たに YAZ2 株由来 BDO の発現系を構築したことで、本領域の学術的発展が期待される。

## < 引用文献 >

- 1) Lunt D, Evans WC. The microbial metabolism of biphenyl. *Biochem J.* 1970 Jul;118(3):54P-55P.
- 2) Hara T, Takatsuka Y. Enzymatic Composition of Two Different Types of Bacterial Catalysts Efficiently Degrades Polychlorinated Biphenyls., *American Society Microbiology 2015 General Meeting, Jun 1st 2015, New Orleans (USA).*
- 3) 太田 茉莉紗、高塚 由美子、櫻間 晴子、原 富次郎、山形県米沢市のポリ塩化ビフェニル分解細菌の単離と bph オペロン解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 27 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)。
- 4) Fukuda K, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ohji S, Yamazoe A, Fujita N, Shintani M, Kimbara K. Complete Genome Sequence of Polychlorinated Biphenyl Degrader *Comamonas testosteroni* TK102 (NBRC 109938). *Genome Announc.* 2014 Sep 11;2(5). pii: e00865-14. doi: 10.1128/genomeA.00865-14.
- 5) 高塚 由美子, 太田 茉莉紗, 原 富次郎, 高活性な遺伝子組換え型ポリ塩化ビフェニル分解複合微生物触媒の検討と評価, 第 67 回 日本生物工学会大会, 平成 27 年 10 月 27 日, 城山ホテル (鹿児島県・鹿児島市)。

## 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 2 件)

原 富次郎, 複合微生物触媒でポリ塩化ビフェニル類汚染廃棄物を分解, 日本機械

学会誌 ,査読有り ,118 巻 ,2015 ,p. 642 .

Hara T, Takatsuka Y, Makuta T, Katakura S, Nakasato M. Monitoring method for polychlorinated biphenyls degradation by composite bacterial catalyst., Proceeding of IWEE2014, JSME., 査読有り, 2014.

〔学会発表〕(計 5 件)

高塚 由美子, 太田 茉莉紗, 原 富次郎, 高活性な遺伝子組換え型ポリ塩化ビフェニル分解複合微生物触媒の検討と評価, 第 67 回 日本生物工学会大会, 平成 27 年 10 月 27 日, 城山ホテル(鹿児島県・鹿児島市).

Hara T. Microbe World and its Harmless Technology of PCBs, The Bachelor of Science Program in Chemistry, Keynote lecture, Aug 19<sup>th</sup> - 22<sup>nd</sup> 2015, Siracha (Thailand).

Takatsuka Y. Microbe World and its Harmless Technology of PCBs - 2, The Bachelor of Science Program in Chemistry, Keynote lecture, Aug 19<sup>th</sup> - 22<sup>nd</sup> 2015, Siracha (Thailand).

Hara T, Takatsuka Y. Enzymatic Composition of Two Different Types of Bacterial Catalysts Efficiently Degrades Polychlorinated Biphenyls., American Society Microbiology 2015 General Meeting, Jun 1<sup>st</sup> 2015, New Orleans (USA).

太田 茉莉紗, 高塚 由美子, 櫻間 晴子, 原 富次郎, 山形県米沢市のポリ塩化ビフェニル分解細菌の単離と bph オペロン解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 27 日, 岡山大学(岡山県・岡山市).

〔図書〕(計 1 件)

原 富次郎, 医歯薬出版, コマモナス属細菌にみるレドックス代謝と内分泌攪乱物質の分解メカニズム, 「医学のあゆみ」別冊レドックス UPDATE, 平成 27 年 7 月 30 日 P. 318 P. 323 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 改変ビフェニルジオキシゲナーゼ及びポリ塩化ビフェニル類を分解するためのその使用媒及びその組み合わせ  
発明者: 原 富次郎, 高塚 由美子  
権利者: 国立大学法人山形大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-056374

出願年月日: 平成 27 年 3 月 21 日  
国内外の別: 国内

名称: ポリ塩化ビフェニル類分解用微生物触媒及びその組み合わせ  
発明者: 原 富次郎, 高塚 由美子, トンサイ ジャモンカン, 杉本 昌隆  
権利者: 国立大学法人山形大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014 169561  
出願年月日: 平成 26 年 8 月 22 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

山形大学大学院理工学研究科 微生物触媒工学応用講座 原富次郎研究室ホームページ  
[www.microbiology.yz.yamagata-u.ac.jp](http://www.microbiology.yz.yamagata-u.ac.jp)

山形大学成果活用企業 アプリザイム株式会社ホームページ  
[www.applizyme.com](http://www.applizyme.com)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 富次郎 (HARA, Tomijiro)  
山形大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号: 70616193

(2) 研究分担者

大場 好弘 (OHBA, Yoshihiro)  
山形大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号: 60152237

高塚 由美子 (TAKATSUKA, Yumiko)  
山形大学・大学院理工学研究科・助教  
研究者番号: 70570810  
(平成 26 年度途中から研究分担者)

(3) 研究協力者

片倉 苑香 (KATAKURA, Sonoka)

藤岡 智明 (FUJIOKA, Tomoaki)  
(平成 26 年度のみ研究協力者)

竹中 康弘 (TAKENAKA, Yasuhiro)  
(平成 27 年度のみ研究協力者)