

博士課程学位論文

Rhodococcus jostii RHA1 における
PCB 分解遺伝子群転写抑制の解明と
その解除方法に関する研究

平成 27 年 2 月

東北学院大学大学院工学研究科

伊 藤 拓

目次

第1章 序論	1
1-1 緒言	2
1-2 背景	2
1-3 本論文の構成	4
第2章 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 における PCB 分解に関する従来の研究	5
2-1 <i>R. jostii</i> RHA1 のビフェニル分解遺伝子群に関する研究	6
2-2 <i>R. jostii</i> RHA1 のビフェニル分解遺伝子群に関する研究	8
2-3 BphS および BphT 二成分制御による転写活性化メカニズムに関する研究	9
第3章 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 における分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制	11
3-1 緒言	12
3-2 材料および方法	12
3-3 結果	16
<i>bphAa</i> プロモーター活性への安息香酸の影響	16
相同組換えによる <i>benA</i> 、 <i>benD</i> 、 <i>catA</i> 、 <i>catB</i> 遺伝子の破壊	17
破壊株における <i>bphAa</i> プロモーター転写活性	17
3-4 考察	22
3-5 結論	23
第4章 BphS/BphT 支配下遺伝子群の発現への中間分解産物カテコールの影響	25
4-1 緒言	26
4-2 材料および方法	27
4-3 結果	28
<i>R. jostii</i> RHA1 における BphS/BphT 支配下のプロモーター活性の観察	28
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>catA</i> における BphS/BphT 支配下のプロモーター転写活性の観察	29
4-4 考察	30
4-5 結論	31

第 5 章	カテコール分解遺伝子の導入による PCB 分解遺伝子群転写活性の強化	33
5-1	緒言	34
5-2	材料および方法	34
5-3	結果	36
	pFcatA によって導入された <i>catA1</i> 遺伝子の機能確認	36
	<i>catA1</i> 高発現による <i>bphAa</i> プロモーター活性への影響	36
	<i>bphAa</i> プロモーター活性とカテコール蓄積の関係	38
5-4	考察	39
5-5	結論	39
第 6 章	<i>R. jostii</i> RHA1 におけるビフェニルを単一炭素源とした生育能の強化	41
6-1	緒言	42
6-2	材料および方法	42
6-3	結果	43
	<i>catA</i> 高発現によるビフェニル代謝能への影響	43
	BphS/BphT 高発現株のビフェニル炭素源における生育の観察	44
6-4	考察	45
6-5	結論	47
第 7 章	安息香酸およびカテコール分解遺伝子群の転写誘導物質の同定	48
7-1	緒言	49
7-2	材料および方法	49
7-3	結論	51
	<i>benA</i> プロモーター活性の観察	51
	<i>catA1</i> プロモーター活性の観察	52
	<i>catA1</i> プロモーター活性観察時の基質濃度および代謝産物濃度の測定	52
7-4	考察	59
7-5	結論	61
第 8 章	結論	63
	謝辞	67
	公表論文	67

第 1 章

序論

1-1 緒言

本論文では、環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl、以下 PCB)を分解する細菌 (以下、このような細菌を PCB 分解菌と呼ぶ)である *Rhodococcus jostii* RHA1 の PCB 分解メカニズムを解明するとともに、その分解活性の抑制現象及び抑制を解除するための分子生物学的手法に関する研究の成果を述べる。*Rhodococcus jostii* RHA1 を PCB 分解に用いるためには、PCB 分解に関わる *bph* 遺伝子群の挙動を理解し、PCB の分解能力を最大限に引き出す必要がある。そこで本研究では、*bph* 遺伝子群のプロモーター転写活性に着目した。この研究によって観察された、PCB 分解に関わる遺伝子群の転写発現に関わる諸要素を検証し、遺伝子工学的的手法による RHA1 の PCB 分解能力の向上を試みた。本研究で得られたこれらの知見は、高効率の PCB 分解菌の育種に貢献できるものと考えられる。

1-2 背景

人類は科学技術の発展に伴い、様々な化学物質を人工的に合成し使用してきた。自然界に存在しない人工的な化学物質は、化学的な安定性や機能性を重視して合成されているため分解されにくい。これらの人工的な化学物質が環境中に放出され、かつ生体に対して毒性を示した場合、環境汚染問題として深刻な影響を与える場合がある。このような環境汚染の原因となる、人工的な化学物質の一つが PCB である。PCB は、ビフェニル環上の水素原子が塩素原子に置換した化合物の総称であり、理論的には 209 種類の異性体が合成可能である (Fig. 1-1)。一般的に PCB と呼ばれているものは、製造の段階から様々な異性体が混合した状態で存在している。

PCB は、1881 年にドイツの化学者シュミットとシュルツによって初めて合成された¹⁾。PCB は化学的に非常に安定な物質であり、絶縁性、不燃性、高脂溶性、低揮発性、高沸点、酸・アルカリに対して安定、金属をほとんど腐食しない等、優れた工業的特性を多数有している。このことから 1929 年のアメリカにおける工業化をかきわきりに、全世界的に大量生産され、絶縁油、熱媒体、潤滑油、可塑剤、塗料、複写紙など、幅広い用途に利用された。日本でも 1950 年ごろから PCB が使用されるようになり、1954 年から PCB の国内生産が開始されている。しかし、1960 年代後半にスウェーデンで死んだ海鳥の体内から高濃度の PCB が検出されたのをきっかけに、世界各国で PCB による汚染が相次いで報告された。日本では 1968 年に、食用油の脱臭のための熱媒体として利用されていた PCB が、配管の穴から食品に混入し、人体に深刻な被害をもたらしたカネミ油症事件が発生した^{1,2)}。この時混入した PCB の濃度は約 1,000 ppm といわれている²⁾。

これらの事件から PCB は、生物に対する発癌性、ホルモン異常、内臓障害、胎児への催奇性などの深刻な有害性を示すことが認識された。1970 年代には環境汚染物質として使用・生産・廃棄が制限され、

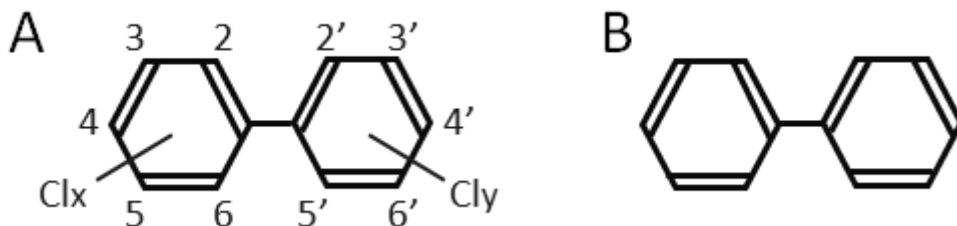


Fig. 1-1 A : PCB の構造式。 $x + y \leq 10$ B : ビフェニルの構造式

現在に至る¹⁾。日本における PCB の現状としては、PCB 特別措置法に基づく PCB 廃棄物等の届出の全国集計結果によると平成 15 年 3 月 31 日の時点で、PCB は 93 t、PCB を含む油は 175,244 t が保管されている¹⁾。しかし、保管された PCB の処理は遅々として進んでいない。さらに、保管の長期化から保管された PCB の漏出や紛失といった問題も懸念される。このような現状を踏まえて、PCB の処理と汚染の浄化は社会的に重要な課題の一つであると考えられる。

PCB を無害化する方法として、高温での焼却処理、紫外線やアルカリ触媒での塩素除去によってビフェニルに変換する方法等の物理・化学的処理と並んで、生物学的処理法が研究されている。生物学的処理法は、PCB を分解する能力を持った微生物を利用して、PCB を無害化する方法である。PCB と化学的に構造の似たビフェニルを分解する微生物の中には、*Acidovorax* sp. KKS102^{4,5)}や *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707⁶⁾などの様々な PCB 分解菌が存在することが報告されている。PCB 分解菌を利用した PCB 処理の実証実験としては、JR 総研で研究された事例が報告されている。これは、紫外線を照射することで PCB を脱塩素して低塩素置換のものに変換した後、閉鎖系で二種類の PCB 分解菌を用いて分解する方法である³⁾。

PCB における生物学的処理法の課題として、高塩素置換の PCB を分解することが難しい、という点があげられる。実証実験の例で、微生物処理を行う前段階で紫外線照射を行い、脱塩素を行ったことから、この課題が伺える。また、ビフェニルにおける塩素置換の位置によっては、分解が途中で止まってしまうケースも報告されている⁷⁾。

これらの問題点を解決する一つの方法として、遺伝子工学的アプローチがある。これは、PCB 分解に関わる遺伝子の役割とメカニズムを解明し、特定の遺伝子进行操作することによって、PCB 分解能を向上させる手法である。PCB 分解菌に関する研究の現状としては、基質となるビフェニル、その分解経路、分解遺伝子群の転写を向上させる基質などは明らかとなっている場合が多いが、微生物における PCB 分解と関連遺伝子の発現メカニズムが完全に解明されているとは言い難い。転写のメカニズムは菌によって異なることも多く、細菌における PCB 分解に関わるメカニズムの知見を深めることは、PCB 分解菌の分解能向上のために重要であると考えられる。

PCB 分解菌を PCB 汚染浄化に実際に用いる場合、二つの方法が考えられる。一つは、閉鎖系で PCB 分解菌を用いる方法である。閉鎖系であれば、遺伝子操作菌を利用できる、微生物の生育に最適な条件を用意することが容易、高濃度の PCB も取り扱い可能、といった利点がある。もう一つは、開放系の PCB 汚染サイトに PCB 分解菌を投入することによって浄化する方法である。この場合、汚染サイトに原生しない微生物や遺伝子操作微生物を用いることになるため、現地の生態系をかく乱する恐れがあり、慎重な運用を求められる。しかし、漏出等によって生じる低濃度・広範囲の PCB 汚染に対して有効である点は生物学的手法の利点であり、物理・化学処理法にはない特徴である。

以上の背景をもとに、いままでに PCB 分解菌の一つとして、*Rhodococcus jostii* RHA1 が単離、研究されてきた。本研究は、*R. jostii* RHA1 の PCB 分解メカニズムの全容解明に貢献することを目的としている。RHA1 を PCB 分解に用いるためには、PCB 分解に関わる *bph* 遺伝子群の挙動を理解し、PCB の分解能力を最大限に引き出す必要がある。

そこで本研究では、まず PCB を共代謝するために用いる基質であるビフェニルの分解過程における *bphAa* プロモーターの転写活性を観察した。その結果、*bphAa* プロモーターの転写活性化に負の影響を与える因子を発見した。さらに、この抑制について解析を行った。また、この抑制を解除する方法につい

でも検証を行った。これらの知見は、高効率の PCB 分解菌を育種するために貢献できると考える。また、遺伝子工学的に育種した PCB 分解菌を活用して PCB を分解処理する新しい技術の開発に貢献できると考える。

1-3 本論文の構成

第 1 章「序論」では、本研究の背景および目的および本論文の構成について述べている。

第 2 章「*Rhodococcus jostii* RHA1 における PCB 分解に関する従来の研究」では、今までに行われてきた *Rhodococcus jostii* RHA1 の PCB 分解に関する研究について述べる。

第 3 章「*Rhodococcus jostii* RHA1 における分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制」では、RHA1 によるビフェニル分解遺伝子の転写活性化を抑制する原因物質についての研究を述べる。

第 4 章「BphS/BphT 支配下遺伝子群の発現への中間分解産物カテコールの影響」では、*bphAa* プロモーター以外の BphS/BphT 支配下の PCB 分解遺伝子に対するカテコールの影響について述べる。

第 5 章「カテコール分解遺伝子の導入による PCB 分解遺伝子群転写活性の強化」では、カテコール分解遺伝子 *catA1* を高発現することで PCB 分解遺伝子群の発現がどのように変化するかの観察について述べる。

第 6 章「ビフェニルを単一炭素源とした生育能の強化」では、*catA1*、*bphS1*、*bphT1* をそれぞれ高発現することで、ビフェニルを単一炭素源として加えた場合の生育能がどのように変化するかの観察について述べる。

第 7 章「安息香酸およびカテコールの分解遺伝子における転写誘導物質の同定」では、カテコール分解遺伝子と、安息香酸分解遺伝子の発現を誘導する物質の解明について述べる。

第 8 章「結論」では、本研究によって得られた結論について述べる。

参考文献

- 1) 財団法人産業廃棄物処理事業振興財団：廃棄物処理方針処理基準に基づく PCB 処理技術ガイドブック (改訂版) 2005
- 2) 増田義人：油症などにみられる PCB, PCDF の人体に対する毒性影響. 福岡医誌. **100**, 141-155, 2009
- 3) 金原 和秀・潮木 知良・京谷 隆・志村 稔・早川 敏雄：光脱塩素と生物分解のハイブリッド法による PCB 処理. 生物工学会誌. **82**, 56-62, 2004
- 4) Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, Takagi M, Ohta A, Nagata Y. BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. J Biol Chem. **276**. 36146-54, 2001
- 5) Ohtsubo Y, Goto H, Nagata Y, Kudo T, Tsuda M. Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. Mol Microbiol. **60**. 1563-75, 2006
- 6) Watanabe T, Fujihara H, Furukawa K. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. J Bacteriol. **185**, 3575-82, 2003
- 7) Seto M, Kimbara K, Shimura M, Hatta T, Fukuda M, Yano K. A Novel Transformation of Polychlorinated Biphenyls by *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. Appl Environ Microbiol. **61**:3353-8. 1995

第 2 章

Rhodococcus jostii RHA1 における PCB 分解に関する従来の研究

2-1 *R. jostii* RHA1 のビフェニル分解遺伝子群に関する研究

PCB 汚染の微生物を用いた浄化を目的として、これまでの研究で PCB 分解菌 *R. jostii* RHA1 が単離され、その PCB 分解経路、及び分解に関与する遺伝子群 (*bph* 遺伝子群)が Fig.2-1 に示したように明らかにされている¹⁾。また、これらの分解遺伝子群は Fig.2-2 に示したようにゲノム上に分かれて存在しているが、転写されるための共通のプロモーター領域を持っており²⁾、ビフェニルのセンサータンパク質である BphS および転写のアクチベータータンパク質である BphT によってビフェニル存在下で同時に転写が活性化されることが明らかになっている^{2,3)}。*R. jostii* RHA1 は PCB のみが存在する環境下では PCB を分解しない。しかし、ビフェニルが共存するとビフェニルを分解する酵素群の発現が誘導され、これらの酵

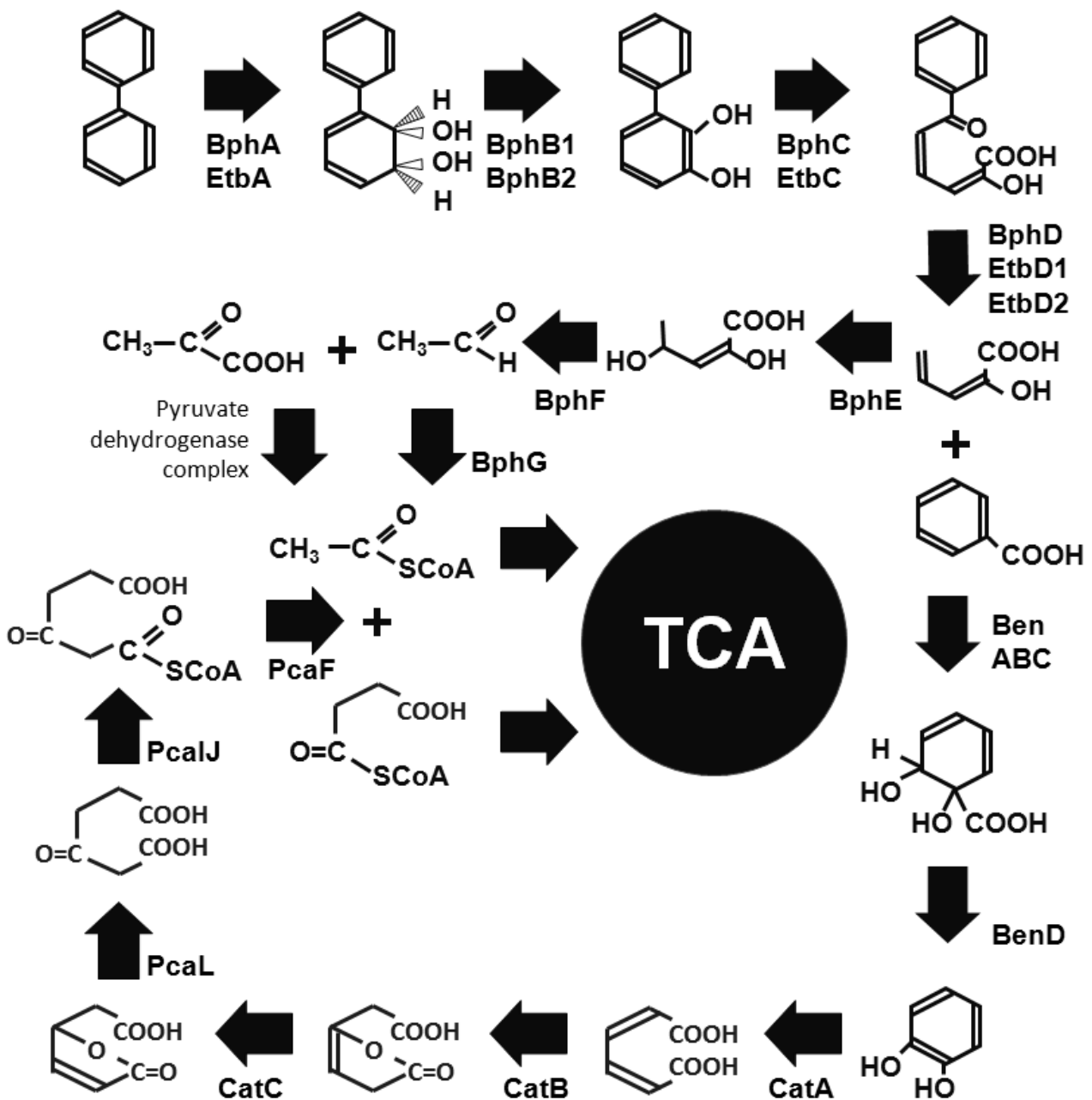


Fig.2-1 *R. jostii* RHA1 におけるビフェニルの分解経路図。矢印の下ないし横に、分解関わる酵素名を記す。PCB も、この経路に従って分解される。ビフェニルの代謝産物は、最終的に TCA サイクルに取り込まれ、水と二酸化炭素にまで分解される。

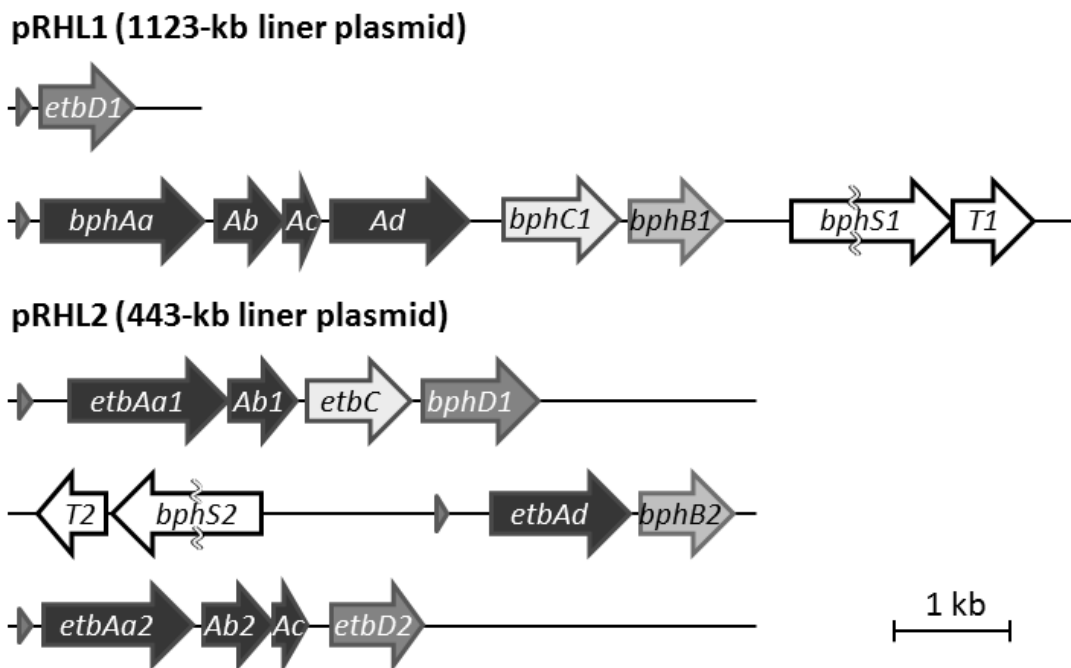


Fig.2-2 *R. jostii* RHA1 におけるビフェニル分解酵素遺伝子群。矢印は各分解酵素をコードする遺伝子を、矢印内に遺伝子名を記す。矢印中の波線は、遺伝子の一部を省略していることを示す。図中の三角形は、各分解酵素遺伝子群のプロモーター領域を示す。ビフェニルと PCB の分解に関与する遺伝子群は、二つの線状プラスミド pRHL1 と pRHL2 上に分散して存在する。

素は基質特異性が低いため、PCB の分解も同時に触媒する。このような分解を、共代謝 (co-metabolism) という (Fig.2-3)。

PCB 分解において重要な *R. jostii* RHA1 のビフェニル分解に関しては、これまでの研究で、分解経路、分解に関する酵素と遺伝子、および、その初発分解遺伝子群である *bphABCD* の転写制御機構が明らかになっている。また、*R. jostii* RHA1 の全ゲノム配列も明らかになっている⁴⁾。

R. jostii RHA1 のビフェニル分解経路、および分解に関与する酵素と遺伝子は Fig.2-1 に示したとおりに明らかになっている。*bphAa, Ab, Ac, Ad* と *etbAa, Ab, Ac, Ad* がコードする biphenyl dioxygenase が biphenyl 骨格の 2, 3 位を水酸化することで、3-phenylcyclohexa-3,5-diene-1,2-diol に変換され、さらに *bphB* がコードする dehydrogenase によって 2,3-dihydroxybiphenyl に変換される。2,3-dihydroxybiphenyl は、*bphC* と *etbC* がコードする dioxygenase によって芳香環が開裂し、黄色を呈するメタ開裂物質 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate に変換される。このメタ開裂物質は *bphD* と *etbD* がコードする hydrolase によって 2-hydroxy-penta-2,4-dienoate と benzoate に変換される。2-hydroxy-penta-2,4-dienoate は *bphF* と *bphG* がそれぞれコードするタンパク質によってピルビン酸とアセチル CoA へと変換される。Benzoate は *benABCD* がコードするタンパク質によって catechol に、*catABC* がコードするタンパク質によって protocate に、*pcaIJF* がコードするタンパク質によってアセチル CoA とスクシニル CoA に変換される。ピルビン酸、アセチル CoA、スクシニル CoA は TCA サイクルに取り込まれ、さらに代謝されていく⁵⁾。

上述の通り、*R. jostii* RHA1 のビフェニル分解に関与する遺伝子は 1 種類の反応に対して複数存在し、Fig. 2-2 に示したようにゲノム上の様々な場所に分かれてクラスターを成して存在していることも明らかとなっている⁴⁾。

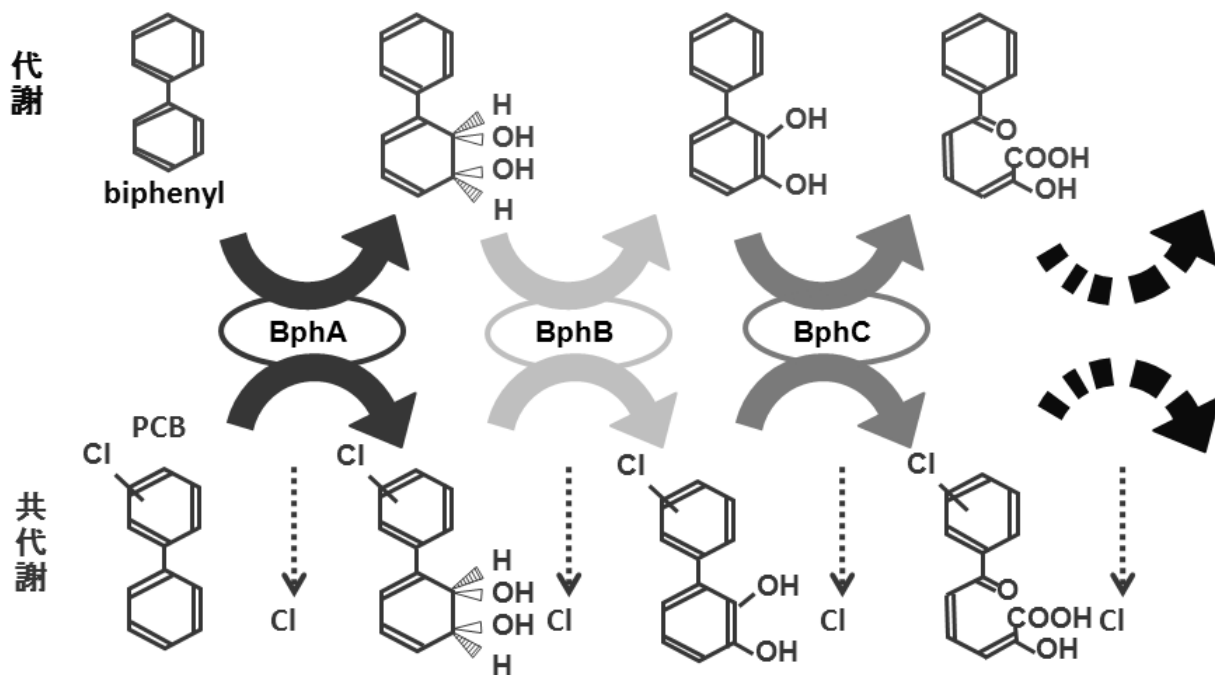


Fig.2-3 ビフェニルの代謝に伴う PCB の共代謝のモデル図。PCB は、ビフェニルを代謝する酵素群によって分解されていく。PCB のビフェニル環上に存在する塩素原子は、自発的に脱塩素するものと考えられる。

2-2 *R. jostii* RHA1 のビフェニル分解遺伝子群の転写調節因子に関する研究

R. jostii RHA1 において上流 4 つの反応を担うビフェニル分解遺伝子群は、センサータンパク質である BphS1 とレギュレータータンパク質である BphT1/BphT2 による、二成分制御系と呼ばれる制御機構によって転写制御されている。以下に、BphS/BphT による転写制御機構について記す。

まず、*bphAa* プロモーターからの転写を活性化する転写制御遺伝子の単離、解析が行われた。この結果、*bphB1* 遺伝子の下流に *bphAa* プロモーターからの転写をビフェニル存在下で活性化する遺伝子の存在が確認された。次に、この領域の塩基配列を決定したところ、1,598 アミノ酸のタンパクをコードする配列と、その下流に 209 アミノ酸のタンパクをコードする配列が見出された。これらの遺伝子は、それぞれ *bphS1*、*bphT1* と命名された³⁾。*bphS1* および *bphT1* より推定されるアミノ酸配列は、種々の二成分制御系の転写制御因子と相同性が見られ、BphS1 はセンサーヒスチジンキナーゼと、BphT1 はレスポンスレギュレーターと相同性がみられた。また、BphS1 の自己リン酸化部位である 1,411 番目のヒスチジン、BphT1 のリン酸受容部位である 48 番目のアルギニンなどのアミノ酸配列がよく保存されていたことから、*bphS1*、*T1* は RHA1 の二成分制御系の転写活性化因子をコードすると推定された。欠変異体の解析から *bphS1*、*T1* 遺伝子領域のみで *bphAa* プロモーターからの転写を活性化し、また、*bphS1*、*T1* 遺伝子産物 (BphS1/T1) がビフェニル、エチルベンゼンなどの芳香族化合物に反応して *bphAa* プロモーターからの転写を活性化することを明らかにした。しかし、BphS1/T1 は 4-クロロビフェニルや PCB による転写活性化は示さなかった⁶⁾。

BphS1/T1 による転写活性化は *R. jostii* RHA1 に存在する他の PCB 分解酵素遺伝子のプロモーターに対しても起こり、BphS1/T1 により様々な分解系遺伝子群が協同的に転写誘導される機構が示唆されている²⁾。また、RHA1 には *bphS1T1* と相同性を示す *bphS2T2* が存在し、*bphS2T2* も *bphAa* プロモーターからの

転写活性化に関与していることが示された²⁾。BphS1 と BphS2 は共に様々な芳香属化合物を感知するが、ビフェニルに対しては BphS1 のみが反応することが明らかとなった (Fig.2-4.A)。

2-3 BphS および BphT 二成分制御系による転写活性化メカニズムに関する研究

R. jostii RHA1 における BphS/T による転写制御の過程は、次のとおりである。まず、基質である芳香族化合物を BphS が感知する。次に、感知した BphS が自己リン酸化する。これによりリン酸化した BphS が、BphT をリン酸化する。そして、リン酸化された BphT が *bph* 遺伝子群のプロモーターに結合することで、遺伝子の転写が開始される。このプロセスは BphS1 から BphT1、BphS2 から BphT2 のみならず、Fig.2-4.A に示したように BphS1 から BphT2、BphS2 から BphT1 といった流れでも活性化されることが明らかになっている。

その後の解析で、リン酸化された BphT の結合配列が探索され、各 *bph* 遺伝子群の転写開始点上流に共通配列が見出された²⁾。さらに Fig.2-4.B に示したように、リン酸化した BphT が 24bp の共通配列に結合することが明らかになっている⁷⁾。

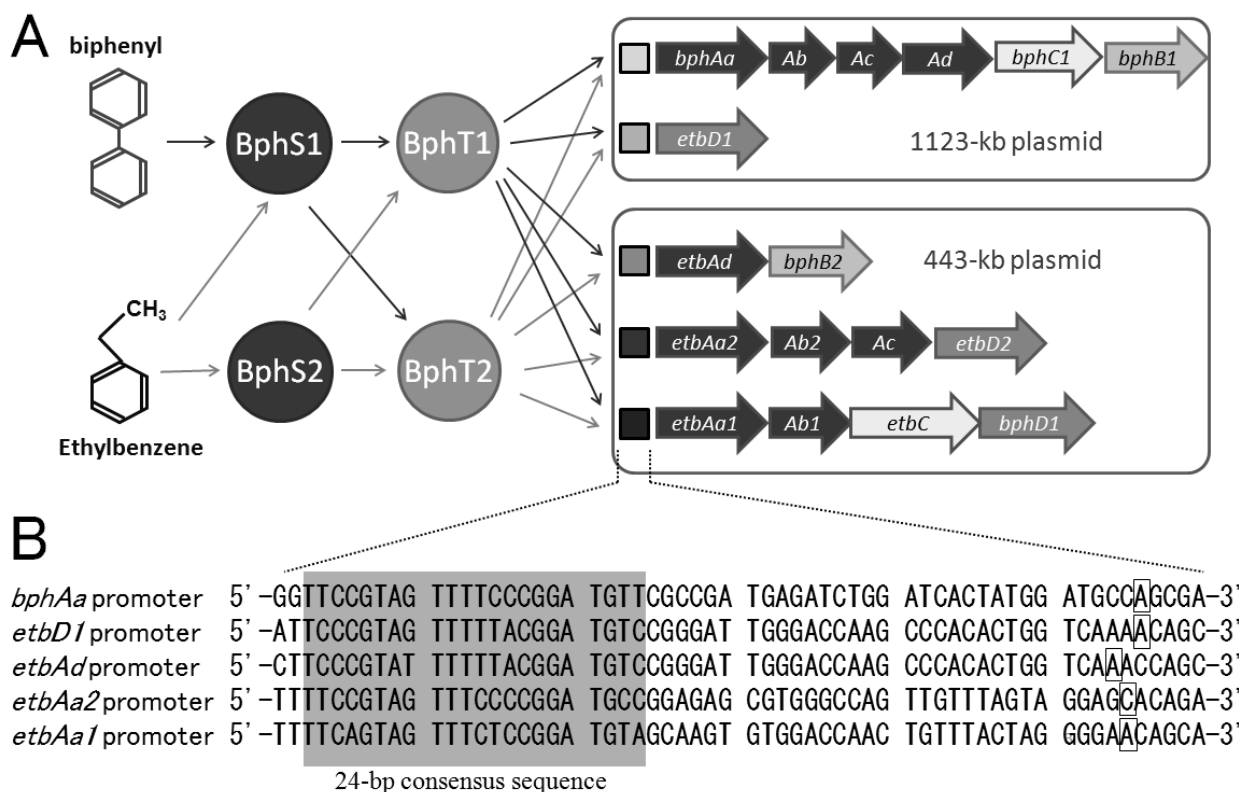


Fig.2-4 ビフェニル分解に関わる遺伝子群の発現制御と、その遺伝子配列。A：*R. jostii* RHA1 におけるビフェニル分解遺伝子群の発現制御メカニズム。基質の存在下で BphS がリン酸化し、BphT を介して各プロモーター領域の転写を活性化する。エチルベンゼンなどでは BphS1、BphS2 の双方がリン酸化するが、ビフェニル存在下では BphS1 のみがリン酸化する。B：ビフェニル分解遺伝子群のプロモーターの転写開始点上流における遺伝子配列。各プロモーターの転写開始点を枠で囲んだ。灰色の部分は、BphT が結合する 24-bp コンセンサス配列を示す。

参考文献

- 1) 福田雅夫・宮内啓介・政井英司 : *Rhodococcus* 属細菌の PCB 分解システム. 蛋白質 核酸 酵素. **50**, 1541-1547, 2005
- 2) Takeda H, Shimodaira J, Yukawa K, Hara N, Kasai D, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. 2010. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. J Bacteriol. **192**:4741-51
- 3) Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. 2004. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. J Bacteriol. **186**:2134-46.
- 4) McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Holt R, Brinkman FS, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. 2006. Proc Natl Acad Sci U S A. **103**:15582-7
- 5) Kitagawa W, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. J Bacteriol. **183**, 6598-606, 2001
- 6) Takeda H, Hara N, Sakai M, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1. Biosci Biotechnol Biochem. **68**, 1249-1258, 2004
- 7) Shimodaira J, Furusawa Y, Miyazawa Y, Kasai D, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. 2012. The 24-bp consensus sequence responsible for regulation of the BphS1T1 two-component system in a hybrid promoter. J Biosci Bioeng. **113**:279-85

第 3 章

Rhodococcus jostii RHA1 における 分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制

3-1 緒言

本章では、*R. jostii* RHA1 の PCB 分解活性の指標として、ビフェニル初発分解酵素 BphA を構成するサブユニットタンパク質である BphAa、BphAb、BphAc、BphAd のうち、BphAa をコードする *bphAa* 遺伝子のプロモーター領域からの転写活性に対するビフェニル代謝産物の影響に着目して、分解遺伝子群の発現の抑制現象を解明した結果について述べる。

ビフェニル代謝産物の影響に着目した理由として、カタボライト抑制の存在があげられる。カタボライト抑制とは、ある物質の代謝産物 (カタボライト) がその物質の分解に関わる上流の遺伝子の発現を負に制御する現象をいう。*R. jostii* RHA1 の PCB 分解に関わるビフェニル分解遺伝子群にもカタボライト抑制が存在した場合、この抑制を解除することでビフェニルと PCB の分解能力を高めることが可能になると考えられる。これは、効率よく PCB を分解できる微生物を育種することにつながり、環境保全上重要な PCB 処理技術の開発に貢献すると考える。

以上を踏まえ、本章の実験では、PCB 分解遺伝子群の転写に対するビフェニルの代謝産物の影響を調べるため、ビフェニルと、必要に応じて安息香酸を加えて *bphAa* プロモーターの転写活性を測定した。また、安息香酸以降の代謝産物の分解遺伝子を破壊することで代謝産物を蓄積させる株を作製し、レポータープラスミドを用いて *bphAa* プロモーターの転写活性を測定した。

3-2 材料および方法

(1) 使用菌株とプラスミド

本研究で用いた菌株を Table 3-1 に、プラスミドを Table 3-2 に示す。野生株である *R. jostii* RHA1 は、ビフェニルを単一炭素源として生育することができる。*R. jostii* RHA1 はビフェニルを蓋上に置く形で単一炭素源として加えた M9 寒天培地 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄·7H₂O solution, 1 ml 0.1 M CaCl₂ solution, in 1,000 ml of dist. Water) に植え継ぎ、培養は 30°C でおこなった。*R. jostii* RHA1 の遺伝子をそれぞれ破壊した変異株、*R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA*、*R. jostii* RHA1Δ*catB* は、1/5LB 寒天培地 (2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. Water) に植え継ぎ、培養は 30°C で行った。大腸菌の培養には LB 培地 (10 g Bacto trypton, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. Water) を使い、培養は 37°C で行った。

(2) *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

本研究において、*Rhodococcus* 属細菌の形質転換にはエレクトロポレーション法を用いた⁶⁾。まず菌株を 10 ml の 1/5LB で OD₆₀₀ が 0.5 になるように培養した。菌体を、4000 rpm で 5 分遠心分離して回収し、0.3 M sucrose 1ml による懸濁、遠心分離、上清除去を 3 回繰り返した。上清を除去したあと、0.3 M sucrose 600μl に懸濁し、competent cell とした。100 μl の competent cell にプラスミド DNA を 1 μl 加え、1.2 kV、800 Ω、25 μF の条件でパルスをかけ、直ちに LB を 1 ml 加えた。これを 30°C で 4 時間培養したのち、抗生物質入りの寒天培地に塗布し、30°C で培養した。コロニー単離後、菌体からプラスミド DNA を回収し、形質転換の成否を電気泳動で確認した。

(3) プロモーター活性測定

R. jostii RHA1 の PCB 分解活性の指標として、PCB 分解の初発反応を触媒する酵素遺伝子である *bphAa* 遺伝子のプロモーター活性を測定した。プロモーター活性が高いということは、転写量、ひいてはタンパク質の生成量が多いということで、分解活性も高いと考えることができる。本研究ではルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたレポータープラスミドを用い、容易に活性を測定できる実験系を用いた。レポータープラスミド pKLAFl (Fig. 3-1)は、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に *bphAa* 遺伝子のプロモーター領域が組み込まれている⁹⁾。このプラスミドを持つ *R. jostii* RHA1 中では、*bphAa* 遺伝子が発現するときはルシフェラーゼ遺伝子が転写されて発現し、発光する。

pKLAFl を導入した菌株を、カナマイシンを最終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB が 10 ml 入った試験管で一晩培養した。遠心 (4,000 rpm, 10 min)して菌体を回収し、上清を捨てた後、1/5LB 10 ml で菌体を洗浄した。再度、遠心 (4,000 rpm, 10 min)し上清を捨てた後、カナマイシンを最終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB 1 ml で再懸濁した。この菌液を、カナマイシンを最終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB 10 ml に OD₆₀₀ が 1.0

Table 3-1 使用菌株

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB 分解菌、野生株、BPH ⁺ BEN ⁺	6)
<i>E. coli</i> S17-1	DNA の接合伝達に使用 <i>recA</i> , harbors the <i>tra</i> genes of plasmid RP4 in the chromosome, <i>proA thi</i>	7)
<i>E. coli</i> JM109	クローニングに使用 <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F⁺[traD36 proAB⁺ lacI^A lacZΔM15]</i>	8)
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>benA</i>	<i>benA</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>benD</i>	<i>benD</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>catB</i>	<i>catB</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> 破壊株、BEN ⁻	this study

BPH⁺ BEN⁺: ビフェニルと安息香酸をそれぞれ単一炭素源として生育可。BEN⁻: 安息香酸を単一炭素源として生育不可。

Table 3-2 使用プラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pKLAFl	<i>bphAa</i> 転写活性を観察するレポータープラスミド pKLA1 with 1.4-kb XhoI-BamHI fragment of <i>R. jostii</i> RHA1 carrying promoter region of <i>bphAa</i>	9)
pKLAPBENF	<i>benA</i> 転写活性を観察するレポータープラスミド pKLA1 with 536 bp Sall fragment of <i>R. jostii</i> RHA1 carrying promoter region of <i>benA</i>	this study
pGEM-T easy	cloning vector; アンピシリン耐性	Promega 社
pK18mobsacB	カナマイシン耐性、 <i>sacB</i> 、 <i>oriT</i>	10)
pK18 Δ <i>benA</i>	<i>benA</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study
pK18 Δ <i>benD</i>	<i>benD</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study
pK18 Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study
pK18 Δ <i>catB</i>	<i>catB</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study

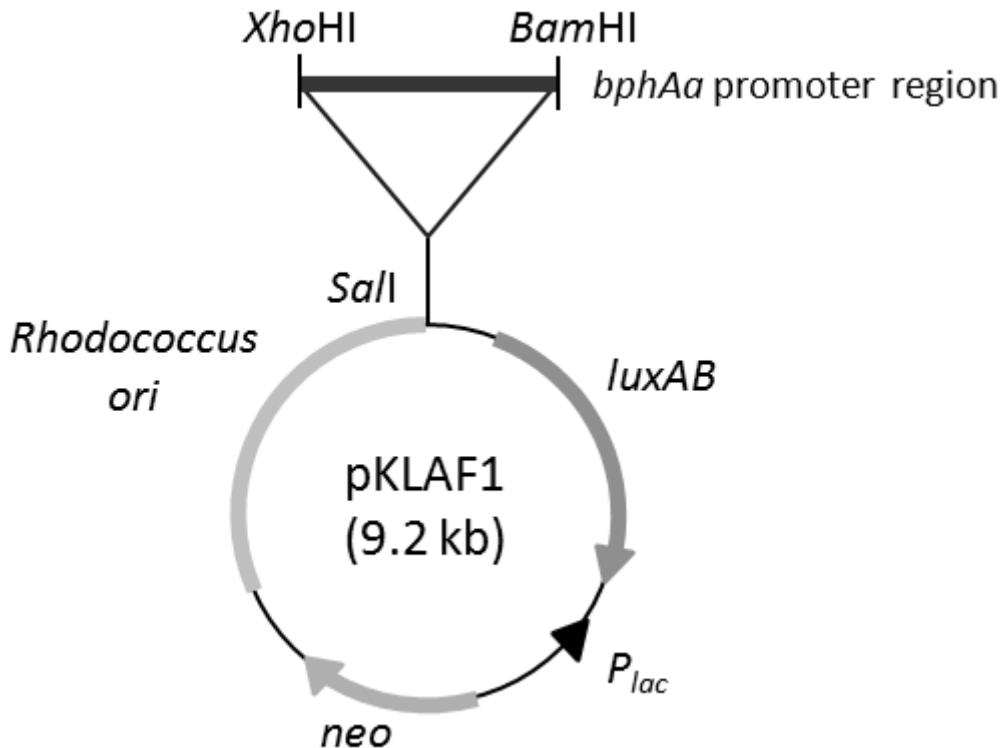


Fig. 3-1 レポータープラスミド pKLA1。 *Rhodococcus* - *E. coli* シャトルベクターである pKLA1 の、発光タンパク質をコードする *luxAB* 上流に、*bphAa* のプロモーター領域を挿入してある。 *neo* はカナマイシン耐性遺伝子である。

となるように加えた。必要に応じてビフェニル、安息香酸を終濃度 10 mM となるように加えた。

30°Cで培養し、3時間おきに発光値と菌液の濁度 (OD₆₀₀)を測定した。発光値は菌液 100 μl に 1-decanal を 2%含む Lux Buffer (10 mM リン酸 Buffer (pH 7.0) 50 ml, 100% EtOH 49 ml)を 25 μl 加え、5秒間の発光を測定した。発光の測定装置として BERTHOLD TECHNOLOGIES 社製 MicroLumimat Plus LB96V-H を用いた。

測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を活性値とした。発光値/ OD₆₀₀ の数値を単位菌数あたりのルシフェラーゼ活性とした。

(4) 接合を用いた相同組換えによる遺伝子破壊

R. jostii RHA1 中の目的の遺伝子を破壊するために、van der Geize らによる方法を用いた¹¹⁾。目標となる遺伝子 (*benA*, *benD*, *catA*, *catB*)と用いたプライマーの位置を Fig. 3-2 に記す。プライマーの配列を Table 3-3 に記す。手順は以下のとおりである。

R. jostii RHA1 を、終濃度 25 mg/l でナリジキシン酸を添加した LBP 寒天培地 (10 g Bacto pepton, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl in 1000 ml of dist. Water)に植菌した。*Escherichia coli* S17-1 を破壊株作製用プラスミド (pK18 Δ*benA*, pK18 Δ*benD*, pK18 Δ*catA*, pK18 Δ*catB*)で形質転換した菌株を、カナマイシンを添加した LB 寒天培地に植菌した。*R. jostii* RHA1 は 30°Cで、S17-1 は 37°Cでそれぞれ培養した。

両菌体が十分に生えていることを確認し、*R. jostii* RHA1、*E. coli* S17-1 それぞれのプレートに、液体の

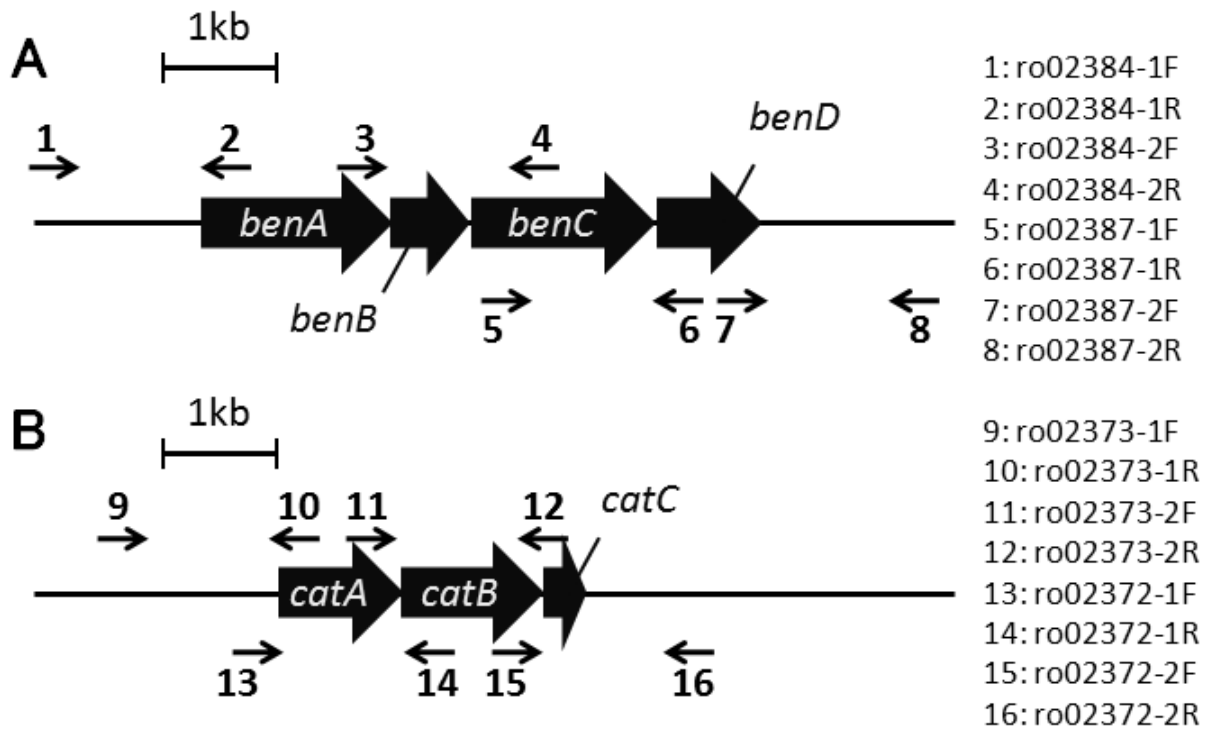


Fig. 3-2 遺伝子破壊をおこなった遺伝子とその近傍の遺伝子地図、および PCR で用いたプライマーの位置。数字とプライマー名の対応は横に記載。A : *benA* および *benD* 周辺。B : *catA* および *catB* 周辺。

Table 3-3 使用プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
ro02384-1F	AAGCTTCACGCTCACCCAGGCCGAC	forward primer for upstream of <i>benA</i>
ro02384-1R	TCTAGACAGGGTGTGTCAGTCATGGGA	reverse primer for upstream of <i>benA</i>
ro02384-2F	TCTAGAGCGAACAACCGCTGAGGGA	forward primer for downstream of <i>benA</i>
ro02384-2R	GGATCCCCGGGAACGGTGATGTTCA	reverse primer for downstream of <i>benA</i>
ro02387-1F	TCTAGAAGTACCTGCGCAGCCGCGC	forward primer for upstream of <i>benD</i>
ro02387-1R	CTGCAGGACGAGTCCGCTCATGCGA	reverse primer for upstream of <i>benD</i>
ro02387-2F	CTGCAGGGCGACCTCGGCTAGCAGC	forward primer for downstream of <i>benD</i>
ro02387-2R	AAGCTTGCGTCTTCCATGATCTTCG	reverse primer for downstream of <i>benD</i>
ro02373-1F	TCTAGACGATCTGACCGACGTGACG	forward primer for upstream of <i>catA</i>
ro02373-1R	GCATGCCTCGGTGGTGGTCATTTGT	reverse primer for upstream of <i>catA</i>
ro02373-2F	GCATGCCTCGACCCCGCGTGACCC	forward primer for downstream of <i>catA</i>
ro02373-2R	AAGCTTAAGTCGATGCCGGTTCCG	reverse primer for downstream of <i>catA</i>
ro02372-1F	GAATTCACATTTCAATGTGACTGCG	forward primer for upstream of <i>catB</i>
ro02372-1R	TCTAGAGGTGGAACGGGTCACGCG	reverse primer for upstream of <i>catB</i>
ro02372-2F	TCTAGATGGACCAGGAACCTAAGGAG	forward primer for downstream of <i>catB</i>
ro02372-2R	AAGCTTCCGACGCACCCGTCTTCG	reverse primer for downstream of <i>catB</i>
PbenA_F	TTCGGTGTCTGAGCGATTCG	forward primer for promoter of <i>benA</i>
PbenA_R	GTCGACGAGTTCGCCCTCCTTGTTCG	reverse primer for promoter of <i>benA</i>

LB を 2 ml 加え、それぞれのプレート上で菌体を掻き取り、菌液の状態にした。この菌液を 500~750 μ l ずつ採取し、混合した。混合菌液を、10,000 rpm、1 min で遠心分離し、上清を捨て、1 ml の LB 培地に菌体を懸濁、うち 200~250 μ l を LBP 培地にまいた。これを、30°C で一晩培養した。

R. jostii RHA1 と *E. coli* S17-1 が混合して生育している状態の寒天培地に、LB を 2 ml 加え、プレート上で菌体を掻き取り、菌液の状態にした。この菌液 100 μ l をナリジキシン酸とカナマイシンを添加した LBP 寒天培地に植菌した。およそ 3 日後にコロニーを得た。

得られたコロニーを、ナリジキシン酸とカナマイシンを添加した LBP 寒天培地と、ナリジキシン酸とカナマイシンと終濃度 10% の sucrose を添加した LBP 寒天培地に番地付けして植えた。sucrose が添加されたプレートでのみ生えないコロニーが、1 回目の相同組換えを起こした目的のコロニーである。

得られたコロニーを、10 ml の LB で一晩液体培養した。液体培養した菌液のうち 100 μ l を、終濃度 10 % の sucrose を添加した LBP 寒天培地にまいた。2~3 日後にコロニーが得られた。

得られたコロニーを、LBP 寒天培地と、カナマイシンを添加した LBP 寒天培地に番地付けして植菌した。カナマイシンを添加したプレートでのみ生えないコロニーが、2 回目の相同組換えを起こした遺伝子破壊株の候補株である。

得られた候補株については、PCR とサザンハイブリダイゼーションによって目標の遺伝子の破壊を確認した。

(5) TSS 法を用いた大腸菌の形質転換

E. coli S17-1 を破壊株作製用プラスミド (pK18 Δ benA、pK18 Δ benD、pK18 Δ catA、pK18 Δ catB) で形質転換するためには、以下に示す TSS 培地を使用する TSS 法を用いた。

E. coli S17-1 を LB 2 ml、37°C で一晩培養した。また、50 ml の LB 培地を 37°C であらかじめ暖めておいた。前培養液 0.5 ml を、暖めておいた 50 ml の LB 培地に植菌し、OD₆₀₀ が 0.3~0.4 になるまで、2~2.5 時間培養した。遠心分離で菌体を回収し、0.5 ml の TSS 培地 (10 ml 2×LB medium pH 6.5, 5 ml PEG3350 40 %, 1 ml DMSO, 4 ml MgCl₂ 250 mM) に懸濁し、competent cell とした。100 μ l の competent cell に、破壊株作製用プラスミドを加え、30~60 分氷上で静置した。その後、37°C で 5 分間、ヒートショックを与え、1.5 時間、しんとう培養した。これを寒天培地に植菌して、37°C で培養し、コロニーを得た。

3-3 結果

(1) *bphAa* プロモーター活性への安息香酸の影響

bphAa レポータープラスミドとして pKLAF1 を用い、*bphAa* プロモーター転写活性を測定した。pKLAF1 を導入した *R. jostii* RHA1 を 1/5LB 培地、および、それにビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加えた 3 条件で培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を Fig. 3-3 に示す。

1/5LB 培地の場合、*bphAa* プロモーター転写活性の上昇は見られなかった。ビフェニルを加えた系では、0 時間を基準として 6 時間で 4 倍、9 時間で 12 倍程度まで *bphAa* プロモーター転写活性が上昇した。一方、ビフェニルと安息香酸を加えた系では *bphAa* プロモーター転写活性化は 9 時間でも 3 倍程度と抑制された。

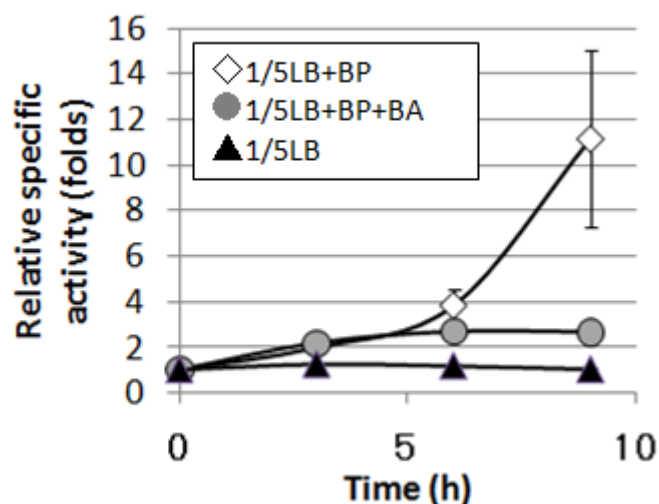


Fig. 3-3 *R. jostii* RHA1 における *bphAa* プロモーター活性に対するビフェニル (BP)、安息香酸 (BA) の影響。pKLAFl を導入した *R. jostii* RHA1 を 1/5LB 培地にビフェニル (終濃度 10 mM) 及び、ビフェニル+安息香酸 (終濃度 10 mM) を加えた培地で培養し、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。

(2) 相同組換えによる *benA*、*benD*、*catA*、*catB* 遺伝子の破壊

相同組換えを用いて、安息香酸以降の分解に関与する *benA*、*benD*、*catA*、*catB* 遺伝子の破壊株の作製を試みた。

候補株を取得後、破壊株用プラスミド作製に用いた目標遺伝子の上流断片の 5'側プライマーと、下流断片の 3'側プライマーを用いた PCR (Fig. 3-4)、およびサザンハイブリダイゼーション (データは示さない) によって目標遺伝子の欠損を確認した。このようにして得られた破壊株をそれぞれ *R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA*、*R. jostii* RHA1Δ*catB* と命名した。

これらの遺伝子破壊株を、安息香酸を終濃度 10 mM で添加した M9 寒天培地に塗布して生育を観察したところ、生育しなかった (Fig. 3-5)。また、培地に安息香酸を添加して *R. jostii* RHA1Δ*catA* を培養したところ、菌液が黒褐色を呈した (Fig. 3-6)。

(3) 破壊株における *bphAa* プロモーター転写活性

作製した遺伝子破壊株 *R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA*、*R. jostii* RHA1Δ*catB* にレポータープラスミド pKLAFl を導入した後に、1/5LB 培地、および 1/5LB 培地にビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加えて培養し、*bphAa* プロモーター活性を比較した。

R. jostii RHA1Δ*benA* (pKLAFl) においては、*R. jostii* RHA1 (pKLAFl) と比較してビフェニルと安息香酸を添加した系の抑制が弱まり、ビフェニルのみの系と近い活性を示した (Fig. 3-7A)。*R. jostii* RHA1Δ*benD* (pKLAFl) では、*R. jostii* RHA1Δ*benA* (pKLAFl) と比較して、ビフェニルと安息香酸を添加した系と、ビフェニルのみの系の両方で活性化が抑えられた (Fig. 3-7B)。*R. jostii* RHA1Δ*catA* (pKLAFl) においては、ビフェニルを添加した系と、ビフェニルと安息香酸を添加した系の双方で、*R. jostii* RHA1Δ*benD* よりもさらに低い、1/5LB の系と同程度の活性が観察された (Fig. 3-7C)。このとき、*R. jostii* RHA1Δ*catA* の菌液の濁度 (OD₆₀₀) は上昇傾向を示していた (Fig. 3-8)。*R. jostii* RHA1Δ*catB* (pKLAFl) では、ビフェニルを添加

した系では活性の上昇が、ビフェニルと安息香酸を加えた系で活性の抑制が観察された (Fig. 3-7D)。
R. jostii RHA1 (pKLAPBENF)と *R. jostii* RHA1 Δ *catA* (pKLAPBENF)を 1/5LB 培地にビフェニルと安息香酸を添加した系で培養した場合、ともに *benA* プロモーターからの転写が活性化した (Fig. 3-9)。

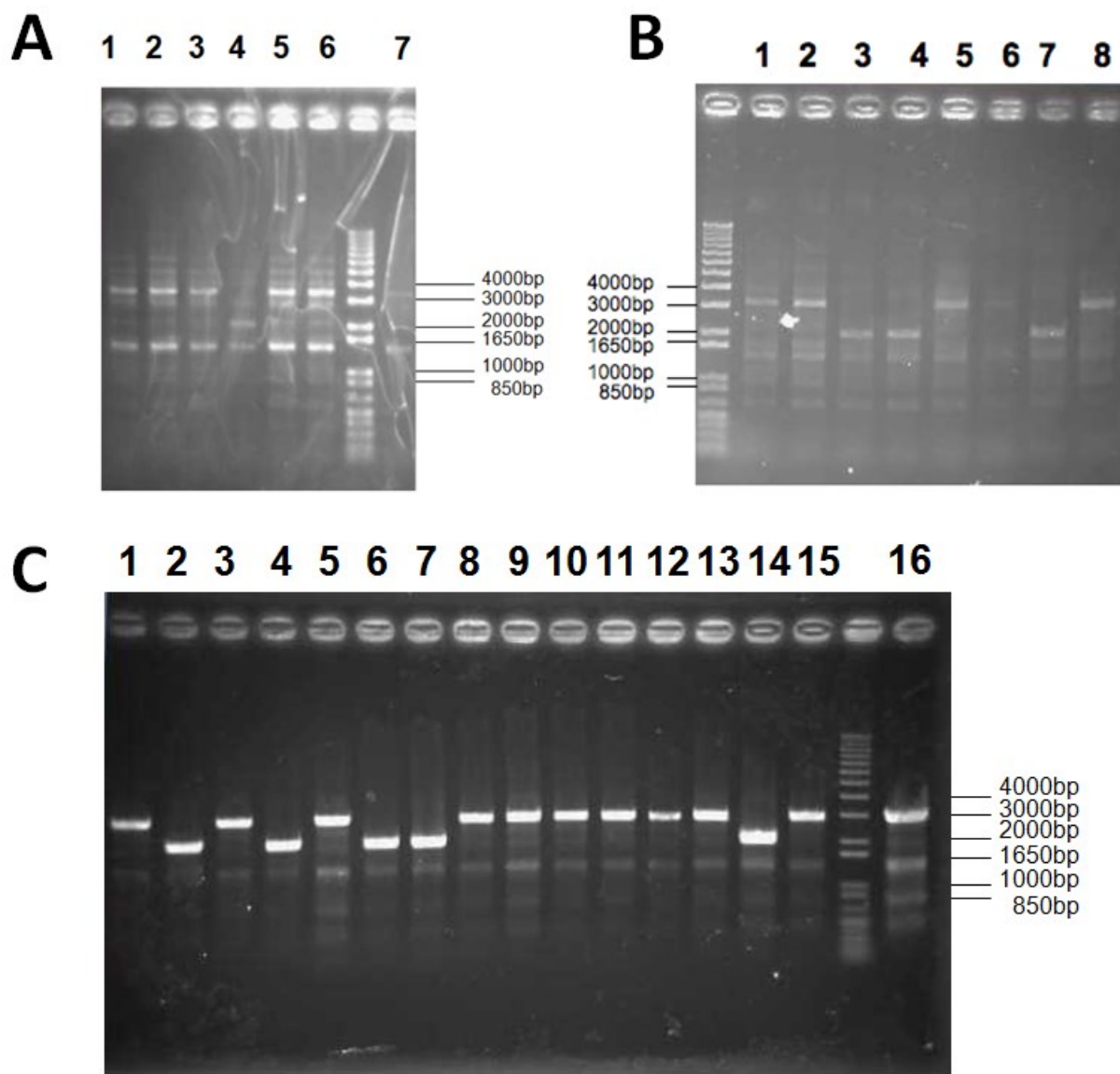


Fig. 3-4 各遺伝子破壊株の電気泳動による遺伝子破壊の結果。 *benD* 破壊株のデータは示さない。 A : *benA* 破壊の確認のために ro02384-1F と ro02384-2R を用いた PCR 結果。 Lane 1-6 は *R. jostii* RHA1 Δ *benA* 候補株の、Lane 7 は *R. jostii* RHA1 の total DNA をテンプレートとしたもの。 *R. jostii* RHA1 は約 3500 bp となるバンドが、遺伝子破壊に成功した Lane 4 の候補株では約 3000 bp となっている。 B : *catB* 破壊の確認のために ro02372-1F と ro02340-2R を用いた PCR 結果。 Lane 1-7 は *R. jostii* RHA1 Δ *catB* 候補株の、Lane 8 は *R. jostii* RHA1 の total DNA をテンプレートとしたもの。 *R. jostii* RHA1 は約 3000 bp となるバンドが、遺伝子破壊に成功した Lane 3, 4, 7 の候補株では約 2000 bp となっている。 C : *catA* 破壊の確認のために ro02372-1F と ro02340-2R を用いた PCR 結果。 Lane 1-15 は *R. jostii* RHA1 Δ *catA* 候補株の、Lane 16 は *R. jostii* RHA1 の total DNA をテンプレートとしたもの。 *R. jostii* RHA1 は約 3000 bp となるバンドが、遺伝子破壊に成功した Lane 2, 4, 6, 7, 14 の候補株では約 2000 bp となっている。

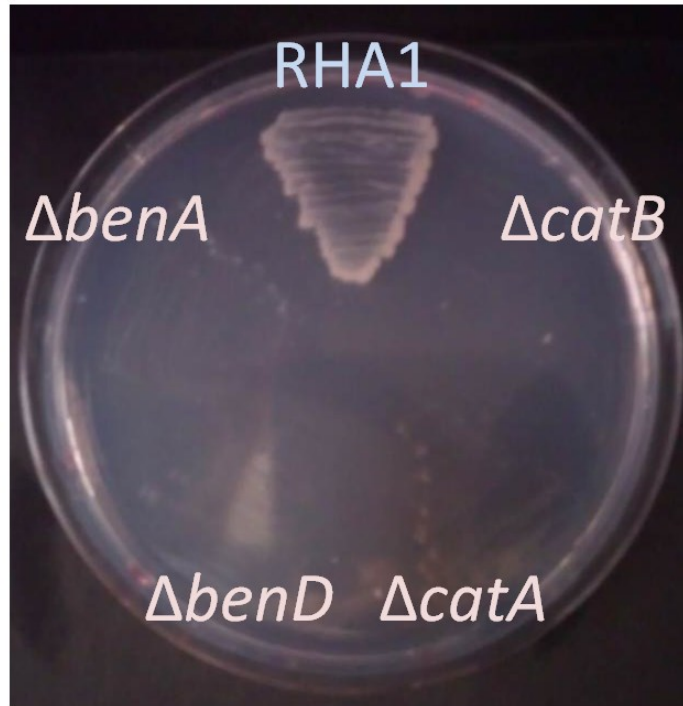


Fig. 3-5 *R. jostii* RHA1、*R. jostii* RHA1 Δ *benA*、*R. jostii* RHA1 Δ *benD*、*R. jostii* RHA1 Δ *catA*、*R. jostii* RHA1 Δ *catB* を、安息香酸 (終濃度 10 mM)を加えた M9 プレート上に塗布し、生育を観察した結果。*R. jostii* RHA1 以外では、菌体の生育を観察できなかった。

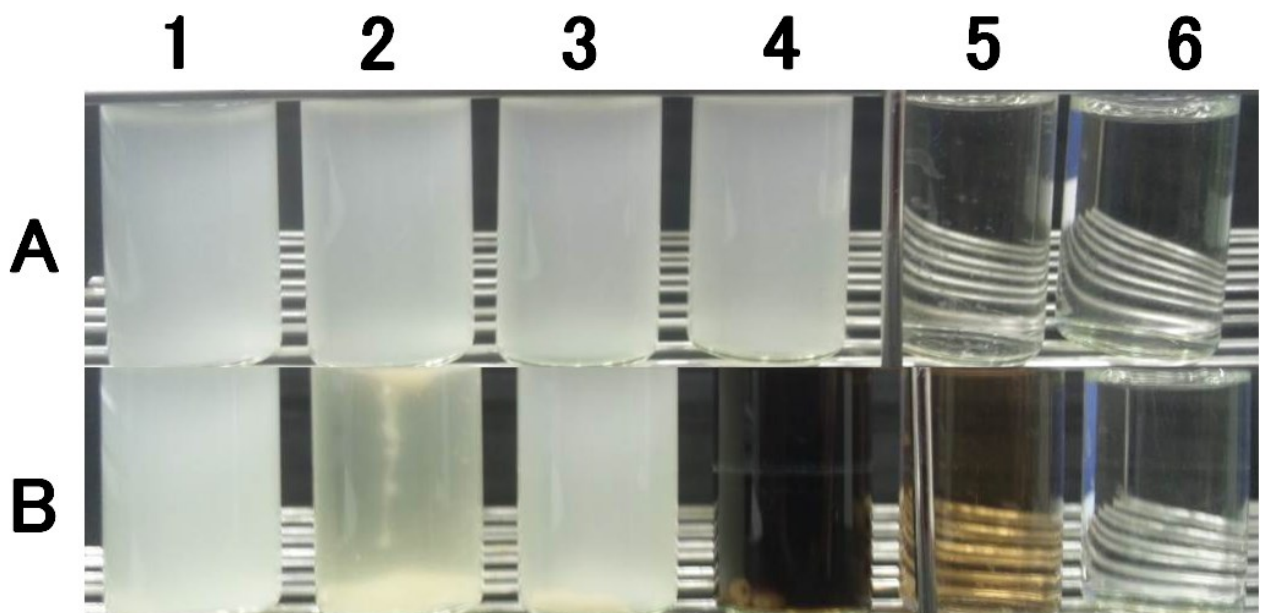


Fig. 3-6 *R. jostii* RHA1 と *R. jostii* RHA1 Δ *catA* を、1/5LB 培地と安息香酸を加えた 1/5LB 培地で培養した結果。A : 0 時間。B : 20 時間。1 : 1/5LB 培地に *R. jostii* RHA1 を植菌。2 : 1/5LB 培地+安息香酸 (終濃度 10 mM)に *R. jostii* RHA1 を植菌。3 : 1/5LB 培地に *R. jostii* RHA1 Δ *catA* を植菌。2 : 1/5LB 培地+安息香酸 (終濃度 10 mM)に *R. jostii* RHA1 Δ *catA* を植菌。5 : 1/5LB 培地+カテコール (終濃度 10 mM)。カテコールは常温で放置すると、分子同士が重合し黒褐色を呈する。6 : 1/5LB 培地。培地のみの場合は、色の変化は起こらない。

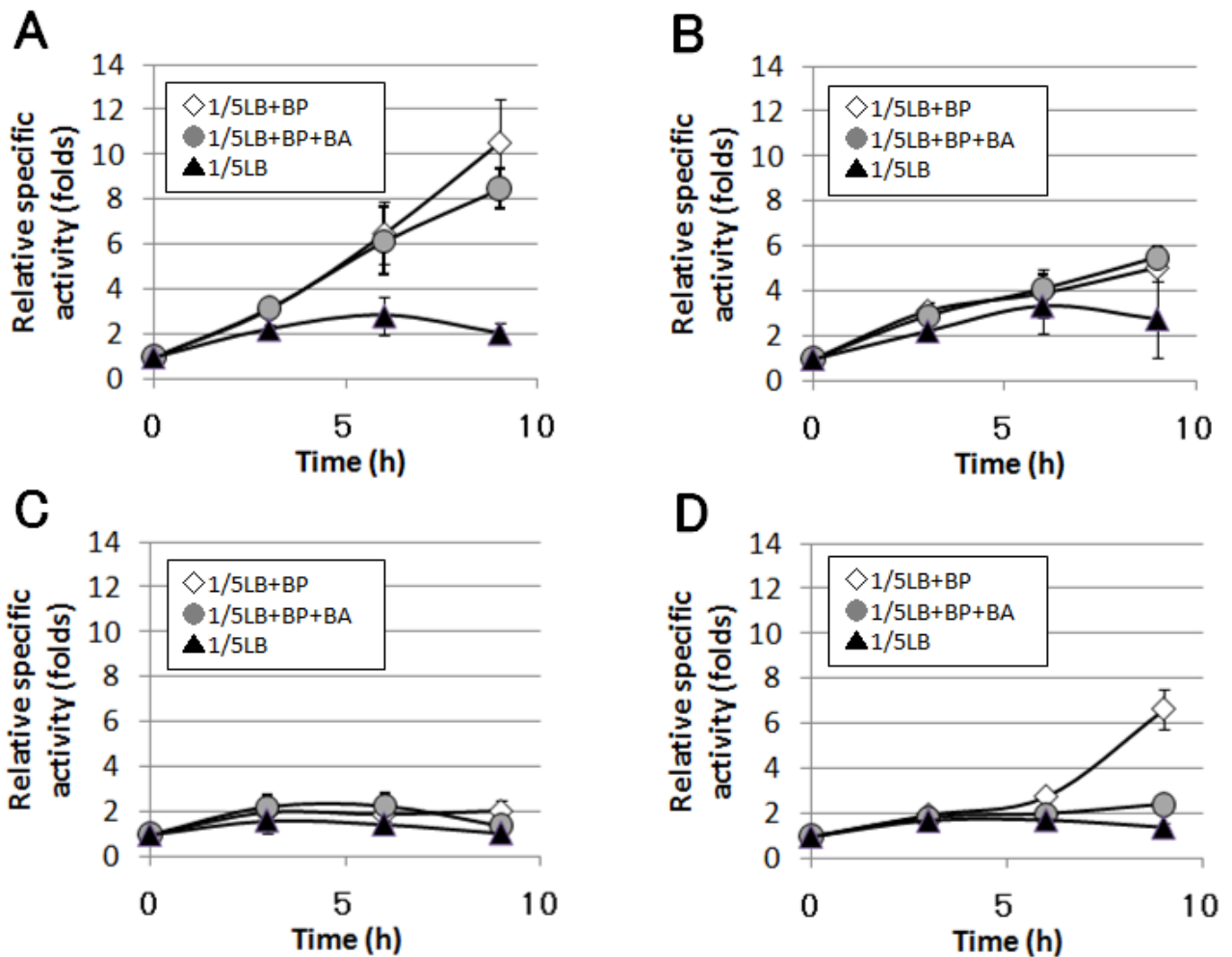


Fig. 3-7 各遺伝子破壊株における *bphAa* プロモーター活性に対するビフェニル (BP)、安息香酸 (BA) の影響。pKLAf1 を導入した各遺伝子破壊株を 1/5LB 培地にビフェニル (終濃度 10 mM) 及び、ビフェニル+安息香酸 (終濃度 10 mM) を加えた培地で培養し、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。A : *R. jostii* RHA1Δ*benA* (pKLAf1) B : *R. jostii* RHA1Δ*benD* (pKLAf1) C : *R. jostii* RHA1Δ*catA* (pKLAf1) D : *R. jostii* RHA1Δ*catB* (pKLAf1)

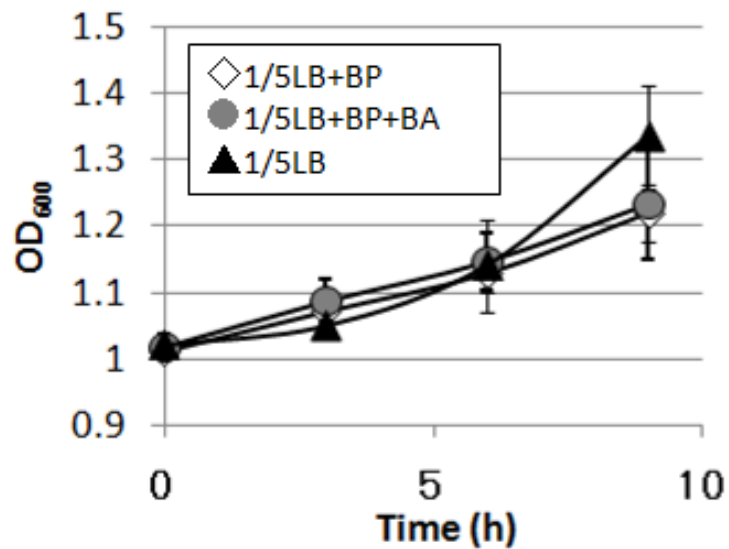


Fig. 3-8 *R. jostii* RHA1 Δ catA (pKLAF1)を用いたプロモーター活性測定の際の菌液の濁度 (OD₆₀₀)の変化。

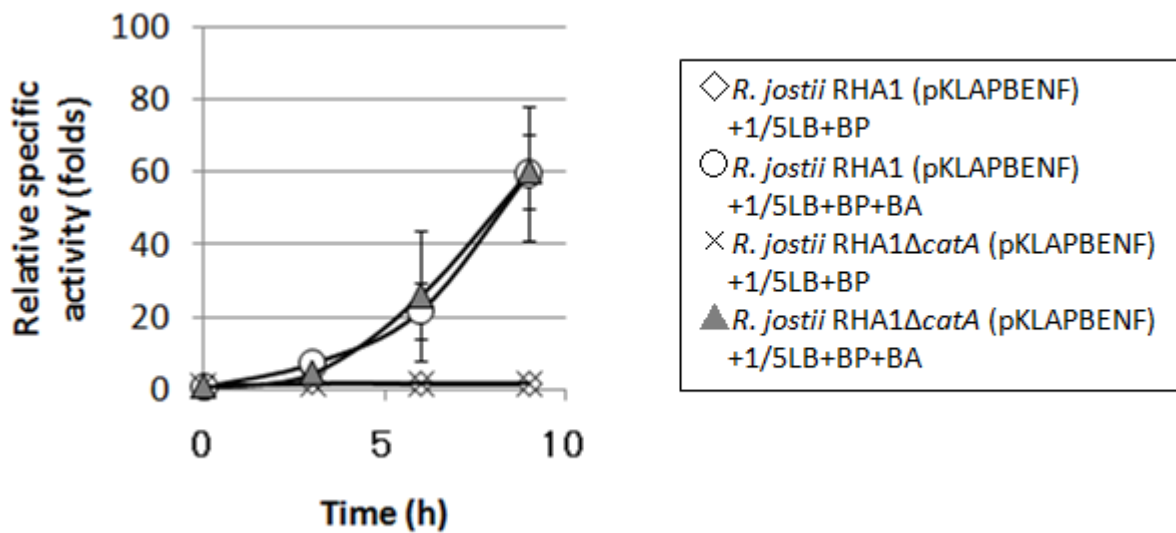


Fig. 3-9 *R. jostii* RHA1 と *R. jostii* RHA1 Δ catA における *benA* プロモーター活性の変化。pKLAPBENAF を導入した菌株を 1/5LB 培地にビフェニル(BP)と安息香酸(BA)をともに終濃度 10 mM になるように加えて培養した。3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定し、発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。

3-4 考察

本研究は、PCB 分解遺伝子群の転写発現メカニズムを解明するための研究の一部である。

本章の結果によって、*R. jostii* RHA1 における PCB 分解遺伝子群の転写活性化抑制は、従来知られていたグルコースやフルクトースの存在下のみならず、*cis*-1, 2-dihydroxycyclohexa-3, 5-diene-1-carboxylate やカテコールの存在下においても観察されることが分かった。

R. jostii RHA1 における *bphAa* プロモーターの転写活性は、1/5LB 培地のみでは上昇せず、1/5LB にビフェニルを添加すると上昇するが、ビフェニルとさらに安息香酸を添加すると 1/5LB のみの場合と同程度まで活性が抑制されることが観察された (Fig. 3-3)。安息香酸は、*R. jostii* RHA1 におけるビフェニルの代謝産物であり、また *R. jostii* RHA1 の菌体内でさらに代謝されていく。そのため、観察された活性化の抑制が安息香酸ではなく、さらに下流の代謝産物である可能性が考えられた。

そこで、安息香酸の代謝に関わる遺伝子 *benA*、*benD*、*catA*、*catB* をそれぞれ破壊した変異株を作製した。これらの変異株は、安息香酸を単一炭素源として生育することができなかった (Fig. 3-5)。この結果から、*benA*、*benD*、*catA*、*catB* の各遺伝子は安息香酸の代謝経路に関わるタンパク質をコードする唯一の遺伝子であることが分かった。また *R. jostii* RHA1Δ*catA* は、1/5LB に安息香酸を加えて培養した場合、菌液中に蓄積したカテコールに由来すると考えられる黒褐色化を示した (Fig. 3-6)。以上より、これらの変異株は破壊された代謝経路の手前の代謝産物が産物が蓄積するものと考え、*R. jostii* RHA1 と同様の方法・条件で *bphAa* プロモーターの転写活性を測定した。

その結果 (Fig. 3-7)、*R. jostii* RHA1Δ*benA* では安息香酸を加えた条件でもビフェニルによる転写活性化が抑制されず、*R. jostii* RHA1Δ*benD* ではビフェニルおよびビフェニルと安息香酸を加えた系で活性の抑制が、*R. jostii* RHA1Δ*catA* では *R. jostii* RHA1Δ*benD* よりもさらに強い抑制が観察された。*R. jostii* RHA1Δ*catB* では、ビフェニルの添加で転写活性が上昇し、安息香酸の添加で活性化が抑制される野生株と同様の傾向が観察された。

以上より、抑制の原因物質は *R. jostii* RHA1Δ*benD* で蓄積されると推測される *cis*-1, 2-dihydroxycyclohexa-3, 5-diene-1-carboxylate や、*R. jostii* RHA1Δ*catA* で蓄積されると推測されるカテコールであることが強く示唆された。特にカテコールは、*cis*-1, 2-dihydroxycyclohexa-3, 5-diene-1-carboxylate よりも強い抑制物質であると考えられる。

カテコールは菌体に対する毒性を持つことが知られているため、カテコールの毒性が菌全体の転写活性を下げ、その結果として *bphAa* プロモーターの転写活性を低下させている可能性も考えられた。しかし、*R. jostii* RHA1Δ*catA* (pKLAF1)を用いたプロモーター活性測定の際に菌液の濁度 (OD₆₀₀)は上昇し続ける結果を示した (Fig. 3-8)ことから、プロモーター活性はカテコールの毒性で下がったわけではない。

また、*bphAa* 以外のプロモーターに対する代謝産物の影響を調べるため、*benA* のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミド pKLAPBENF を用いて、転写活性化を測定した。*benA* のプロモーター領域は、*bphAa* とは異なるメカニズムで転写制御される。この結果、*benA* の転写活性は、野生株とカテコールが蓄積する *R. jostii* RHA1Δ*catA* で同様の結果を示した (Fig. 3-9)。この結果より、カテコールによる転写活性化の抑制は、*bphAa* プロモーターに対して特異的な現象であることが示唆された。

PCB分解遺伝子群の転写制御メカニズムに関しては本研究で用いている *R. jostii* RHA1のほかに、*Acidovorax* sp. KKS102、*P. pseudoalcaligenes* KF707、*Rhodococcus* sp. DK17などが研究されている。

Acidovorax sp. KKS102 や *P. pseudoalcaligenes* KF707 では、PCB 分解遺伝子群はオペロンとしてゲノム

中の一カ所に集中して存在している。*Acidovorax* sp. KKS102 においては、BphS タンパク質が分解遺伝子群の転写抑制因子として機能しており、BphC タンパク質による代謝産物が BphS タンパク質と結合すると転写抑制が解かれ、転写が活性化する¹⁾。*P. pseudoalcaligenes* KF707 においては、BphR1 と BphR2 の 2 種類の転写活性化タンパク質が協調して分解遺伝子群の転写を制御していることが明らかとなっている²⁾。*Acidovorax* sp. KKS102 においては、コハク酸、フマル酸、酢酸の存在下で PCB 分解遺伝子群の転写が抑制されることが明らかになっている³⁾が、これらの菌においては、ビフェニル代謝産物による転写抑制の報告はない。*R. jostii* RHA1 においては、ビフェニル分解遺伝子群の転写がグルコースやフルクトースの存在下で抑制されることが明らかになっている⁴⁾。また、*R. jostii* RHA1 と同じ *Rhodococcus* 属の DK17 においては、フタル酸の分解遺伝子群が安息香酸存在下で抑制されることが明らかになっている⁵⁾。しかしながら、この場合の安息香酸はフタル酸の代謝産物ではないため、カタボライト抑制とはいえない。

3-5 結論

抑制の原因物質を解明するため、安息香酸以降の代謝産物の分解遺伝子を破壊することで代謝産物を蓄積させる変異株を作製し、レポータープラスミドを用いて *bphAa* プロモーター活性を測定した。

RHA1 においてビフェニル存在下における *bphAa* プロモーターの転写活性化は、ビフェニル分解の中間代謝産物である安息香酸の存在下で抑制された。抑制の原因物質が、安息香酸か、より下流の分解産物であるかを解明するため、*R. jostii* RHA1 Δ *benA*、*R. jostii* RHA1 Δ *benD*、*R. jostii* RHA1 Δ *catA*、*R. jostii* RHA1 Δ *catB* を作製し、解析した。その結果、抑制の原因物質は *R. jostii* RHA1 Δ *benD* で蓄積されると推測される *cis*-1, 2-dihydroxycyclohexa-3, 5-diene-1-carboxylate と、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* で蓄積されると推測されるカテコールであることが強く示唆された。特にカテコールは強い抑制の原因物質であると考えられる。

参考文献

- 1) Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, Takagi M, Ohta A, Nagata Y. BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. *J Biol Chem.* **276**, 36146-54, 2001
- 2) Watanabe T, Fujihara H, Furukawa K. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Bacteriol.* **185**, 3575-82, 2003
- 3) Ohtsubo Y, Goto H, Nagata Y, Kudo T, Tsuda M. Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Mol Microbiol.* **60**, 1563-75, 2006
- 4) Araki N, Niikura Y, Miyauchi K, Kasai D, Masai E, Fukuda M. Glucose-mediated transcriptional repression of PCB/biphenyl catabolic genes in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **20**, 53-62, 2011
- 5) Choi KY, Zylstra GJ, Kim E. Benzoate catabolite repression of the phthalate degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 1370-4, 2007
- 6) Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Characterization of Transcriptional Regulatory Genes for Biphenyl Degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriology*, **186**, 2134-2146, 2004
- 7) Simon R, Preifer U, Puhler A: Abroad host renege mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gramnegative bacteria. *Nat Biotech*, **9**, 784-791, 1983
- 8) Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequencing of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene*, **33**, 103-119, 1985
- 9) Takeda H, Hara N, Sakai M, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**, 1249-1258, 2004
- 10) Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowskj, Thierbach G, Puhler A: Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*.**145**, 69-73, 1994
- 11) Van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, van der Meijden P, Dijkhuizen L. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol Lett.* **205**, 197-202, 2001

第 4 章

BphS/BphT 支配下遺伝子群の発現への 中間分解産物カテコールの影響

4-1 緒言

前章までの研究で、培地中にビフェニルの中間代謝産物である安息香酸を添加するとビフェニルによる *bphAa* プロモーターの転写活性化が抑制されること、安息香酸以下の分解遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を用いた実験により、安息香酸より下流の代謝産物であるカテコールが *bphAa* プロモーターのビフェニルによる転写活性化を抑制することを明らかにした。

R. jostii RHA1 の PCB 分解に関わる遺伝子群はゲノム上に分かれてオペロンとして存在しており (Fig. 4-1)、*bphAa*、*etbD1* (*bphD* ホモログ)、*etbAd* (*bphAd* ホモログ)、*etbAa1* (*bphAa* ホモログ)、*etbAa2* (*bphAa* ホモログ)それぞれの遺伝子上流に共通のプロモーター領域が存在する¹⁾。これらの遺伝子群の転写は、ビフェニル存在下で、センサーである BphS1、およびレスポンスレギュレーターである BphT1/ BphT2 タンパク質からなる二成分制御系によって同時に活性化されることが明らかにされている^{2,3)}。基質であるビフェニルを BphS1 が感知することで BphS1 が自己リン酸化し、リン酸化した BphS1 が BphT1/T2 をリン酸化し、リン酸化された BphT1/T2 がビフェニル分解遺伝子群のプロモーター領域に結合することによって転写が開始されると考えられる (Fig. 4-1)。

そこで本章では、*R. jostii* RHA1 の PCB 分解能力を発揮させるにあたって、前章において明らかにしたカテコールによる抑制が *bphAa* プロモーターに特異的であるか、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響するのかの差異は重要な知見になると考え、実験を行った。カテコールによる抑制が BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響するならば、このカテコールによる抑制を解除して *bphAa* プロモーターの転写を強化する手法を開発することで、他のビフェニル分解遺伝子群の転写強化にも役立ち、効率よい PCB 分解菌の育種技術に貢献すると考える。

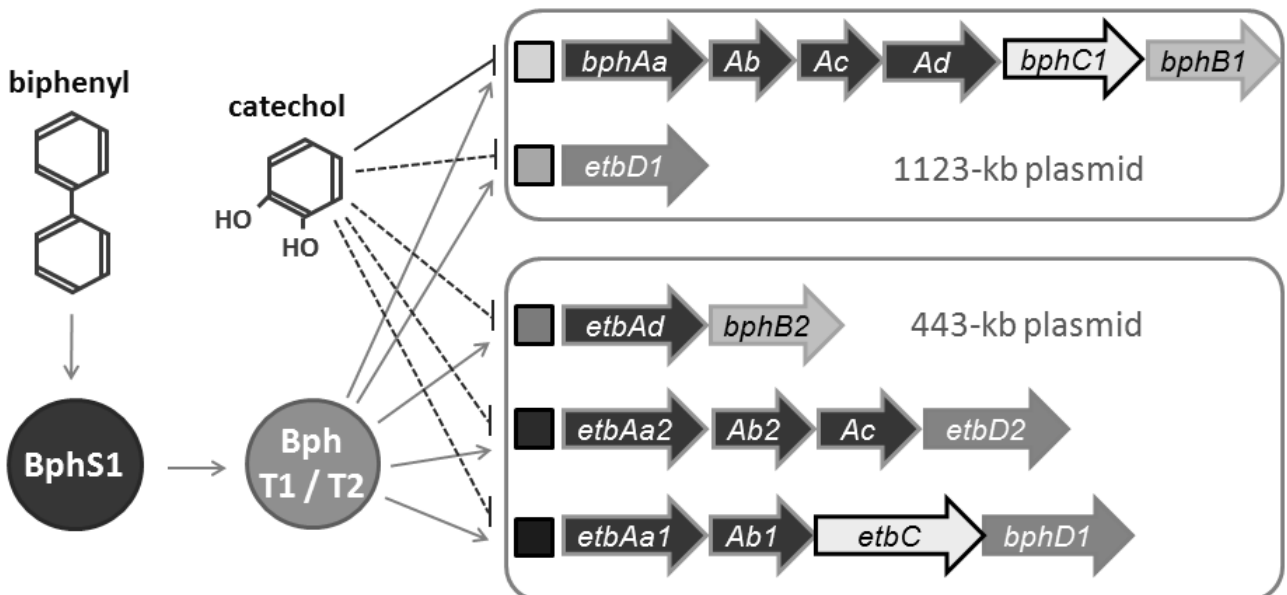


Fig. 4-1 *R. jostii* RHA1 におけるビフェニル分解遺伝子群の、ビフェニルによる転写活性化とカテコールによる転写活性化抑制のモデル図。カテコールによる転写活性化抑制は、*bphAa* プロモーターのみならず、BphST 支配下の他の 4 つのプロモーターにも影響している可能性が考えられる。

4-2 材料および方法

(1) 使用菌株とプラスミド

本章で用いた菌株を Table 4-1 に、プラスミドを Table 4-2 に示す。*R. jostii* RHA1 および *R. jostii* RHA1 Δ *catA* の培養は 1/5LB 培地 (2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. water)、またはビフェニルを単一炭素源とした M9 培地 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄·7H₂O solution, 1 ml 0.1 M CaCl₂ solution, in 1,000 ml of dist. water)を用いて、30 °Cでおこなった。ビフェニルは寒天培地のときは蓋上に置いて、液体培地には粉を直接加えて用いた。

(2) *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

Rhodococcus 属細菌の形質転換は既報⁵⁾に従いエレクトロポレーション法によっておこなった。

(3) プロモーター活性測定

R. jostii RHA1 のビフェニル分解遺伝子群の転写を観察するため、*etbD1*、*etbAd*、*etbAa1*、*etbAa2* の各プロモーター領域をレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*)の上流に挿入したプラスミド pKLAED1、pKLAEA4、pKLAED2、pKLABD1 (Table 3-2 に記載) をそれぞれ用いた。

各レポータープラスミドを導入した *R. jostii* RHA1、もしくは *R. jostii* RHA1 Δ *catA* を、カナマイシンを最終濃度 50 μ g/ml で添加した 1/5LB 培地を 100 ml 入ったバツフル付き三角フラスコで 48 時間培養した。遠心分離 (4,000 rpm, 10 min)して菌体を回収し、上清を捨てた後、1/5LB 培地 5 ml で菌体を洗浄し、カナマイシン (最終濃度 50 μ g/ml) を添加した 1/5LB 培地 5 ml に OD₆₀₀ が 1.0 となるように調整した。必要に応じてビフェニル、安息香酸ナトリウムを最終濃度 10 mM となるように加えた。30 °Cで培養し、3 時間おきに発光値と菌液の濁度 (OD₆₀₀)を測定した。発光値は菌液 100 μ l に 1-decanal を 1 %含む Lux Buffer (10 mM リン酸 Buffer (pH 7.0) 50 ml, 100% EtOH 49 ml)を 25 μ l 加え、5 秒間の発光を測定した。発光は BERTHOLD TECHNOLOGIES 社製 MicroLumat Plus で測定した。測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を発光値とした。発光値 / OD₆₀₀ の数値を単位菌数あたりのプロモーター転写活性とした。各サ

Table 4-1 使用菌株

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB degrader, wild type, BPH ⁺ , BEN ⁺	5)
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> -deleted mutant of RHA1, BEN ⁻	4)

BPH⁺, growth on biphenyl; BEN⁺, growth on benzoate; BEN⁻, no growth on benzoate

Table 4-2 使用プラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pKLAEA4	Promoter plasmid carrying <i>etbAd</i> promoter region, Km ^r	1)
pKLAED2	Promoter plasmid carrying <i>etbAa2</i> promoter region, Km ^r	6)
pKLABD1	Promoter plasmid carrying <i>etbAa1</i> promoter region, Km ^r	6)
pKLAED1	Promoter plasmid carrying <i>etbD1</i> promoter region, Km ^r	6)

Km^r, kanamycin resistance

ンプルにおける 0 時間における発光値を 1 とし、それとの相対値によって各菌株のプロモーター活性を比較した。

4-3 結果

(1) *R. jostii* RHA1 における BphS/BphT 支配下のプロモーター活性の観察

BphS/BphT 支配下の 4 つのプロモーター領域 *etbD1*、*etbAd*、*etbAa1*、*etbAa2* にそれぞれ対応したレポータープラスミド pKLAED1、pKLAEA4、pKLAED2、pKLABD1 (Table 3-2) を、それぞれ *R. jostii* RHA1 に導入した。これらの菌株を 1/5LB 培地、および、それにビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加えた培地で培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。

0 時間を基準として 9 時間時点のプロモーター活性は、*etbD1* プロモーターにおいてビフェニルを加えた場合は約 17 倍に上昇し、さらに安息香酸を加えた場合は約 10 倍にとどまった (Fig. 4-2.A)。*etbAd* プロモーターにおいては、ビフェニルを加えた場合は約 8 倍、さらに安息香酸を加えた場合は約 5 倍 (Fig.

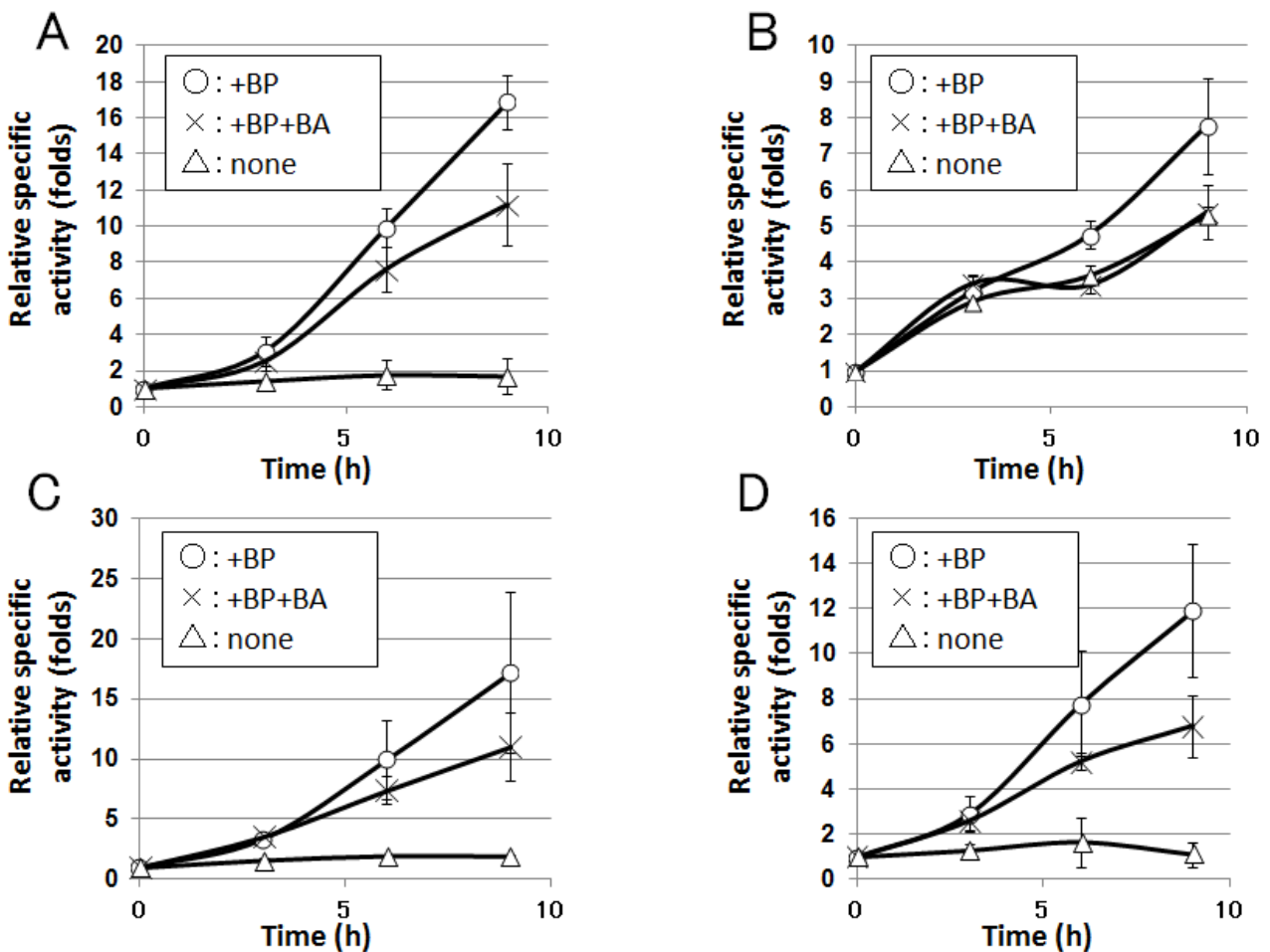


Fig. 4-2 RHA1 における BphST 支配下の 4 つのプロモーター転写活性に対する、ビフェニル (BP)、安息香酸 (BA) の影響。それぞれのプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドを *R. jostii* RHA1 に導入し、1/5LB 培地にビフェニル (終濃度 10 mM) 及び、ビフェニル+安息香酸 (終濃度 10 mM) を加えた培地で培養、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの各プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。A : pKLAED1 (*etbD1* プロモーター) B : pKLAEA4 (*etbAd* プロモーター) C : pKLABD1 (*etbAa1* プロモーター) D : pKLAED2 (*etbAa2* プロモーター)

4-2.B)、*etbAa1* プロモーターにおいては、ビフェニルを加えた場合は約 17 倍、さらに安息香酸を加えた場合は約 11 倍 (Fig. 4-2.C)、*etbAa2* プロモーターにおいては、ビフェニルを加えた場合は約 12 倍、さらに安息香酸を加えた場合は約 7 倍程度の転写活性の上昇が観察された (Fig. 4-2.D)。1/5LB のみの場合は、*etbAd* プロモーター以外の転写活性は 2 倍前後まで上昇し、*etbAd* プロモーターのみ 5 倍程度まで上昇した (Fig. 4-2.B)。

(2) *R. jostii* RHA1 Δ *catA*における BphS/BphT 支配下のプロモーター転写活性の観察

BphS/BphT 支配下の 4 つのプロモーター転写活性に対するカテコールの影響を観察するため、カテコールが蓄積すると考えられる *R. jostii* RHA1 Δ *catA* に、レポータープラスミド pKLAED1、pKLAE4、pKLAED2、pKLABD1 をそれぞれ導入して実験を行った。これらの形質転換株を 1/5LB 培地にビフェニルを加えた培地で培養して、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定し、前項の実験で得られた RHA1 株における同条件のルシフェラーゼ活性と比較を行った。結果を Fig. 4-3 に示す。

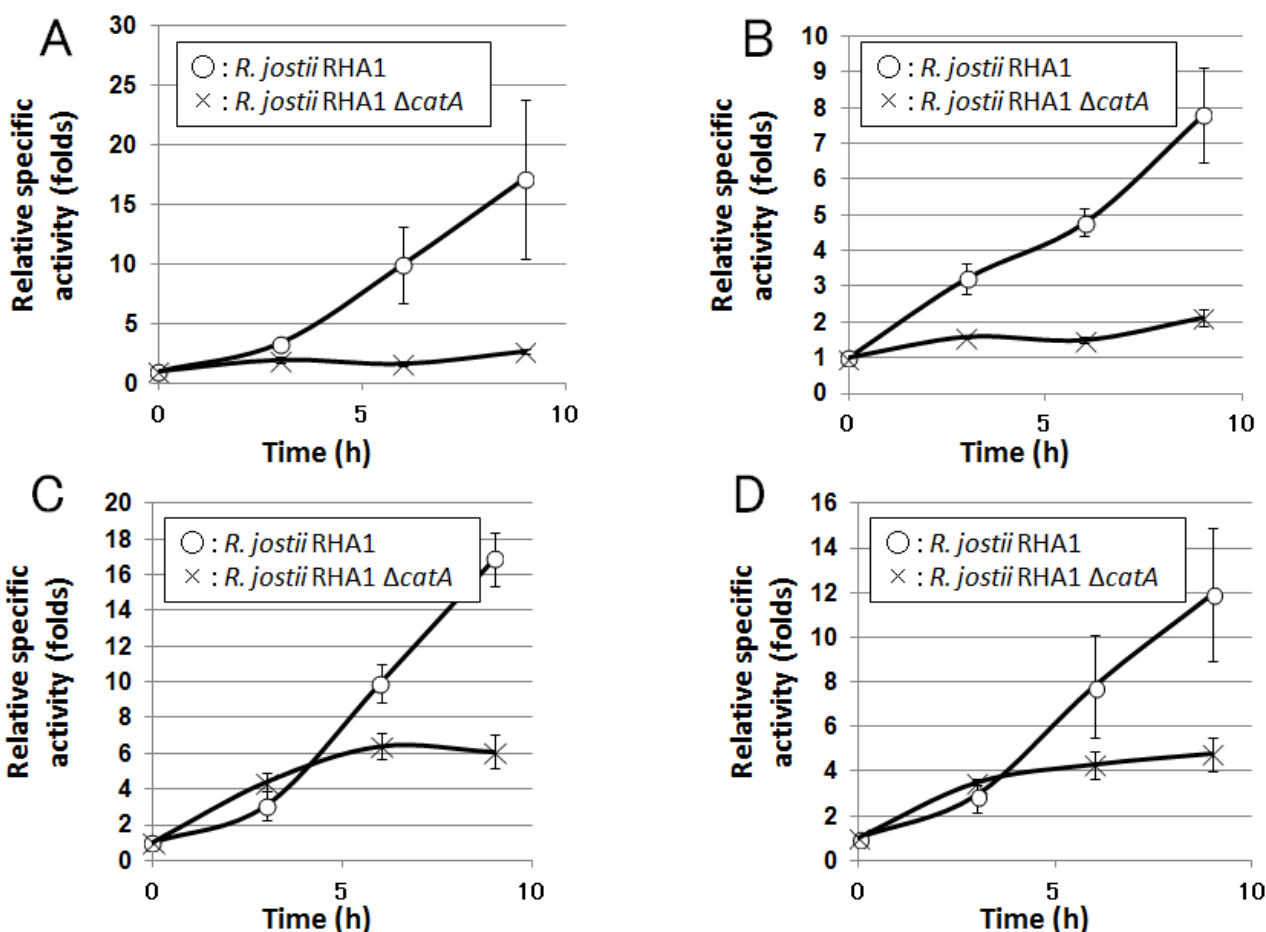


Fig. 4-3 *R. jostii* RHA1 Δ *catA*における BphST 支配下の 4 つのプロモーター転写活性。それぞれのプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドを RHA1 に導入し、1/5LB 培地にビフェニル (終濃度 10 mM)を加えた培地で培養、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの各プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。A : pKLAED1 (*etbD1* プロモーター) B : pKLAE4 (*etbAd* プロモーター) C : pKLABD1 (*etbAa1* プロモーター) D : pKLAED2 (*etbAa2* プロモーター)

R. jostii RHA1 と *R. jostii* RHA1 Δ *catA* の結果を比較すると、0 時間を基準として 9 時間時点の *etbD1* プロモーター転写活性は、*R. jostii* RHA1 において約 17 倍であったものが、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* においては約 2 倍にとどまった (Fig. 4-3.A)。同様に、*etbAd*、*etbAa1*、*etbAa2* の各プロモーターでは RHA1 株と Δ *catA* 株の 9 時間での転写活性化がそれぞれ 8 倍と 2 倍 (Fig. 4-3.B)、17 倍と 6 倍 (Fig. 4-3.C)、12 倍と 5 倍 (Fig. 4-3.D)となり、いずれも *R. jostii* RHA1 Δ *catA* でビフェニルによるプロモーターの活性化に負の影響があった。

4-4 考察

本章では、PCB 分解遺伝子群の転写発現メカニズムの解明に迫るため、カテコールによる抑制が *bphAa* プロモーターに特異的か、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響するのか明らかにすることを目的とした。

そこで、BphS/BphT 支配下にあり PCB 分解に関わる 4 つの遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを用い、*R. jostii* RHA1 に導入してビフェニル、および、ビフェニルと安息香酸を加えた場合のプロモーター転写活性を観察した。また、同様のレポータープラスミドを *R. jostii* RHA1 Δ *catA* にも導入し、ビフェニルを添加して培養した場合のプロモーター転写活性を *R. jostii* RHA1 と比較した。

その結果、*R. jostii* RHA1 において BphS/BphT 支配下のビフェニル分解に関わる 4 つの遺伝子のプロモーターは *bphAa* プロモーターと同様に、ビフェニル存在下でプロモーター活性が上昇するが、さらに安息香酸を加えることで活性化に負の影響があることが示された。また、ビフェニル存在下で *R. jostii* RHA1 と *R. jostii* RHA1 Δ *catA* を比較した場合、4 つのプロモーター領域それぞれにおいて、*R. jostii* RHA1 よりも *R. jostii* RHA1 Δ *catA* においてプロモーター転写活性に対する負の影響が観察された。

この中で、1/5LB 培地の場合における *R. jostii* RHA1 の *etbAd* プロモーターの転写活性は 9 時間で 5 倍程度の上昇が観察され、*bphAa* プロモーターや他の 3 つのプロモーターより比較的高い結果を示した。過去の研究において、ビフェニル存在下における *etbAd* の転写量は、他のビフェニル分解遺伝子の転写量よりも、比較的低いことが示されている⁶⁾。そのため、今回の実験においては、*etbAd* のビフェニルによる転写活性上昇に対して培養中の菌体内の転写活性の全体的な上昇による影響が相対的に大きく現れたものと考えられる。ビフェニルに安息香酸を加えた場合の *etbAd* プロモーターの転写活性は、1/5LB と同程度の倍率となっており、今回の実験で用いた他の 3 つのプロモーターよりも安息香酸に対する感受性が高いことを示唆している。

また、*R. jostii* RHA1 と *R. jostii* RHA1 Δ *catA* の結果の比較より、ビフェニルによる転写活性化がカテコールの蓄積によって抑制されるという現象は、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子のプロモーター全般に対して起こることが強く示唆された。*R. jostii* RHA1 の実験において 1/5LB 培地の場合のみで特異な結果を示した *etbAd* プロモーターは、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* では他の株同様の転写活性化抑制を示した。*R. jostii* RHA1 Δ *catA* において 1/5LB にビフェニルを加えた条件で生育した場合の *etbAd* プロモーターの転写活性は、*R. jostii* RHA1 において 1/5LB のみで生育した場合の転写活性よりも低いことから、菌体内に蓄積したカテコールが *etbAd* プロモーターの転写活性化に対して強い負の影響をもたらすことが示唆された。

以上より、カテコールは BphS/BphT 支配下の 5 つのプロモーターに対してビフェニルによる活性化に負の影響を与える物質であることが強く示唆された。

BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーターに対するカテコールによる抑制のメカニズムとしては、カテコール、もしくはカテコールによって誘導される未知のタンパク質が BphS の働きを抑える、BphT の働きを抑える、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーターからの転写を抑える、転写された mRNA の翻訳を抑える、などが考えられる (Fig. 4-4)が、現時点では詳細は不明である。

4-5 結論

本章の実験では、カテコールによる転写活性化抑制が、*bphAa* プロモーターに特異的か、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響するのかの解明を試みた。

そこで、BphS/BphT 支配下にありビフェニル分解に関わる 4 つの遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを用い、*R. jostii* RHA1 に導入してビフェニル、および、ビフェニルと安息香酸を加えた場合の影響を観察した。また、同様のレポータープラスミドを *R. jostii* RHA1Δ*catA* にも導入し、*R. jostii* RHA1 と比較した。

結果、*bphAa* 以外の 4 つのプロモーターにおいても、カテコールが蓄積すると考えられる条件での転写活性化抑制が観察された。このことから、カテコールによる転写活性化抑制は、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーター全般に影響することが明らかになった。

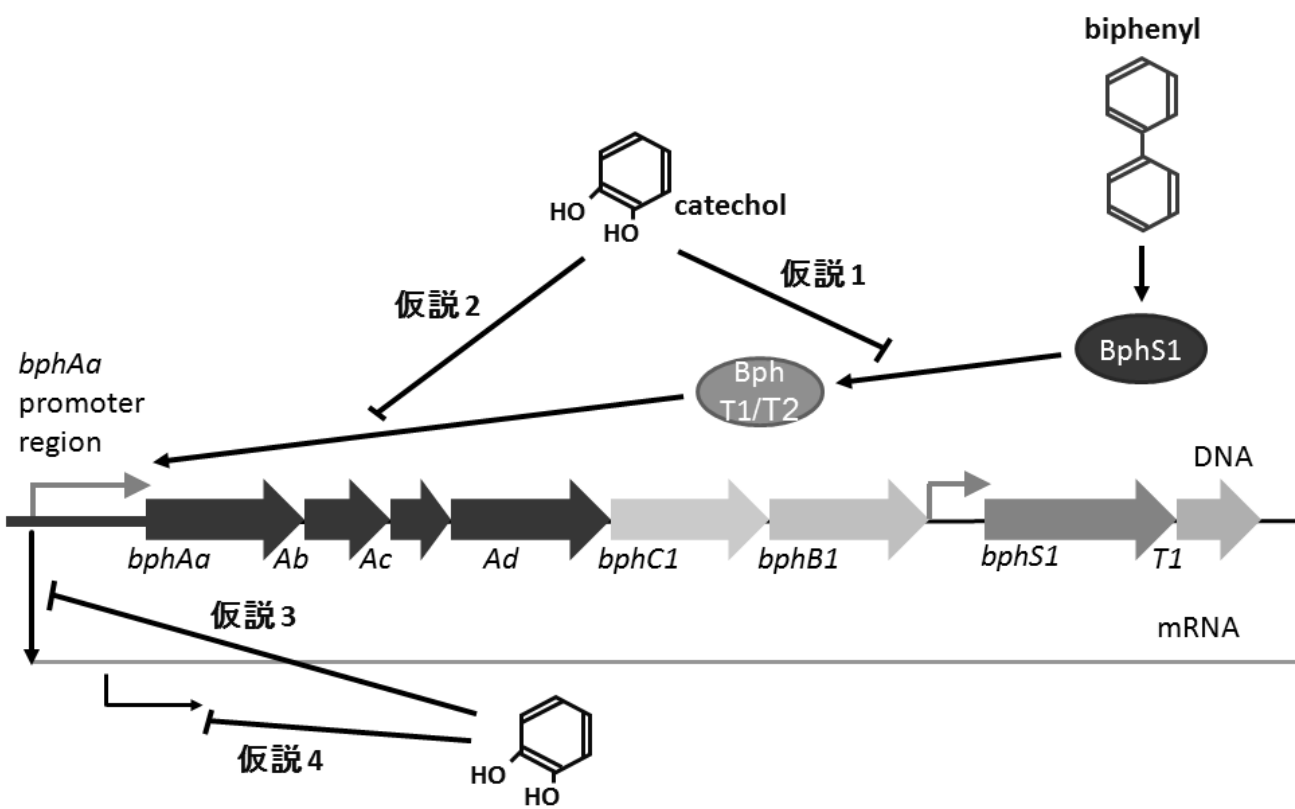


Fig. 4-4 カテコールによる転写活性化抑制のメカニズム予想図。仮説 1：カテコールは BphS1 による BphT1/T2 のリン酸化を阻害する。仮説 2：カテコールは BphT1/T2 によるプロモーター領域の転写活性化を阻害する。仮説 3：カテコールは BphST 支配下の遺伝子の転写を阻害する。仮説 4：カテコールは BphST 支配下の遺伝子の翻訳を阻害する。

参考文献

- 1) Takeda H., N. Hara, M. Sakai, A. Yamada, K. Miyauchi, E. Masai, and M. Fukuda. 2004. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 1249-1258
- 2) Seto M., K. Kimbara, M. Shimura, T. Hatta, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3353–3358
- 3) Takeda H., J. Shimodaira, K. Yukawa, N. Hara, D. Kasai, K. Miyauchi, E. Masai, and M. Fukuda. 2010. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.* **192**: 4741–4751
- 4) 伊藤 拓, 荒木直人, 遠藤銀朗, 福田雅夫, 宮内啓介. 2011. PCB 分解菌における分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制. *環境工学研究論文集.* **48**: 485-493
- 5) Masai E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of Gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079-2085
- 6) Yamada, A., H. Kishi, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Nakamura, E. Masai, and M. Fukuda. 1998. Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2006-2012

第 5 章

カテコール分解遺伝子の導入による PCB 分解遺伝子群転写活性の強化

5-1 緒言

前章までの研究で、ビフェニルの分解産物である安息香酸を添加するとビフェニル存在下での *bphAa* をはじめとするビフェニル分解遺伝子群の転写活性化が抑制されること、また、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* によって中間代謝産物であるカテコールを蓄積させると *bphAa* プロモーターの転写が大きく抑制されたことから、転写活性化抑制の主要な原因物質が安息香酸の代謝産物であるカテコールであると考えられた。効率的に PCB を分解できる菌株を育種するためには、このカテコールによるビフェニル分解遺伝子の転写活性化抑制を、可能な限り低減することが必要と考える。

そこで本章では、この問題を解決するための、カテコール分解遺伝子 *catA1* を *R. jostii* RHA1 に導入し高発現させるアプローチについて述べる。*R. jostii* RHA1 が本来持つカテコール分解遺伝子に加え、遺伝子操作によりカテコール分解遺伝子の発現量をさらに増やすことにより、菌体中のカテコールをスムーズに分解できれば、*bphAa* 転写活性化抑制の影響を低減できると考える。この手法によってビフェニル分解能の強化、ひいては PCB 分解能の強化に貢献することが本章の研究の目的である。

5-2 材料および方法

(1) 使用菌株とプラスミド

本研究で用いた菌株を Table 5-1 に、プラスミドを Table 5-2 に示す。野生株である *R. jostii* RHA1 は PCB 分解菌であり、ビフェニルを単一炭素源として生育することができる。RHA1 の培養はビフェニルを単一

Table 5-1 使用菌株

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB 分解菌、野生株、BPH ⁺ BEN ⁺	1)
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15]	2)
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>catA</i>	RHA1 の <i>catA</i> 破壊株、BEN ⁻	3)

BPH⁺ BEN⁺: ビフェニルと安息香酸をそれぞれ単一炭素源として生育可。BEN⁻: 安息香酸を単一炭素源として生育不可

Table 5-2 使用プラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pKLAf1	pKLA1 with 1.4-kb XhoI-BamHI fragment of <i>R. jostii</i> RHA1 carrying promoter region of <i>bphAa</i>	4)
pMD19	cloning vector; アンピシリン耐性	タカラバイオ社
pYN17	カナマイシン耐性遺伝子のプロモーターを持つプラスミド、アンピシリン耐性	5)
pFAJ2574	<i>Rhodococcus-E.coli</i> shuttle vector、クロラムフェニコール耐性	6)
pMDcatA	pMD19 に <i>catA</i> が挿入されたプラスミド	this study
pYNcatA	pYN17 に <i>catA</i> が挿入されたプラスミド	this study
pFcatA	pFAJ2574 に P _{Km^r} - <i>catA</i> が挿入されたプラスミド	this study

炭素源とした M9 培地 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄·7H₂O solution, 1

ml 0.1 M CaCl₂ solution, in 1,000 ml of dist. Water)を用いて、30 °Cでおこなった。ビフェニルは寒天培地のときは蓋上に置いて、液体培地のときは粉を直接加えて用いた。

R. jostii RHA1Δ*catA* の培養は、1/5LB 寒天培地 (2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. Water)を用いて、30 °Cで行った。*E. coli* JM109 の培養には LB 培地 (10 g Bacto trypton, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. Water) を用い、37 °Cでおこなった。

(2) *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

Rhodococcus 属細菌の形質転換にはエレクトロポレーション法を用いた⁷⁾。

(3) *catA1* 高発現プラスミド pFcatA の構築

R. jostii RHA1 においてカテコール分解遺伝子 *catA1* を高発現させるため、*catA1* を構成的に発現するプラスミド pFcatA を構築した。*R. jostii* RHA1 の全 DNA を template とし、*catA1* 領域を PCR で増幅した。プライマーとしては、*catA1_F* (5'- GAATTCGCATAGCGTACACATGCAAG -3')と *catA1_R* (5'- AAGCTTTTTTCTCTACGGGTGGAACG -3')を用いた。酵素に Prime Star (タカラバイオ社)を用いて、94°C 1 min を 1 サイクル、98 °C 10 sec、55 °C 5 sec、72 °C 2 min を 30 サイクル、72 °C 2 min を 1 サイクルの条件で PCR を行い、得られた DNA 断片を pMD19 (タカラバイオ社)を用いてクローニングした。得られたプラスミドを pMDCatA と命名した。pMDCatA から *catA1* を含む断片を EcoRI と HindIII で切断して切り出した。この *catA1* を含む断片を、pYN17 を EcoRI と HindIII で切断したものに、構成的に発現するカナマイシン耐性遺伝子のプロモーター (P_{Kmr})の下流に組み込んだ。得られたプラスミドを pYNcatA と命名した。pYNcatA を SpeI で切断し、P_{Kmr}-*catA1* 断片を得た。これを *Rhodococcus-E. coli* シャトルベクター pFAJ2574 の XbaI 部位にクローニングし、得られたプラスミドを pFcatA とした (Fig. 5-1)。

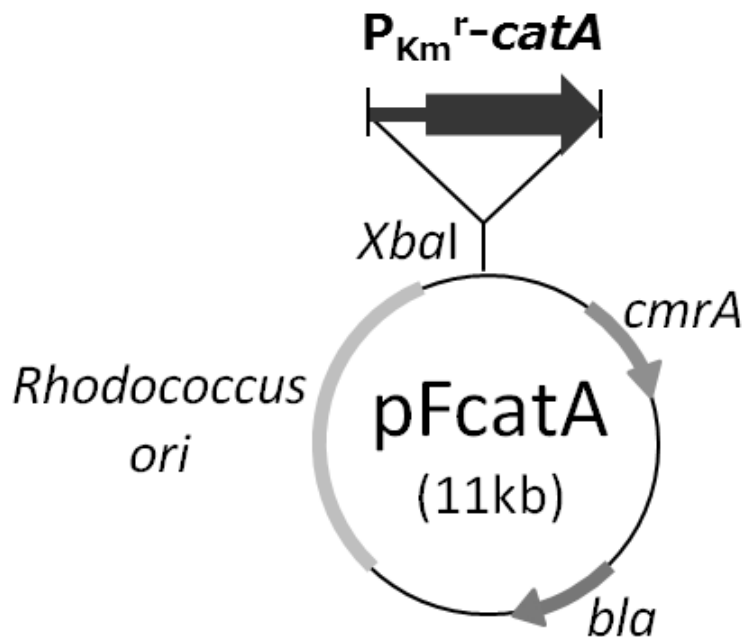


Fig. 5-1 *catA1* 高発現プラスミド pFcatA。構成的に発現する pYN17 のカナマイシン耐性遺伝子のプロモーター (P_{Kmr})を *catA1* の上流に組み込み、この遺伝子断片を *Rhodococcus-E. coli* シャトルベクターである pFAJ2574 に挿入している。*cmrA* はクロラムフェニコール耐性遺伝子。*bla* はアンピシリン耐性遺伝子。

(4) プロモーター活性測定

R. jostii RHA1 の PCB 分解活性の指標として、PCB 分解の初発反応を触媒する酵素遺伝子である *bphAa* 遺伝子のプロモーター活性を測定した。このために、ルシフェラーゼ遺伝子上流に *bphAa* 遺伝子のプロモーター領域が組み込まれているレポータープラスミド pKLAF1 を用いた。

pKLAF1 に加え、pFcatA もしくは pFAJ2574 を導入した RHA1 を、カナマイシンを終濃度 50 µg/ml、クロラムフェニコールを終濃度 30 µg/ml で添加した 1/5LB が 10 ml 入った試験管で一晩培養した。遠心 (4,000 rpm, 5 min) して菌体を回収し、上清を捨てた後、1/5LB 10 ml で菌体を洗浄し、カナマイシン (終濃度 50 µg/ml) とクロラムフェニコール (終濃度 30 µg/ml) を添加した 1/5LB 10 ml に濁度 (OD₆₀₀) が 1.0 となるように調整した。必要に応じてビフェニル、安息香酸ナトリウムを終濃度 10 mM となるように加えた。30 °C で培養し、3 時間おきに発光値と菌液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した。発光値は菌液 100 µl に 1-decanal を 2% 含む Lux Buffer (10 mM リン酸 Buffer (pH 7.0) 50 ml, 100% EtOH 49 ml) を 25 µl 加え、5 秒間の発光を測定した。発光の測定装置として BERTHOLD TECHNOLOGIES 社製 MicroLumat Plus を用いた。測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を活性値とした。発光値 / OD₆₀₀ の数値を単位菌数あたりのルシフェラーゼ活性とした。0 時間における発光値を 1 とし、比によって各菌株のプロモーター活性を比較した。相対活性の違いの有意性を検定するために、相対活性値の常用対数を用いて、t 検定をおこなった。

(5) HPLC 分析

菌液中の安息香酸、およびカテコールの濃度を測定するために HPLC (Prominence HPLC システム 島津) を用いた。カラムは Luna 5 µm C18(2) 100 Å 4.6 mm × 150 mm (phenomenex 社) を使い、カラム温度は 30 °C、移動相は A 液に 0.1% リン酸、B 液に 0.1% リン酸-アセトニトリルを総流量 1 ml/min で A : B = 80 : 20 とした。検出波長は安息香酸には 254 nm、カテコールには 230 nm を使い、サンプルは 10 µl を注入した。

サンプルは、M9 培地に炭素源としてビフェニル (終濃度 10 mM) とピルビン酸 (終濃度 10 mM)、もしくはビフェニル (終濃度 10 mM) と安息香酸 (終濃度 5 mM) を加えたもので菌株を培養し、菌液をサンプリング後に遠心分離し、0.45 µm のフィルターでろ過したものを用いた。

5-3 結果

(1) pFcatA によって導入された *catA1* 遺伝子の機能確認

R. jostii RHA1Δ*catA* に pFcatA とベクターコントロールである pFAJ2574 をそれぞれ導入し、単一炭素源として安息香酸ナトリウム (終濃度 10 mM) を加えた M9 寒天培地で培養し生育を比較した。その結果、pFcatA を導入した菌株のみ生育が観察された (Fig. 5-2)。

(2) *catA1* 高発現による *bphAa* プロモーター活性への影響

catA1 遺伝子の高発現が *R. jostii* RHA1 の *bphAa* プロモーター転写活性化にどのような影響を与えるかを観察した。*bphAa* プロモーター転写活性の測定のため、レポータープラスミド pKLAF1 を用いた。菌株としては、*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFcatA) と、*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFAJ2574) を用いた。これらの菌株を 1/5LB 培地、および、それにビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加えた培地で培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を Fig. 5-3 に示す。

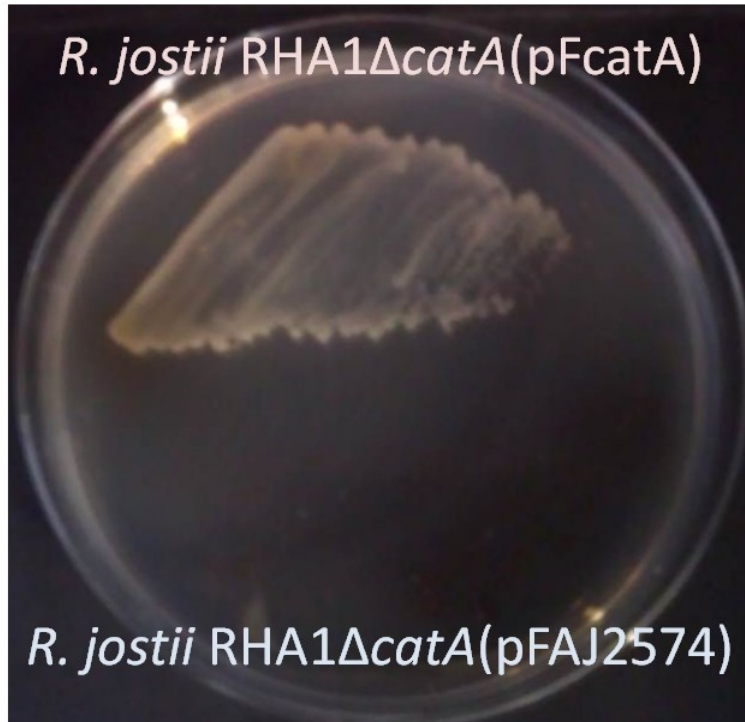


Fig. 5-2 *R. jostii* RHA1 Δ catA (pFcatA)と *R. jostii* RHA1 Δ catA (pFAJ2574)を、安息香酸 (終濃度 10 mM)を加えた M9 プレート上に塗布し、30°Cで一晩培養した。

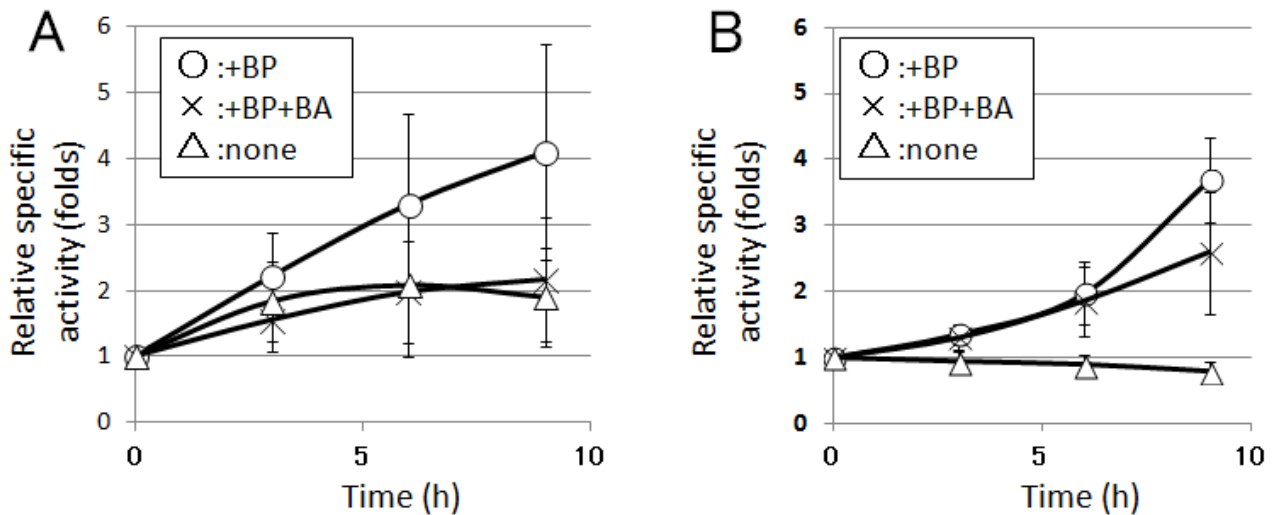


Fig. 5-3 *R. jostii* RHA1 Δ catA (pKLAf1, pFcatA)と *R. jostii* RHA1 Δ catA (pKLAf1, pFAJ2574)における *bphAa* プロモーター活性に対するビフェニル (BP)、安息香酸 (BA)の影響。pKLAf1 を導入した *R. jostii* RHA1 Δ catA を 1/5LB 培地にビフェニル (終濃度 10 mM)及び、ビフェニル+安息香酸 (終濃度 10 mM)を加えた培地で培養し、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。A : *R. jostii* RHA1 Δ catA (pKLAf1, pFAJ2574) B : *R. jostii* RHA1 Δ catA (pKLAf1, pFcatA)

ビフェニルを加えた場合、双方の菌株において9時間で約2-4倍の *bphAa* プロモーター転写活性の上昇が観察された。*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFAJ2574)を用いた場合 (Fig. 5-3 A)において、9時間におけるビフェニル添加時の相対活性 (クローン1: 2.89、クローン2: 6.41、クローン3: 2.99)の平均値 (4.1)はビフェニルと安息香酸を添加時の相対活性 (クローン1: 1.24、クローン2: 2.44、クローン3: 1.83)の平均値 (2.2)より大きく、この差は優位であった ($t(2) = 6.36, p < 0.05$)。また、ビフェニル添加時の相対活性の平均値 (4.1)は1/5LB培地のみでの相対活性 (クローン1: 1.46、クローン2: 2.95、クローン3: 1.29)の平均値 (1.9)より大きく、この差は優位であった ($t(2) = 16.5, p < 0.01$)。なお、ビフェニルと安息香酸添加時と1/5LB培地のみでの相対活性の平均値には優位性はなかった ($t(2) = 0.77, p > 0.05$)。すなわち、ビフェニルと安息香酸を加えた場合、*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFJ2574)においては *bphAa* プロモーター転写活性化がビフェニルを加えていない1/5LB培地と同程度まで抑制されたといえる (Fig. 5-3 A)。一方、*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFcatA)においては転写活性化の抑制が弱まっていることが観察された (Fig. 5-3 B)。

(3) *bphAa* プロモーター活性とカテコール蓄積の関係

bphAa プロモーター活性とカテコール蓄積の関係を調べるために、菌液中に含まれる安息香酸とカテコールの量を HPLC で測定し、*bphAa* プロモーター転写活性と比較した。菌株としては、*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFcatA)と *R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFAJ2574)を用いた。菌液中の物質の検出を容易にするため、無機塩培地である M9 培地にビフェニルと安息香酸ナトリウム、もしくはビフェニルとピルビン酸ナトリウムを添加して培養した。ピルビン酸は、分解遺伝子の転写に影響を与えない炭素源として用いた。これらの培地を用い、15時間後の菌液のルシフェラーゼ活性が培養開始時点と比べて何倍に変化したかを測定した。また、15時間後の安息香酸、およびカテコールの菌液中の濃度を測定した。その結果を Table 5-3 に示す。

R. jostii RHA1 (pKLAF1, pFAJ2574)では、ビフェニルとピルビン酸を加えた場合に比べて、ビフェニルと安息香酸での活性が約0.27倍に抑制された。一方、*R. jostii* RHA1 (pKLAF1, pFcatA)では、ビフェニルとピルビン酸を加えた場合に比べて、ビフェニルと安息香酸を加えた場合の活性化抑制は0.33倍にまで緩和された。2標本t検定の結果、この差は、有意であった ($t(4) = 3.89, p < 0.05$)。このとき、菌液中のカテコール濃度を測定した結果、*catA1* を高発現した株では有意にカテコールを分解していた。

Table 5-3 培養15時間後における *bphAa* プロモーター転写活性、および培地中の安息香酸とカテコールの濃度 (N=3)

	relative specific activity (folds) ^{*1}	benzoate (mM) ^{*1, *2}	catechol (mM) ^{*1, *2}
RHA1 (pKLAF1, pFAJ2574) +biphenyl+pyruvate	14.2 [1.0]	N.D.	N.D.
RHA1 (pKLAF1, pFAJ2574) +biphenyl+benzoate	3.8 [0.2]	2.9 [0.2]	0.6 [0.2]
RHA1 (pKLAF1, pFcatA) +biphenyl+pyruvate	13.3 [4.0]	N.D.	N.D.
RHA1 (pKLAF1, pFcatA) +biphenyl+benzoate	4.5 [1.3]	1.0 [0.7]	N.D.

*1[]には標準偏差を記す。 *2N.D. : not detected

5-4 考察

本章ではカテコールによるビフェニル分解遺伝子群の転写活性化抑制を解除する方法の一つとして、原因物質であるカテコールの分解遺伝子 *catA1* の高発現による効果を確認した。

まず、*catA1* 高発現プラスミド pFcatA を構築し、pFcatA が *R. jostii* RHA1 の菌体内で機能するか確認を行った。安息香酸を単一炭素源とする M9 寒天培地を用いて培養したところ *R. jostii* RHA1 Δ *catA* (pFcatA) は生育を確認できたが、ベクターコントロールである *R. jostii* RHA1 Δ *catA* (pFAJ2574) は生育しなかった (Fig. 5-2)。以上より、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* で遮断されていたカテコールの代謝経路が pFcatA の導入で相補された、すなわち、pFcatA 上の *catA1* が機能することが確認された。

この pFcatA を導入した *R. jostii* RHA1 において、カテコールによるプロモーター転写活性化抑制の緩和が観察された (Fig. 5-3)。また、pFcatA を導入した *R. jostii* RHA1 はそうでない株に比べて、安息香酸とカテコールを優位に分解していることが HPLC による測定で確認された。この結果から、*catA1* 高発現株における *bphAa* 転写活性化抑制の緩和は、菌体内のカテコールが野生株よりもスムーズに代謝されることによるものと考えられる。

以上より、*R. jostii* RHA1 において *catA1* を高発現することで代謝産物であるカテコールの分解により、*bphAa* 転写活性の抑制が緩和できることが強く示唆された。カテコールの除去は、PCB 分解微生物の遺伝子工学的機能強化方法として有効であると考えられる。

5-5 結論

PCB分解菌 *R. jostii* RHA1 におけるビフェニルによる *bphAa* プロモーターの転写活性化は、カテコールの存在によって抑制される。この転写活性化抑制の解除を目的として、本研究ではカテコール分解遺伝子 *catA1* 高発現プラスミド pFcatA を構築し、RHA1 に導入した。pFcatA を導入した RHA1 において、レポータープラスミド pKLAFl を用いた *bphAa* 転写活性の測定と、HPLC による菌液中の安息香酸とカテコールの濃度を測定した。結果として、RHA1 (pFcatA) では、カテコールによるプロモーター転写活性化抑制の緩和と、安息香酸とカテコールの分解能向上が観察された。

以上より、RHA1 における *catA1* 高発現はビフェニル分解能の向上に寄与することが強く示唆された。

参考文献

- 1) Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Characterization of Transcriptional Regulatory Genes for Biphenyl Degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriology*, **186**, 2134-2146, 2004
- 2) Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequencing of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene*, **33**, 103-119, 1985
- 3) 伊藤拓・荒木直人・遠藤銀朗・福田雅夫・宮内啓介：PCB 分解菌における分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制. *環境工学研究論文集* **48**, 485-493, 2011
- 4) Takeda H, Hara N, Sakai M, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**, 1249-1258, 2004
- 5) Sukda P, Gouda N, Ito E, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Characterization of a transcriptional regulatory gene involved in dibenzofuran degradation by *Nocardioide* sp. strain DF412. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63**, 508-516, 2009
- 6) De Mot, R., Nagy, I., De Schrijver, A., Pattanapitpaisal, P., Schoofs, G., and Vanderleyden, J., Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 and construction of *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vectors. *Microbiology*, **143**, 3137-3147, 1997
- 7) Masai E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of Gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079-2085

第 6 章

R. jostii RHA1 における ビフェニルを単一炭素源とした生育能の強化

6-1 緒言

前章までの研究で、ビフェニルの代謝産物でもあるカテコールがビフェニル分解遺伝子の転写活性化を抑制すること、カテコール分解遺伝子 *catA1* の高発現は、カテコールによる *bphAa* の転写活性化抑制を緩和することが強く示唆された。

catA1 の高発現は、ビフェニル分解遺伝子 *bphAa* の転写活性化抑制物質であるカテコールの分解を早め、代謝経路の流れ自体もスムーズにする効果が期待できる。しかし、前章まででおこなったプロモーター転写活性の測定では、遺伝子の発現の度合いを観察することはできるが、実際の代謝の流れ自体は観察できない。

そこで本章の研究では、ビフェニルを単一炭素源とした場合における菌体の生育に着目した。ビフェニルを単一炭素源とした場合の菌体の生育は、ビフェニルの資化能力と考えることができる。これにより、ビフェニルを単一炭素源とした場合の菌体の生育は、分解遺伝子の転写活性以上にビフェニル、および、ビフェニルと共代謝される PCB の分解能力を示す指標となる。

また、*catA1* 高発現以外によるカテコールの影響を軽減するアプローチとして、ビフェニル分解遺伝子の正の制御因子 *bphS1* と *bphT1* の高発現に着目した。*bphS1*、*bphT1* は BphS/T 制御系の支配下にある遺伝子を正に制御することが知られており、これらの遺伝子を高発現することでビフェニルの資化能力の向上が期待できる。*bphS1*、*bphT1* をそれぞれ高発現することで、カテコールによるビフェニル分解遺伝子の転写活性化抑制の軽減が観察できれば、*catA1* とともに、PCB 分解能向上への応用に貢献できると考える。

以上より本章では、*R. jostii* RHA1 におけるビフェニルの資化能力の向上を目的として、カテコール分解遺伝子 *catA1*、ビフェニル分解遺伝子の正の制御因子である *bphS1* と *bphT1* の高発現を行った実験の結果について述べる。

6-2 材料および方法

(1) 使用菌株とプラスミド

本章の実験では菌株は *R. jostii* RHA1 を、プラスミドは Table 6-1 に示したものをを用いた。使用したプラスミドのうち、pFJS1 と pFTCM は詳細を Fig. 6-1 に示す。野生株である株は PCB 分解菌であり、ビフェニルを単一炭素源として生育することができる⁴⁾。*R. jostii* RHA1 の培養は 1/5LB 培地 (2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. water)、またはビフェニルを単一炭素源とした M9 培地 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄·7H₂O solution, 1 ml 0.1 M CaCl₂ solution, in 1,000 ml of dist. water) を用いて、30 °Cでおこなった。ビフェニルは寒天培地のときは蓋

Table 6-1 使用プラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pFAJ2574	<i>Rhodococcus</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, Cm ^r	1)
pFcatA	pFAJ2574 carrying P _{km^r} - <i>catA1</i>	this study
pFJS1	pFAJ2574 carrying <i>bphS1</i>	2)
pFTCM	pFAJ2574 carrying <i>bphT1</i>	3)

Km^r, kanamycin resistance; Cm^r, chloramphenicol resistance

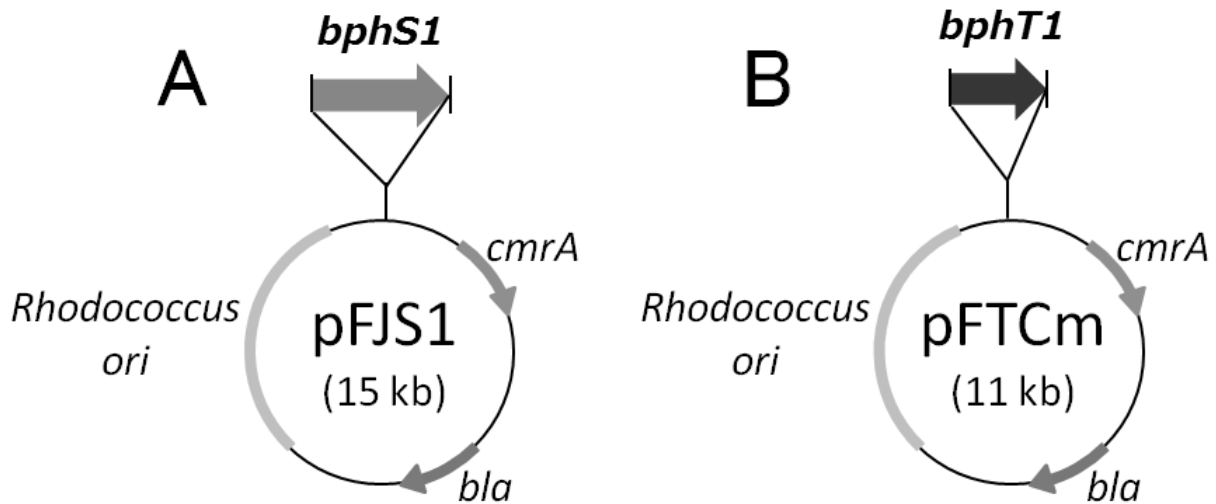


Fig. 6-1 A: *bphS1* 高発現プラスミド pFJS1 B: *bphT1* 高発現プラスミド pFTCm とともに *Rhodococcus - E. coli* シャトルベクター pFAJ2574 に目的の遺伝子断片を挿入してある。 *cmrA* はクロラムフェニコール耐性遺伝子。 *bla* はアンピシリン耐性遺伝子。

上に置いて、液体培地のときは粉を直接加えて用いた。

(2) *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

Rhodococcus 属細菌の形質転換は既報⁵⁾に従いエレクトロポレーション法によって行った。

(3) 液体培養時の生育測定

pFeatA、pFJS1、pFTCm もしくは pFAJ2574 を導入した *R. jostii* RHA1 を、クロラムフェニコールを終濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ で添加した 1/5LB 培地 10 ml を入れた試験管で一晩培養した。遠心分離 (4,000 rpm, 10 min) して菌体を回収し、測定の際に用いる培地で菌体を洗浄し、菌液を OD₆₀₀ が 1.0 となるよう調整した後、L 字試験管中の培地 5 ml に 2% 植菌して測定した。培地は 1/5LB か、M9 にビフェニルを添加したものを用いた。いずれの培地にも、クロラムフェニコールを終濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ で添加した。ビフェニルを用いる場合は、粉末を L 字試験管に入れて 70°C で融解させて壁面に固着させた。菌液濁度 (OD₆₀₀) は、ADVANTEC 社製バイオフィトレコーダー TVS062CA を用いて測定した。測定間隔は 15 分、振とう速度は 60 rpm とした。測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を用いた。

6-3 結果

(1) *catA* 高発現によるビフェニル代謝能への影響

R. jostii RHA1 に *catA1* 高発現プラスミドである pFeatA と、ベクターコントロールである pFAJ2574 をそれぞれ導入した形質転換株を用いた。これらの菌株を、単一の炭素源としてビフェニルを加えた M9 培地、もしくは栄養培地である 1/5LB 培地で培養した。それぞれの菌液の濁度 OD₆₀₀ を 15 分ごとに測定し、生育を比較した。その結果を、Fig. 6-2 に示す。

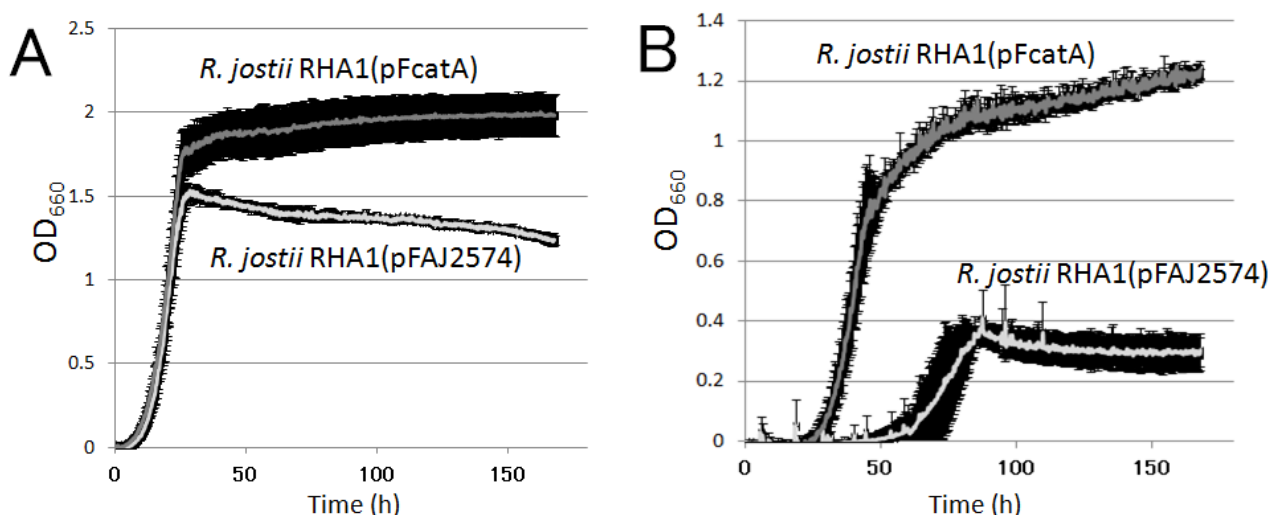


Fig. 6-2 *R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) と *R. jostii* RHA1 (pFcatA) の生育比較。標準偏差を縦方向の線で表した。
A: 1/5LB 培地 B: M9 培地+ビフェニル (終濃度 10 mM)

1/5LB を用いて両菌株を培養した場合、最終到達濁度は *R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) で 1.5、*R. jostii* RHA1 (pFcatA) で約 2 となった (Fig. 6-2A)。増殖の立ち上がりと最終到達濁度までにかかる時間は、両菌株ではほぼ同じだった。*R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) は最終到達濁度に達した後、徐々に濁度が低下したが、*R. jostii* RHA1 (pFcatA) の濁度は測定終了時点まで徐々に上昇し続けた (Fig. 6-2A)。

ビフェニルを単一炭素源とした M9 培地で培養した場合、*R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) の増殖の立ち上がりは約 50 時間で、最終到達濁度に約 80 時間で達し、OD₆₆₀ は約 0.4 だった (Fig. 6-2B)。対して *R. jostii* RHA1 (pFcatA) の増殖の立ち上がりは約 20 時間で、約 30 時間で対数増殖期から定常期に達し、その時点での OD₆₆₀ は 0.9 前後であった (Fig. 6-2B)。RHA1 (pFAJ2574) は最終到達濁度に達した後、徐々に濁度が低下したが、*R. jostii* RHA1 (pFcatA) の濁度は測定終了まで上昇し続け、最終的な濁度は約 1.2 となった (Fig. 6-2B)。

(2) BphS/BphT 高発現株のビフェニル炭素源における生育の観察

R. jostii RHA1 に *bphS1* 高発現プラスミド pFJS1、*bphT1* 高発現プラスミド pFTCm、およびこれらのベクタープラスミドである pFAJ2574 をそれぞれ導入した形質転換株を用いた。これらの菌株を 1/5LB 培地と、無機塩培地である M9 培地に単一の炭素源としてビフェニルを加えたもので培養した。それぞれの菌液の濁度 OD₆₆₀ を 15 分ごとに濁度を測定し、生育を比較した。その結果を、Fig. 6-3 に示す。

1/5LB を用いて両菌株を培養した場合、増殖の立ち上がりは全菌株ではほぼ同じであった。最終到達濁度は *R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) における約 1.5 に対して、*R. jostii* RHA1 (pFJS1) と *R. jostii* RHA1 (pFTCm) では約 2 となった (Fig. 6-3A)。

ビフェニルを単一炭素源とした M9 培地で培養した場合、*R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) が約 80 時間で最終到達濁度 OD₆₆₀ 0.4 に到達し、その後の濁度は緩やかに減少したのに対して、両高発現株は約 50 時間の時点で *R. jostii* RHA1 (pFJS1) は濁度 0.8 程度、*R. jostii* RHA1 (pFTCm) は濁度 0.6 程度となり、両菌株とも測

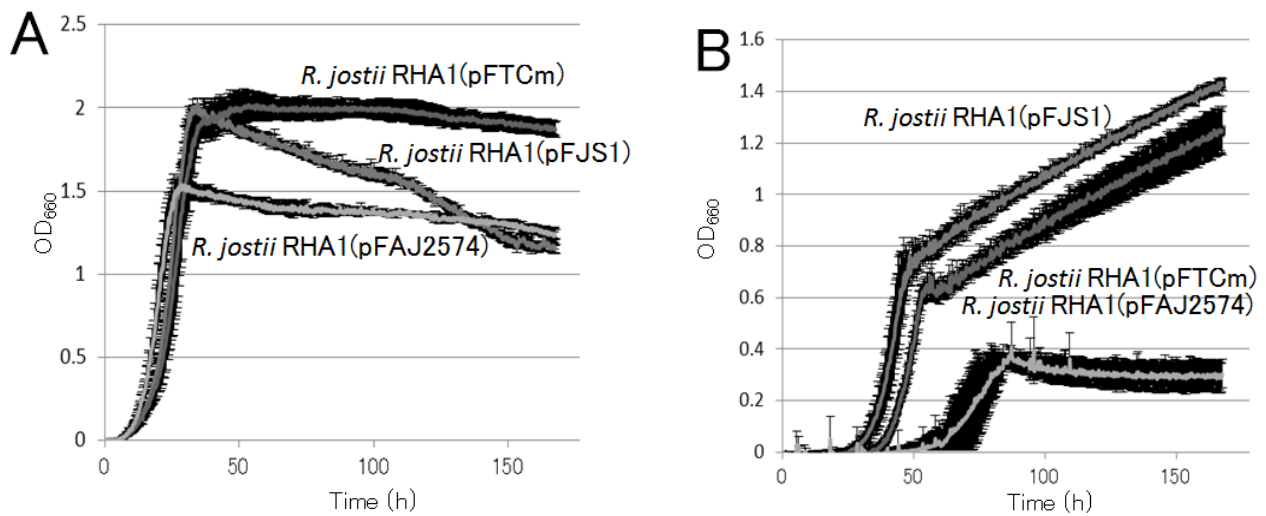


Fig. 6-3 *R. jostii* RHA1 (pFAJ2574) と *R. jostii* RHA1 (pFJS1)、*R. jostii* RHA1 (pFTCm) の生育比較。標準偏差を縦方向の線で表した。A : 1/5LB 培地 B: M9 培地+ビフェニル (終濃度 10 mM)

定終了まで濁度は上昇し続けた (Fig. 6-3B)。増殖の立ち上がりは *R. jostii* RHA1 (pFAJ2574)の約 50 時間に対して、*R. jostii* RHA1 (pFJS1)と *R. jostii* RHA1 (pFTCm)は約 30 時間だった。*R. jostii* RHA1 (pFJS1)と *R. jostii* RHA1 (pFTCm) を比較すると、*R. jostii* RHA1 (pFJS1)のほうが増殖の立ち上がりはやや早かった (Fig. 6-3B)。

6-4 考察

本章の研究では、*R. jostii* RHA1 におけるビフェニル分解遺伝子群の転写活性化のカテコールによる抑制を低減することが、ビフェニル分解遺伝子群の転写抑制解除のみならず、ビフェニルの資化能力の向上にも寄与するかどうかの検証を行った。そのために、カテコール分解遺伝子 *catA1*、ビフェニル分解遺伝子の正の制御因子である *bphS1* と *bphT1* の高発現に着目した。

結果として、いずれの遺伝子の高発現株も、ベクターコントロールと比較してビフェニルを単一炭素源とする条件での生育の上昇が示された。この生育の上昇は、1/5LB で培養した条件と比較しても、顕著であった。以上の結果より、*R. jostii* RHA1 において *catA1*、*bphS1* または *bphT1* を高発現させることで、ビフェニルを単一炭素源としたときの生育が大きく向上することが示された。

ビフェニル単一炭素源での生育が上昇した理由として、カテコールによる *bphAa* 転写活性化抑制の緩和が考えられる。カテコールは、本研究によってビフェニル分解遺伝子群のプロモーター転写活性化の抑制物質であることが示されたが、同時に微生物に対して毒性を示すことでも知られている⁶⁾。*catA1* の高発現によってビフェニルを単一炭素源とした場合の生育が大きく上昇した理由としては、カテコールによるビフェニル分解遺伝子群のプロモーター転写活性化の抑制が解除され、分解酵素の生成が多くなったことと、毒性を持つカテコールが RHA1 株の菌体内で速やかに分解されたことの二つが考えられる。

bphS1 または *bphT1* の高発現の結果は、*catA1* 高発現株の生育曲線と同様の傾向を示していた。さらに、*bphS1* または *bphT1* の高発現を比較した場合、生育能向上には *bphS1* の高発現がより有効であることが示

唆された。しかし、*bphS1*、*bphT1* の各遺伝子が、実際にどのようなメカニズムで *bphAa* 転写活性化抑制を解除しているかは不明である。

BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーターに対するカテコールによる抑制のメカニズムとしては、カテコール、もしくはカテコールによって誘導される未知のタンパク質が BphS の働きを抑える、BphT の働きを抑える、BphS/BphT 支配下のビフェニル分解遺伝子群のプロモーターからの転写を抑える、転写された mRNA の翻訳を抑える、などが考えられる (Fig. 6-4)。本章に示した実験結果では、ビフェニルの資化能力向上は *bphT1* 高発現よりも *bphS1* 高発現がより有効であることが示唆された。このことから、ビフェニルの代謝によって生じるカテコールの影響を *bphS1* の高発現によって緩和している、すなわち、カテコールに起因する *bphAa* の転写活性化抑制因子は BphS の働きを阻害している、と考えることができる。これらの仮説モデルは、Fig. 6-4 の仮説 1 に示す。ただし、これらの仮説は BphS と BphT が 1 対 1 で作用しているという前提でのみ成り立つ。実際には、単位個数の BphS に対して同数の BphT が作用するかどうか、BphS と BphT の半減期はほぼ同値とみなせるか、1 つのビフェニル分子に対して BphS と BphT は 1 対 1 で作用するのかどうか、といった様々な要素が関係する。そのため本章の結果のみでは、カテコールに起因する *bphAa* の転写活性化抑制因子の作用メカニズムを断定することはできず、今後の課題となる。

しかしながら、*catA1*、*bphS1*、*bphT1* の各遺伝子の高発現がビフェニルの資化能力向上に寄与するという結果は、明瞭に得られた本章の成果であり、PCB の分解においてもこのような技術的方法が可能と考える。

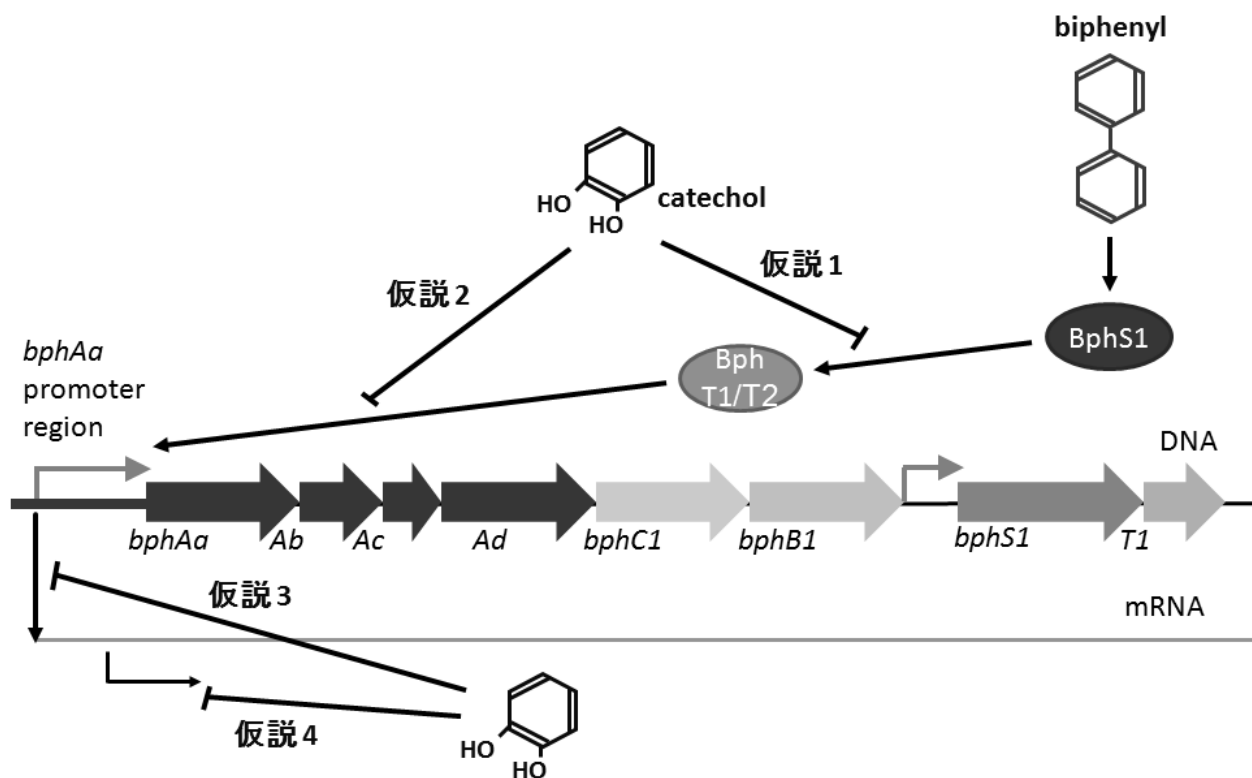


Fig. 6-4 カテコールによる転写活性化抑制のメカニズム予想図。仮説 1：カテコールは BphS1 による BphT1/T2 のリン酸化を阻害する。仮説 2：カテコールは BphT1/T2 によるプロモーター領域の転写活性化を阻害する。仮説 3：カテコールは BphST 支配下の遺伝子の転写を阻害する。仮説 4：カテコールは BphST 支配下の遺伝子の翻訳を阻害する。

6-5 結論

本章では、*catA1*、*bphS1*、*bphT1* それぞれの高発現プラスミドである pFcatA、pFJS1、pFTCm、もしくはこれらのベクタープラスミドである pFAJ2574 をそれぞれ導入した *R. jostii* RHA1 を、栄養培地である 1/5LB 培地と、無機塩培地である M9 に単一炭素源としてビフェニルを加えたもので培養し、15 分ごとに菌液濁度を測定する実験について述べた。

結果として、いずれの遺伝子の高発現株も、ベクターコントロールと比較してビフェニルを単一炭素源とする条件での生育の上昇が示された。この生育の上昇は、1/5LB で培養した条件と比較しても、顕著であった。以上より *catA1*、*bphS1*、*bphT1* の各遺伝子の高発現は、ビフェニルの資化能力向上に寄与すると考えられた。

参考文献

- 1) De Mot, R., I. Nagy, A. De Schrijver, P. Pattanapitpaisal, G. Schoofs, and J. Vanderleyden. 1997. Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 and construction of *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vectors. *Microbiology*. **143**: 3137–3147
- 2) Takeda H., A. Yamada, K. Miyauchi, E. Masai, and M. Fukuda. 2004. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J. Bacteriol.* **186**: 2134-2146
- 3) Nguyen P. A. T., T. H. T. Trinh, Y. Fukumitsu, J. Shimodaira, K. Miyauchi, M. Tokuda, D. Kasai, E. Masai, and M. Fukuda. 2013. Gene cluster and regulation system for 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethylene (DDE) degradation in *Janibacter* sp. TYM3221. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 91-100
- 4) Seto M., K. Kimbara, M. Shimura, T. Hatta, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3353–3358
- 5) Masai E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of Gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079-2085
- 6) Sang-Ho Park, Yeon-Ja Ko, Chi-Kyung Kim. Toxic Effects of Catechol and 4-Chlorobenzoate Stresses on Bacterial Cells. *The Journal of Microbiology*, **39**, 206-212, 2001

第7章

安息香酸およびカテコール 分解遺伝子群の転写誘導物質の同定

7-1 緒言

本章では、*R. jostii* RHA1 において安息香酸の分解経路を担う *benABCDK* オペロンとカテコールの分解経路を担う *catAIBC* オペロン、それぞれの転写誘導基質を解明した結果について述べる。

前章までの実験で *R. jostii* RHA1 において、カテコールがビフェニル分解遺伝子群の転写活性化を抑制することと、カテコール分解遺伝子 *catA1* の高発現により菌体内のカテコールが除去されビフェニル分解遺伝子群の活性化抑制が解除されること、*catA1* の高発現によりビフェニルを単一炭素源とした場合の生育が上昇することが明らかとなった。

本章の実験では、安息香酸の分解経路を担う *benABCDK* オペロンとカテコールの分解経路を担う *catAIBC* オペロン、それぞれの転写を誘導する基質の解明を試みた。安息香酸とカテコールの分解経路を担う遺伝子群の転写が、どのような物質により誘導されるか理解できれば、効率的にカテコールを分解できる微生物を育種する方法につながり、ひいてはビフェニル分解能、PCB 分解能の向上へつながると考える。

そこで、*R. jostii* RHA1 とその *benA*、*benD*、*catA1*、*catB* それぞれの破壊株に、*benABCD* オペロンのプロモーター領域である *benA* プロモーターと *catAIBC* オペロンのプロモーター領域である *catA1* プロモーターをそれぞれ導入したレポータープラスミドを導入し、各遺伝子群の転写活性の観察と、必要に応じて HPLC による基質濃度の測定を行った。

7-2 材料および方法

(1) 使用菌株とプラスミド

本章で用いた菌株を Table 7-1 に、プラスミドを Table 7-2 に示す。

野生株である *R. jostii* RHA1 および各遺伝子破壊株の培養は、1/5LB 培地 (2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. water) を用いて、必要に応じて安息香酸を添加し、30 °C でおこなった。

(2) *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

Rhodococcus 属細菌の形質転換は既報⁴⁾に従いエレクトロポレーション法によっておこなった。

(3) レポータープラスミド pPKLAPcatA の構築

catA1 の転写活性を調べる為、*catA1* のプロモーター領域をレポーター遺伝子 *luxAB* の上流に組み込んだプラスミド pKLAPcatA (Fig.7-1) を作製した。

R. jostii RHA1 の全 DNA を template とし、*catA1* プロモーター領域を PCR で増幅した。プライマーとしては、PcatA_F_2 (5'- ATGCCTGCAGGTCGAAGCCGCGCTCGATGCTCTGGATG -3') と PcatA_R_2 (5'- GCTCGATAAAGTCGAGCCGAGCGCATCCTTGGCGATG -3') を用いた。酵素に Prime Star (タカラバイオ社) を用いて、94 °C 1 min を 1 サイクル、98 °C 10 sec、55 °C 5 sec、72 °C 2 min を 30 サイクル、72 °C 2 min を 1 サイクルの条件で PCR を行った。得られた DNA 断片と Sall で切断した pKLA1 を、In-Fusion cloning キット (クロンテック社) を用いて挿入した。これによって得られた、pKLA1 の *luxAB* 上流に *catA1* プロモーターが位置するプラスミドを、pPKLAPcatA と命名した。

Table 7-1 使用菌株

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB 分解菌、野生株、BPH ⁺ BEN ⁺	1)
<i>E. coli</i> JM109	クローニングに使用 <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ F ['] [<i>traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ</i> Δ M15]	2)
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>benA</i>	<i>benA</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>benD</i>	<i>benD</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>catB</i>	<i>catB</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1 Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> 破壊株、BEN ⁻	this study

BPH⁺ BEN⁺: ビフェニルと安息香酸をそれぞれ単一炭素源として生育可。 BEN⁻: 安息香酸を単一炭素源として生育不可。

Table 7-2 使用プラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pKLA1	pK4 with a 2.4-kb luciferase gene, <i>luxAB</i> from <i>Vibrio harveyi</i> , カナマイシン耐性	3)
pKLAPBENF	<i>benA</i> 転写活性を観察するレポータープラスミド pKLA1 with 536 bp SalI fragment of RHA1 carrying promoter region of <i>benA</i> , カナマイシン耐性	this study
pKLAPcatA	<i>catA</i> 転写活性を観察するレポータープラスミド pKLA1 with 382 bp fragment of RHA1 carrying promoter region of <i>catA1</i> , カナマイシン耐性	this study

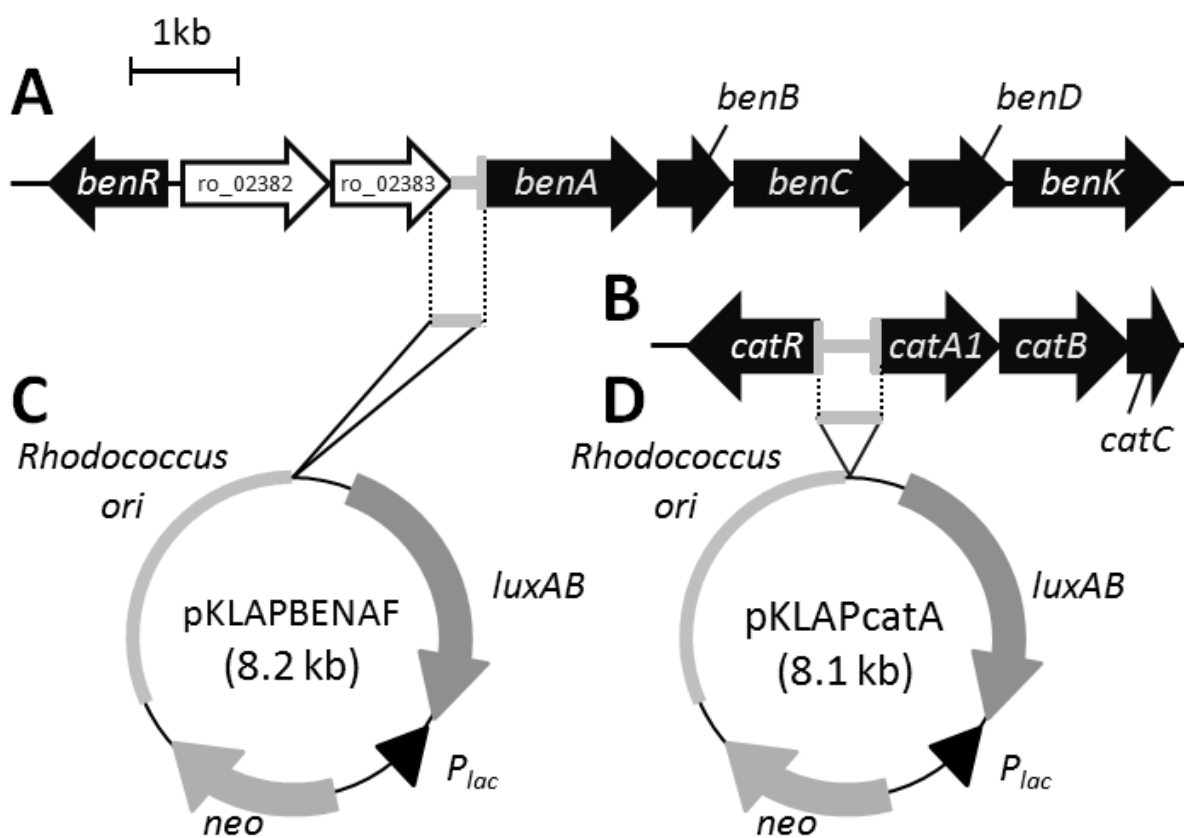


Fig. 7-1 A: *R. jostii* RHA1 におけるカテコールの分解遺伝子 *benABCDK* と *benR* の遺伝子地図 B: *R. jostii* RHA1 におけるカテコールの分解遺伝子 *catA1BC* と *catR* の遺伝子地図 C: *benA* プロモーター転写活性レポータープラスミド pKLAPBENAF D: *catA* プロモーター転写活性レポータープラスミド pKLAPcatA

(4) プロモーター活性測定

pKLAPcatA もしくは pKLAPBENF を導入した菌株を、カナマイシンを終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB が 10 ml 入った試験管で一晩培養した。遠心 (4,000 rpm, 10 min) して菌体を回収し、上清を捨てた後、1/5LB 10 ml で菌体を洗浄した。再度、遠心 (4,000 rpm, 10 min) し上清を捨てた後、カナマイシンを終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB 1 ml で再懸濁した。この菌液を、カナマイシンを終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB 10 ml に OD₆₀₀ が 1.0 となるように加えた。必要に応じて、菌液に安息香酸を加えた。30°C で培養し、3 時間おきに発光値と菌液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した。発光値は菌液 100 µl に 1-decanal を 2 % 含む Lux Buffer (10 mM リン酸 Buffer (pH 7.0) 50 ml, 100 % EtOH 49 ml) を 25 µl 加え、5 秒間の発光を測定した。発光の測定装置として BERTHOLD TECHNOLOGIES 社製 MicroLumimat Plus LB96V-H を用いた。

測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を活性値とした。発光値/ OD₆₀₀ の数値を単位菌数あたりのルシフェラーゼ活性とした。

(5) HPLC 分析

菌液中の安息香酸、カテコール、*cis*, *cis*-muconate の濃度を測定するために、HPLC (Prominence HPLC システム 島津) を用いた。カラムは Luna 5 µm C18(2) 100 Å 4.6 mm × 150 mm (Phenomenex 社) を用い、カラム温度は 30 °C、移動相は A 液に 0.1% リン酸、B 液に 0.1% リン酸-アセトニトリルを総流量 1 ml/min で A : B = 80 : 20 とした。検出波長は安息香酸には 254 nm、カテコールには 230 nm を用い、サンプルは 10 µl を注入した。

サンプルは、プロモーター活性測定に用いた菌液からサンプリングし、遠心分離した後、0.45µm のフィルターでろ過したものを用いた。

7-3 結果

(1) *benA* プロモーター活性の観察

R. jostii RHA1 中での *benA* プロモーターの転写活性を調べるため、*R. jostii* RHA1、*R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA1*、*R. jostii* RHA1Δ*catB* それぞれの菌株に、レポータープラスミド pKLAPBENF を導入した。これらの菌株を 1/5LB 培地と、それに安息香酸を終濃度 10 mM、5 mM、1 mM となるように加えた培地で培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。

全ての菌株において、1/5LB のみの条件では活性は上昇しなかった。*R. jostii* RHA1 において、9 時間時点のプロモーター活性は安息香酸 10 mM で約 120 倍、5 mM で約 90 倍、1 mM で約 50 倍に上昇した (Fig. 7-2)。

R. jostii RHA1 Δ*benA* においては 9 時間時点で、安息香酸 10 mM で約 170 倍、5 mM で約 150 倍、1 mM で約 120 倍に上昇した (Fig. 7-3.A)。*R. jostii* RHA1Δ*benD* においては 9 時間時点で、安息香酸 10 mM で約 230 倍、5 mM で約 250 倍、1 mM で約 190 倍に上昇した (Fig. 7-3.B)。*R. jostii* RHA1Δ*catA1* においては 6 時間時点で、安息香酸 10 mM で約 300 倍、5 mM で約 200 倍、1 mM で約 130 倍に上昇し、9 時間時点で、安息香酸 10 mM で約 250 倍、5 mM で約 150 倍、1 mM で約 100 倍となった (Fig. 7-3.C)。*R. jostii* RHA1Δ*catB* においては 9 時間時点で、安息香酸 10 mM、5 mM、1 mM において 50 倍前後まで上昇した (Fig. 7-3.D)。

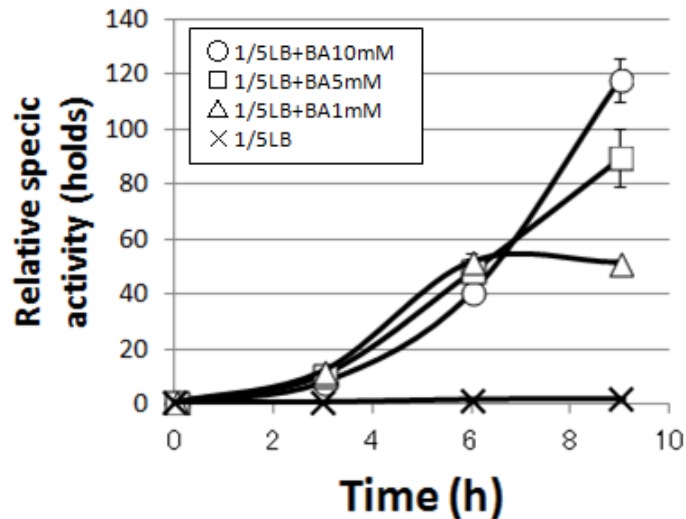


Fig. 7-2 *R. jostii* RHA1 における *benA* プロモーター活性に対する安息香酸 (BA) の影響。pKLABENF を導入した *R. jostii* RHA1 を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *benA* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。

(2) *catA1* プロモーター活性の観察

R. jostii RHA1 中での *catA1* プロモーターの転写活性を調べるため、*R. jostii* RHA1、*R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA1*、*R. jostii* RHA1Δ*catB* それぞれの菌株に、レポータープラスミド pKLAB*catA* を導入した。これらの菌株を 1/5LB 培地と、それに安息香酸を終濃度 10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM となるように加えた培地で培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。

全ての菌株において、1/5LB のみの条件では活性は上昇しなかった。*R. jostii* RHA1 において、9 時間時点のプロモーター活性は安息香酸 10 mM で約 8 倍、5 mM で約 7 倍、1 mM で約 4 倍、0.5 mM で約 3 倍に上昇し、0.1 mM では上昇を観察できなかった (Fig. 7-4.A)。*R. jostii* RHA1 Δ*benA* においては 6 - 9 時間で、安息香酸 10 mM で約 5 - 6 倍、5 mM で約 3 - 4 倍に上昇し、1 mM、0.5 mM、0.1 mM では上昇を観察できなかった (Fig. 7-5.A)。*R. jostii* RHA1 Δ*benD* においては 3 時間時点で、安息香酸 10 mM で約 4 倍、5 mM で約 3 倍に上昇し、その後低下した。1 mM、0.5 mM、0.1 mM では上昇を観察できなかった (Fig. 7-6.A)。*R. jostii* RHA1 Δ*catA1* においては、安息香酸 10 mM は 9 時間時点で約 6 倍、5 mM は 6 時間時点で約 5 倍、9 時間時点で約 3 - 4 倍、1 mM、0.5 mM、0.1 mM は 9 時間時点で約 2 倍に上昇した (Fig. 7-7.A)。*R. jostii* RHA1 Δ*catB* においては 9 時間時点で、安息香酸 10 mM では上昇を観察できず、5 mM で約 2 倍、1 mM と 0.5 mM で約 6 倍に上昇し、0.1 mM は 6 時間時点で約 6 倍、9 時間時点で約 4 倍となった (Fig. 7-8.A)。

(3) *catA1* プロモーター活性観察時の基質濃度および代謝産物濃度の測定

前項で *catA1* プロモーター活性に用いた菌液を各時間で回収し、HPLC を用いて菌液中の安息香酸、カテコール、*cis, cis* - muconate、それぞれの濃度を測定した。

R. jostii RHA1 において 9 時間時点で、安息香酸 10 mM 加えたサンプルでは約 9 mM まで (Fig. 7-4.B)、

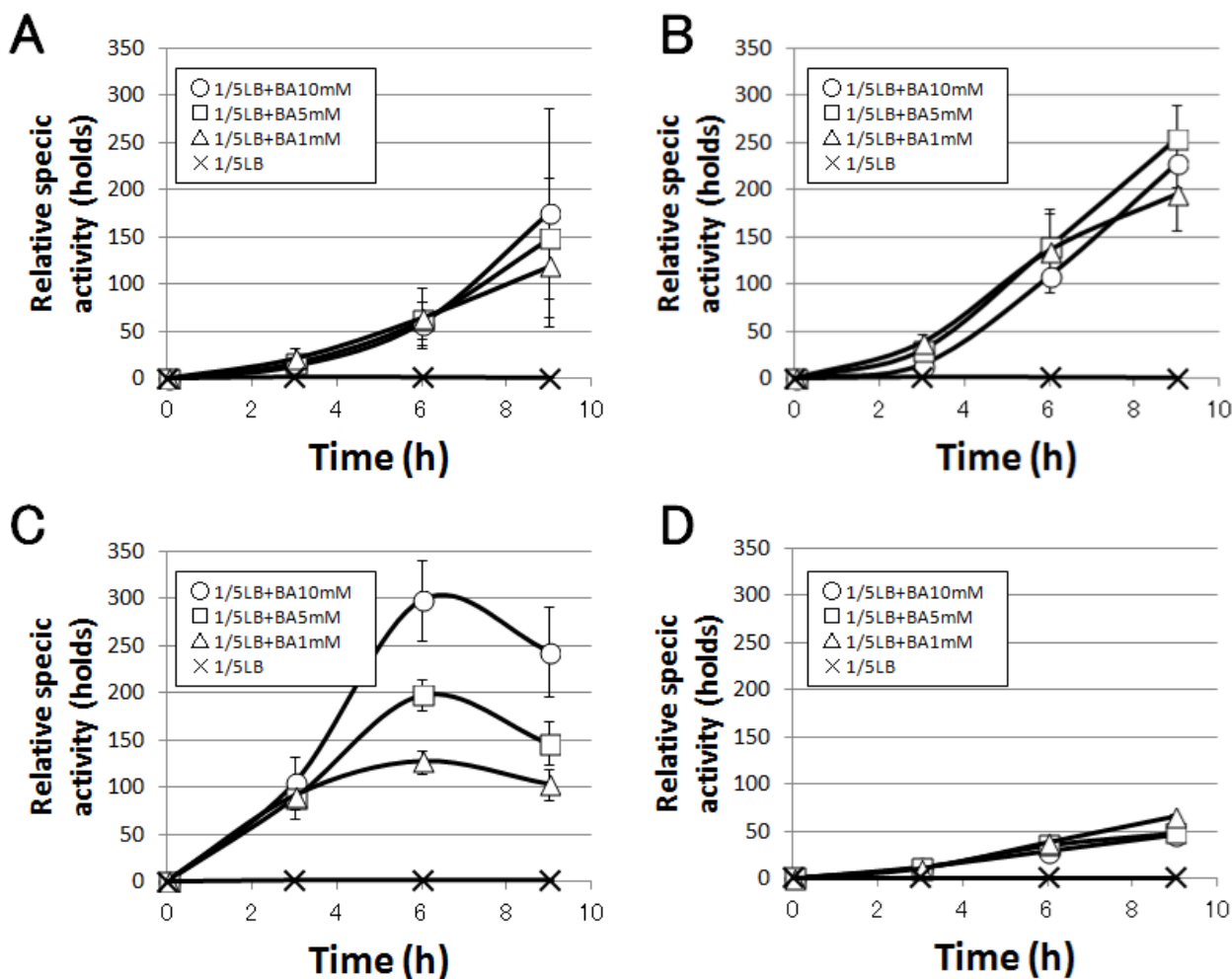


Fig. 7-3 各遺伝子破壊株における *benA* プロモーター活性に対する安息香酸 (BA) の影響。pKLAPBENF を導入した遺伝子破壊株を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM 添加したもの、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *benA* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。A : *R. jostii* RHA1Δ*benA* (pKLAPBENF) B : *R. jostii* RHA1Δ*benD* (pKLAPBENF) C : *R. jostii* RHA1Δ*catA* (pKLAPBENF) D : *R. jostii* RHA1Δ*catB* (pKLAPBENF)

5 mM 加えたサンプルでは約 3 mM まで (Fig. 7-4.C)減少した。安息香酸 1 mM、0.5 mM、0.1 mM においては、6–9 時間で検出限界以下まで減少した (Fig. 7-4.D, E, F)。いずれの条件においても、カテコールと *cis, cis*-muconate の顕著な蓄積は観察されなかった (Fig. 7-4)。

R. jostii RHA1 Δ*benA* においては、いずれの条件においても安息香酸の減少と、カテコールと *cis, cis*-muconate の蓄積は観察されなかった (Fig. 7-5)。

R. jostii RHA1 Δ*benD* において 9 時間時点で、安息香酸 10 mM は約 7 mM まで (Fig. 7-6.B)、5 mM は約 2 mM まで (Fig. 7-6.C)減少した。安息香酸 1 mM、0.5 mM、0.1 mM においては、3–6 時間で検出限界以下まで減少した (Fig. 7-6.D, E, F)。いずれの条件においても、カテコールと *cis, cis*-muconate の顕著な蓄積は観察されなかった (Fig. 7-6)。

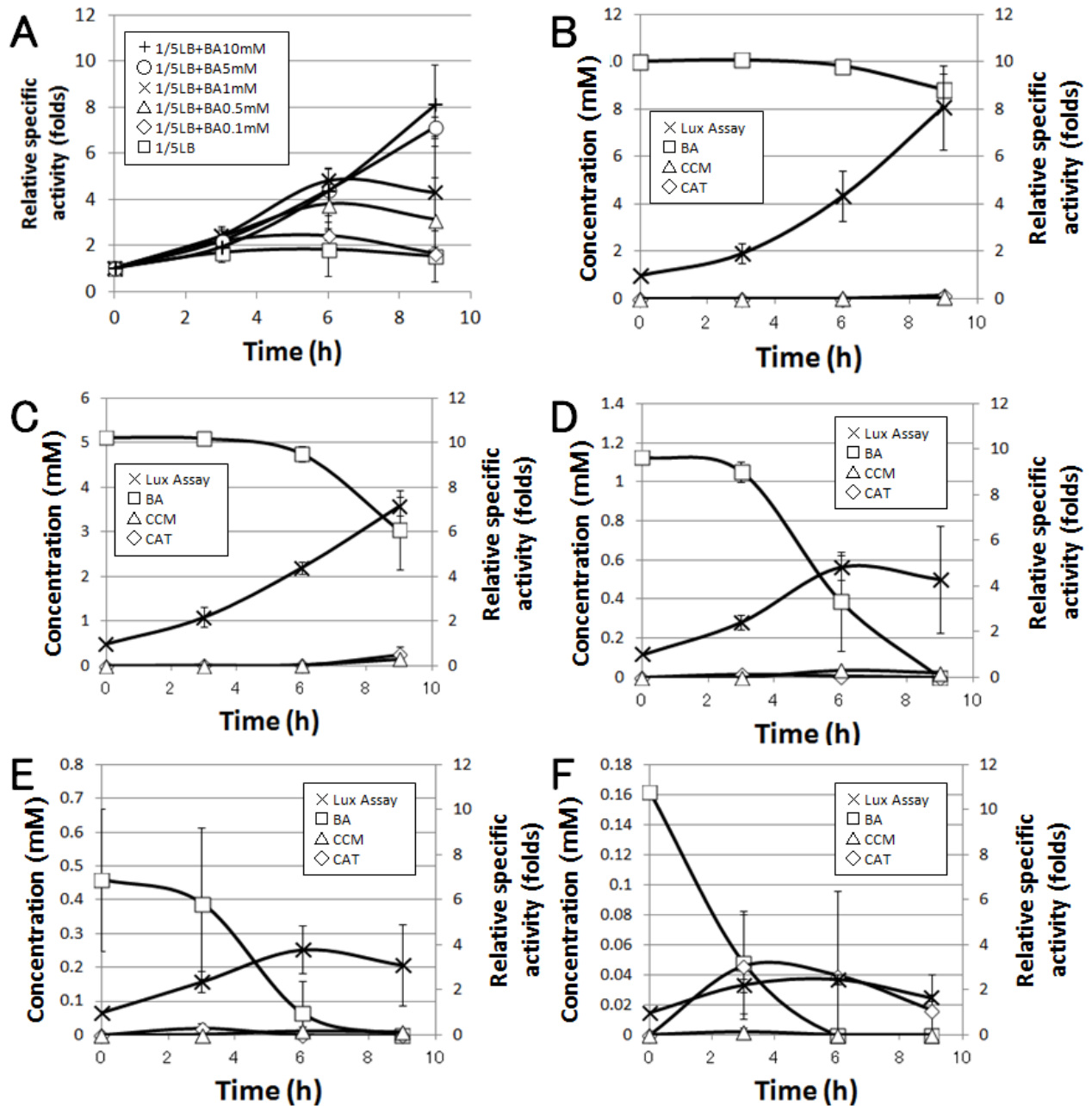


Fig. 7-4 *R. jostii* RHA1 における *catA1* プロモーター活性に対する安息香酸の影響と、菌液中の基質および代謝産物の濃度。pKLAPcatA を導入した *R. jostii* RHA1 を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値、OD₆₀₀、安息香酸と代謝産物の濃度を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *catA1* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。Lux Assay はプロモーターの転写活性を、BA は安息香酸を、CCM は *cis, cis*-muconate を、CAT はカテコールを示す。A : *catA1* プロモーターの転写活性 B : 安息香酸 10 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 C : 安息香酸 5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 D : 安息香酸 1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 E : 安息香酸 0.5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 F : 安息香酸 0.1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度

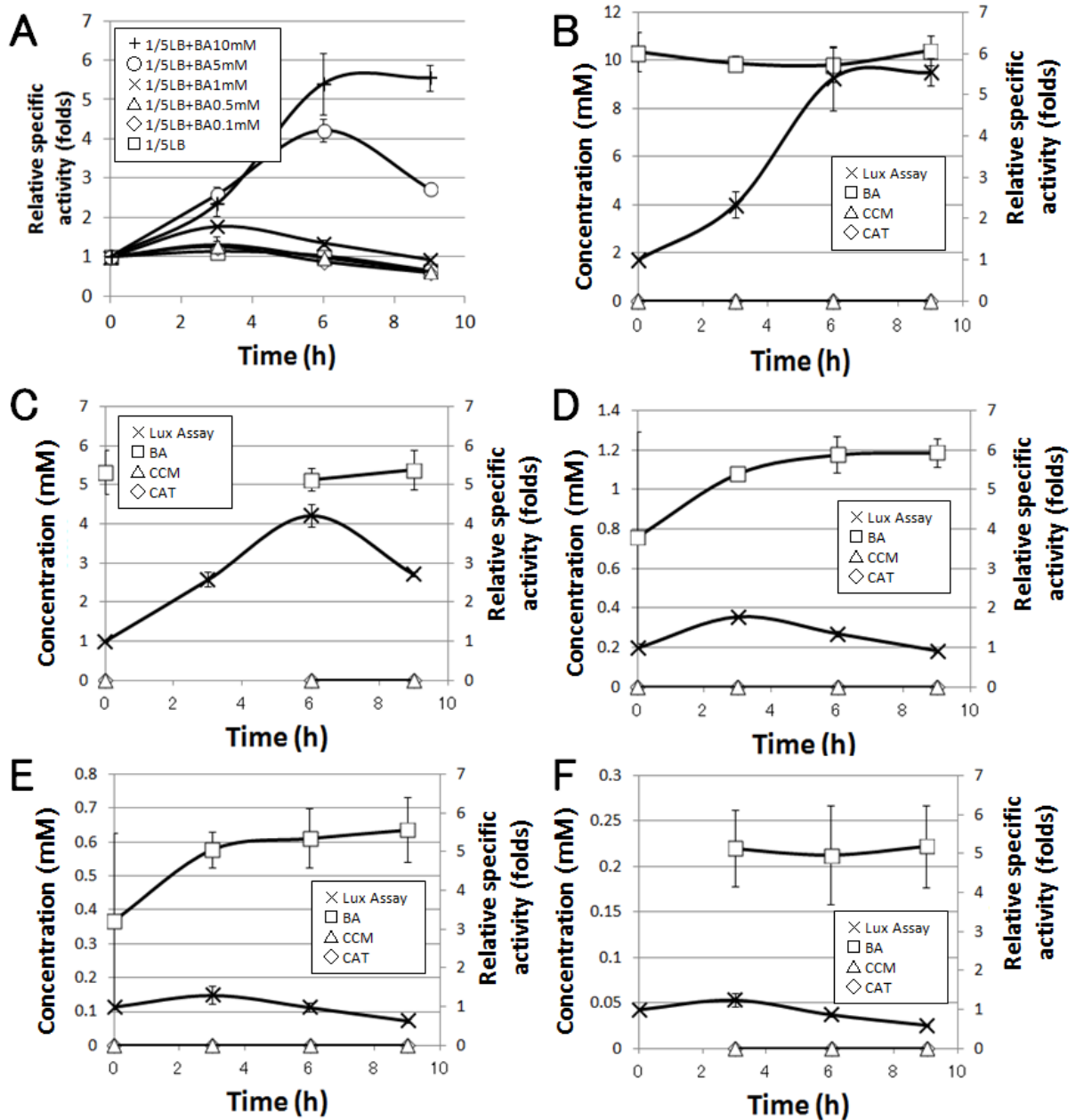


Fig. 7-5 *R. jostii* RHA1 Δ *benA* における *catA1* プロモーター活性に対する安息香酸の影響と、菌液中の基質および代謝産物の濃度。pKLP*catA* を導入した *R. jostii* RHA1 Δ *benA* を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値、OD₆₀₀、安息香酸および代謝産物の濃度を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *catA1* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。Lux Assay はプロモーターの転写活性を、BA は、安息香酸を CCM は *cis, cis*-muconate を、CAT はカテコールを示す。A : *catA1* プロモーターの転写活性 B : 安息香酸 10 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 C : 安息香酸 5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 D : 安息香酸 1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 E : 安息香酸 0.5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 F : 安息香酸 0.1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度

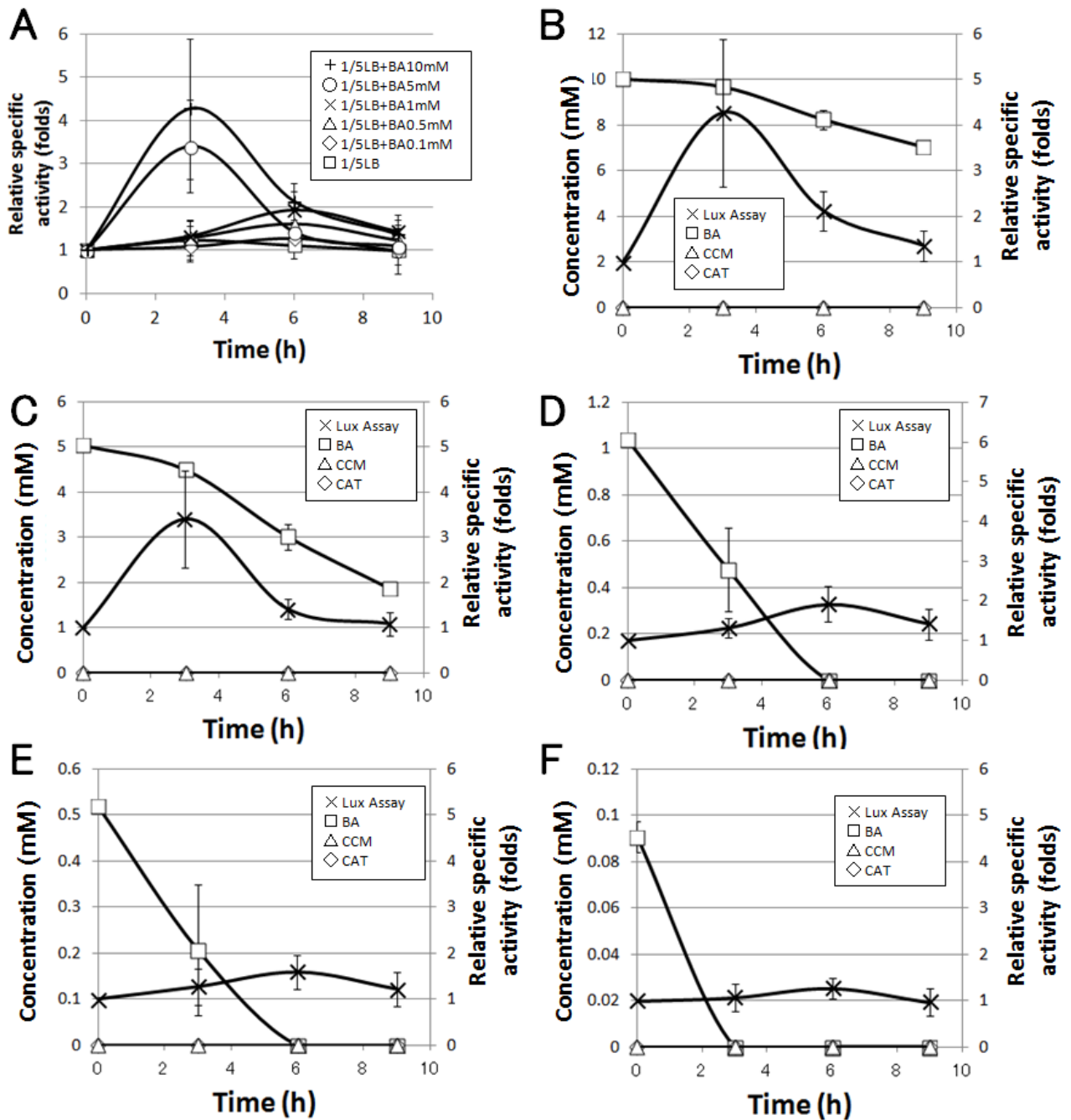


Fig. 7-6 *R. jostii* RHA1 Δ benD における *catA1* プロモーター活性に対する安息香酸の影響と、菌液中の基質および代謝産物の濃度。pKLAPcatA を導入した *R. jostii* RHA1 Δ benD を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値、OD₆₀₀、安息香酸とその代謝産物の濃度を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *catA1* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。Lux Assay はプロモーターの転写活性を、BA は安息香酸を、CCM は *cis, cis*-muconate を、CAT はカテコールを示す。A : *catA1* プロモーターの転写活性 B : 安息香酸 10 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 C : 安息香酸 5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 D : 安息香酸 1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 E : 安息香酸 0.5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 F : 安息香酸 0.1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度

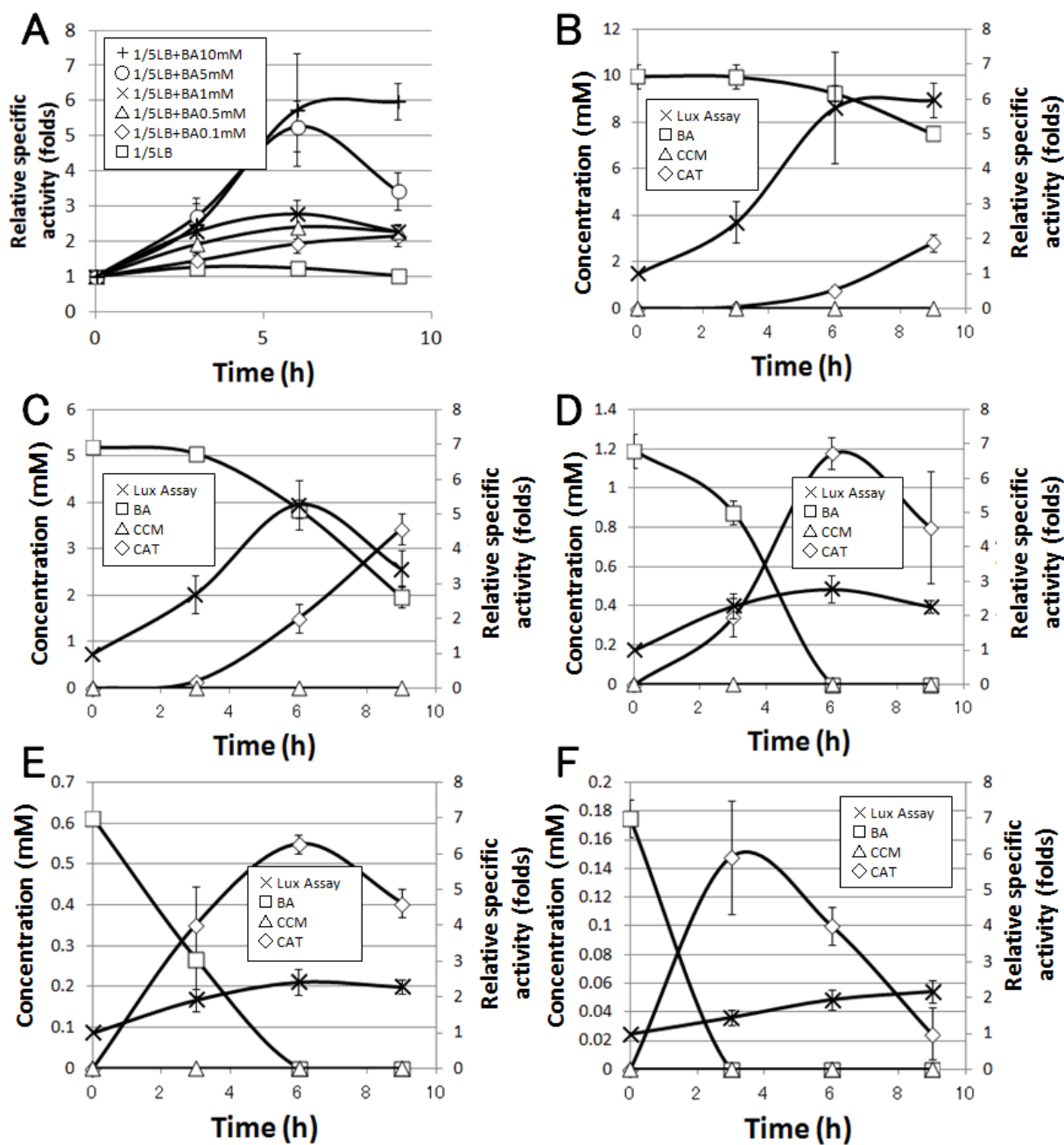


Fig. 7-7 *R. jostii* RHA1Δ*catA* における *catA1* プロモーター活性に対する安息香酸の影響と、菌液中の基質および代謝産物の濃度。pK_{LAP}*catA* を導入した *R. jostii* RHA1Δ*catA* を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値、OD₆₀₀、安息香酸と代謝産物の濃度を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *catA1* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。Lux Assay はプロモーターの転写活性を、BA は安息香酸を、CCM は *cis, cis*-muconate を、CAT はカテコールを示す。A: *catA1* プロモーターの転写活性 B: 安息香酸 10 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 C: 安息香酸 5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 D: 安息香酸 1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 E: 安息香酸 0.5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 F: 安息香酸 0.1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度

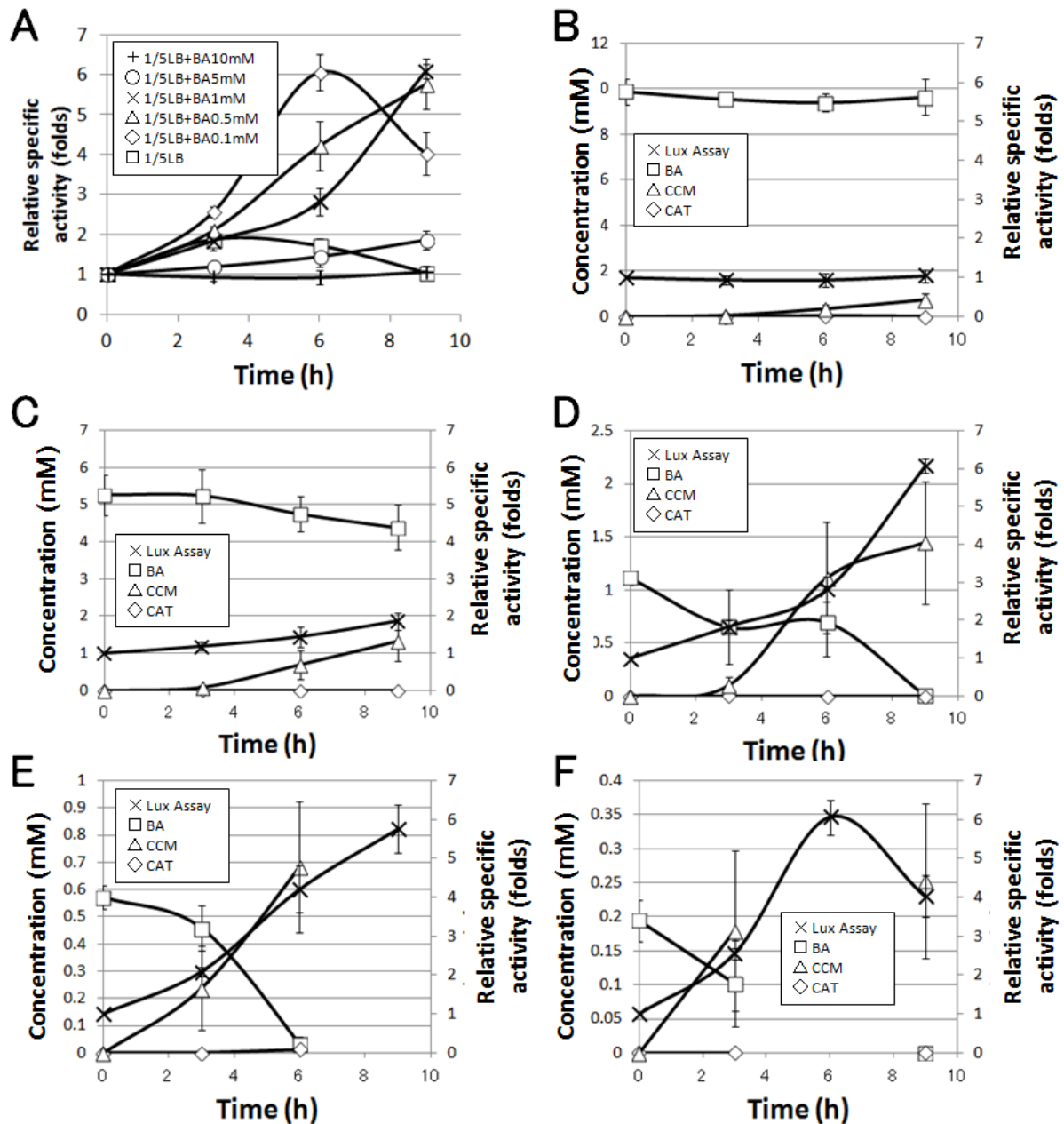


Fig. 7-8 *R. jostii* RHA1 Δ catB における *catA1* プロモーター活性に対する安息香酸の影響と、菌液中の基質および代謝産物の濃度。pKLPcatA を導入した *R. jostii* RHA1 Δ catB を 1/5LB 培地に安息香酸を 10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM 添加したものと、添加していない培地で培養し、3 時間おきに発光値、OD₆₀₀、安息香酸と代謝産物の濃度を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *catA1* プロモーターの転写活性とした。グラフの縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比、グラフの縦線は標準偏差を示した。Lux Assay はプロモーターの転写活性を、BA は安息香酸を、CCM は *cis, cis*-muconate を、CAT はカテコールを示す。A: *catA1* プロモーターの転写活性 B: 安息香酸 10 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 C: 安息香酸 5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 D: 安息香酸 1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 E: 安息香酸 0.5 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度 F: 安息香酸 0.1 mM を添加した場合の菌液中の基質濃度

R. jostii RHA1 $\Delta catA$ において9時間時点で、安息香酸 10 mM は約 8 mM まで減少し、カテコールは約 2 mM まで蓄積した (Fig. 7-7.B)。同様に9時間時点で、安息香酸 5 mM は約 2 mM まで減少し、カテコールは約 3 mM まで蓄積した (Fig. 7-7.C)。安息香酸 1 mM、0.5 mM、0.1 mM においては、3–6 時間で検出限界以下まで減少し、代わりにカテコールの蓄積が観察された (Fig. 7-6.D, E, F)。いずれの条件においても、*cis, cis*-muconate の蓄積は観察されなかった (Fig. 7-6)。

R. jostii RHA1 $\Delta catB$ においては、安息香酸 10 mM では9時間時点での基質濃度の顕著な変化は観察されなかった (Fig. 7-8.B)。安息香酸 5 mM では、9時間時点で安息香酸が約 4 mM まで減少し、*cis, cis*-muconate が約 1 mM 蓄積した (Fig. 7-8.C)。安息香酸 1 mM では、9時間時点で安息香酸が検出限界以下まで減少し、代わりに *cis, cis*-muconate が蓄積した (Fig. 7-8.D)。安息香酸 0.5 mM では、6時間時点で安息香酸が検出限界以下まで減少し、代わりに *cis, cis*-muconate が蓄積した (Fig. 7-8.E)。安息香酸 1 mM では、9時間時点で安息香酸が検出限界以下となり、*cis, cis*-muconate の蓄積が観察された (Fig. 7-8.F)。いずれの条件でも、カテコールの蓄積は観察されなかった (Fig. 7-8)。

7-4 考察

本章の実験では、カテコール分解遺伝子、および安息香酸分解遺伝子の転写誘導物質の解明を試みた。この結果として得られた知見を、Fig. 7-9 に示す。

benA プロモーターでは、野生株と全ての破壊株において、安息香酸を加えた条件で転写活性が上昇した。全ての条件で菌体内に存在していると考えられる基質は安息香酸のみであるため、*benA* プロモーターの誘導物質は安息香酸であることが示唆された。また、*R. jostii* RHA1 $\Delta catB$ においては、他の菌株と比べて転写活性が低いことから、*R. jostii* RHA1 $\Delta catB$ に蓄積すると考えられる *cis, cis*-muconate が、*benA* プロモーターの抑制物質として作用している可能性が示唆された。

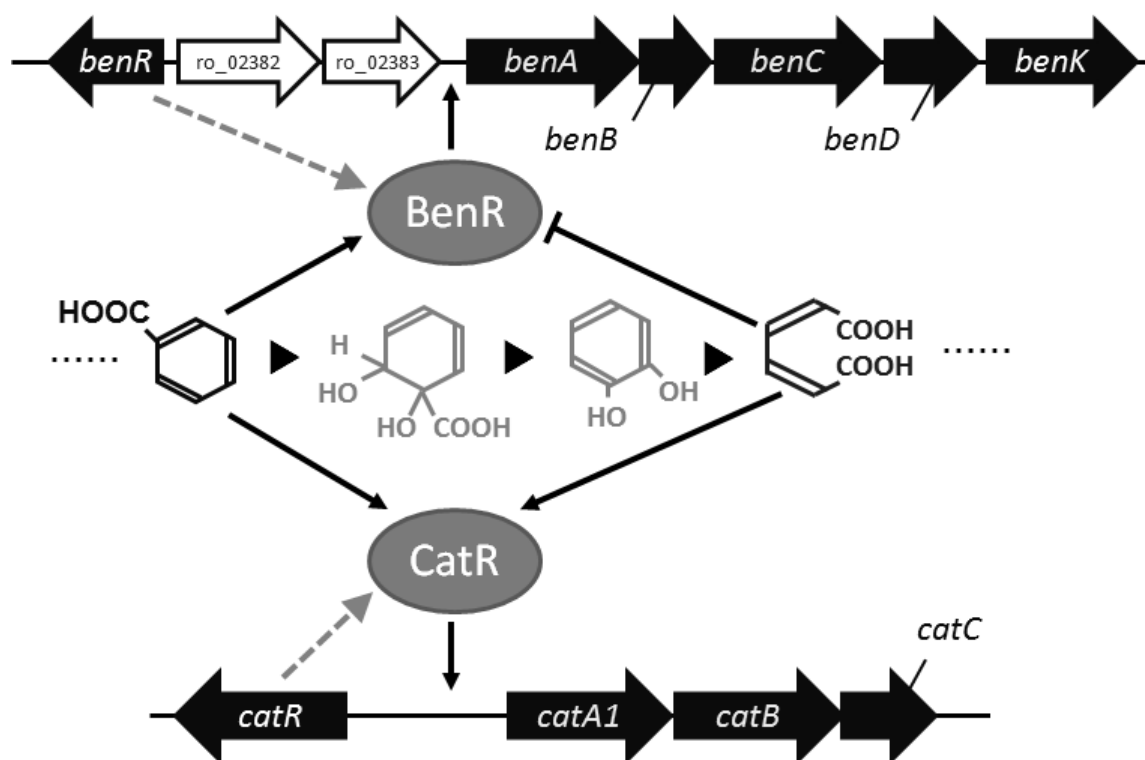


Fig. 7-9 *benA* プロモーターと *catA* プロモーターにおける転写活性化および抑制のモデル図。

catA1 プロモーターでは、野生株と *R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA* において、安息香酸存在下で転写活性の上昇が観察された。

しかし、*R. jostii* RHA1Δ*catB* においては、安息香酸の添加が 0.1mM、0.5mM、1mM の場合のみ活性が上昇し、5mM、10mM では活性が観察されなかった。*R. jostii* RHA1Δ*catB* における HPLC 測定では、安息香酸の添加が 0.1mM、0.5mM、1mM の条件では 6 - 9 時間の時点で安息香酸は、ほぼ検出限界以下まで分解され、代わりに *cis, cis* - muconate の蓄積が観察された。*R. jostii* RHA1Δ*catB* に安息香酸を 5mM、10mM 添加した場合は、6 - 9 時間の時点で菌液中に安息香酸と *cis, cis* - muconate がともに検出された。他の破壊株の菌液中では、代謝経路が遮断されているため、*cis, cis* - muconate は検出されなかった。

以上の結果から、安息香酸、*cis, cis* - muconate がそれぞれ個別に存在する条件では *catA1* プロモーターの転写が活性化するが、安息香酸と *cis, cis* - muconate がともに存在する条件では転写活性化が抑制されることが示唆された。

安息香酸と *cis, cis* - muconate が同時に存在する場合における、*catA* プロモーターの転写活性化抑制のメカニズム予想図を Fig. 7-10 に示す。Fig. 7-10 A に示す通り、安息香酸によって未知の抑制遺伝子から未知の抑制タンパク質が転写され、この抑制タンパク質が *cis, cis* - muconate と結合することで *catA* プロモーターの転写を抑制する可能性が考えられる。また、Fig. 7-10 B に示す通り、安息香酸と *cis, cis* - muconate が逆の役割を果たすパターンも考えられる。しかし、実際のメカニズムがどのようなものかは現状で断定することはできず、この説明は今後の課題となる。

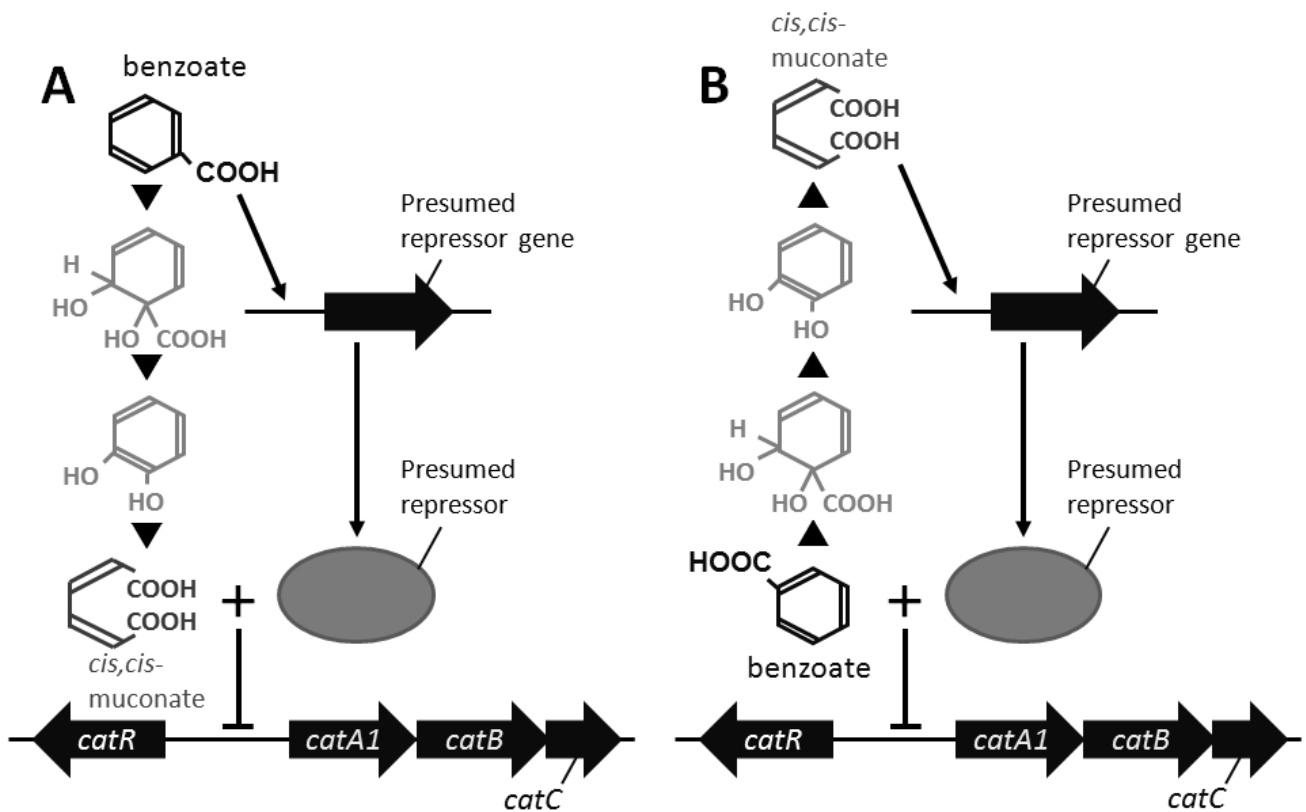


Fig. 7-10 安息香酸と *cis, cis* - muconate が同時に存在する場合における *catA* プロモーターの転写活性化抑制のメカニズム予想図 A: 安息香酸が未知の抑制遺伝子の転写を活性化するモデル B: *cis, cis* - muconate が未知の抑制遺伝子の転写を活性化するモデル

R. jostii RHA1 において、*benABCDK* オペロンのレギュレーター BenR は AraC/XylS ファミリーに、*catAIBC* オペロンのレギュレーター CatR は IclR ファミリーに分類される。類似する分解経路およびに制御遺伝子を持つ菌株としては、フェノール分解菌である *Rhodococcus erythropolis* CCM2595 があげられる^{5,6)}。*Rhodococcus erythropolis* CCM2595 は、CatR によって制御される *catABC* オペロンを持つ。*Rhodococcus erythropolis* CCM2595 における *catABC* は、上流の代謝基質であるフェノールによって転写が活性化されること、フェノール分解遺伝子もまた同様であることが報告されている。カテコール分解遺伝子群の転写が上流の代謝基質によって活性化する点が、本実験で観察された *R. jostii* RHA1 における *benABCD* オペロンと *catAIBC* オペロンの挙動に類似している。また、*Rhodococcus erythropolis* CCM2595 におけるフェノール分解遺伝子のレギュレーター PheR は AraC/XylS ファミリーに分類され、この点も *R. jostii* RHA1 の BenR と同様である。

Rhodococcus erythropolis CCM2595 のフェノール分解遺伝子およびカテコール分解遺伝子群は、フェノールやカテコールの代謝産物でもあるコハク酸によってカタボライト抑制が発生することが明らかにされている^{5,6)}。同様に、*R. jostii* RHA1 の *benABCDK* オペロンにおいても、*cis, cis - muconate* によるカタボライト抑制が生じている可能性が考えられる。

本研究の段階では BenR と CatR が、それぞれアクチベーターかリプレッサーか、また構成的に発現しているかそうでないかは不明である。これは、*benR* と *catR* それぞれの破壊株を作製し、*catA1*、*benA*、*benR*、*catR* のプロモーターの転写活性を測定することで明らかにできると考える。*Rhodococcus erythropolis* CCM2595 においては、*catR* は構成的に発現し⁵⁾、*pheR* はフェノールによって発現が誘導されることが報告されている⁶⁾。

R. jostii RHA1 の *catA1* プロモーターに関しては、安息香酸と *cis, cis - muconate* がそれぞれ個別に転写を活性化していると示唆されることから、2 つ以上のメカニズムが関わっていると考えられる。さらに、安息香酸と *cis, cis - muconate* がともに存在する条件で *catA1* プロモーターの転写活性化が抑制される現象にも何らかのメカニズムが関わっていると考えられ、これらの解明は今後の課題となる。

7-5 結論

benABCD オペロンと *catAIBC* オペロンの転写誘導物質を解明するため、それぞれの遺伝子群のプロモーター領域である *benA* プロモーターと *catA1* プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを用意し、安息香酸以降の代謝産物の分解遺伝子を破壊することで代謝産物を蓄積させる変異株を用いて、2 つのプロモーターの転写活性を測定した。

benA プロモーターは、野生株と全ての変異株において安息香酸存在下で高い転写活性を示したことから、安息香酸が転写誘導物質であることが示唆された。また、*cis, cis - muconate* が、*benA* プロモーターの抑制物質であることが示唆された。

catA1 プロモーターでは、野生株と *R. jostii* RHA1Δ*benA*、*R. jostii* RHA1Δ*benD*、*R. jostii* RHA1Δ*catA* において、安息香酸存在下で転写活性が上昇した。*R. jostii* RHA1Δ*catB* においては、安息香酸の添加が 0.1mM、0.5mM、1mM の場合のみ活性が上昇した。HPLC による測定とプロモーター転写活性を比較したところ、*catA1* プロモーターは、安息香酸と *cis, cis - muconate* がそれぞれ単独に存在する場合は転写が活性化し、安息香酸と *cis, cis - muconate* が同時に存在する場合は転写活性化が抑制されることが示唆された。

参考文献

- 1) Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Characterization of Transcriptional Regulatory Genes for Biphenyl Degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriology*, **186**, 2134-2146, 2004
- 2) Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequencing of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene*, **33**, 103-119, 1985
- 3) Yamada A, Kishi H., Sugiyama K, Hatta T, Nakamura K, Masai E, Fukuda M: Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2006–2012, 1998
- 4) Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Characterization of Transcriptional Regulatory Genes for Biphenyl Degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriology*, **186**, 2134-2146, 2004
- 5) Veselý M, Knoppová M, Nesvera J, Pátek M. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **76**, 159-168. 2007
- 6) Szököl J, Rucká L, Šimčíková M, Halada P, Nešvera J, Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 8267-8279, 2014

第 8 章

結論

本論文では、環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl, PCB)の分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 の PCB 分解メカニズムを解明するとともに、その分解活性の抑制現象、及び、抑制を解除するための分子生物学的手法に関する研究の成果を述べた。本研究で得られた知見のモデル図を Fig. 8 に示す。

第3章では、*R. jostii* RHA1 によるビフェニル初発分解遺伝子 *bphAa* の転写を、レポータープラスミドを用いて観察し、安息香酸存在下でビフェニルによる *bphAa* の転写活性化が抑制されることを明らかにした。この抑制の原因物質を解明するため、ビフェニル分解経路における安息香酸以降の代謝産物の分解遺伝子を破壊することで中間代謝産物を蓄積させる変異株を作製し、*bphAa* プロモーター活性を測定した。*R. jostii* RHA1 においてビフェニル存在下における *bphAa* プロモーターの転写活性化は、ビフェニル分解の中間代謝産物である安息香酸の存在下で抑制された。抑制の原因物質が、安息香酸か、より下流の分解産物であるかを解明するため、*R. jostii* RHA1 Δ *benA*、*R. jostii* RHA1 Δ *benD*、*R. jostii* RHA1 Δ *catA*、*R. jostii* RHA1 Δ *catB* を作製し、原因物質の特定をおこなった。その結果、抑制の原因物質は *R. jostii* RHA1 Δ *benD* で蓄積されると推測される *cis*-1, 2-dihydroxycyclohexa-3, 5-diene-1-carboxylate と、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* で蓄積されると推測されるカテコールであることが強く示唆された。特にカテコールは強い抑制の原因物質であることが知られた。

第4章では、BphS/BphT 支配下にあり PCB 分解に関わる4つの遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを用い、*R. jostii* RHA1 に導入してビフェニルや安息香酸に対する各プロモーターからの転写活性を調べた。また、同様のレポータープラスミドを *R. jostii* RHA1 Δ *catA* にも導入し、ビフェニルを添加して培養を行い、カテコールを蓄積させた場合のプロモーター転写活性を *R. jostii* RHA1 と比較した。結果として、4つのプロモーター領域それぞれにおいて、ビフェニルを添加した場合よりも、ビフェニルと安息香酸を添加した場合に、プロモーター転写活性に対する抑制効果が観察された。また、ビフェニル存在下で *R. jostii* RHA1 と *R. jostii* RHA1 Δ *catA* を比較した場合、4つのプロモーター領域それぞれにおいて、*R. jostii* RHA1 よりも *R. jostii* RHA1 Δ *catA* においてプロモーター転写活性に対するより強い抑制効果が観察された。これらのことから、カテコールは BphS/BphT 支配下の5つのプロモーターに対してビフェニルによる活性化に負の影響を与える物質であることが示唆された。

第5章では、カテコールによるビフェニル分解遺伝子群の転写活性化抑制を解除する方法の一つとして、原因物質であるカテコールの分解遺伝子 *catA1* の高発現による効果を確認した。まず、*catA1* 高発現プラスミド pFcatA を構築し、pFcatA が *R. jostii* RHA1 の菌体内で機能するか確認を行った。安息香酸を単一炭素源とする M9 寒天培地を用いて培養したところ、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* (pFcatA) は生育を確認できたが、ベクターコントロールである *R. jostii* RHA1 Δ *catA* (pFAJ2574) は生育しなかった。以上より、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* で遮断されていたカテコールの代謝経路が pFcatA の導入で相補されることが知られ、pFcatA 上の *catA1* が機能していることが確認できた。この pFcatA を導入した *R. jostii* RHA1 において、カテコールによるプロモーター転写活性化抑制の緩和が観察された。また、pFcatA を導入した *R. jostii* RHA1 はそうでない菌株に比べて、安息香酸とカテコールを優位に分解していることが HPLC による測定で確認された。これらの結果から、*catA1* 高発現株における *bphAa* 転写活性化抑制の緩和は、菌体内のカテコールが野生株よりもスムーズに代謝されることによるものと考えられた。以上より、*R. jostii* RHA1 において *catA1* を高発現することで代謝産物であるカテコールの分解により、*bphAa* 転写活性の抑制が緩和できることが強く示唆された。

第6章では、*catA1*、*bphS1*、*bphT1* それぞれを *R. jostii* RHA1 中で高発現させ、栄養培地である 1/5LB 培地と、無機塩培地である M9 培地に単一炭素源としてビフェニルを加えた培地で培養し、各細菌株の増殖を調べた。結果として、いずれの遺伝子の高発現株も、ベクターコントロールと比較してビフェニルを単一炭素源とする条件での生育が向上した。この生育の向上は、1/5LB で培養した条件と比較しても顕著であった。以上より *catA1*、*bphS1*、*bphT1* の各遺伝子の高発現は、ビフェニルの資化能力の増大に寄与することが明らかとなった。

第7章では、安息香酸分解遺伝子群である *benABCDK* オペロンとカテコール分解遺伝子群である *catA1BC* オペロンの転写誘導物質を解明するため、それぞれの遺伝子群のプロモーター領域である *benA* プロモーターと *catA1* プロモーターを組み込んだレポータープラスミドをそれぞれ用意し、安息香酸以降の代謝産物の分解遺伝子を破壊することで代謝産物を蓄積させる変異株を用いて、2つのプロモーターの転写活性を測定した。*benA* プロモーターは、野生株と全ての変異株において安息香酸存在下で高い転写活性を示したことから、安息香酸が転写誘導物質であることが示唆された。また、*cis, cis - muconate* が、*benA* プロモーターの抑制物質であることが示唆された。*catA1* プロモーターでは、野生株と *R. jostii* RHA1 Δ *benA*、*R. jostii* RHA1 Δ *benD*、*R. jostii* RHA1 Δ *catA* において、安息香酸存在下で転写活性が上昇した。*R. jostii* RHA1 Δ *catB* においては、安息香酸の添加が 0.1mM、0.5mM、1mM の場合のみ活性が上昇した。HPLC による測定とプロモーター転写活性を比較したところ、*catA1* プロモーターは、安息香酸と *cis, cis - muconate* がそれぞれ単独に存在する場合は転写が活性化し、安息香酸と *cis, cis - muconate* が同時に存在する場合は転写活性化が抑制されることが示唆された。

本研究の成果として、*R. jostii* RHA1 におけるビフェニル存在下での PCB 分解遺伝子群の転写活性化抑制現象と、その原因物質が中間代謝産物のカテコールであることと、その抑制現象の解除方法を明らかにすることができた。また、それらに加えて、*R. jostii* RHA1 のビフェニル単一炭素源における生育能を向上させる方法と、転写活性化抑制の原因物質であるカテコールとその上流の代謝産物である安息香酸を分解する遺伝子の転写制御物質を見出した。本研究で得られた知見を利用によって、より効率よく PCB を分解できる微生物を育種し、PCB の除去技術として利用するためのいくつかの方向を明らかにできたものとする。

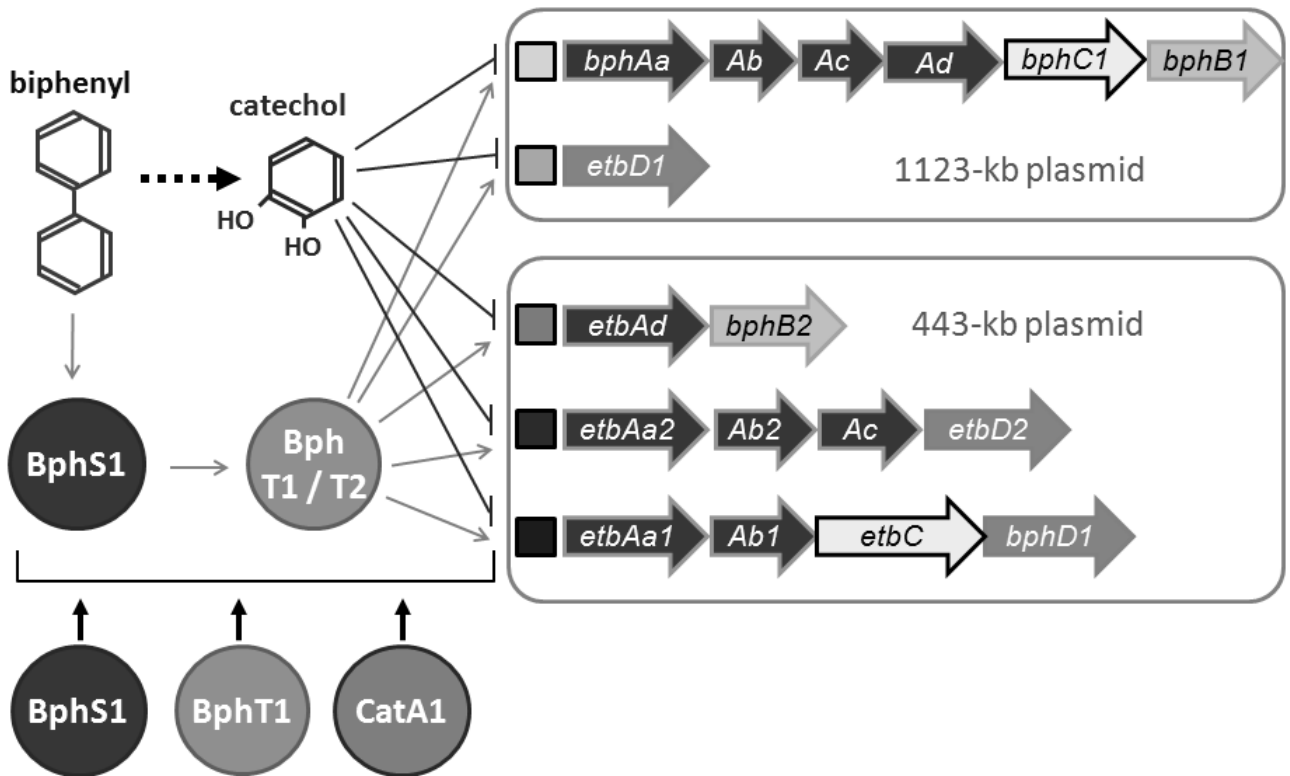


Fig. 8 本研究で得られた知見のモデル図。カテコールは、*bphAa* プロモーターのビフェニルによる転写活性化を抑制し、また、BphST 支配下のビフェニル分解遺伝子全般に影響する。*catA1* を高発現することで、カテコールによる負の影響を緩和できる。*catA1*、*bphS1*、*bphT1* それぞれを高発現することで、ビフェニル単一炭素源での生育を向上できる。

謝辞

本研究の進行および論文の作成にあたり、ご指導、ご教示を賜り下さった東北学院大学工学研究科環境建設工学専攻の宮内啓介教授に深甚の謝意を表します。研究やディスカッションを通して日頃より多くの助言を賜った同大学工学研究科環境建設工学専攻の遠藤銀朗教授、尚絅学院大学の神尾好是名誉教授に心から御礼を申し上げます。

微生物工学・遺伝子工学の貴重な知見を蓄積してくれた先人に、ともに研究を進めた宮内啓介・遠藤銀朗両研究室のメンバーに、心から感謝を申し上げます。

最後に、これまでの私の人生を温かく見守り、支えて下さった両親と友人たちに心から御礼を申し上げます。

公表論文

PCB 分解菌における分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制, 伊藤拓・荒木直人・遠藤銀朗・福田雅夫・宮内啓介, 土木学会論文集 G (環境), **67**, III_485- III_494, 2011

カテコール分解遺伝子導入による PCB 分解菌の分解遺伝子群転写活性の強化, 環境工学論文集, 伊藤拓・遠藤銀朗・福田雅夫・宮内啓介, 土木学会論文集 G (環境), **69**, III_223-III_229, 2013

PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における BphS/BphT 支配下遺伝子群の発現への中間分解産物カテコールの影響, 伊藤拓・鎌田裕樹・遠藤銀朗・福田雅夫・宮内啓介環境, バイオテクノロジー学会誌, **14**, 57-63, 2014