

# *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

土木工学専攻 宮内啓介研究室 0994451 伊藤 拓

主査：教授 宮内 啓介  
副査：教授 遠藤 銀朗  
副査：教授 中村 寛治

## 論文要旨

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。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。PCB は化学的に非常に安定な物質であり、絶縁性、不燃性、高脂溶性など、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。

これらの報告から 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、現在に至る<sup>1)</sup>。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。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 や *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 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。

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。

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、特定の遺伝子を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、およびその分解産物、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。微生物における 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。

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。

第3章では、*R. jostii* RHA1 によるビフェニル分解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、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。*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、安息香酸の代謝に関与する遺伝子をそれぞれ破壊した *R. jostii* RHA1 $\Delta$ *benA*、*R. jostii* RHA1 $\Delta$ *benD*、*R. jostii* RHA1 $\Delta$ *catA*、*R. jostii* RHA1 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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 $\Delta$ *catA* (pFAJ2574) は生育しなかった。以上より、*R. jostii* RHA1 $\Delta$ *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 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 *benABCD* オペロンとカテコール分解遺伝子群

である *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* RHA1 $\Delta$ *benA*、*R. jostii* RHA1 $\Delta$ *benD*、*R. jostii* RHA1 $\Delta$ *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 $\Delta$ *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考えている。

## 審査結果の要旨

本論文は、環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解細菌である *Rhodococcus jostii* RHA1 (以下 RHA1 株) における、ビフェニル分解遺伝子群の新たな転写抑制制御機構を見出し、また、本菌のビフェニル分解能を増強することを目的として、その転写抑制を解除する方法について研究したものである。

PCB は人類が人工的に合成した化合物であり、高脂溶性、絶縁性、安定性等の優れた性質のため、世界中で生産・使用されてきた。しかし、生体に対して毒性を示すことが知られたことから現在ではその製造・使用・廃棄が禁止されており、毒性と同時に化学的安定性が高い PCB の処理は、非常に大きな環境問題の一つである。PCB の処理方法の一つとして微生物による分解が考えられており、これまでに PCB を分解可能な細菌が環境中から単離されてきた。そのなかでも RHA1 株は他の細菌より高塩素置換の PCB を分解することが可能な有望株の一つである。RHA1 株は PCB の基本骨格であるビフェニルを分解する細菌として土壌環境中から単離された細菌である。それゆえ、本菌に PCB のみを与えても PCB

は分解されず、ビフェニルと共に与えたときに、ビフェニルによってビフェニル分解酵素群が生成され、それらを用いて PCB が分解される。すなわち、本菌の PCB 分解能を高めるためには、ビフェニル分解酵素群をより多く発現させる必要があると言える。本論文では RHA1 株のビフェニル分解酵素群の発現の指標として分解遺伝子群の転写量を用いて、分解遺伝子の転写が抑制される新たな現象を見出し、その解除方法を示した。

本論文は全 7 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、PCB およびその汚染に関してまとめている。

第 2 章では、RHA1 株のビフェニル分解機構についての従来の研究についてまとめている。

第 3 章では、RHA1 株のビフェニル分解の初発分解酵素遺伝子である *bphAa* 遺伝子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用いて、ビフェニルおよびその代謝産物である安息香酸存在下での *bphAa* 遺伝子の転写を解析している。ビフェニル存在下では *bphAa* 遺伝子の転写は活性化されることが明らかになっているが、同時に安息香酸が存在するとその転写活性化が抑制されることが見出された。さらに、安息香酸の代謝に関与する遺伝子群の遺伝子破壊株を作製し、それらを用いることで、この抑制には安息香酸の分解産物であるカテコールが大きく関与していることを明らかにしている。また、この抑制機構はビフェニルの上流代謝系に関与する酵素遺伝子にのみ働くことも明らかにしている。

第 4 章では、RHA1 株ゲノム上に分散して存在しているビフェニルの上流代謝系に関わる遺伝子群の全てに対して、本論文で見出した転写抑制機構が働いていることを明らかにしている。このことから、本抑制機構の全容を解明し、それを解除することで RHA1 株のビフェニル、しいては PCB の分解能が高まる可能性が示された。

第 5 章では、カテコール分解遺伝子を RHA1 内で高発現させることによって、ビフェニル分解遺伝子群の転写抑制に関与しているカテコールを速やかに分解させることで、分解遺伝子群の転写抑制を解除することを試みている。その結果、カテコール分解遺伝子を導入することで、ビフェニル分解時に蓄積するカテコールが分解除去され、分解遺伝子群の転写の抑制が弱くなることが示された。この結果は、遺伝子工学的手法を用いて RHA1 株の PCB 分解能を上昇させる方法を示したものである。

第 6 章では、第 5 章で述べたカテコール分解遺伝子、およびビフェニル分解酵素遺伝子群の正の転写制御を担う *bphS1* および *bphT1* 遺伝子を RHA1 で高発現させ、ビフェニルを単一炭素源として用いた際の RHA1 株の生育に対する影響を調べている。どの場合も生育速度の促進が観察され、カテコールの除去がビフェニルを炭素源とした際の生育にも正の効果をもたらすこと、転写活性化因子の導入もまたビフェニル分解の増強に繋がることを示した。

第 7 章では、ビフェニル分解遺伝子群の転写制御機構のうち、詳細に明らかになっていなかった安息香酸以下の代謝に関与する遺伝子群の転写制御機構について研究をおこなったものである。その結果、安息香酸分解遺伝子群 *benABCDK* の転写は安息香酸によって誘

導されることを明らかにした。また、その下流のカテコール分解遺伝子群 *catABC* の転写は、基質として用いた安息香酸の濃度によって異なる可能性を示唆する結果を得ており、これは細菌における遺伝子の転写制御機構という観点からも興味深い結果であると言える。第 8 章では、本論文のまとめを述べている。

以上、本論文は、環境汚染物質である PCB を分解することが可能なビフェニル分解細菌に関して、そのビフェニル分解能を最大限に発揮させる際に妨げとなる現象を見出し、また、得られた結果と遺伝子工学的手法を用いて、その抑制を解除し分解能を上昇させる方法を示したものである。基礎的な研究に重点を置いてはいるが、特定細菌を用いて PCB の分解処理をおこなう際に問題となりうる現象を見出し、それをクリアするための工学的手法を示しており、博士（工学）の博士論文として十分に評価できる。なお、本論文の成果は、土木学会論文集(G)（環境工学研究論文集）に 2 編、および環境バイオテクノロジー学会誌に 1 編の合計 3 編が査読あり学術論文として発表されており、また **American Society for Microbiology** 第 110 回 **General Meeting** において英語により発表されている。したがって、「東北学院大学大学院工学研究科の学位授与における論文審査基準に関する内規」第 3 条、および「東北学院大学大学院工学研究科土木工学専攻の学位授与における論文審査基準に関する申し合わせ事項」第 4 条の要件を満たしている。

## 最終試験結果の要旨

2015 年 2 月 13 日、関係教員出席のもとで最終試験をおこなった結果、合格と判定する。