



環境細菌の PCB 分解能を司る遺伝因子の解析と各種ゲノム解析ソフトウェアの開発

東北大学大学院生命科学研究科生態システム生命科学専攻 助教 大坪 嘉行

はじめに

ポリ塩化ビフェニル (PCB) はビフェニル骨格に塩素原子が 1 から 10 個結合した化合物であり、代表的な人為起源環境汚染物質である。Acidovorax sp. KKS102株は PCB 分解能を有する β ・プロテオバクテリアであり、筆者が研究を開始した当初、分解に関与する酵素の遺伝子群 (*bphEGFAIA2A3BCDA4*) が同定され、またビフェニルの分解代謝経路についてもすでに明らかにされていた。

筆者らは、本株の *bph* 遺伝子群の発現調節および可動性などについて解析し以下の成果を上げた。一方、近年、ゲノム情報といった比較的多量のデータをコンピューター上で取り扱うことが研究の遂行上ますます重要になってきている。そこで、KKS102株の解析をする一方で、筆者らはゲノム解析に有用な各種解析ソフトウェアの開発に取り組んできた。

KKS102株の PCB 分解能を司る遺伝因子の解析

(1) *bph* 遺伝子群の発現調節機構の解明 (図1) *bph* 遺伝子群の発現がビフェニルの添加により誘導されることを見出し、その機構を解明した。*bph* 遺伝子群は *bphE* 上流にある pE プロモーターより転写されており、pE プロモーターの破壊株で *bph* 遺伝子群全体の転写量が減少したことから、本遺伝子群はオペロン (*bph* オペロン) をなしており、pE プロモーターは *bph* オペロンの発現に重要なプロモーターである。

各種代謝酵素遺伝子の破壊株の解析から、*bph* オペロンの転

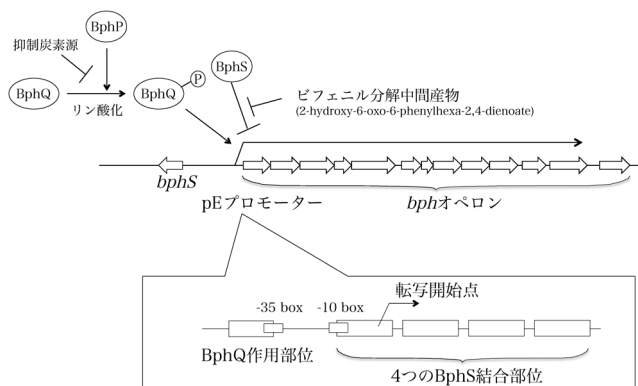


図1 *bph* オペロンの転写調節に負の制御因子 BphS タンパク質が関わることを見いだした。基底レベルで発現している酵素がビフェニルを分解することでビフェニル分解中間産物が蓄積すると、BphS タンパク質が pE プロモーター DNA 付近から解離することで転写抑制が解除されることが *bph* 遺伝子群の発現がビフェニルによって誘導されるメカニズムであることを明らかにした。また本プロモーターはカタボライト抑制されること、この現象に二成分調節系の制御因子 BphP および BphQ が関与していることを見いだした。抑制炭素源の存在がどのように認識されるかについて現在解析を行っている。

写誘導にはビフェニルが代謝されて生じる分解中間産物が重要であることを明らかにした。さらに pE プロモーターの活性調節について、*bph* オペロンの上流に逆向きにコードされる BphS が pE プロモーターの転写開始点付近に存在する 4 つの BphS 結合部位に結合すること、その結合がビフェニル分解中間産物によって弱まることを見出した。これらは *bph* オペロンがビフェニル添加によって誘導的に発現する機構についての核心部分である。

また pE プロモーターがコハク酸を始めとする炭素源の存在時には活性化されないというカタボライト調節現象を見だし、この現象に二成分調節系のセンサーカイネースおよびレスポンスレギュレーターをコードする *bphP* および *bphQ* 遺伝子が関与することを見いだした。BphPQ のオーソログ遺伝子は類縁の β ・プロテオバクテリアに広く存在しており、類縁菌でもカタボライト調節に関与していることが推察された。

(2) *bph* オペロンを担う可動性遺伝因子 (図2) KKS102

株染色体上にある *bph* オペロンが ICE (integrative and conjugative element) と呼ばれる可動性遺伝因子上に存在することを見だし、実際に *bph* オペロンを含む DNA 領域が接合によって他の系統的に離れた複数細菌株の染色体に水平伝達することを証明した。配列上類縁性が認められる ICE は約 5% の γ -および β -プロテオバクテリアのゲノム配列が決定済みの株に存在しているが、実際の転移が証明されたのは本 ICE が初めてである。細胞間を転移可能であることは、当該因子が ICE であることを示す重要な指標であり、本成果は、非常に多くの細菌株に存在する類縁 ICE ファミリーを解析・理解するための重要な基盤知見である。

(3) 本株 PCB 分解能に関する他の研究

本株の PCB 分解能力を増強する目的で、強度の異なる様々なプロモーターを相同組換えによって *bph* オペロン上流に組み込み、実際に分解能力が向上した株を創出することに成功した。一方、本株の PCB/ビフェニル分解能はエネルギー獲得という点でだけでなく、基質の持つ毒性を緩和する上でも重要な役割を果たしてい

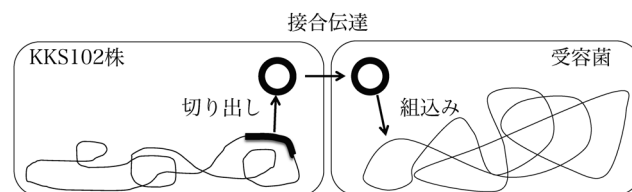


図2 ICE は近年注目されている可動性遺伝因子の一種であり、染色体に潜り込んだ可動性プラスミドであると捉えることができる。*bph* オペロンを担う ICE_{KKS102}Tn4677 は自身がコードする integrase の働きによって環状になる。これは接合伝達によって受容菌に移った後、再度 integrase の働きによって染色体に組み込まれる。

ることを見いだした。

各種ゲノム解析ソフトウェアの開発

(1) ゲノム配列比較関連ソフトウェア 筆者らは、多数のコンピューターソフトウェアを作成して公開してきた。なかでも代表的なものは GenomeMatcher である。本ソフトウェアは2つのゲノム配列を BLAST などの解析プログラムでゲノム配列等を比較した結果を二次元表面上にグラフィカルに表示する。操作は非常に簡便であり、配列データファイルを指定してボタンをクリックするだけでドットプロット図を描画できる。また描画された比較イメージ上で任意の範囲を選択して再解析が可能であるように設計してあるため、細部にわたるまでの詳細な比較解析を効率良く実施可能である。さらに GenomeMatcher には研究上有用な様々な機能が含まれている。なかでも RecordMatcher は、例えば、郵便番号と住所の関係が与えられているときに、複数の郵便番号を同時に指定して、それぞれの対応する住所を知ることのできるツールである。また DataCounter は、文字列集合を取り扱うための機能であり、指定した2つの集合の両方にある要素、および2つの集合の一方のみにある要素、を抽出することができる。RecordMatcher と DataCounter は、データ処理において普遍的に生じるこれらの類のタスクをコピー & ペーストとクリックだけで解決可能なツールであり、大量のデータを処理する際の有用なツールとして、高度な情報処理技術を有さない研究者も容易に使用が可能である。

(2) 完全ゲノム配列決定関連ソフトウェア Roche社の454シーケンサーによって KKS102株のドラフトゲノム配列を得たが、ゲノム情報を十分に活用するには、全ゲノム配列の決定が望ましいと考えられた。そこで、ドラフトゲノム配列を出発点としてゲノム配列を完全決定する過程(フィニッシング)を支援する3つのコンピューターソフトウェア、GenoFinisher, AceFileViewer, ShortReadManager を作成し、実際にこれらを利用して KKS102株の完全ゲノム配列を決定した。

これらソフトウェアは、次世代シーケンサー由来の配列データを最大限活用することで、フィニッシングに関わる作業の手間とコストを削減し、フィニッシングに必要な期間の大幅な短

縮を可能にするものである。また「完成したつもり」のゲノム配列に間違いがないことをいくつかの視点でチェックするためのツールも利用可能である(本大会にて発表予定2A15a07)。これらソフトウェアを活用し、既に公的データバンクに登録済みであるものも含めて農芸化学と縁の深い細菌株を中心に、人為起源殺虫剤の HCH (ヘキサクロロシクロヘキサン:別名 BHC) 分解関連の5株、植物共生細菌、トリクロロフェノール分解菌、グラム陽性の PCB 分解菌、など自身が直接関与したものだけでも10株以上の細菌ゲノムの完全決定に至っている。このうち3株については、完全にパソコンを利用したデータ処理だけで、数日以内に完全決定に至っている。また別の数株についても、パソコンを利用したデータ処理でほぼ大半の解析を終え、10程度の PCR 反応と数個の PCR 産物の塩基配列決定実験のみで、完全決定に至っている。これらソフトウェアはフィニッシングを大幅に効率化するものであり、KKS102株の配列決定以後も継続的に改良を加えている。今後、各種有用な形質を示す様々な微生物株ゲノムのフィニッシングに大きく寄与することが期待される。

謝辞 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻細胞遺伝学研究室、理化学研究所環境分子生物学研究室、東北大学大学院生命科学研究科生態システム生命科学専攻遺伝情報動態分野にて実施されたものです。細胞遺伝学研究室に在籍して以来、研究について技術的な基礎から精神面にいたるまで幅広く学ばせていただいた高木正道先生、太田明徳先生、堀内裕之先生、福田良一先生に心より感謝申し上げます。また理化学研究所で研究する機会を与えていただき、ご助言と励ましにより常に前向きな気持ちで研究に専念させて頂いた工藤俊章先生に心より感謝申し上げます。また、東北大学にてご指導、ご助言いただき、本賞にご推薦頂きました津田雅孝先生には、厚く御礼申し上げます。また、細胞遺伝学研究室に在籍して以来現在に至るまで継続的に、公私にわたってお世話になった永田裕二先生、宮内啓介先生に深く感謝いたします。また本研究は多くの共同研究者、研究室のメンバーの協力のもと実施したものであり、またソフトウェアの機能向上、改善にはユーザーの皆様から頂いたフィードバックが重要でした。この場を借りて厚く御礼申し上げます。