



微生物による芳香族化合物分解システムの 生化学的・分子生物学的解明

長岡技術科学大学技術研究院生物機能工学専攻 教授 福田 雅 夫

はじめに

環境汚染物質には石油類やダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル(PCB)など芳香族化合物を主成分とするものが少なくない。我々は環境汚染物質の微生物による浄化(バイオレメディエーション)技術への利用を目指して、芳香族化合物を中心に好気性細菌の分解酵素系と分解メカニズムの解明を進めて来た。ここでは、最も力を注いできたロドコッカス属分解細菌の分解酵素システムに的を絞って述べる。

ビフェニル・ポリ塩化ビフェニル分解細菌の分離

環境汚染物質として知られるPCBは電源トランス等の絶縁油や工業製品の脱脂洗浄剤、蒸留装置の熱媒体などに広く使用された難燃性の有機溶媒で、ビフェニル骨格に塩素がランダムに付加した混合物である。しかし、食用油への混入による健康被害や環境への漏出による環境汚染と生物濃縮が問題となり、1970年代に製造や使用、廃棄が禁止された。我々は環境汚染の浄化やPCB汚染物の処理への利用を目指して、PCBを標的として幅広い分解性を有する分解細菌のスクリーニングを行い、複数のPCB分解菌を選抜したが、その中でも特に強力な分解活性を示したのが東京大学の試験圃場の土壌から分離されたロドコッカス属細菌*Rhodococcus jostii* RHA1株であった。この圃場では有機塩素系殺虫剤リンデン(γ -HCHや γ -BHCとも呼ばれる、 γ -hexachlorocyclohexane)を連用した結果、リンデンが分解されるようになり、妹尾啓史先生(東京大学)により γ -HCH分解細菌*Pseudomonas paucimobilis*(現*Sphingobium japonicum*)UT26株が分

離されていた。我々はこのUT26株の γ -HCH分解酵素システムを解明しており、分解副産物として塩化ベンゼンが蓄積することからPCB分解菌の集積を予想してスクリーニングに利用した。それまでに報告されたPCB分解菌の大半がグラム陰性細菌であったのに対し、RHA1株はミコール酸含有放線菌に属するグラム陽性細菌で、世界でもトップクラスのPCB分解性を有することから注目を集めた[41]。

ロドコッカス属分解細菌の分解酵素システム

RHA1株のPCB分解は誘導物質としてビフェニルを必要とし、既に知られているPCB分解菌と同様にビフェニル分解酵素系が構造の似ているPCBを分解する共代謝による分解と考えられた。そこでRHA1株のビフェニル分解酵素系の解析を進めたところ、初発水酸化酵素や芳香環開裂酵素を含む酵素ステップで複数の分解酵素アイソザイムが関与していることが示唆された。更に分解酵素遺伝子群の構造の解明と分解酵素の転写誘導を担う転写制御システムの解析を進めた結果、RHA1株のビフェニル/PCB分解酵素システムは、複数の分解酵素アイソザイムが誘導される多重酵素系が各分解ステップの分解を触媒すること、分解酵素群を転写誘導するのは2組の二成分制御系転写制御システムであること、2組の二成分制御系転写制御システムが協調して働くことが分かった(図1)。更に、分解酵素群と転写制御遺伝子が二つの巨大線状プラスミドpRHL1(1,123 kb)とpRHL2(443 kb)に五つのオペロンとして配置していることも明らかにした。2組の転写制御システムを同時に破壊したところビフェニルだけでなく、ベンゼンやエチルベンゼン、プロピルベンゼンなどの芳香族化合物における生育能が喪失し、同一の多重酵素系が多様な芳香族化合物生育能を提供する極めてユニークな分解酵素システムが明らかとなった(図2)。

また、千田俊哉先生のX線結晶構造解析グループとの共同研

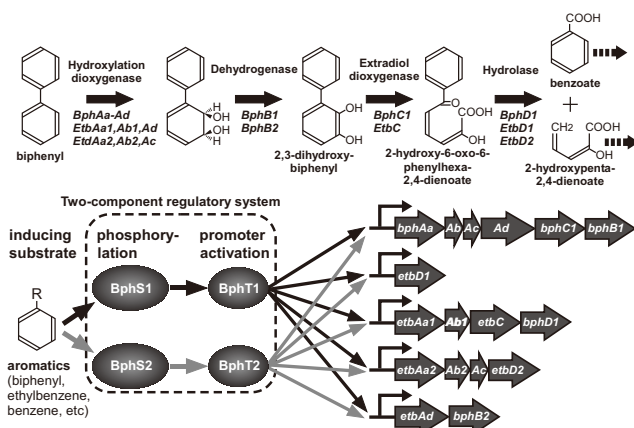


図1. ビフェニル分解酵素系(上段)と転写制御システム(下段)。

上段はビフェニル分解の上流経路と各ステップを触媒する酵素(矢印上側)と多重酵素系を構成するサブユニット(矢印下側)を示した。下段は二組の二成分制御システム(鎖線枠内)と誘導基質(左側)、制御を受ける酵素サブユニット遺伝子クラスターの配置(右側)を示した。センサーであるBphS1/S2が誘導基質を感知すると、応答制御タンパク質BphT1/T2をリン酸化し、リン酸化されたBphT1/T2は各プロモーターからの転写を活性化する。制御を受ける酵素サブユニット遺伝子を黒矢印と白抜き文字で、プロモーターは折れ曲がり矢印で示した。尚、BphS1-T2間およびBphS2-T1間でクロストークが起こることが示唆されている。

Substrate	Strains					
	RHA1	$\Delta bphS1$	$\Delta bphS2$	$\Delta bphS1 \Delta bphS2$	$\Delta bphT1$	$\Delta bphT1 \Delta bphT2$
ethylbenzene	+	+	+	-	+	+
toluene	+	+	+	-	+	+
benzene	+	+	+	-	+	+
isopropylbenzene	+	+	+	-	+	+
o-xylene	+	+	+	-	+	+
biphenyl	+	-	+	-	+	+
m-xylene	-	-	-	-	-	-
p-xylene	-	-	-	-	-	-
terephthalate	+	+	+	+	+	+

図2. 二成分制御システム変異体での生育特性。

Δ は遺伝子破壊を、+は生育あり、-は生育なしを示す。*bphS1*と*bphS2*を共に破壊すると上段5種類の基質で生育しなくなり、*bphS1*のみを破壊するとビフェニルで生育しなくなる。各変異株の結果からビフェニルでの転写誘導には*bphS1*のみが、上段5種の基質での転写誘導には*bphS1*と*bphS2*が共に関与することが示唆された。また、二組の二成分制御システムの制御を受ける多重酵素系が多様な芳香族化合物の分解に関与することも示唆された。

究により、初発4段階のピフェニル(PCB)分解酵素の三次元立体構造を明らかにした。特に芳香環開裂ジオキシゲナーゼ 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenaseでは、世界で初めて同酵素種の三次元立体構造を解明し、反応メカニズムの解明でも世界をリードした。更に、リグニン分解酵素系の研究における芳香環開裂ジオキシゲナーゼprotocatechuate 4,5-dioxygenaseの構造解明につながり、互いに進化的起源の異なる2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenaseとprotocatechuate 4,5-dioxygenaseが収斂進化によりほぼ同じ活性中心を持つに至ったことが示唆された。

ロドコッカス属分解細菌のゲノム解析

RHA1株のピフェニル分解酵素システムに興味を持ったBritish Columbia大学(UBC)のグループがカナダ政府のプロジェクトとして共同研究を提案し、RHA1株のゲノム解析が進められた。我々は既に着手していた線状染色体や線状プラスミドの末端配列の解明と重複遺伝子の識別を担当し、更にアノテーションを分担した。ゲノムサイズが大きく遺伝子重複が多いため当時の技術では苦労したが、完全なゲノム配列を明らかにすることに成功した。トータルゲノムサイズは9,703kbもあり、当時では細菌最大のゲノムとして注目を集め、放線菌では*Streptomyces*に続く2例目の全ゲノムデータとして利用された。ゲノム解析の結果、RHA1株が極めて多様な分解酵素遺伝子を有していることや相同性を有する多数の分解酵素遺伝子種を有していることが明らかになり、トランスクリプトーム解析の結果から多重分解酵素系の芳香族化合物分解への関与が確かめられた。

ロドコッカス属分解細菌の多彩な分解能力

RHA1株はピフェニルやPCB以外に環境汚染物質であるテトラクロロエチレンやジクロロエチレン、殺虫剤DDTの環境分解産物DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene)など、多彩な分解活性が次々と明らかになっている。特にテトラクロロエチレンでは上述のピフェニル分解酵素システムの初発水酸化ジオキシゲナーゼが分解を触媒し、しかもテトラクロロエチレン自体が二成分制御システムの誘導基質となって分解酵素を誘導することが分かり、ピフェニル分解酵素システムの間口の広さに驚いている。

オキシゲナーゼが開く多様な分解経路

ロドコッカス属ポリ塩化ピフェニル分解細菌における分解酵素システムに的を絞ったが、他の細菌における多様な分解酵素システムの解明にもかかわって来た。*Sphingobium* sp. SYK-6株における多様なリグニン化合物分解酵素系の解明、*Janibacter* sp. TYM3221株におけるDDE分解酵素系の解明、*Nocardioides* sp. DF412株におけるダイオキシン類ジベンゾフラン分解酵素系の解明、*Sphingobium japonicum* UT26株における殺虫剤 γ -HCH分解酵素系の解明、*Bradyrhizobium* sp. HW13株における除草剤2,4-Dの新規分解酵素の発見、*Rhizobacter gummiphilus* NS21株における天然ゴムpoly(cis-1,4-isoprene)分解酵素の解明などであるが、いずれの分解酵素系でもオキシゲナーゼが鍵酵素となっており、オキシゲナーゼの重要性を改めて知った次第である。

おわりに

以上に述べたように、芳香族化合物を中心にオキシゲナーゼが関与する多様な分解酵素系の解明にかかわってきた。これらの成果により学術的な意味で農芸化学分野に少なからず貢献できたのではないかと考えている。一方、研究とは別に経済産業省の遺伝子組換え微生物の安全確認や微生物を用いた環境修復(バイオレメディエーション)への微生物利用における安全確認に長年にわたりかかわり、農林水産省の遺伝子組換え生物の第一種利用の安全確認にも携わっており、農芸化学分野におけるバイオテクノロジーの推進に貢献できたのではと考えている。

最後に、研究をご指導いただいた故矢野圭司先生と高木正道先生(前新潟薬科大学学長)ならびに古川謙介先生(元九州大学)、研究を支えて下さった故三井幸雄先生、故堀之内末治先生、金原和秀先生(静岡大学)、James Tiedje先生(Michigan州立大学)、鎌形洋一先生(産業技術総合研究所)、永田裕二先生(東北大学)、政井英司先生(長岡技術科学大学)、千田俊哉先生(高エネルギー加速器研究機構)、Robert van der Geize博士(元Groningen大学)、Lindsey Eltis先生(British Columbia大学)、宮内啓介先生(東北学院大学)、笠井大輔先生(長岡技術科学大学)、上村直史先生(長岡技術科学大学)など多くの皆様、功績賞に推薦して下さいました太田明德先生(中部大学)に心から御礼申し上げます。