

ビフェニル/PCB代謝オペロンの構造と機能に関する研究

木村, 信忠
九州大学農学研究科農芸化学専攻

<https://doi.org/10.11501/3123048>

出版情報 : 九州大学, 1996, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

ビフェニル / PCB代謝オペロンの
構造と機能に関する研究

本 橋 信 正

1997

①

ビフェニル/PCB 代謝オペロンの構造と機能に関する研究

木村 信忠

1997

目 次

第 1 章	序 論	1
第 2 章	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707 と <i>Pseudomonas cepacia</i> LB400 の分解特性	
2・1	緒 言	12
2・2	実験材料および方法	12
2・3	実験結果	15
2・3・1	芳香族化合物の資化性	15
2・3・2	PCB に対する黄色環開裂化合物への変換活性	16
2・3・3	PCB 分解代謝産物の同定	16
2・4	考 察	17
2・5	小 括	18
第 3 章	KF707 株ビフェニル代謝遺伝子 <i>bphX</i> 領域の解析	
3・1	緒 言	28
3・2	実験材料と方法	28
3・3	実験結果	
3・3・1	KF707 株ビフェニル代謝遺伝子 <i>bphX</i> 領域の塩基配列	31
3・3・2	<i>bphX</i> 遺伝子群保有大腸菌の Glutathione S-transferase 活性	32
3・3・3	<i>bphX</i> 遺伝子群保有大腸菌の Acetaldehyde dehydrogenase 活性	33
3・4	考 察	33
3・5	小 括	34
第 4 章	諸種のビフェニル/ PCB 分解菌の <i>bphX</i> 領域の構造・機能解析	

4・1	緒言	40
4・2	実験材料および方法	40
4・3	実験結果	
4・3・1	ビフェニル/PCB 分解菌の <i>bphX0</i> 遺伝子の存在確認	43
4・3・2	諸種ビフェニル/PCB 分解菌の Glutathione S-transferase 活性	43
4・3・3	異なる炭素源による KF707 と LB400 株の Glutathione S-transferase 活性の比較	44
4・3・4	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707 株 <i>bphX</i> 領域と <i>P. putida</i> KF715 株のビフェニル代謝遺伝子の塩基配列の比較	44
4・3・5	<i>P. putida</i> KF715 株 <i>bphX</i> 領域の特定	45
4・4	考察	45
4・5	小括	47
第 5 章 KF707 株のビフェニル代謝遺伝子 <i>bphA1</i> 上流領域の解析		
5・1	緒言	55
5・2	実験方法と材料	55
5・3	実験結果	
5・3・1	KF707 株 <i>bphA1</i> 上流領域の塩基配列	60
5・3・2	ビフェニル/PCB 分解菌の <i>orf0</i> の存在確認	61
5・3・3	<i>orf0</i> 破壊株の遺伝子構造の解析	62
5・3・4	<i>orf0</i> 破壊株のビフェニル資化能	63
5・3・5	<i>orf0</i> 破壊株の環開裂黄色化合物の生成量	62
5・3・6	<i>orf0</i> 破壊株のビフェニル代謝系酵素の活性	63
5・3・7	<i>bphD</i> 遺伝子導入株のビフェニル資化能	63
5・4	考察	64
5・5	小括	65

第 6 章	ハイブリッド遺伝子クラスターの構築とハイブリッド代謝系の機能解析	
6・1	緒言	75
6・2	実験材料および方法	75
6・3	実験結果	
6・3・1	ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌による環開裂ジオキシゲナーゼ活性	79
6・3・2	ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌による PCB に対する環開裂黄色化合物への変換活性	79
6・3・3	ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌による PCB 分解特性	75
6・4	考察	81
6・5	小括	82
第 7 章	キメラ遺伝子クラスターの構築とキメラ代謝系の機能解析	
7・1	緒言	89
7・2	実験方法と材料	89
7・3	実験結果	
7・3・1	キメラビフェニルジオキシゲナーゼ系の遺伝子産物の確認	93
7・3・2	キメラビフェニルジオキシゲナーゼ系のサブユニット構成	94
7・3・3	キメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌による PCB 分解特性	94
7・4	考察	97
7・5	小括	98
第 8 章	変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ系の構築による分解特性に関するアミノ酸残基の特定	

8・1	緒言	105
8・2	実験方法と材料	105
8・3	実験結果	
8・3・1	変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌による PCB 分解特性	106
8・3・2	変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ系の遺伝子発現産物 の確認	108
8・4	考察	108
8・5	小括	110
第9章	諸種芳香族化合物分解菌の芳香環ジオキシゲナーゼのハイブリッド ド末端ジオキシゲナーゼの構築と機能解析	
9・1	緒言	116
9・2	実験材料と方法	116
9・3	実験結果	
9・3・1	ハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ系のサブユニット構成	120
9・3・2	ハイブリッド遺伝子クラスター発現大腸菌による環開裂 ジオキシゲナーゼ活性	121
9・3・3	ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌による芳香族 化合物分解特性	121
9・3・4	ハイブリッド遺伝子クラスター発現大腸菌による PCB 分解の環開裂黄色化合物の変換活性	122
9・4	考察	123
9・5	小括	125
第10章	諸種ビフェニル/ PCB 分解菌のビフェニルジオキシゲナーゼによる キメラ末端ジオキシゲナーゼの構築と機能解析	

10・1	緒言	132
10・2	実験材料と方法	132
10・3	実験結果	
10・3・1	キメラ末端ジオキシゲナーゼ系の遺伝子産物の確認	134
10・3・2	キメラ末端ジオキシゲナーゼ系のサブユニット構成	135
10・3・3	キメラ遺伝子クラスター発現大腸菌による環開裂 ジオキシゲナーゼ活性	135
10・3・4	キメラ遺伝子クラスター発現大腸菌による芳香族化合物 分解特性	136
10・3・5	キメラ遺伝子クラスター発現大腸菌による PCB の環開裂黄色 化合物生成量の測定	136
10・4	考察	137
10・5	小括	138

第 11 章 PCB 分解菌の機能改変

11・1	緒言	146
11・2	実験材料と方法	146
11・3	実験結果	
11・3・1	組換え型ビフェニルジオキシゲナーゼ産生株 KF707-D34 の遺伝子構造	149
11・3・2	ビフェニル資化能の測定	150
11・3・3	PCB 分解産物の特定	151
11・3・4	Kaneclor 300 分解特性	151
11・3・5	組換え型ビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (BphA1) の遺伝子産物の確認	151
11・3・6	組換え型ビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (BphA1) 遺伝子の塩基配列の決定	151

11・4 考察 152

11・5 小括 153

第 12 章 終 論 160

謝 辞 157

参 考 文 献

ABBREVIATIONS

ADH	Acetaldehyde dehydrogenase
Ap	ampicillin
bp	base pair
BP	biphenyl
<i>bpdC1</i>	a large subunit of the terminal dioxygenase component in biphenyl dioxygenase complex
<i>bph</i>	biphenyl/PCB degradative gene
Bph	<i>bph</i> gene products
BphA1	a large subunit of the terminal dioxygenase component in biphenyl dioxygenase complex
BphA2	a small subunit of the terminal dioxygenase component in biphenyl dioxygenase complex
BphA3	ferredoxin component in biphenyl dioxygenase complex
BphA4	ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase complex
BphB	<i>cis</i> -biphenyl dihydrodiol dehydrogenase
BphC	23DHBP dioxygenase
BphD	HPDA hydrolase
BphX0	glutathine S-transferase
BphX1	2-hydroxy penta-2,4 dienoate hydratase
BphX2	Acetaldehyde dehydrogenase
BphX3	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
BSM	basal salt medium
C230	catechol 2,3-dioxygenase
CB	chlorinated biphenyl
Cm	chloramphenicol
23DHBP	2,3-dihydroxybiphenyl
Dox	dioxygenase

EDTA ethylenediaminetetraacetate
F1 *Pseudomonas putida* F1
GC-MS gas chromatography-mass spectrometry
Gm gentamycin
GST Glutathione S-transferase
HODA 2-hydroxy-6-oxohexa-2,4-dienoate
HOHD 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate
IPTG isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KF707 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707
KF715 *Pseudomonas putida* KF715
Km kanamycin
Lac lactose catabolic gene of *E. coli*
LB Luria-Bertani
LB400 *Pseudomonas cepacia* LB400
M5 *Rhodococcus* sp. M5
/ novel junction (fusion)
OD optical density
20P4E 2-oxopenta-4-dienoate
ORF open reading frame
p plasmid
PCR polymerase chain reaction
PCB polychlorinated biphenyl
R resistant
SDS sodium dodecyl sulfate
Sm streptomycin
Tc tetracycline
TCE Trichloroethene
TE Tris-EDTA buffer
TMS trimethylsilyl

tod toluene degradative gene

Tod *tod* gene products

todC1 a large subunit of the terminal dioxygenase component in toluene dioxygenase complex

第 1 章 序 論

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は 1881 年に初めて合成され、1928 年米国で工業製品として製造が開始された。PCB はその化学的安定性、不燃性、絶縁性、高脂溶性、低揮発性などの優れた性質により絶縁油、熱媒体、機械油、可塑剤、塗料など極めて広い範囲で使用された。PCB による環境汚染は 1966 年、スウェーデンの海岸で死亡した野鳥から高濃度の PCB が検出されたのが最初の報告である。その後、各国で PCB 汚染が報告され、PCB の地球規模での汚染が明らかとなった。PCB はビフェニル (BP) を鉄触媒のもとに塩素ガスで直接塩素化して製造されるため、BP の水素が塩素に置換される数および置換位置の異なる化合物が理論上 210 種類存在する。

Achmed と Focht は 1973 年に土壤中より分離した *Achromobacter* 属細菌が mono- および dichlorobiphenyl を塩化安息香酸へ分解することを初めて報告した。

(1) その後 Furukawa らは各地の諸種のビフェニル/ PCB 分解菌を分離し、これらが ^{14}C -2,5,2'-trichlorobiphenyl を分解することを明らかにした。これらの分離されたビフェニル/ PCB 分解菌の多くは *Pseudomonas* 属細菌およびその関連細菌である

Achromobacter、*Alcaligenes*、*Acinetobacter*、*Moraxella* などであるが、*Arthrobacter*、*Corynebacterium* などグラム陽性菌も含まれていた。(37)

Bedard らは米国ニューヨーク市の PCB で汚染したハドソン川の河川土壌より分離した各種ビフェニル/ PCB 分解菌の PCB 異性体に対する分解活性の測定を行い、以下に要約されるような特徴を見出した。(Fig. 1-1)

すなわち、(1) PCB の生分解性速度は塩素置換数の増大と共に減少する。また塩素置換数が 4-5 個以上になると生分解性は極度に低下する、(2) ビフェニル分子の片方の芳香環のみに塩素を置換した PCB は同じ数の塩素を両方の芳香環に置換しているものより分解されやすい、(3) 2,6-、2,3,6-、2,3,5,6-chlorobiphenyl などの片方の芳香環のオルソ位 (2,6 位)、および 2,2'-、2,5,2'-chlorobiphenyl などのそれぞれの芳香環のオルソ位 (2,2' 位) に塩素が置換した PCB は難分解性である、(4) 芳香環の開裂は塩素の置換していない、あるいは塩素置換数の少ない芳香環に酸素分子が導入され、環開裂が起こる、(5) 諸種 PCB 異性体の分解性は菌株により

大きな違いが存在するというものである。(Fig.1-1,3)^(10,11)

これまでに分離された ビフェニル/ PCB 分解菌において、BP は安息香酸を経てカテコールに酸化分解され、以下 *ortho*- または *meta*- 開裂経路で TCA 回路の中間体へと分解される。ビフェニル/ PCB 分解菌は BP から安息香酸へ至るまでの初期反応系において、BP は芳香環の 2 位と 3 位へ分子状酸素が添加され、それに続いて脱水素反応を経て、2,3-dihydroxybiphenyl (23DHBP, Fig.1-2、化合物III) に変換され、続いて酸素添加反応にともなう環開裂黄色化合物 (Fig.1-2、化合物IV) の生成を経て、加水分解反応により、安息香酸と (Fig.1-2、化合物V) 2-oxopent-4-enoate (20P4E, Fig.1-2、化合物VI) を生成する。

Furukawa らは 1986 年に北九州市のビフェニル工場の土壌中より分離したビフェニル/ PCB 分解菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株の全ゲノムを制限酵素 *Xho*I で処理し、広宿主域ベクター pKT230 を利用して *P. aeruginosa* PA01161 を形質転換して、BP を環開裂黄色化合物へ変換するコロニーを得た。この菌株はビフェニル代謝遺伝子 (*bph* 遺伝子) の *bphA* 遺伝子 (Biphenyl dioxygenase 遺伝子)、*bphB* 遺伝子 (*cis*-biphenyl dihydrodiol dioxygenase 遺伝子) および *bphC* 遺伝子 (23DHBP dioxygenase 遺伝子) を含む 6.8 kb の DNA 断片を保有した。⁽³⁹⁾ さらに、環開裂黄色化合物の加水分解による安息香酸と 20P4E の生成に関与する HPDA hydrolase をコードする *bphD* 遺伝子を *bphC* 遺伝子の下流領域よりクローニングし、*bphC* と *bphD* の間には 3.4 kb の *bphX* 領域が存在することを明らかにした。

一方、同研究グループはビフェニル/ PCB 分解菌 *P. putida* KF715 株から *bphAB-CD* 遺伝子のクローニングを行い、KF715 株の *bphA* 遺伝子領域の制限酵素地図は、KF707 株 *bph* 遺伝子と極めて類似しているものの、*bphC* と *bphD* 遺伝子の間に *bphX* 領域が存在しないことを明らかにした。(Fig.1-2)⁽⁶⁰⁾

さらに *Pseudomonas*、*Achromobacter*、*Alcaligenes*、*Moraxella*、*Arthrobacter* 属細菌などのビフェニル/ PCB 分解菌の *bph* 遺伝子の相関関係について遺伝学的、免疫学的方法によりそれらを 4 つのグループに分類し、16 種類の菌株のうち 6 種類の *Pseudomonas* 属細菌と 1 種類の *Alcaligenes* 属細菌が KF707 株と同じ *bphAB-CXD* のクラスターを形成し、(グループI) 他の 3 菌株は KF707 株 *bphABCD* と相

同性が高いが *bphX* 領域を欠失し、(グループ II) 3 菌株は KF707 株 *bphABCD* と相同性が低く (グループ III)、他の 3 菌株は KF707 株 *bphABCD* と相同性が存在しなかった。(グループ IV)⁽²⁹⁾ これらの結果は *bph* 遺伝子が他の菌株へ水平伝播していることを示唆した。

Gibson らはビフェニル/PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と 米国 GE 社によりニューヨーク市のハドソン川より分離された *Pseudomonas cepacia* LB400 株⁽¹⁴⁾ の各種 PCB 異性体に対する分解特性の比較を行い、KF707 株は 19 種類の PCB 異性体のうち 7 種類のみを分解したのに比べ、LB400 株は 19 種類の PCB 異性体のうち 17 種類を分解など幅広い PCB 分解特性を示すことを明らかにした。(Table1-1)⁽⁴⁶⁾ また、KF707 株は 4,4'-dichlorobiphenyl (4,4'-CB) (double para-substituted congener) に対して分解活性を示すのに対し、2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl (2,5,2',5'-CB) (*ortho-meta*-substituted congener) に対して分解活性は示さなかった。このことから KF707 株による PCB 分解の主経路が 酸素分子が芳香環の塩素置換されていない 2,3 位へ導入される 2,3-dioxygenation を通して進行することが示唆された。一方、LB400 株は 4,4'-CB に対して分解活性を示さないのに対し、2,5,2',5'-CB に対して高い分解活性を示した。(Table1-1) このことから LB400 株は酸素分子が芳香環の塩素置換されていない 2,3 位へ導入される 2,3-dioxygenation とともに、3,4-dioxygenation により PCB を分解する経路の存在が示唆された。⁽⁹⁾

一方、ビフェニル/PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株 *bph* 遺伝子 *bphA1A2A3A4BC* および *bphD* の全 DNA 塩基配列が決定され、*bphA1* はビフェニルジオキシゲナーゼ複合系の terminal dioxygenase 成分大サブユニット、*bphA2* は同小サブユニット、*bphA3* は ferredoxin、*bphA4* は ferredoxin reductase、*bphB* は Biphenyl dihydrodiol dehydrogenase、*bphC* は 23DHBP dioxygenase、*bphD* は 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid hydrolase をコードすることが明らかにされた。^(28,109) その後、ビフェニル/PCB 分解菌 *P. cepacia* LB400 株 *bph* 遺伝子の DNA 塩基配列が決定され、各遺伝子コンポーネント間において BphA1, 95.6 %; BphA2, 99.5 %; BphA3, 100 %; BphA4, 100 %; BphB, 99.3 %; BphC, 99.7 %;

BphD, 97.6 % の極めて高い相同性を示し、各遺伝子の並びも一致した。(Table 1-2)^(20,65) よって KF707 株と LB400 株はその PCB 分解特性は大きく異なっているのにも拘わらず、両菌株のビフェニル代謝遺伝子群の構造は極めて類似していることが明らかにされた。

トルエン資化菌 *Pseudomonas putida* F1 株のトルエン代謝系酵素は KF707 株ビフェニル代謝系酵素と異なる基質特異性を示すが、そのトルエン代謝遺伝子 *todC1C2BADE* の塩基配列は、KF707 株の *bph* 遺伝子 *bphA1A2A3A4BC* と遺伝子構成や対応する酵素タンパク質の大きさ、予想されるアミノ酸配列において極めて類似していた。

さらに、*todC1* 遺伝子を KF707 株に導入した菌株はトルエン/ベンゼン資化性を獲得し⁽³⁴⁾、さらにハイブリッド遺伝子クラスター *todC1* (F1)*bphA2A3A4BC* (KF707) を保持する大腸菌はトルエンを環開裂黄色化合物への分解能を獲得した。よって末端ジオキシゲナーゼ大サブユニット (*bphA1* と *todC1*) が両菌株の基質特異性に関与しているコンポーネントであることが明らかにされた。

また土壌細菌からトルエン、ナフタレン、ベンゼン、フェノール、キシレンなどの多くの芳香族化合物を資化する菌株が分離され、多くの芳香族化合物資化性菌から芳香環分解系酵素をコードする遺伝子がクローニングされ、それらの塩基配列とアミノ酸配列が決定され、その芳香環分解系酵素の大部分において類似した分子量とアミノ酸残基を有することが明らかとなっている。^(7, 67, 75, 89, 97, 123, 124)

近年、有害物質で汚染された環境の修復に微生物を利用するバイオリメデーションの研究が国内外で活発化している。⁽¹¹³⁾ 現在、燃焼を含む物理処理/化学処理のあとの微量に残存する PCB や土壌中、河川を低濃度で汚染している PCB を微生物を利用し、効率よく分解するシステムの開発が試みられている。⁽²²⁾ そのためにこれまでに多数のビフェニル/PCB 分解菌がスクリーニングされ、その代謝遺伝子がクローニングされた。^(2, 3, 59, 70, 71, 82, 84, 108, 117)

以上のように、環境微生物から多くの分解遺伝子がクローン化されたが、機能的に異なる芳香族化合物の代謝酵素の構造に類縁性が認められ、これらは共通の祖先より由来しているものとみなされている。^(17, 55, 56, 62) そして様々な芳香環分解系の類似性や機能の関連性を考察したり、さらにその進化的側面を論じることが可能となってき

ている。

中でもビフェニル/ PCB 分解菌の PCB 分解特性を決定している代謝酵素を比較検討し、酵素的諸性質を明らかにするとともに基質特異性の進化に関与する機能と構造を特定することは、芳香環代謝酵素系の機能進化における分子的メカニズムを探るうえで有効あり、また応用面においても極めて重要である。

本研究は、KF707 株のビフェニル/ PCB 代謝オペロンの構造と機能を解析し、PCB 分解特性の相違に関与している機能と構造を特定するとともに、それらの知見を利用して、新規な分解特性を持つ分解系酵素の構築とビフェニル/ PCB 分解菌の育種を試みたものである。すなわち、

(i) *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株のビフェニル代謝系酵素の基質特異性の比較検討および PCB 分解産物の同定を行い、両菌株のビフェニル代謝系の PCB 分解特性に関与している機能の特定を行った。(第 2 章)

(ii) *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 遺伝子に存在する機能不明な領域 *bphX* および *bphA1* 遺伝子上流領域の構造と機能を解析し、*P. cepacia* LB400 株の *bph* 遺伝子との比較検討を行った。さらに各種ビフェニル/ PCB 分解菌の *bph* 遺伝子の構造と機能における相同性について検討を行った。(第 3, 4, 5 章)

(iii) *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株のビフェニル代謝系遺伝子群の各コンポーネントを *cis* に組換えたハイブリッド遺伝子クラスターを構築し、PCB 分解特性に関与している遺伝子コンポーネントの特定を行った。(第 6 章)

(iv) *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の PCB 分解特性に関与している遺伝子コンポーネント間で組換えたキメラおよび変異型酵素を構築し、PCB 分解特性に関与しているビフェニル代謝系酵素の構造の特定を行った。(第 7, 8 章)

(v) 各種芳香環代謝系のうち分解特性に関与している芳香環末端酸素添加酵素遺伝子のコンポーネントよりハイブリッドおよびキメラ酵素を構築し、その構造と機能の検討を行った。(第 9, 10 章)

(vi) *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の *bphA1* 遺伝子からなるキメラ *bphA1* 遺伝子が KF707 株染色体上の *bphA1* 遺伝子とランダムに相同組換えを起こし、新規 PCB 分解能を有する ビフェニル/ PCB 分解菌の取得を行った。

(第 11 章)

本論文は、これらの実験結果をまとめたものである。

Table 1-1 Primary degradation of PCB-congeners by *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400

Congeners	degradability(%)	
	KF707	LB400
2,3-	100	100
2,4-	100	100
2,2'-	18	100
2,5,2'-	10	100
2,5,4'-	100	98
2,3,2',3'-	81	100
2,3,2',5'-	9	100
2,5,3',4'-	18	100
2,5,2',5'-	9	100
2,4,5,2',5'-	0	100
2,3,4,2',5'-	0	100
2,4,5,2',3'-	0	100
4,4'-	100	25
2,4,4'-	99	89
2,4,2',4'-	0	81
2,4,3',4'-	31	43
3,4,3',4'-	0	6
2,4,5,2',4',5'-	0	41
2,4,6,2',4'- (IS)	0	0

IS; internal standard

Table 1-2 Comparison of sequence similarity in nucleotides and amino acids of biphenyl dioxygenase components from *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400

Component	KF707		LB400		Similarity (%)		Sequence difference
	Product	a.a. Size	Product	a.a. Size	Nucleotides	Amino acids	
Unknown	ORF0	245	ORF0	245	83.3	80.0	49
Large Subunit	BphA1	459	BphA	460	95.9	95.6	19 (1)
Small subunit	BphA2	213	BphE	213	99.9	99.5	1
Unknown	ORF3	139	ORF1	139	99.5	99.3	1
Ferredoxin	BphA3	109	BphF	109	100	100	0
Reductase	BphA4	408	BphG	408	100	100	0

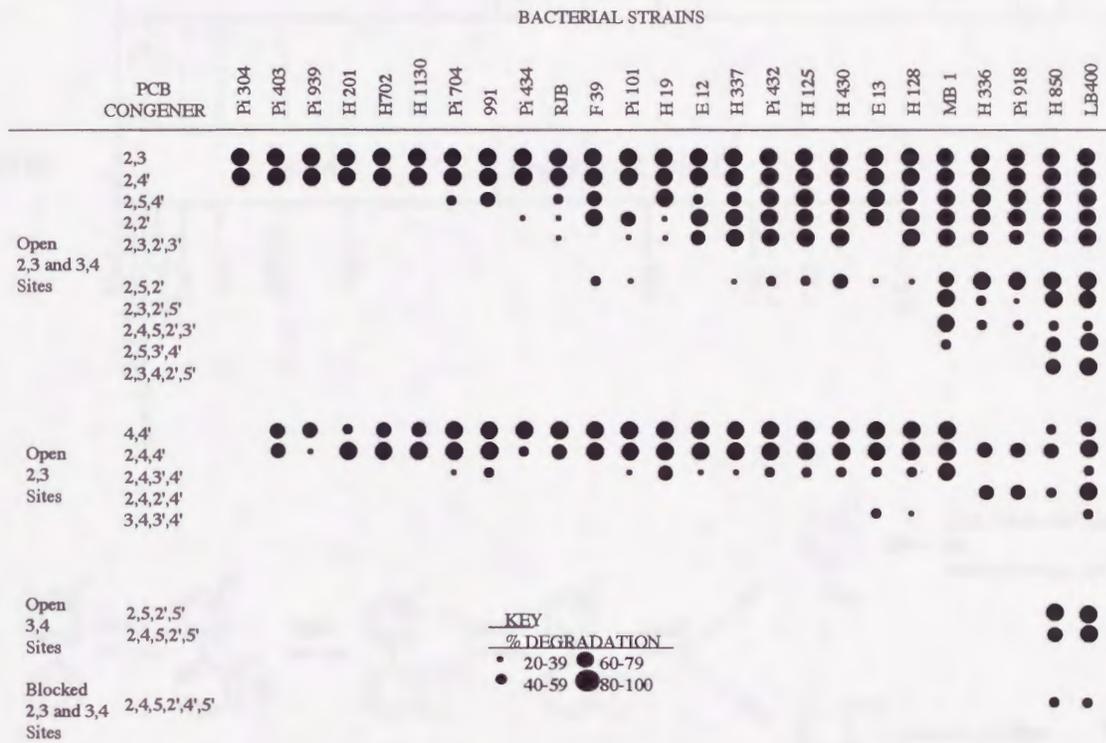


Fig. 1-1 PCB-degradative competence of environmental isolates.

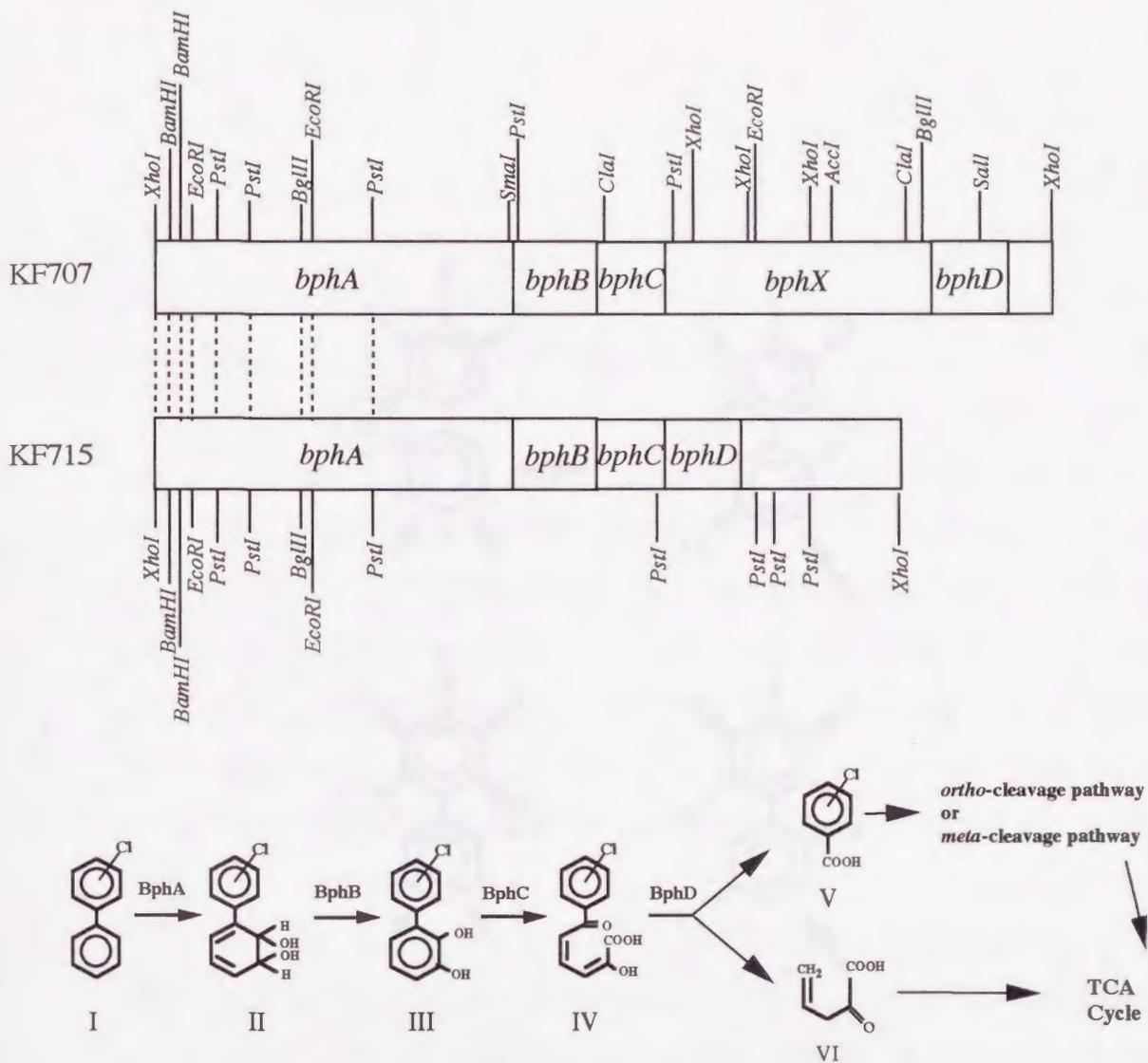


Fig.1-2 (a) Organization of *bph* operons in *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. putida* KF715
(b) The degradative pathway of biphenyl/PCB by soil bacteria

Copounds: I, biphenyl; II, cis-2,3-dihydroxy-1-phenyl-cyclohexa-4,6-diene; III, 2,3-dihydroxybiphenyl (23DHBP); IV, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate (HPDA); V, benzoate; VI, 2-oxopent-4-enoate (2OP4E). Enzyme; BphA, biphenyl dioxygenase; BphB, dihydrodiol dehydrogenase; C, 23 DHBP dioxygenase; D, HPDA hydrolase.

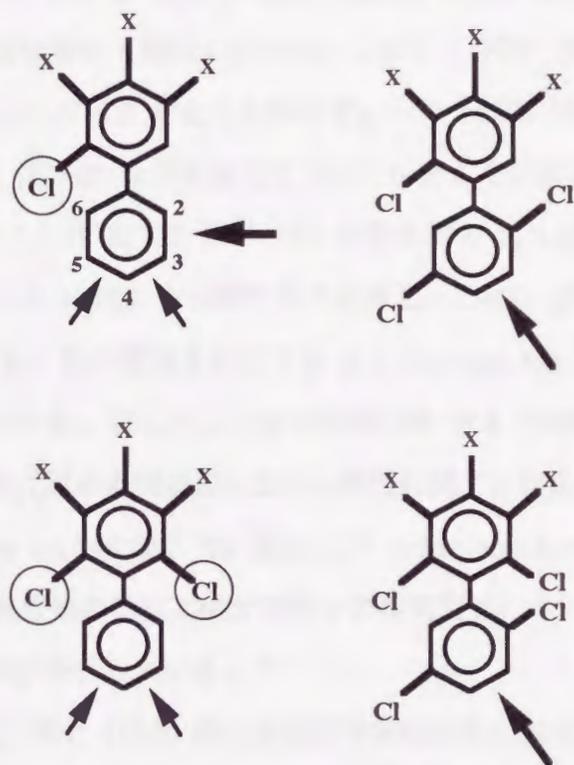


Fig.1-3 Model proposed to explain why 2,6-substituted congeners containing a 2,5-chlorophenyl ring are degraded more rapidly by H850 than those containing an unchlorinated ring.

Top: The relative susceptibilities of an unchlorinated ring and a 2,5-chlorophenyl ring to H850 attack at positions 2,3 (or 5,6) and 3,4 (or 4,5), explaining the more rapid degradation of congeners containing an unchlorinated ring. Bottom: The relative susceptibilities of an unchlorinated ring and a 2,5-chlorophenyl ring in a 2',6'-substituted PCB to H850 attack at positions 2,3 and 3,4. The chlorines at position 2,3 (or 5,6) but permit attack sterically block attack at position 2,3 (or 5,6) but permit attack at position 3,4 (or 4,5). Chlorines at position 2,5 enhance oxidation at position 3,4.

第 2 章 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 と *Pseudomonas cepacia* LB400 の分解特性

2・1 緒 言

ビフェニル/ PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の *bph* 遺伝子の構造は極めて類似している。しかし、KF707 株は 4,4'-CB を分解するのに対して、2,5,2',5'-CB を全く分解せず、一方 LB400 株は 4,4'-CB を全く分解しないが、2,5,2',5'-CB など高塩化ビフェニルをよく分解し、幅広い PCB 分解特性を示す。⁽⁴⁶⁾ このことは KF707 株は PCB の芳香環の 2,3 位へ酸素を添加する 2,3-dioxygenase 系により PCB を分解するのに対し、LB400 株は 2,3-dioxygenase 系と共に芳香環の 3,4 位へ酸素を添加する 3,4-dioxygenase 系を同時示すことによるものと考えられている。以上のような両代謝系の PCB 分解特性の差異をもたらす要因を知る上で、両代謝系の機能面における特性に関する知見は重要である。Furukawa らは *Alcaligenes* sp. Y42 株、Y33 株および *Acinetobacter* sp. P6 株における各種 PCB 異性体の塩素置換の部位と生分解性との相関関係について PCB 分解産物の同定することにより検討を行っている。⁽⁴⁵⁾

本章では KF707 株と LB400 株の各種芳香族化合物に対する資化能を調べ、次いで KF707 株と LB400 株のビフェニル代謝系による 4,4'-CB、2,5,4'-CB の環開裂黄色化合物への変換活性について調べた。さらに KF707 株と LB400 株による 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB からの分解産物の同定と比較検討を行った。

2・2 実験材料および方法

(1) 使用菌株および培地

ビフェニル/ PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株は九州大学農学部発酵学教室所有の菌株である。また、ビフェニル/ PCB 分解菌 *P. cepacia* LB400 株は米国 General Electric 社 Research and Development center より供与を受けた。

Pseudomonas 属細菌の培養は炭素源として BP または 5 g/l のコハク酸ナトリウム 6 水和物 (Suc) を加えた最少無機培地 Basal salt medium (BSM) または BSM-agar plate (1.5 % agar) を使用した。BSM の組成は Table 2-1 に示す通りである。なおこれらの成分は、25-1000 倍濃度の水溶液を調製し、別々に 0.75 kg/cm²、15 分間オートクレーブしたものを 70℃ 以下の温度に冷却してから混合した。BP を唯一の炭素源として平板培地 (BSM plate) で培養する場合、シャーレを逆さまにおいた蓋の上に約 20 mg 程度の粉末を乗せ、シャーレをビニールテープで密閉後、30℃ で静置して培養した。液体培養の場合は BP 粉末 0.02~0.2 % を直接添加して、30℃ で振とう培養した。

ビフェニル/PCB 分解菌 KF707 及び LB400 株の芳香族化合物資化性の検討は最少無機培地である BSA-agar plate に、唯一の炭素源として BP またはその関連化合物である 4-クロロビフェニル (4-ClBP)、4-メチルビフェニル (4-MeBP)、ジフェニルメタン (DM)、または *o*-フェニルフェノール (OPP)、またはベンゼン (Ben)、トルエン (Tol)、4-クロロトルエン (4-ClTol)、ナフタレン (Nah) を添加し、30℃ で 4 日間培養した。BP、4-ClBP、4-MeBP、Nah、OPP を炭素源として培養する場合、シャーレを逆さまにおいた蓋の上に約 20 mg 程度の粉末を乗せたシャーレをビニールテープで密閉し、DM を炭素源として培養する場合、常温で液化するため、DM を数滴染み込ませた脱脂綿をシャーレを逆さまにおいた蓋の上におき、ビニールテープで密閉した。Ben、Tol、4-ClTol を炭素源として培養する場合、Tol、4-ClTol また Ben を 5 滴程度浸透させた脱脂綿をガラス管 (口径 3 mm) に詰めたものをシャーレを逆さまにおいた蓋の上におき、ビニールテープで密閉した。

Table 2-1 Composition of basal salt medium (BSM)

Inorganic salts	
K_2HPO_4	4.3 g / 1 H ₂ O
KH_2PO_4	3.4
$(NH_4)_2SO_4$	2.0
$MgCl_2$	0.16
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.001
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0006
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.026
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002

(2) PCB に対する黄色環開裂化合物への変換活性の検討

さきに PCB である 4,4'-CB、2,5,4'-CB は最終代謝産物として環開裂黄色化合物へと分解することを示されている。⁽⁴⁵⁾ そこで KF707 株と LB400 株の 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。使用した菌株は前節に示す通りである。

上記の菌株を BP を炭素源とする BSM 培地 100 ml 中で OD₆₆₀ が約 3 になるまで培養し、4,000 rpm、10 分間の冷却遠心分離によって集菌した。これを 100 ml の 50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中に懸濁し、再び同条件で集菌した。さらに、OD₆₆₀ が 1.0 になるように同緩衝液中に懸濁し、これを静止菌体として以後の実験に使用した。

100 ml 三角フラスコ中に 20 ml の静止菌体を分注し、エタノール中に適当な濃度に溶解希釈した 4,4'-CB または 2,5,4'-CB (5 mg/ml) を終濃度 20 ppm になるように添加した。30℃ において回転振とう機上で振とうし、経時的に 1 ml の懸濁液をあらかじめ 100 μl の 100 mM disodium ethylenediaminetetraacetate (Na₂·EDTA) (pH 8.0) を分注したエッペンドルフチューブに移して反応を停止させ、12,000

rpm で 10 分間遠心分離して菌体を除去した。上清の吸光度変化を計時的に測定し、黄色環開裂化合物生成の有無を調べた。各基質に対する環開裂化合物の生成は、4,4'-CB に対して 412 nm、2,5,4'-CB に対して 398 nm の各波長で測定した。

(3) PCB 分解産物の同定

4,4'-CB、2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB に対する分解産物の同定を Furukawa らの方法⁽⁴⁾に従って行った。使用した菌株は上記に示す通りである。上記の菌株を 2・2・(2) に示した方法により静止菌体を調製し、以後の実験に使用した。

100 ml 三角フラスコ中に 5 ml の静止菌体を分注し、エタノール中に適当な濃度に溶解希釈した 4,4'-CB、2,5,4'-CB または 2,5,2',5'-CB (5mg/ml) を終濃度 20 ppm になるように添加した。回転振とう機上で 30℃、24 時間振とうし、濃塩酸をパスツールピペットにより 2 滴程度添加して酸処理したのち (pH 1.0)、5 ml の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後に、遠心濃縮機 (アトー) により酢酸エチルを蒸発させた。残った固体を少量の酢酸エチルに溶解し、N,O-bis-(trimethylsilyl)-acetamide (BSA、東京化成工業) を加えて trimethylsilyl (TMS) 化し、1 μ l を GC-MS (QP-5000、島津製作所) に供した。担体は silicon OV-1 (ジーエルサイエンス) を用い、カラムは 140℃ から 300℃ まで 10℃/min で昇温した。

2・3 実験結果

2・3・1 芳香族化合物の資化性

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の種々の BP および安息香酸誘導体に対する資化性を調べた結果を Table 2-2 に示した。両菌株は BP および安息香酸を単一炭素源として生育するが、KF707 株は旺盛なビフェニル資化性を示したのに対し、LB400 株は KF707 株よりも弱いビフェニル資化性を示した。

一方、ビフェニル関連化合物である 4-CIBP、4-MeBP、DM の資化能は大きく異なっ

ており、KF707 株は 4-ClBP、4-MeBP、DM に資化性を示したのに対し、LB400 株はこれらの化合物に資化性を示さなかった。一方 OPP、Tol、4-MeTol、Ben、Nah に対してはいずれの菌株も資化性は示さなかった。

2・3・2 PCB に対する黄色環開裂化合物への変換活性

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の静止菌体による 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性を調べた結果を Fig.2-1 に示した。

KF707 株の静止菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB を迅速に分解し、環開裂黄色化合物へと変換したが、LB400 株の静止菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB からの環開裂黄色化合物へと変換はほとんど認められなかった。

以上のように KF707 株と LB400 株の 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する変換活性は大きく異なることが明らかとなった。

2・3・3 PCB 分解代謝産物の同定

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の静止菌体による 2,5,4'-CB、4,4'-CB および 2,5,2',5'-CB の分解産物の同定を行った。

KF707 株は 2,5,4'-CB より最終分解産物として 2,5-dichlorobenzoic acid (compound b-I in Fig.2-3) を蓄積し、また中間代謝産物として dihydrodiol 中間体 (b-II)、dihydroxy compound 中間体 (b-V) および 環開裂黄色化合物 (IV) を生成していた。また、2,5,4'-CB の 2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位へ酸素が添加されて脱塩素化した 5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl (b-IV) がわずかに生成した。

一方、LB400 株は 2,5,4'-CB より最終分解産物として 4-chlorobenzoic acid (compound e-I in Fig.2-4) を蓄積し、また中間代謝産物として 5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl (e-VII,VIII)、dihydrodiol 中間体 (e-II,

III)、dihydroxy compound 中間体 (e-IV) を生成した。

一方、4,4'-CB に対して KF707 株は最終分解産物として環開裂黄色化合物 (compound a-II in Fig.2-2)、4-chlorobenzoic acid (a-I) を生成したが、LB400 株からの分解産物は認められなかった。一方、2,5,2',5'-CB に対して KF707 株は分解産物は認められなかったが、LB400 株は 5 (or 2),2'5'-trichloro-2,3- (or 5,6-) dihydroxybiphenyl (compound f-V,VI in Fig.2-5)、2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl (f-VII) を生成した。(Fig.2-2,2-5)

2・4 考 察

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の種々の BP および安息香酸誘導体に対する資化性の検討を行い、KF707 株は 4-ClBP、4-MeBP、DM に資化性を示したのに対し、LB400 株はこれらの化合物に対する資化性は認められず、両菌株の芳香族化合物に対する分解特性および資化性が異なることを明らかにした。(Table 2-2)

また KF707 株の静止菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB を迅速に分解し、環開裂黄色化合物へと変換したが、LB400 株の静止菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB からの環開裂黄色化合物への迅速な変換は認められず、両菌株間で大きく異なっていた。(Fig.2-1)

Gibson らによれば LB400 株は KF707 株とともに 2,5,4'-CB に対して迅速な分解活性を示すことが明らかとなっており⁽⁴⁶⁾、2,5,4'-CB は LB400 株により環開裂黄色化合物とは異なる化合物へ変換していることが推考される。

そこで、KF707 株と LB400 株の静止菌体による 2,5,4'-CB、4,4'-CB、2,5,2',5'-CB の分解産物の同定を行った。KF707 株の静止菌体は 2,5,4'-CB から最終産物として 2,5-dichlorobenzoic acid とともに、5 (or 2),4'-dichloro-2,3 (or 5,6) dihydroxybiphenyl をわずかに生成した。(Fig.2-3) このことは KF707 株は 2,5,4'-CB を主に 4 位へ塩素が置換している芳香環 (4-chlorophenyl ring) の 2,3 位へ酸素が添加することにより分解することを示唆した。一方、LB400 株の静止菌体は 2,5,4'-CB から最終産物として 4-dichlorobenzoic acid とともに、2,5,4'-trichloro-

3,4-dihydroxybiphenyl を生成した。(Fig. 2-3, 4) このことは LB400 株は 2,5,4' -CB に対して 2,5 位へ塩素が置換している芳香環 (4-chlorophenyl ring) の 2,3 位へ酸素を添加するとともに、3,4 位へ酸素を添加することを示唆した。以上の結果から両菌株のビフェニル代謝系による 2,5,4' -CB に対する分解経路は異なることが明らかとなった。(Fig. 2-6)

また 4,4' -CB に対して KF707 株は最終分解産物として 4 位へ塩素が置換している芳香環 (4-chlorophenyl ring) の 2,3 位へ酸素が添加することにより分解する環開裂黄色化合物を生成したが、LB400 株からの分解産物は認められず、一方、2,5,2',5' -CB に対して KF707 株からの分解産物は認められなかったが、LB400 株から 5 (or 2), 2'5' -trichloro-2,3- (or 5,6-)dihydroxybiphenyl、2,5,2',5' -tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl が生成し、2,5 位へ塩素が置換している芳香環 (2,5-dichlorophenyl ring) の 2,3 位へ酸素を添加するとともに、3,4 位へ酸素を添加することを示している。

Bedard および Seeger により、LB400 株は PCB に酸素を添加する際に塩素置換部位の異なる芳香環に対して non-2->2,5->3->>2,4->4-chlorophenyl ring という選択性が存在することが明らかされた。^(8,94) 上記の結果から、KF707 株が主に 4 位へ塩素が置換している芳香環 (4-chlorophenyl ring) を酸化分解するのに対し、LB400 株は 2,5 位へ塩素が置換している芳香環 (2,5-chlorophenyl ring) を酸化分解することが明らかとなり、両菌株の PCB 分解特性の差異は塩素置換の異なる芳香環に対する酸素添加能力の差異に起因するものと考察した。

2・5 小 括

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の種々の BP および安息香酸誘導体に対する資化性を調べた。そのうち KF707 株は 4-C1BP、4-MeBP、DM に資化性を示したのに対し、LB400 株はこれらの化合物に資化性は存在せず、両菌株のビフェニル代謝系は置換基の種類や置換部位の異なる芳香族化合物に対する分解特性および資化性が異なることを示唆した。

次に KF707 株と LB400 株の静止菌体による 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性を調べた結果、KF707 株の静止菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB を迅速に分解し、環開裂黄色化合物へと変換したが、LB400 株の静止菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB からの環開裂黄色化合物への迅速な変換は認められず、両菌株の 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する変換活性は大きく異なっていた。

さらに KF707 株と LB400 株の静止菌体による 2,5,4'-CB、4,4'-CB、2,5,2',5'-CB の分解産物の同定を行い、KF707 株が主に 4 位へ塩素が置換している芳香環 (4-chlorophenyl ring) を酸化分解しているのに対し、LB400 株は 2,5 位へ塩素が置換している芳香環 (2,5-chlorophenyl ring) を酸化分解していることを明らかにした。

以上の結果から両菌株の PCB 分解特性の差異は 両菌株の塩素置換の異なる芳香環に対する酸素添加能力の差異によるものと考察した。

Table. 2-2 Biphenyl-utilizing strains used and their growth characteristics on various biphenyl and benzoate derivatives

Strains	Carbon sources									
	BP	4Cl BP	4MeBP	2OHBP	Nah	Tol	4ClTol	Ben	DM	BA
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	+++	+	+	-	-	-	-	-	+	+++
<i>P. cepacia</i> LB400	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

Growth was checked after 1 week of incubation at 30 °C.

+++ , good growth ; ++ , moderate growth ; + , poor growth ; - , no growth or very poor growth

Table.2-3 Metabolite from 4,4'-CB, 2,5,4'-CB and 2,5,2',5'-CB by *P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. cepacia* LB400

Strain	Substrate	GC-MS				
		Peak in Fig.3	Compound	Mol. mass	No. of chlorine substitutions	
KF707	4,4'-CB	a-I	4-chlorobenzoic acid	228	1	
		a-II	ring meta-cleavage compound	430	2	
	2,5,4'-CB	b-I	2,5-dichlorobenzoic acid	262	2	
		b-II	2,5,4'-trichloro-2'(or3') hydroxybiphenyl (dehydration product from 2,3-dihydrodiol)	344	3	
		b-III, V	2,5,4'-trichloro-dihydroxy biphenyl	432	3	
		b-IV	2(or 5),4'-dichloro-2,3(or 5,6)-dihydroxybiphenyl	398	2	
	b-VI	ring meta-cleavage compound	464	3		
	2,5,2',5'-CB		no metabolite			
	LB400	4,4'-CB		no metabolite		
		2,5,4'-CB	e-I	4-chlorobenzoic acid	228	1
e-II,III			2,5,4'-trichloro-3(or 4)-hydroxy biphenyl(dehydration product from 3,4-dihydrodiol)	344	3	
e-IV,V,VI			dichlorohydroxy biphenyl (dehydration product from 2,3-dihydrodiol)	310	2	
e-VII,VIII			2 (or 5), 4'-dichloro-2,3-dihydroxy biphenyl (2,3- or 5,6-catechol)	398	2	
e-IX			2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxy biphenyl (3,4-catechol)	432	3	
2,5,2',5'-CB		f-I,II,III	2,5,2',5'-tetrachloro-hydroxy biphenyl (dehydration product from 2,3- and 3,4-dihydrodiol)	378	4	
		f-V,VI	5 (or 2),2',5'-trichloro-2,3 (or 5,6) -dihydroxy biphenyl	432	3	
		f-IV	(?)			
		f-VII	2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxy biphenyl (3,4-catechol)	466	4	

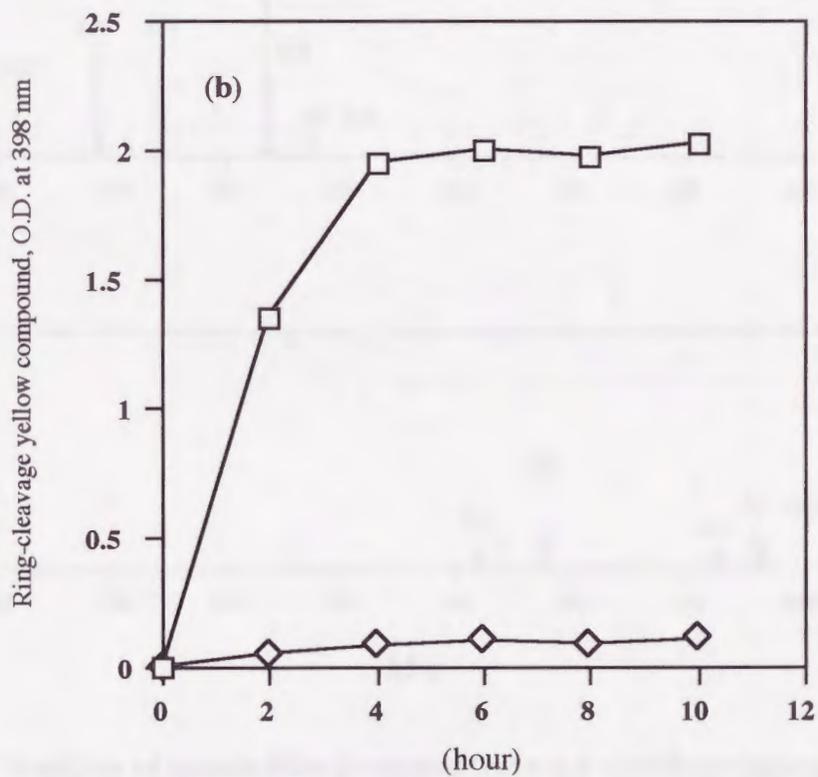
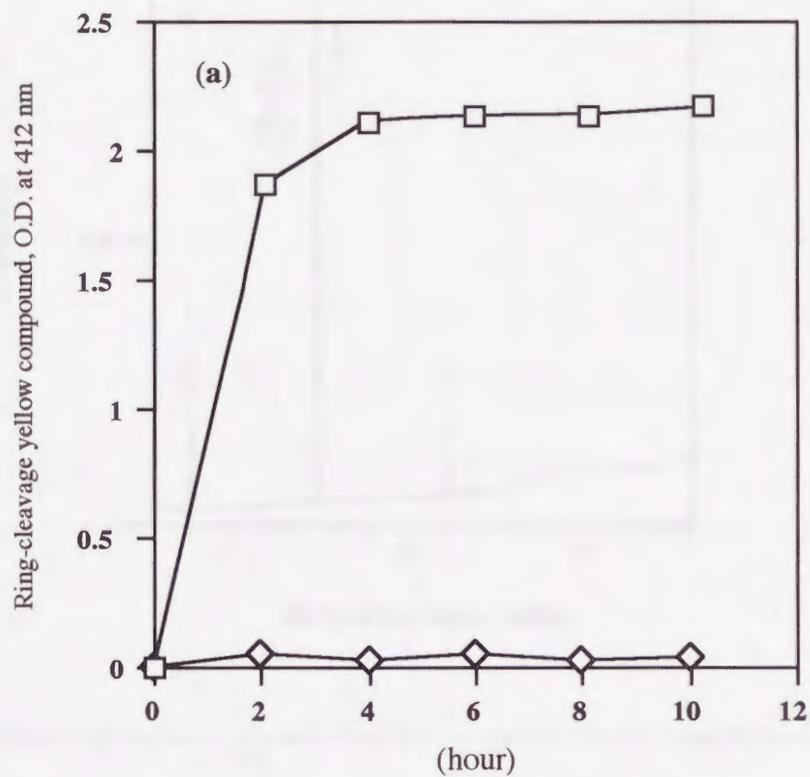


Fig.2-1 Degradation of (a) 4,4'-dichlorobiphenyl, (b) 2,5,4'-trichlorobiphenyl by *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400

□, KF707; ◇, LB400.

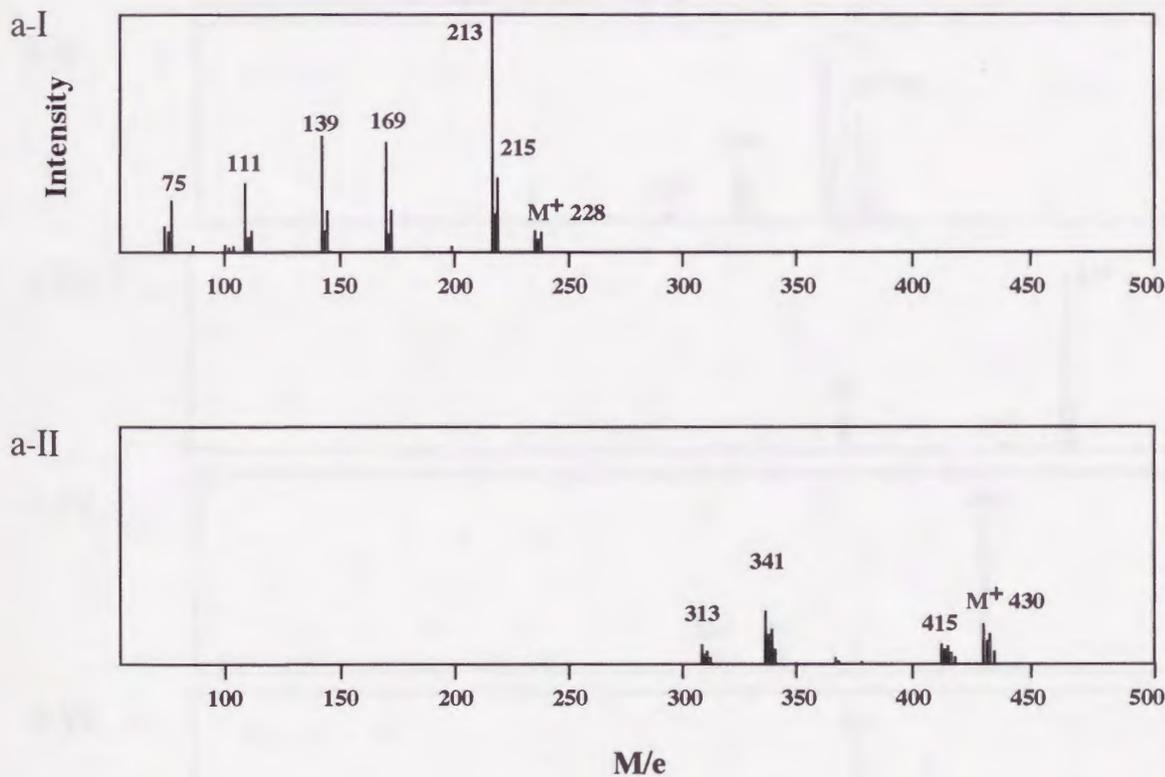
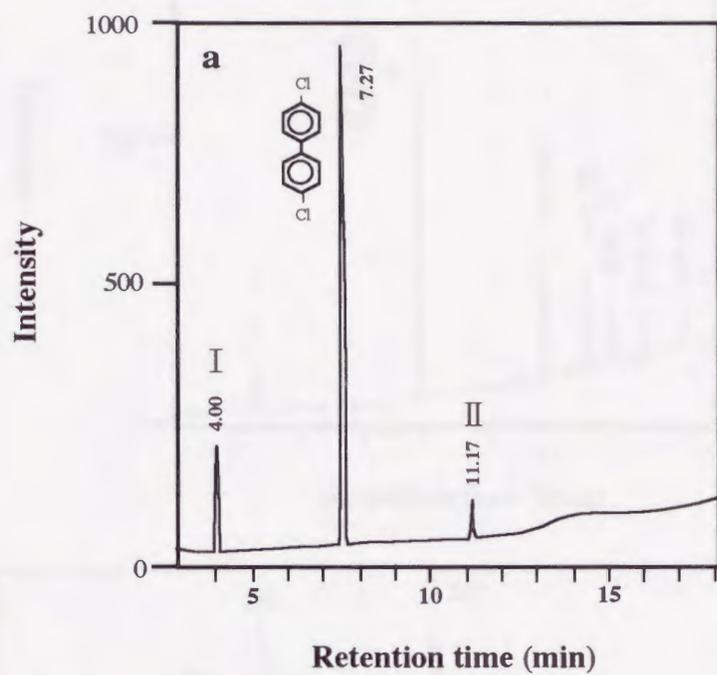


Fig.2-2 Analysis of metabolites produced from 4,4'-dichlorobiphenyl by *P. pseudoalcaligenes* KF707

- a. The GC-MS total ion monitor of the ethylacetate extract.
 a-I,II Mass spectra of the GC peaks corresponding to TMS-derivatives of 4-chlorobenzoic acid (I) or ring *meta*-cleavage compound (II)

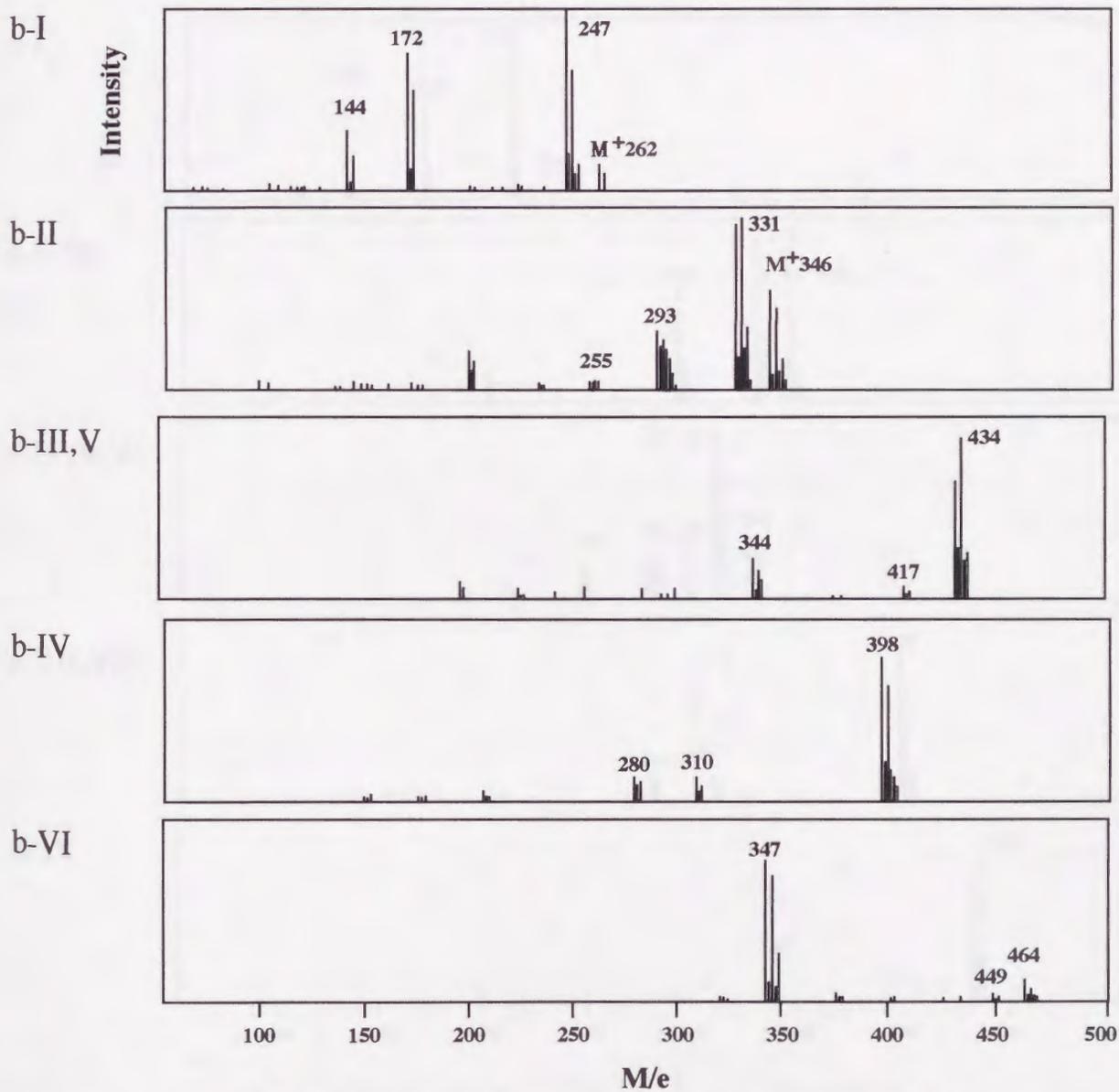
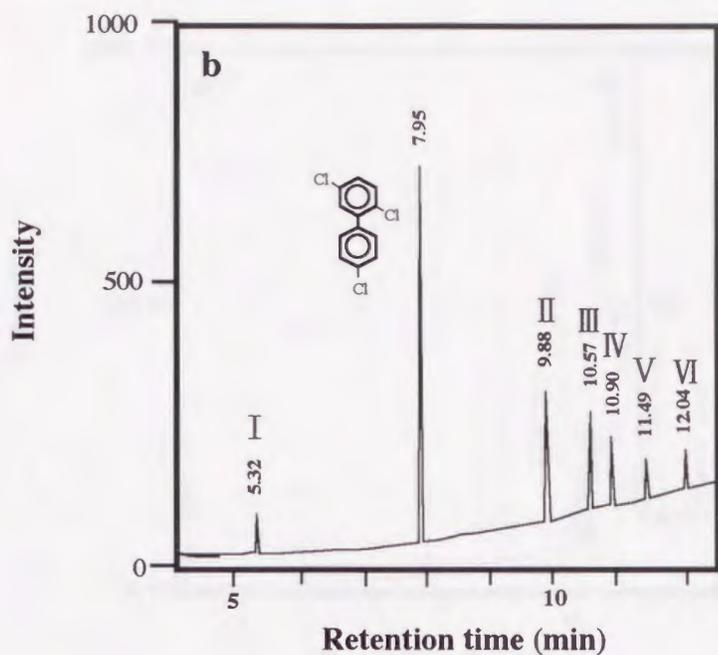


Fig.2-3 Analysis of metabolites produced from 2,5,4'-dichlorobiphenyl by *P. pseudoalcaligenes* KF707

The GC-MS total ion monitor of the ethylacetate extract.

b-I,II,III,IV,V,VI Mass spectra of the GC peaks corresponding to TMS-derivatives metabolites

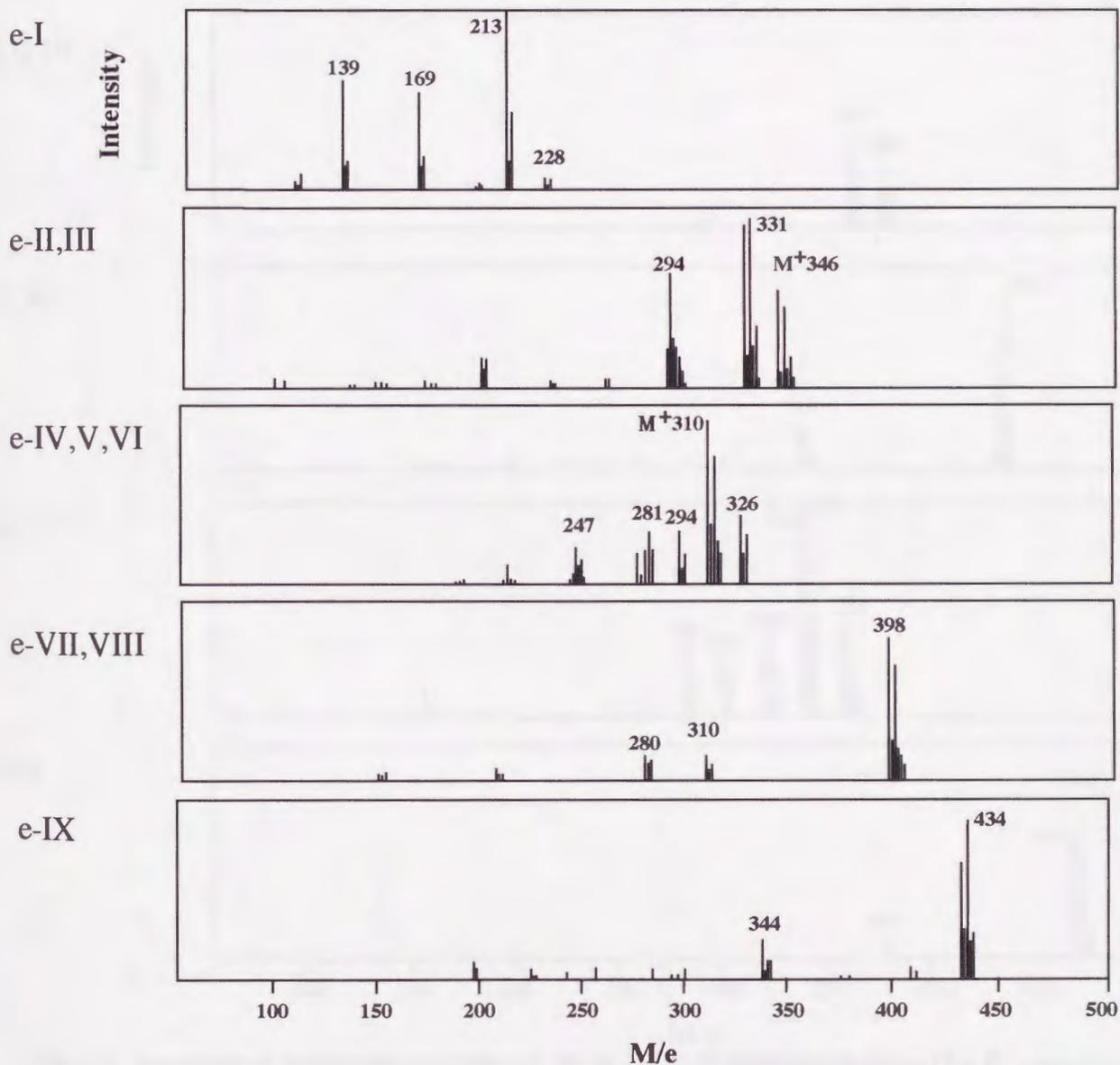
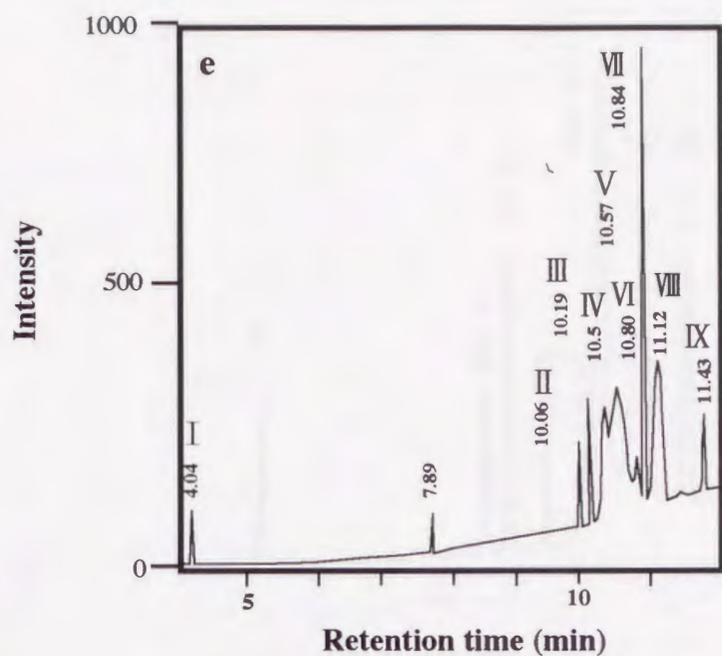
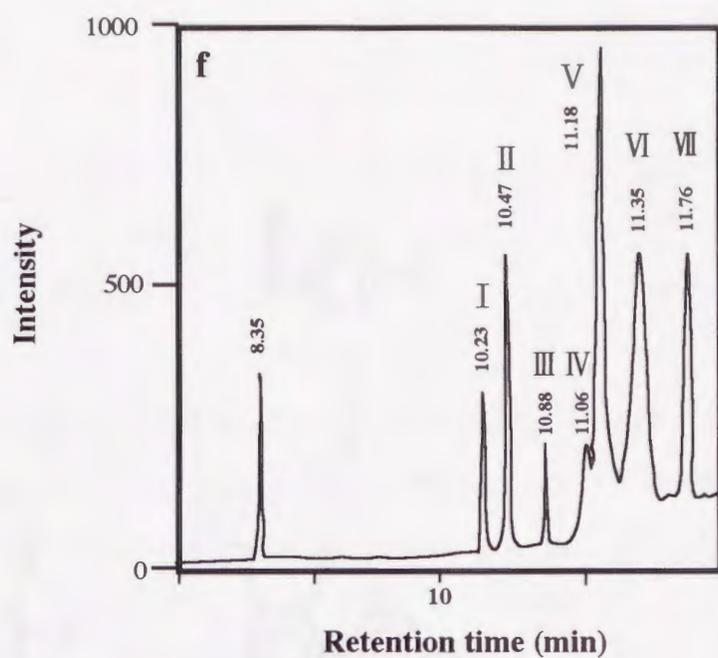


Fig.2-4 Analysis of metabolites produced from 2,5,4'-dichlorobiphenyl by *P. cepacia* LB400

e. The total ion monitor of the ethylacetate extract.

e-I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII,IX Mass spectra of the GC peaks corresponding to TMS-derivatives of metabolites.

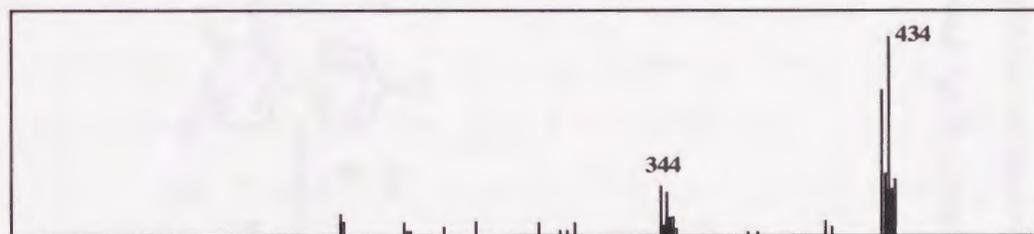


f-I,II,III

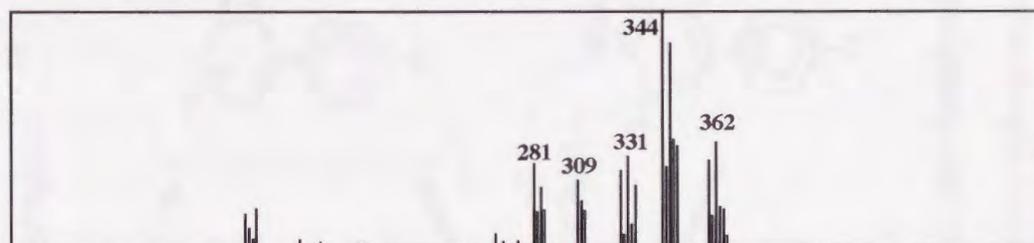
Intensity



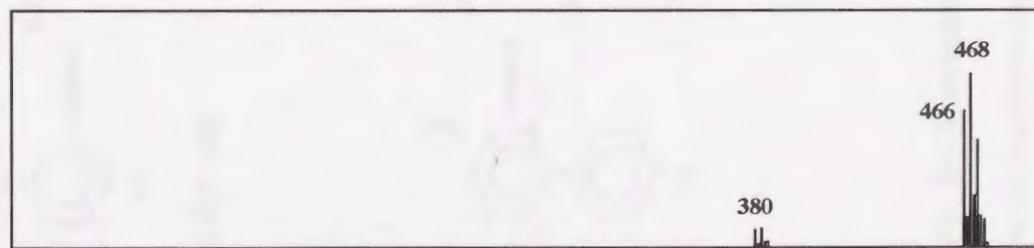
f-V,VI



f-IV



f-VII



M/e

Fig.2-5 Analysis of metabolites produced from 2,5,2',5'-dichlorobiphenyl by *P. cepacia* LB400

f. The total ion monitor of the ethylacetate extract.

f-I,II,III,IV,V,VI,VII Mass spectra of the GC peaks corresponding to TMS-derivatives of metabolites

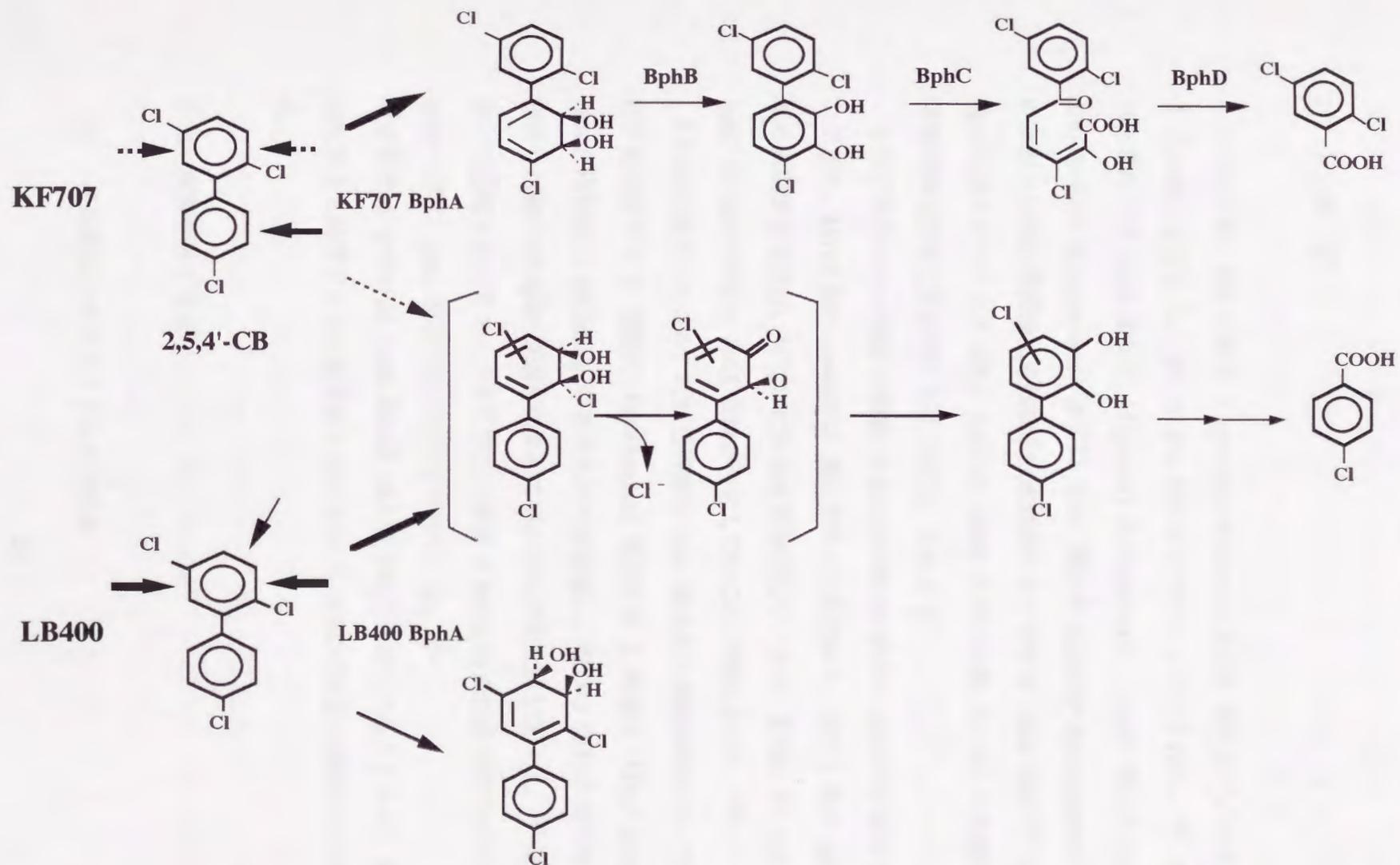


Fig. 2-6 Metabolite of 2,5,4'-trichlorobiphenyl by *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400

KF707 attack preferentially 4'-phenyl ring (as indicated thick arrow), and introduce O_2 at 2,3 position.

LB400 attack 2,5-phenyl ring and introduce O_2 at 2,3 (or 5,6) and 3,4 position.

3・1 緒 言

ビフェニル/PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の全ゲノムから *bph* 遺伝子 *bphABC* を含む 6.8 kb の DNA 断片がクローニングされた。⁽³⁹⁾ クローン化された断片には *bphA* 遺伝子 (Biphenyl dioxygenase)、*bphB* 遺伝子 (*cis*-biphenyl dihydrodiol dioxygenase) および *bphC* 遺伝子 (23DHBP dioxygenase) が含まれていたが、のちに環開裂化合物加水分解酵素をコードする *bphD* 遺伝子 (HPDA hydrolyase) がクローニングされ、*bphC* と *bphD* の間には約 3.4 kb の機能不明な *bphX* 領域が存在することが明らかにされた。(Fig. 3-1)

またビフェニル/PCB 分解菌 *P. putida* KF715 株から *bphABCD* 遺伝子がクローニングされ、KF707 株の *bphABCXD* 遺伝子群との比較から、KF715 株の *bphA* 遺伝子領域の制限酵素地図は、KF707 株と極めて類似しているが、KF715 株 *bph* 遺伝子には *bphC* と *bphD* の間に *bphX* 領域が存在しないことが確認された。⁽⁶⁰⁾

さらに各種ビフェニル/PCB 分解菌の *bph* 遺伝子の相関関係について調べ、16 種類の菌株のうち 6 種類の *Pseudomonas* 属細菌と 1 種類の *Alcaligenes* 属細菌が KF707 株と同じ *bphABCXD* のクラスターを形成し、他の 3 菌株は KF707 *bphABCD* と相同性が高いが *bphX* 領域を欠失していることが明らかとなった。⁽²⁹⁾ また、米国において分離されたビフェニル/PCB 分解菌 *P. cepacia* LB400 株についても *bphC* と *bphD* の間に *bphX* 領域の存在が確認されている。⁽⁶⁴⁾

本章では KF707 株 *bphX* 領域の DNA 塩基配列を決定するとともに、遺伝子産物を発現する大腸菌による酵素活性を測定を行い、*bphX* の構造と機能について検討を行った。

3・2 実験材料と方法

- (1) 使用菌株、プラスミドおよび培地

KF707 株 *bph* 遺伝子 *bphX* 領域を挿入断片として含むプラスミド pXKF101 は、染色体歩行 (gene walking) により取得した *bphC* と *bphB*、*bphD* の一部を含む 3.4 kb の *SalI* 断片をプラスミド pUC118 の *SalI* サイトに導入することにより構築した。このプラスミドは大腸菌 *Escherichia coli* JM109 株へ Hanahan 法⁽⁵⁴⁾ により導入し、形質転換した。

(2) 大腸菌の培養条件

大腸菌の培養はすべて、LB 培地 (1 % Bacto-trypton、Difco, 0.5 % 酵母エキス、和光純薬, 1 % NaCl、ナカライテスク社を 1.0 kg/cm² で 20 分間のオートクレープで殺菌) 中で行った。一方、各菌株に導入したプラスミドにコードされている薬剤耐性遺伝子に応じて 50℃ 以下に冷却した LB 培地に終濃度 50 μg/ml アンピシリンナトリウム (Ap、明治製菓)、30 μg/ml クロラムフェニコール (Cm、三共) を添加した。

(3) 組換え DNA

制限酵素 (TOYOBO) による DNA の切断は、添付の緩衝液を使用して、各制限酵素について製造者が定める方法によって行った。その他、T4 DNA リガーゼ (TOYOBO) による DNA 断片の連結、目的の組換え体を保有するクローン取得のための大腸菌 JM109 株の形質転換、アルカリ-溶菌法によるプラスミド抽出ならびに DNA 断片のアガロース電気泳動等、DNA 組換えに必要な操作は、成書^(4,83) に従って行った。

(4) 欠失プラスミドの作成

クローン化された *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bphX* 領域を含む 3.4 kb の *SalI* 断片を pUC118 の *SalI* サイトに導入することにより構築した pXKF101 を制限酵素で消化した後 Exonuclease III により Deletion 反応を行った。次いで、65℃ で 5 分間保温することにより Exonuclease III を失活させた後、DNA 末端を Klenow fragment により平滑化し、T4 DNA ligase により連結した。

(5) *bphX* 領域の塩基配列の決定

上記の方法により調製したプラスミドを用いて、Sanger らの dideoxy chain termination 法⁽⁹³⁾により DNA Sequencer Model 373A (Applied Biosystem) を使用して、DNA 塩基配列の決定を行なった。(Fig. 3-2)

(6) 大腸菌菌体抽出液の調製

Glutathione S-transferase (GST) 活性測定のための大腸菌菌体抽出液の調製法は、以下の通りである。pXFK101 を保有する大腸菌 JM109 株を終濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ AP、40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を含む 100 ml の LB 培地中で 30°C 下、菌体量が OD_{660} が 3.0 になるまで培養した。培養後、4,000 rpm で 5 分間遠心分離して集菌を行った。さらに、30 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 中に懸濁した後に、同条件で遠心分離し、菌体を洗浄した。さらに同操作により菌体を再び洗浄した後に 2 mM DTT (Dithiothreitol、東京化成) を含む 4 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 中に懸濁した菌体を超音波破碎機 (USD-130, Tosho Electric) を使って 10 分間破碎した。これを遠心分離して (15,000 rpm, 10 分間)、得られた上清を粗酵素液として用いた。

一方、Acetaldehyde dehydrogenase (ADH) 活性測定のための大腸菌菌体抽出液の調製法は pXKF101 を保有する大腸菌 JM109 株を終濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ AP、40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG を含む 40 ml の LB 培地中で 30°C 下、菌体量が OD_{660} が 3.0 になるまで培養した。培養後、4,000 rpm で 5 分間遠心分離して集菌を行った。さらに、20 ml の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に懸濁した後に、同条件で遠心分離し、菌体を洗浄した。さらに同操作により菌体を再び洗浄した後に 2 mM DTT を含む 400 μl の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 中に懸濁した菌体を超音波破碎機 (USD-130, Tosho Electric) を使って 10 分間破碎した。これを遠心分離して (40,000 rpm, 60 分間)、得られた上清を粗酵素液として用いた。

上記のいずれの菌体抽出液中のタンパク質含量も Lowry 法⁽⁸⁰⁾で測定した。

(7) Glutathione S-transferase 活性の測定

GST 活性の測定は Habig らの方法⁽⁴⁸⁾に従って以下のように行った。すなわち、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene (CDNB、Aldrich) を終濃度 66 mM、還元型 Glutathione (GSH、東京化成) を終濃度 30 mM になるように溶解した反応液 50 μ l に前項で示した方法で調製した粗酵素抽出液 100 μ l を添加して 25°C、2 分間、分光光度計 (UV-2200、島津製作所) にセットしたセル内で反応を行い、CDNB-GSH の生成を吸収極大波長である 340 nm における吸光度により測定した。なお CDNB-GSH の分子吸光係数は、 $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いた。1 分間に 1 μ mole の CDNB-GSH を生成する酵素活性を 1 unit とした。また、測定した値は 3 回の計測値の平均値を示している。

(8) Acetaldehyde dehydrogenase 活性の測定

ADH 活性の測定は Shingler らの方法⁽⁹⁶⁾に従って以下のように行った。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に NAD^+ を終濃度 285 μ M、Acetaldehyde を終濃度 10 mM、前項で示した方法で調製した粗酵素抽出液 100 μ l を添加して、20°C、1分間インキュベートした後に CoA を終濃度 100 μ M になるように加え、20°C、5 分間、分光光度計 (UV-2200、島津製作所) にセットしたセル内で反応を行い、CDNB-GSH の生成を吸収極大波長である 340 nm における吸光度により測定した。なお 1 分間に 1 μ mole の NADH を生成する酵素活性を 1 unit とした。

3.3 実験結果

3.3.1 KF707 株ビフェニル代謝遺伝子 *bphX* 領域の塩基配列

P. pseudoalcaligenes KF707 株に存在する *bphX* 領域の 3351 bp の DNA 塩基配列を決定した。(Genbank accession No. D85853) その結果、この領域には Fig. 3-3 に示すように 4 つの Open reading frame (読み枠) が存在した。

2 番目の ORF にコードされている 780 bp よりなる *bphX1* 遺伝子は GC 含量が 65.1 mol%、推定されるアミノ酸配列より計算した分子量は 27442 Da であった。ま

た塩基配列より予想される BphX1 のアミノ酸配列は *Pseudomonas* sp. CF600 株のフェノールや 3,4-ジメチルフェノールの代謝に関与する 2-hydroxy penta-2,4-dienoate hydratase である DmpE⁽⁹⁶⁾ および pWW0 の xyl オペロンのメタ開裂経路に存在する XylJ と 67.8 % の相同性を示した。(Fig. 3-3 A)

次に、3 番目の ORF にコードされている 912 bp よりなる *bphX2* 遺伝子は GC 含量が 63.5 mol%、推定されるアミノ酸配列より計算した分子量は 32256 Da であり、塩基配列より予想される BphX2 のアミノ酸配列は Acetaldehyde dehydrogenase である DmpF⁽⁹⁶⁾ および XylK と 54.4 % の相同性を示した。(Fig. 3-3 B)

さらに、4 番目の ORF にコードされている 1038 bp よりなる *bphX3* 遺伝子は GC 含量が 63.4 mol%、推定されるアミノ酸配列より計算した分子量は 36796 Da であり、塩基配列より予想される BphX3 のアミノ酸配列は 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase である DmpG⁽⁹⁶⁾ および XylE と 51.6 % の相同性を示した。(Fig. 3-3 C)

一方、1 番目の ORF にコードされている 609 bp よりなる *bphX0* 遺伝子は GC 含量が 60.6 mol%、推定されるアミノ酸配列より計算した分子量は 22432 Da であり、予想されるアミノ酸配列は *Pruteus mirabilis* の GST と 48.3 % の相同性を示した。(Fig. 3-3 D) *bphX0*、*bphX1*、*bphX2*、*bphX3* 遺伝子の Open reading frame の上流にはいずれも SD 配列 (5'-AAGGA-3') が存在し、これらは、*P. aeruginosa* の 16S rRNA の 3' 末端付近と相補性を示した。GC 含量は 60.6-65.1 % と他のビフェニル代謝遺伝子群に比べ (56.0-61.7 %) やや高い値を示した。

3・3・2 *bphX* 遺伝子群保有大腸菌の Glutathione S-transferase 活性

KF707 株 *bphX* 領域を含む pXKF101 および大腸菌発現ベクター pUC118 を保有する大腸菌菌体抽出液の GST 活性の有無を測定した結果を Fig. 3-4 に示した。

KF707 株 *bphX* 領域を含む pXKF101 を保有する大腸菌菌体抽出液は迅速に 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-Glutathione (CDNB-GSH) conjugate を生成した。一方、大腸菌発現ベクター pUC118 を保有する大腸菌菌体抽出液は CDNB-GSH の生成は見られず、この結果は *bphX0* 遺伝子が GST をコードすることを明らかにした。

3・3・3 *bphX* 遺伝子群保有大腸菌の Acetaldehyde dehydrogenase 活性

KF707 株 *bphX* 領域を含む pXKF101 および大腸菌発現ベクター pUC118 を保有する大腸菌菌体抽出液の ADH 活性の有無を測定した結果を Fig. 3-4 に示した。

KF707 株 *bphX* 領域を含む pXKF101 を保有する大腸菌菌体抽出液は迅速に NAD^+ を還元し、NADH を生成したが、大腸菌発現ベクター pUC118 を保有する大腸菌菌体抽出液は NADH の生成は見られなかった。以上の結果は *bphX2* 遺伝子が ADH をコードすることを明らかにした。

3・4 考察

P. pseudoalcaligenes KF707 株の *bphX* 領域の決定した DNA 塩基配列 3.4 kb から、4 つの読み枠 (ORF) が認められた。(Fig. 3-3) それぞれの ORF の予想されるアミノ酸配列のホモロジー検索より、BphX1 は *Pseudomonas* sp. CF600 株のフェノールや 3,4-ジメチルフェノールの代謝に関与する 2-hydroxy penta-2,4-dienoate hydratase である DmpE および pWW0 の *xyl* オペロンのメタ開裂経路に存在する XylJ と 67.8 %、BphX2 は Acetaldehyde dehydrogenase である DmpF および XylK と 54.4 %、BphX3 は 4-hydroxy-2-oxoalderate aldolase である DmpG および XylE と 51.6 % の相同性を示した。従って *bphX* 領域に存在する *bphX1*、*X2*、*X3* 遺伝子は BP の環開裂黄色化合物の加水分解において生成する 2-hydroxy penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA へ代謝する酵素をコードするものと考察した。また BphX0 は *Pruteus mirabilis* の GST と 48.3 % の相同性を示し、*bphX0* 遺伝子を保有する大腸菌抽出液は GST 活性が存在した。

一方、*P. cepacia* LB400 株の *bph* 遺伝子の *bphC* と *bphD* の間に存在する機能不明な領域 *bphX* 3.4 kb についても解析が行われ、*bphX* 領域は Glutathione S-transferase (BphK)、2-hydroxy penta-2,4-dienoate hydratase (BphH)、Acetaldehyde dehydrogenase (BphJ)、4-hydroxy-2-oxoalderate aldolase (BphI) をコー

ドすることが明らかになり、それらは KF707 株の *bphX0X1X2X3* 遺伝子と極めて高い相同性を示した。(Table3-1)⁽⁶⁴⁾

3・5 小 括

P. pseudoalcaligenes KF707 株の *bphX* 領域の決定した DNA 塩基配列 3.4 kb から 4 つの読み枠 (ORF) が認められた。そのうち 3 つの ORF のアミノ酸配列のホモロジー検索より *dmp* および *xyl* 遺伝子と 51.6-71 % の相同性を示す 2-hydroxy penta-2,4-dienoate hydratase (BphX1)、Acetaldehyde dehydrogenase (BphX2)、4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (BphX3) がコードすることが明らかとなった。従って *bphX* 領域に存在する *bphX1*, *X2*, *X3* 遺伝子は BP の環開裂黄色化合物の加水分解より生成する 2-hydroxy penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA へ代謝する酵素をコードするものと考察した。また、*bphX* 領域は Glutathione S-transferase (BphX0) をコードしており、KF707 株 BphX0, X1, X2, X3 は LB400 株の *bphX* 領域がコードする BphH, I, J, K と極めて高い相同性を示した。

Table 3-1 Comparison of sequence similarity in nucleotides and amino acids of *bphX* region components from *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400

Component	KF707		LB400		Similarity (%)		Sequence difference
	Product	a.a. Size	Product	a.a. Size	Nucleotides	Amino acids	
Glutathione S-transferase	BphX0	204	BphK	204	99.8	99.5	1
2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase	BphX1	261	BphH	261	99.5	99.2	2
acetaldehyde dehydrogenase	BphX2	305	BphJ	305	99.6	100	0
4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase	BphX3	347	BphI	347	99.6	99.4	2

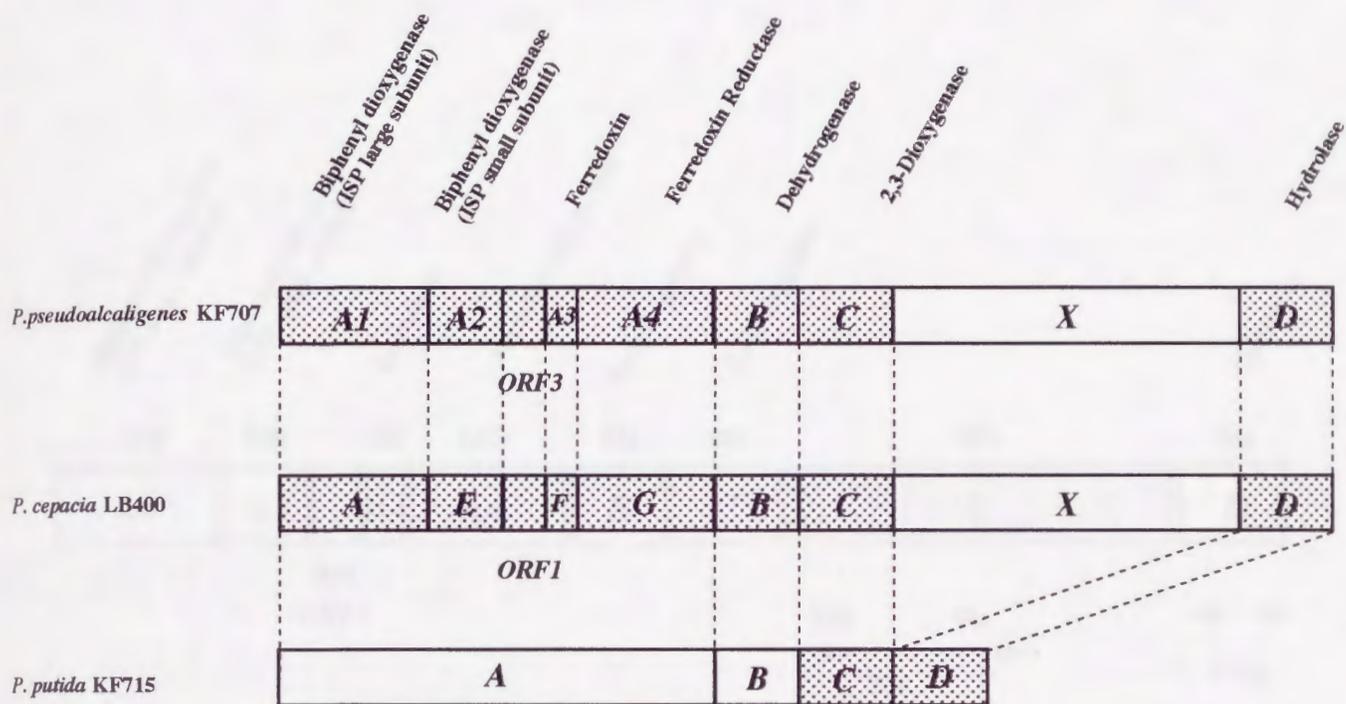


Fig.3-1 Organization of *bph* operons in *P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. putida* KF715 and *P. cepacia* LB400

Shaded boxes show sequenced genes

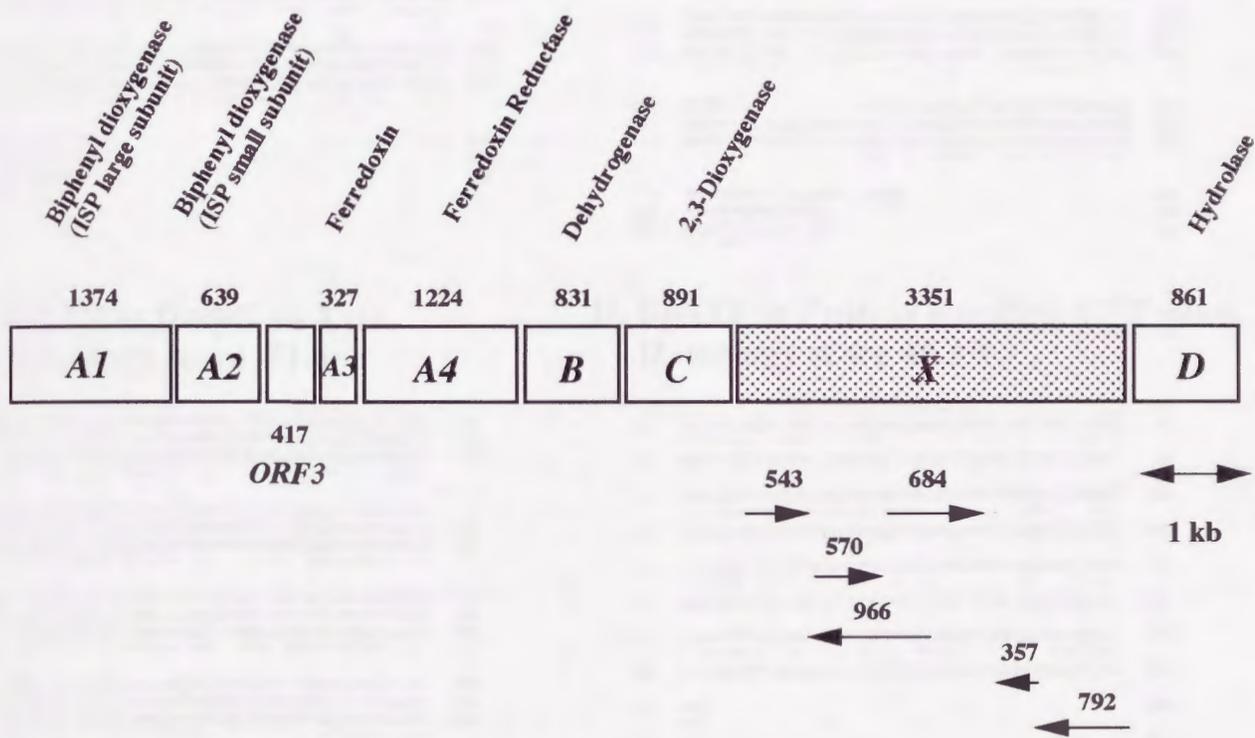


Fig. 3-2 Organization of *bph* operon in *P. pseudoalcaligenes* KF707

A. BphX1 vs DmpE vs XylJ
Homology score 67.8%

(1)	MTPELIGTLGDELYSALCTRTVVEPLTSRHEPITVEDAYHIQORMISRRL	50
(2)	MDKILINELGDELYQAMVNRREASPLTERGLDISVDDAYHISLRMLERRL	50
(3)	MDKTLINELGDELYQAMVOREVTPLTSRGRFISVEDAYHISLRMLERRL	50

(1)	QAGERVVGKKIGVTSAAVHMMLGVYOPDFGYMLDGMIVSDGGSTAHSS-L	99
(2)	AAGEKVI GKKIGVTSKAVQNMMLNVHOPDFGLTDRMVFNSGEAMPISOLL	100
(3)	AAGERVIGKKIGVTSKAVQNMMLGVHOPDFGYLTDAMVYNSGEAMPISOKL	100

(1)	IOPKAEGEIAFVFLKDKLHMGPGVTHADVLAATDFVMPCFEIVDSRIGDWKI	149
(2)	MDPKAEGEVAFVFLKDKLIGPGVTHADVLAATECVMPCFEIVDSRIRDWKI	150
(3)	IOPRAEGEIAFVFLKDKLHMGPGVTHADVLAATECVIPCFEIVDSRIGDWKI	150

(1)	KIQDITVADNASCQFVFLGSSAADPRRIDLMTGCMVLEKNGEIIATGAGAA	199
(2)	KIQDITVADNASCGLFVLDGQAVSPROVDLVTGCMVLEKNGHIIATGAGAA	200
(3)	KIQDITVADNASCGLFVLDGQAVSPROVDLVTGCMVLEKNGQLLSTGAGAA	200

(1)	ALGSPVNSVAULANTLGRGLIGLKAGEVILSGALAAFPAAQGDHFRVTI	249
(2)	ALGSPVNCVAULANTLGRFGIALKAGEVILSGSLVPLEPVKAGDVHRVDI	250
(3)	ALGSPVNCVAULANTLGHFGILGLKAGEVILSGSLVPLEPVKAGDFHRVEI	250

(1)	GGIGGSVRFH	260
(2)	GGIGSASVRFI	261
(3)	GGIGSASVRFI	261

B. BphX2 vs DmpF vs XylQ
Homology score 54.4%

(1)	MTKKIKCALIGPGNIGTDLAKLORSP-VLEPIVMVGDIPESDGLKRARE	49
(2)	MNOKLKVAILGSGNIGTDLNFKVLRNAYLEMGAVGIDAAADGLARAOR	50
(3)	MNKKLKVAILGPGNIGTDLNFKVHRNAYLEMGAVGIDPASDGLARAOR	50

(1)	HGIXTTADGVVGLIPHMADGVQIVFDATSAYVHADN-S--RKNALGAL	96
(2)	HGVITTYAGVEGLIKLPEFADIDFVFDATSASAHVONEALLROAKP-GIR	99
(3)	HGVATTHEGVEGFNLPEFADIDFVFDATSASAHVONDALLRRAKP-GIR	99

(1)	MIDLTPAAIGPFCVPTVNLKEHVKGEMVNVHVTGCGOATIPMVAASRV	146
(2)	LIDLTPAAIGPYCVPVVNLLEHLGK--LNVNHVTGCGOATIPMVAASRV	147
(3)	LIDLTPAAIGPYCVPVVNLLEHLAK--LNVNHVTGCGOATIPMVAASRV	147

(1)	OPVAYGEIVATVSSKSAGPGTRKXIDEFTRITAGAVEKVGGAKKGKAI	196
(2)	AKVHYAEIVASISSKSAGPGTRANIDEFTETTSKAEVIGGAAGKAI	197
(3)	AKVHYAEIVASIASKSAGPGTRANIDEFTETTSKAEVIGGAAGKAI	197

(1)	LHPAEPPLIMRDTVHCLLESEPDOAKITESTIHAMIKEVQYVPGYKLVNG	246
(2)	MHPAEPPLIMRDTVY-VLSAADQAAVAASVAENVOAVQAYVPGYRLKQD	246
(3)	MHPAEPPLIMRDTVF-VLSETVDDQAVASVEEHTSAVQAVVPGYRLKQK	246

(1)	PVFD-----GLRVSVYLEVEGLDGLPKYAGHLDIMTA	279
(2)	VQFDVIPSAPLHPIGLGRFSGLKTSVFLEVEGAHYLPAYAGHLDIMTS	296
(3)	VQFDVIPSAPLHPIGLGTFSGLKTSTYLEVEGAHYLPAYASSLDIMTS	296

(1)	AAARTAEMFAEILAGQLTOPVHA	304
(2)	AALATAERMAOSMLNA	312
(3)	AALATAERMAOSLLNA	312

C. BphX3 vs DmpG vs XylK
Homology score 51.6%

(1)	MKLEG-KKVTVDHMTLRDGMHPKRHOMTLEQHKSIACGLDAAIGPLIEVT	49
(2)	MTFNPKKLYISDVTLRDGSNAIRHOYITLDDVRAIARALDKAKVDSIEVA	50
(3)	MTFNPKKLYISDVTLRDGSNAIRHOYSIQVQVDAARALDKARVDSIEVT	50

(1)	HGDGLGSSVNYGFAHSDDEEYLGAVIPLMKQAKVALLPGIGTVEHLK	99
(2)	HGDGLGSSFNYPGFRHTDLEYIEAVAGEISHAIIATLLPGIGSVHDLK	100
(3)	HGDGLGSSFNYPGFAHSDLEWIEAADVIOHARVTLLVPGIGTVEHLK	100

(1)	MAKDLGVNTRVATHCTEADVSEGHITOSRKLGLDTVGLMMAHMASPEK	149
(2)	NAYQAGARVVRVATHCTEADVSKOHEIYARNLGMHTVGLMMSHMI PAEK	150
(3)	AAYDAGARVVRVATHCTEADVSRQHEIYARELGMHTVGLMMSHMI PAEQ	150

(1)	LVSQALLHOGYGANCIYVTDVSDAGYMLPDDVKARLSAVRAALKPETELGFH	199
(2)	LAEQKLNESYGATCIYHADSGGAMHNDIRDRMRAFKAVLKPETOVMGMH	200
(3)	LAAQKLNETYGAQCIYHADSGGAMHNDIRDRMRAFKAVLNPOTOTGMH	200

(1)	GHHNLAMGVANSIAAIEAGATRIDAAAGLGAGAGNTPMEVFIAVCARMG	249
(2)	AHHNLSLGVANSIYAVEEGCDRVDASLAGMGAGNAPLEVFIAVAERLG	250
(3)	AHHNLSLGVANSIYAVEEGCDRIDASLAGMGAGNAPLEVFIAAAERLG	250

(1)	IETGVDFKIQDVSDELVVPIMDHVIRIDRDSLTLGYAGVYSSFLFAKR	299
(2)	VNHGDTLYTLMDAADDIVRPLQDRPVRVDRETLGLGYAGVYSSFLRHAET	300
(3)	VNHGDTLYTLMDAADDIVRPLQDRPVRVDRETLGLGYAGVYSSFLRHAET	300

(1)	ASEKYGPARDILVELGRRGMVGGQEDMIEDTAMHARERGLTLTAA	346
(2)	AAAKYMLKTLDELVELGRRRMVGGQEDMIVDALDLAAH--KENRA	345
(3)	AAAKYGLKTLDELVELGRRRMVGGQEDMIVDALDLAAR--KEQQA	345

D. BphX0 vs Pruteus mirabilis GST gene
Homology score 48.3%

(1)	MKLYYSPGACSLSPHIALREAGLHFLVQVLDASKKTASGDDYLEINPAG	50
(2)	MKLYYTPGCSLSPHIVLRETGLDFSIERIDLRTKKTESGKDFLAIMPKG	50

(1)	YVPCLOLDGRTLTGPAIVQYVADQVPGKOLAPANGSFERYHLOQWLF	100
(2)	QVPVLQDNGDILTTEGVAIVQYLADLKPDRHLIAPPKALERYHOLEWLF	100

(1)	ISSELHKSFSPLFNPASSDEWKHAVROSLNRLGGOVAROLENAPYLLGDD	150
(2)	LASEVHKGSPLFSSDTPESYLPVVKKLLKSKFVYINDVLSKOKCVCGDH	150

(1)	LSVADITLVVYLGWSAYVNDLSPWPSLOAFQGRVGGREAVQSALRAEGL	200
(2)	FTVADAYFTLSQWAPHVALDLDLSHLOOYLARIORPNVSHALVTEGL	200

(1)	IKE	203
(2)	IKE	203

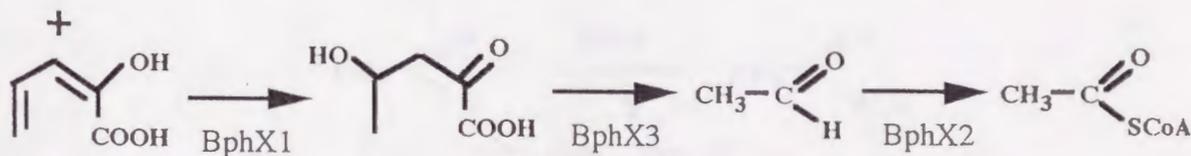
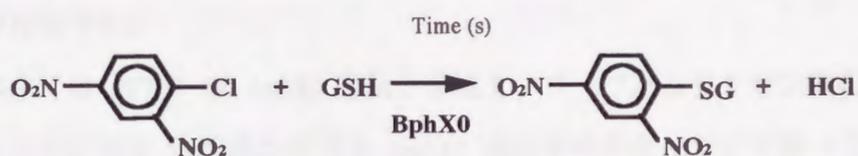
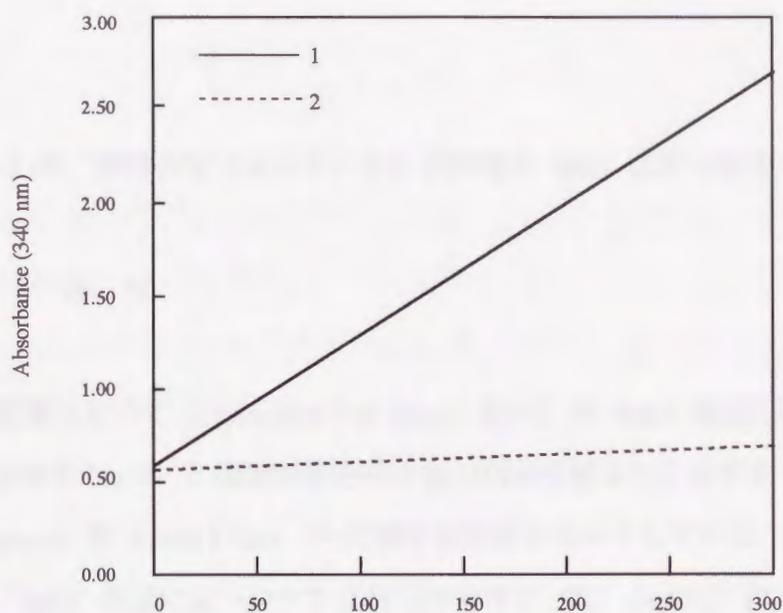


Fig.3-3 Amino acid sequence alignments of BphX0, BphX1, BphX2, BphX3 against Xyl and Dmp corresponding proteins

(a)



(b)

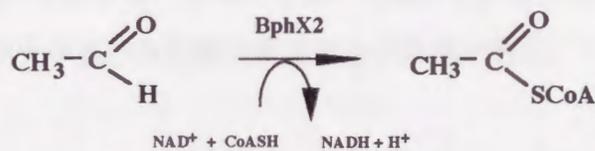
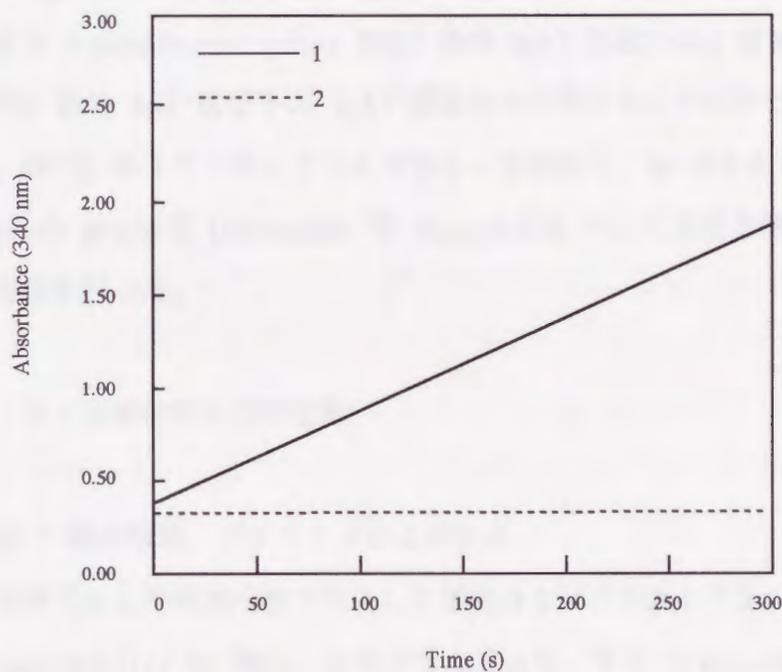


Fig.3-4 Analysis of Glutathione S-transferase and Aldehyde dehydrogenase activities of recombinant *E.coli* JM109

1. Cell free extract of cells containing pXKF101, 2. Cell free extract of cells containing pUC118

第4章 諸種のビフェニル/PCB分解菌の *bphX* 領域の構造-機能解析

4.1 緒言

前章において *P. pseudoalcaligenes* KF707 株 *bphX* 領域には *bphX1*, *X2*, *X3* 遺伝子が存在し、BP の環開裂黄色化合物の加水分解より生成する 2-hydroxy penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA へ代謝する酵素をコードしていることを明らかにした。一方、*bphX* 領域にはハロゲン化作用を有する GST (*BphX0*) がコードする *bphX0* 遺伝子が存在する。

本章では KF707 株 *bphX0* 遺伝子領域をプローブとしてサザン解析を行い、各種ビフェニル/PCB分解菌における *bphX0* 遺伝子の存在について調べた。また異なる炭素源で培養したビフェニル/PCB分解菌の GST 活性の測定を行い、ビフェニル代謝系と GST 活性の関係について検討を行った。さらに *P. putida* KF715 株の *bph* 遺伝子と *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bphX* 領域の DNA 塩基配列の相同性を調べ、KF715 株の *bph* 遺伝子の *bphX* 領域の欠失のメカニズムについて検討を行うとともに、KF715 株よりコスミドライブラリーを構築し、BP からの中間代謝産物である 2-hydroxy penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA への代謝する酵素系をコードする領域の特定を行った。

4.2 実験材料および方法

(1) 使用菌株、プラスミドおよび培地

本章で示した実験内容で使用した菌株およびプラスミドを、Table 4-1 に示した。*P. paucimobilis* Q1 株は、シカゴの土壌より、また *P. cepacia* LB400 株を除く他のビフェニル/PCB分解菌は、日本の各地の土壌から分離されたものである。*P. putida* AC30 株は、九州大学農学部発酵学教室所有の菌株である。

(2) Genomic DNA の調製

ピフェニル/PCB 分解菌を 0.2~0.02 % の BP と 5 g/l の Suc を含む BSM 培地 40 ml で 30℃、14 時間で振とう培養し、集菌、洗浄後、TE 緩衝液 (50 mM トリス、1 mM EDTA、pH 7.5) に懸濁した。次にリゾチーム (生化学工業) を最終濃度 2 μ g/ml と ProtinaseK (Merck) を最終濃度 30 μ g/ml、また 10 % SDS を 0.8 ml 加え、37℃ で 60 分間保温し、溶菌した。さらに 5 M NaCl を加え、懸濁した後に、CTAB/NaCl (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide/NaCl) を 2.6 ml 加えて、再懸濁した。65℃、10 分間保温後、フェノールおよびクロロフォルム抽出を行い、0.6 volume のイソプロパノールにより Genomic DNA を沈殿させ、TE 緩衝液に溶解した。その一部について 260 nm の吸光度を測定して濃度を決定した。

(3) サザンハイブリダイゼーション

各種ピフェニル/PCB 分解菌より調製した Genomic DNA を制限酵素 *EcoRI* で消化し、アガロースゲル (0.7 %) により電気泳動をおこなった。泳動された DNA 断片は Southern の方法⁽¹⁰⁰⁾ により Biodyne B nylon membrane (Pall) へ移行した。

DNA プローブは以下の方法で調製した。すなわち、*bphX0* プローブは pXKF101 より *bphX0* 遺伝子を含む 0.6 kb *HinfI* 断片を、一方 *bphX* プローブは pXKF101 より *bphX* 領域の一部を含む 2.9 kb *SaII*-*BglIII* 断片をアガロースゲルから GeneClean kit (フナコシ) を利用して回収したものを使用した。これらのプローブとして使用した DNA 断片を Fig. 4-1 に示した。プローブ DNA のラベリングは Nonradioactive DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim) を使用した。DNA の相同性の検出は、得られたプローブを前述のメンブランの DNA にハイブリダイズし、Nonradioactive DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim) を使用して行った。

(4) Glutathione S-transferase 活性の測定

GST 活性測定のためのピフェニル/PCB 分解菌の菌体抽出液の調製法は、以下の通りである。ピフェニル/PCB 分解菌を終濃度 0.2~0.02 % の BP 粉末、5 g/l の Suc を含む 40 ml の BSM-Suc-BP 培地、終濃度 0.2~0.02 % の BP 粉末のみを炭

素源とした BSM-BP 培地、または 5 g/l の Suc のみを炭素源として含む培地のいずれかで 30°C 下、菌体増殖が定常期になるまで培養した。培養後、4,000 rpm で 5 分間遠心分離して集菌を行った。さらに、30 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 中に懸濁した後に、同条件で遠心分離し、菌体を洗浄した。さらに同操作により菌体を再び洗浄した後に 2 mM DTT を含む 4 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 中に懸濁した菌体を超音波破碎機 (USD130、Tosho Electric) を使って 10 分間破碎した。これを遠心分離して (15,000 rpm, 10 分間)、得られた上清を粗酵素液として用いた。粗酵素液中のタンパク質含量は Lowry 法⁽⁸⁰⁾で測定した。またピフェニル/PCB 分解菌菌体の GST 活性の測定は 3・2 節 (7) に示した方法で行った。

(5) *P. putida* KF715 株 Genomic DNA のコスミドライブラリーの作成

P. putida KF715 株の Genomic DNA は 4・2 節 (2) に示した方法により抽出した。Genomic DNA は制限酵素 *Sau3AI* により部分消化し、ショ糖密度勾配遠心を成書⁽⁴⁾に示す方法により行い、平均 40 kb の大きさの DNA 断片を得た。次にコスミドベクター Super COS1 (TOYOBO) の *Bam*HI サイトに *Calf intestinal phosphatase* (TOYOBO) を用いて脱リン酸化した Genomic DNA を T4 DNA ligase により連結し、Gigapack II Gold (Stratagene) を使用して *in vitro* packaging を行った。さらに構築したファージにより *E. coli* 490A へ形質導入し、AP 耐性を有する形質転換体を得た。(Fig. 4-3)

(6) KF715 株 *bph* 遺伝子の下流領域のクローニング

上記の方法により構築した形質転換体のうち、23DHBP dioxugenase 活性 (BphC) を有する形質転換体を選択するために、AP を含む (50 μ g/ml) LB 寒天培地上の AP 耐性クローンに 2,3-dihydroxybiphenyl (23DHBP) 水溶液 (1 g/l) を噴霧し、23DHBP を環開裂黄色化合物に変換する能力を有するクローンを得た。

同様に Catechol 2,3-dioxygenase 活性 (BphG) を有する形質転換体を選択するために、AP を含む (50 μ g/ml) LB 寒天培地上の AP 耐性クローンに Catechol (CA) 水溶液 (1 g/l) を噴霧し、CA を環開裂黄色化合物に変換する能力を有するクローン

を得た。

4・3 実験結果

4・3・1 ビフェニル/PCB 分解菌の *bphX0* 遺伝子の存在確認

ビフェニル/PCB 分解菌および安息香酸資化菌から Genomic DNA を抽出し、制限酵素 *EcoRI* で消化後、*P. pseudoalcaligense* KF707 株の *bphX0* 遺伝子の 0.6 kb 断片をプローブとしてサザン解析を行った。その結果を Fig. 4-2 に示す。

KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群と同一か極めて類似している KF702、KF703 株については KF707 株と同じ 7.2 kb と 6.0 kb の相同な DNA 断片が認められたが、KF710、KF711 株は KF707 株と同じ 6.0 kb の相同な DNA 断片が認められたが、KF707 株とは異なる 13.0 kb の相同な DNA 断片が認められた。

また、KF707 株の *bph* 遺伝子と相同性は示すが *bphX* 領域を欠失している KF701、KF715 株は KF707 株とは異なる 5.3 kb と 13.0 kb の相同な DNA 断片が認められた。

一方、KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群とほとんど相同性を示さない KF712、Q1 株については相同な DNA 断片が認められなかった。また、安息香酸資化菌 AC30 株についても相同な DNA 断片が認められなかった。

さらに、LB400 株は KF707 株と同じ 6.0 kb の相同な DNA 断片が認められたが、KF707 株や上記のいずれの菌株とも異なる 2.2 kb の相同な DNA 断片が認められた。

4・3・2 諸種ビフェニル/PCB 分解菌の Glutathione S-transferase 活性

諸種の ビフェニル/PCB 分解菌 および安息香酸資化菌の GST 活性の測定を行った。菌株はすべて炭素源として Suc と BP を含む BSM 培地により培養を行い、測定に使用した。その結果を Table 4-2 に示す。

KF707 株の *bphX0* 遺伝子と相同な DNA 断片が認められたビフェニル/PCB 分解菌

KF702、KF703、KF707、KF710、KF711、LB400 株は GST 活性が認められたが、KF707 株の *bphX0* 遺伝子と相同な DNA 断片が認められないピフェニル/PCB 分解菌 KF712 および安息香酸資化菌 AC30 株については GST 活性が認められなかった。

一方、KF707 株とは異なる相同な DNA 断片が認められた KF701、KF715 株についても GST 活性が認められなかった。

4.3.3 異なる炭素源による KF707 株と LB400 株の Glutathione S-transferase 活性の比較

KF707 株と LB400 株を BSM-Suc 培地または BSM-BP 培地で培養し、異なる炭素源を与えた際の GST 活性の測定を行った結果を Table 4-3 に示す。

KF707 株については Suc を炭素源として培養した際と比べ、BP を炭素源として培養した際に GST 活性が約 3.1 倍に上昇した。一方、LB400 株については Suc を炭素源として培養した際と比べ、BP を炭素源として培養した際に GST 活性が約 16 倍となり、KF707 株よりも高い値を示した。

Table.4-3 Activity of glutathione S-transferase in the strain KF707 and LB400 cell extracts

Strain	Activity (mU / mg of protein)	
	Suc	BP
<i>P.pseudoalcaligenes</i> KF707	0.7	2.2
<i>P.cepacia</i> LB400	0.2	3.2

4.3.4 *P.pseudoalcaligenes* KF707 株 *bphX* 領域と *P.putida* KF715 株のピフェニル代謝遺伝子の塩基配列の比較

KF707 株と KF715 株の *bphC* および *bphD* 遺伝子の相同性はそれぞれ 91.4 % および 96.5 % であり、両菌株の *bph* 遺伝子は極めて高い相同性を示す。^(28,60) 続いて決定した KF707 株 *bphX* 領域の塩基配列と KF715 株の *bphC* 遺伝子と *bphD* 遺伝子の間の領域の塩基配列の比較を行った。

Fig. 4-4 に示すように KF715 株の *bphC* 遺伝子と *bphD* 遺伝子の間の領域 208 bp の塩基配列は KF707 株 *bphC* 遺伝子の終止コドンから *bphX0* 遺伝子の開始コドン (ATG) の A までの塩基配列と KF707 株 *bphX3* 遺伝子の 3' 末端の 106 bp を含む *bphD* 遺伝子の開始コドンまでの塩基配列と極めて高い相同性を示した。(Fig. 4-4)

4・3・5 *P. putida* KF715 株 *bphX* 領域の特定

P. putida KF715 株の *bphD* 遺伝子の下流領域の DNA 断片を含むコスミドクローン を制限酵素 *XhoI* で消化し、*bphX1X2X3* 遺伝子を含む 2.9 kb DNA 断片 (*bphX* プロープ: Fig. 4-1) をプロープとしてサザン解析を行った。

その結果、*P. putida* KF715 株の *bphD* 遺伝子の下流領域の DNA 断片を含むコスミドクローンに 2.9 kb と 0.75 kb の相同な DNA 断片の存在が認められ、KF707 株の *bphX1X2X3* 遺伝子と相同な領域が存在することを確認した。(Fig. 4-5)

4・4 考 察

P. pseudoalcaligenes KF707 株の *bphX0* 遺伝子の DNA 断片をプロープとしたサザン解析より、KF707 株の *bph* 遺伝子と同一か極めて類似しているビフェニル/PCB 分解菌については KF707 株と 2 つの相同な DNA 領域が認められ、また KF707 株の *bph* 遺伝子と相同性は示すが *bphX* 領域を欠失しているビフェニル/PCB 分解菌は、サイズは異なるが相同な領域が認められた。よって各種ビフェニル/PCB 分解菌の染色体上に、複数の *bphX0* 遺伝子が存在し、他の *bph* 遺伝子コンポーネントと水平伝搬している可能性を示した。

さらに BP を炭素源として培養した菌体の GST 活性は、Suc を炭素源として培養した際と比べ、KF707 株については 3.1 倍、LB400 株については 16 倍に GST 活性の上昇が認められた。一般に GST は動物⁽¹³⁾、植物、原生生物などに広く存在し、解毒作用、主に脱ハロゲン化作用の役割を果たしている。^(49,92) また、海洋微生物である *Cycloclasticus oligotrophus* RB1 は芳香族化合物の資化性に関与する遺伝子クラスターが存在し、その中の XylK が BphX0 と 60.6 % の相同性を示すことが明らかにされている。⁽¹¹⁸⁾ さらに今回の実験結果は *bphX0* 遺伝子の転写が BP を炭素源とした際に誘導していることを示しており、GST がビフェニル代謝系において何らかの役割を果たしていることを示した。

KF715 株の *bphC* と *bphD* 遺伝子間と KF707 株 *bphX* 領域の DNA 塩基配列との比較から、KF715 株の *bph* 遺伝子は KF707 株/ LB400 株タイプの *bph* 遺伝子から *bphX* 領域の一部が欠失することにより形成したものと考察した。しかし *P. putida* KF715 株の *bphD* 遺伝子の下流領域の DNA 断片を含むコスミドクローンに対するサザン解析より、*bphD* 遺伝子の下流領域に BP の環開裂黄色化合物の加水分解において生成する 2-hydroxy-penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA へと代謝する酵素系 BphX1X2X3 をコードする領域が存在した。(Fig. 4-5)

ビフェニル/ PCB 分解菌 *Pseudomonas* sp. KKS102 株や *Alcaligenes xylosoxidans* A41 株の *bph* 遺伝子は *bphA1A2A3BCDA4* のクラスターを形成しており、BphX1X2X3 をコードする領域は *bphA1* 遺伝子の上流領域に存在し、またトルエン分解菌 *P. putida* F1 株のトルエンの環開裂黄色化合物の加水分解において生成する 2-hydroxy-penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA へと代謝する酵素系をコードしている領域は 2,3-dihydroxytoluene dioxygenase をコードする *todE* 遺伝子の下流に隣接していることが明らかにされている。^(70,71,77)

以上の結果、*bphX0* および *bphX1X2X3* 遺伝子は各種ビフェニル/ PCB 分解菌に存在し、その遺伝子配置は菌株間で大きく異なっていた。芳香環分解菌には、遺伝子の欠失や転座^(58,86) や、転移機能^(12,101,115) を有するものが分離されている。また、同一の菌株内において、類似した機能を有する遺伝子を複数保持するものが存在している。^(59,82) これらの多様性は共通の祖先となる酵素遺伝子が進化の過程における遺伝

子転移や DNA シャフリングより生じたものと推考した。上記の研究結果はビフェニル/PCB 分解菌においてもそのような現象が生じていることを示唆した。

4・5 小 括

ビフェニル/PCB 分解菌および安息香酸資化菌から Genomic DNA を抽出し、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bphX0* 遺伝子の DNA 断片をプローブとしたサザン解析より、KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群と同一か極めて類似している菌株および KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群と相同性を示すが *bphX* 領域を欠失している菌株に相同な DNA 領域が認められた。また KF707 株の *bphX0* 遺伝子と相同な DNA 断片が認められたビフェニル/PCB 分解菌は GST 活性が認められた。このように各種ビフェニル/PCB 分解菌において KF707 株と類似した *bph* 遺伝子を保有する菌株に *bphX0* 遺伝子が保存されており、*bph* 遺伝子とともに *bphX0* 遺伝子が水平伝搬しているものと考察した。

次に KF707 株と LB400 株を BP を唯一の炭素源として培養した菌体の GST 活性の測定を行い、Suc を炭素源として培養した際と比べ、GST 活性の上昇が認められた。このことは GST がビフェニル代謝系において何らかの役割を果たしていることが示唆した。

一方、*P. putida* KF715 株の *bphX1X2X3* 遺伝子を含む DNA 断片をプローブとしたサザン解析より、KF715 株 *bphD* 遺伝子の下流領域に KF707 株の *bphX1X2X3* 遺伝子と相同な領域を確認した。以上の結果、*bphX0* および *bphX1X2X3* 遺伝子は各種ビフェニル/PCB 分解菌に存在し、その遺伝子配置は菌株間で大きく異なることを明らかにした。

Table 4-1 Bacterial strains and plasmids used in this chapter

strain and plasmid	Relevant description	Source or reference
Strain		
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1</i>	Takara shuzo
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	wild type, BP ⁺	(39)
<i>Pseudomonas putida</i> KF715	wild type, BP ⁺	(60)
<i>Pseudomonas putida</i> AC30	wild type, Ben ⁺ , BP ⁻	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> KF701	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas fluorescence</i> KF703	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas paucimobilis</i> Q1	wild type, BP ⁺	(38)
<i>Alcaligenes</i> sp. KF711	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas</i> sp. KF702	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas</i> sp. KF710	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas</i> sp. KF712	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas cepacia</i> LB400	wild type, BP ⁺	(14)
Plasmid		
pUC118	Ap ^r	(120)
pXKF101	<i>bphCX0X1X2X3</i> in pUC118, Ap ^r	This study

Table 4-2 Activity of Glutathion S-transferase in various PCB degrading strains

	Strains									
	KF701	KF702	KF703	KF707	KF710	KF711	KF712	KF715	LB400	AC30
Activity (mU / mg of protein)	0.5	1.1	0.7	2.8	0.9	1.7	0.5	ND	1.1	ND

P.pseudoalcaligenes KF707 *bph* gene

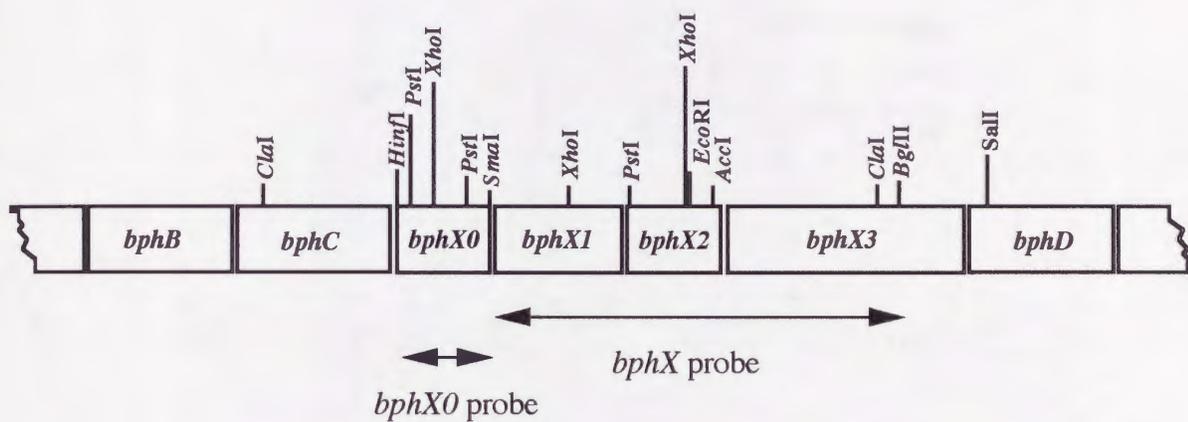


Fig. 4-1 DNA fragments used as probe for detection of *bphX* genes in various PCB degrading strains

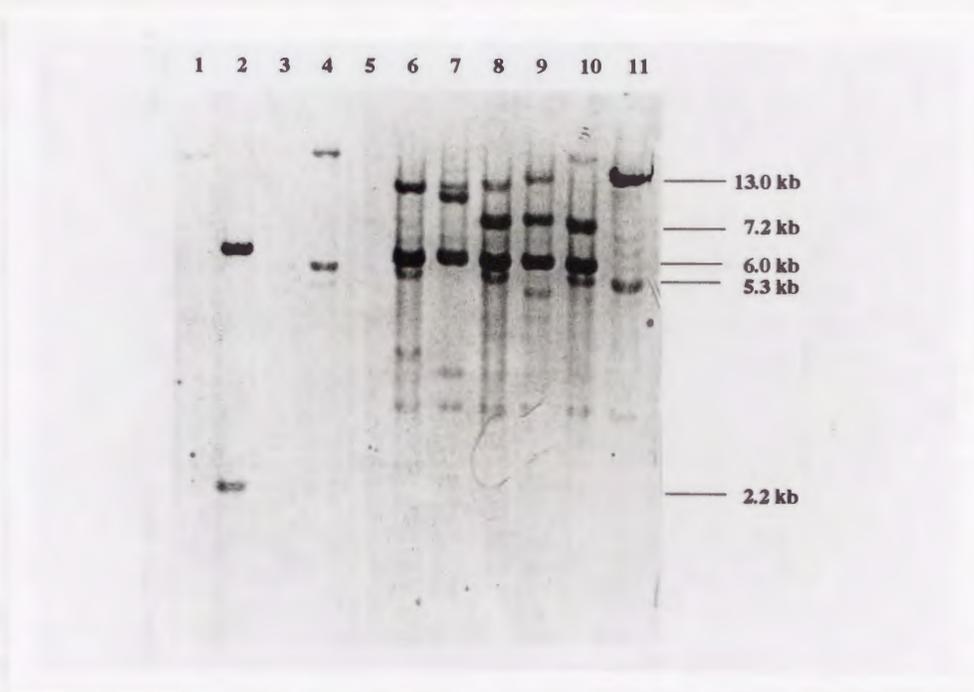


Fig.4-2 Southern analysis of *P. pseudoalcaligenes* KF707 *bphX0* probe to various PCB-degrading strain genomic DNA

The arrows indicate the DNA fragments containing KF707 *bphX0* DNA. Lane 1, AC30; Lane 2, LB400; Lane 3, Q1 ; Lane 4, KF715 ; Lane 5, KF712 ; Lane 6, KF711 ; Lane 7, KF710 ; Lane 8, KF707 ; Lane 9, KF703 ; Lane 10, KF702 ; Lane 11, KF701.

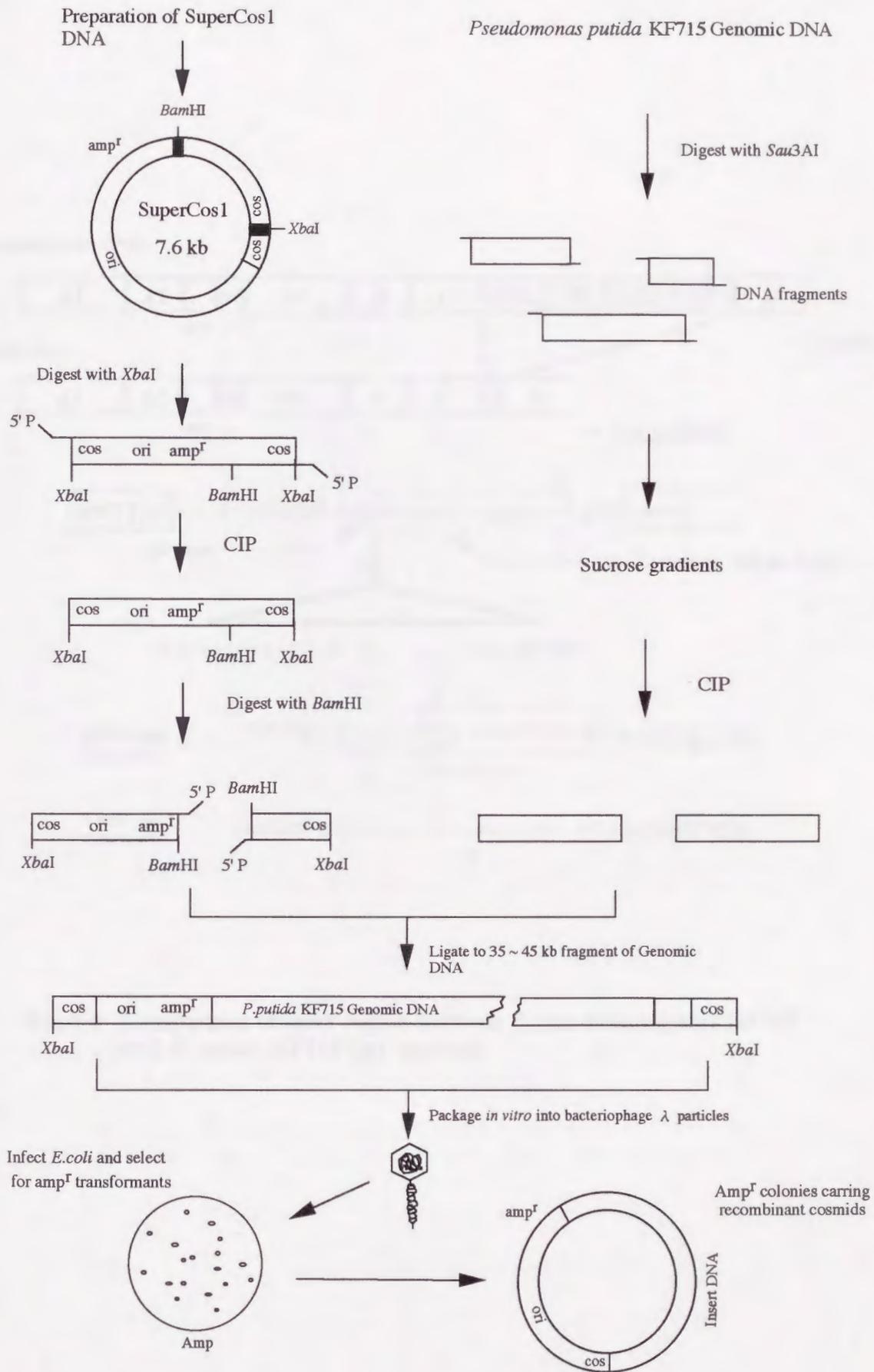
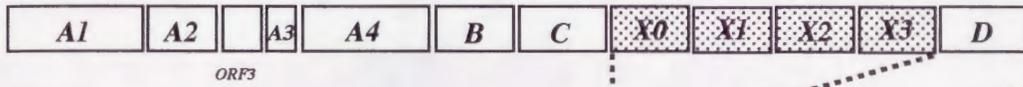
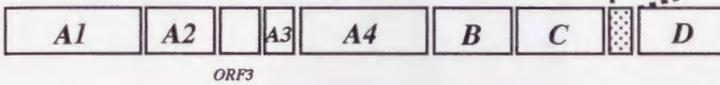


Fig. 4-3 Schematic representation of construction of cosmid library of *P. putida* KF715 genomic DNA

P. pseudoalcaligenes KF707



P. putida KF715



--- TAAGGAGAAA

--- TAACCCGGAT

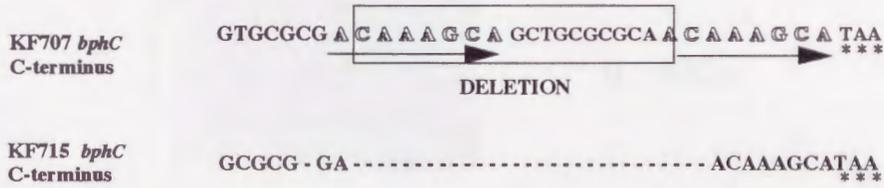
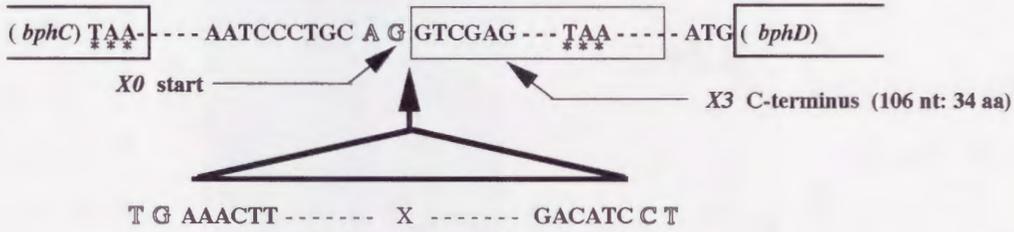


Fig.4-4 Comparison of *bphX* region between *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. putida* KF715 *bph* operons

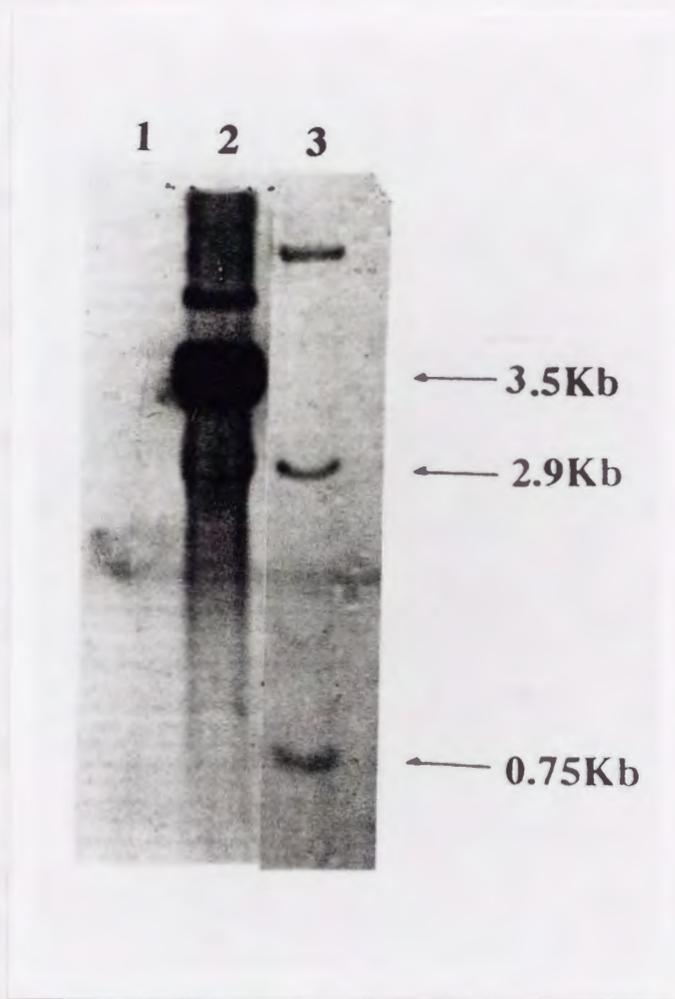


Fig.4-5 Southern analysis of *P. pseudoalcaligenes* KF707 *bphX* probe to *P. putida* KF715 *bphD* downstream region

The arrows indicate the DNA fragments containing KF707 *bphX*.

Lane 1, pHSG396 (Control) ; Lane 2, pXKF101; Lane 3, KF715 *bphD* downstream region

第 5 章 KF707 株のビフェニル代謝遺伝子 *bphA1* 上流領域の解析

5・1 緒言

ビフェニル/PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 遺伝子は *bphA1A2* (*orf3*) *A3A4BCX0X1X2X3D* の遺伝子クラスターを形成しており、その塩基配列は、*P. cepacia* LB400 株の *bph* 遺伝子 *bphAE(orf1)FGBCKHJID* と 95-100% の極めて高い相同性を示すことが明らかにした。一方、米国 GE 社の Mondello らのグループは LB400 株の *bph* 遺伝子 *bphA1* の上流に機能不明な読み枠 *orf0* が存在し、両菌株の PCB 分解特性に関与している可能性を示唆した。⁽²⁰⁾

本章では KF707 株の *bph* 遺伝子 *bphA1* 上流領域の DNA 塩基配列を決定し、LB400 株の *bphA1* 上流領域の構造との比較検討を行うとともに、KF707 株の *orf0* 破壊株および導入株を構築し、機能解析を行った。

5・2 実験方法と材料

(1) 使用菌株、プラスミドおよび培地

本章で示した実験内容で使用した菌株およびプラスミドを、Table 5-1 に示した。*P. pseudoalcaligenes* KF7095、KF7131 の構築の方法は、5・2 節 (5)、(6) および 5・2 節 (11) に示した。トランスポゾン Tn5-B21 を *P. putida* KF715 の *bph* 遺伝子の *bphD* へ挿入して遺伝子破壊を行った菌株 KF7065 株は Furukawa らにより構築された。⁽³⁰⁾

プラスミド pUKF18 は染色体歩行 (gene walking) により取得した KF707 株の *bphA1* 遺伝子上流領域を含む 3.2 kb の *SmaI*-*XhoI* 断片を含む pUKF101 へ pKTF18⁽¹⁰⁹⁾ の *bphABC* 遺伝子を含む *XhoI* 断片を挿入し、構築した。また、プラスミド pSUPB101 の構築の手順を Fig. 5-2 に示した。すなわち、pSUPB30⁽⁹⁸⁾ の 4.4 kb のテトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc^R) を含む *XhoI* 断片を 1.3 kb の KF707 株 *orf0*

を含む *Sa*I 断片と交換して pSUPB11 を構築し、さらに pSUPB11 の挿入した断片の *orf0* の中心付近に存在する *Xho*I サイトに pSUP30 由来の Tc^R を含む *Xho*I 断片を挿入した。

(2) *bphA1* 上流領域を含む DNA 断片のサブクローニング

クローン化された *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bphA1* 上流領域を含む 3.4 kb の *Sma*I-*Eco*RI 断片を pUC19⁽¹²⁰⁾ の *Sma*I-*Eco*RI サイトに導入することにより pUKF101 を構築した。次に pUKF102 は pUKF101 の *Pst*I 断片を pUC19 へ挿入することにより構築した。pUKF103 は pUKF101 の *Sph*I-*Cla*I 断片を pUC19 へ挿入することにより構築した。pUKF104 は 1.5 kb の *Sa*I-I-*Xho*I 断片を pUC118⁽¹²⁰⁾ の *Sa*I-I-*Xho*I サイトに挿入して構築した。さらに、pUKF105 は pUKF101 の *Pst*I-*Xho*I 断片を pUC19 の *Pst*I-*Xho*I サイトに挿入して構築した。pUKF106 は pUKF101 の *Cla*I-*Xho*I 断片を pHSG396⁽¹¹⁰⁾ の *Cla*I-*Xho*I サイトに挿入して構築した。(Fig. 5-1)

(3) *bphA1* 上流領域の塩基配列の決定

上記の方法により調製したプラスミドを用いて、Sanger らの dideoxy chain termination 法⁽⁹³⁾により DNA Sequencer 373A (Applied Biosystems) を用いることにより DNA 塩基配列の決定を行なった。(Fig. 5-1)

(4) PCR 法による *orf0* の増幅

P. pseudoalcaligenes KF707 株 *orf0* のクローニングと各種ビフェニル/PCB 分解菌における *orf0* の存在の確認を目的として PCR (Polymerase chain reaction) 法による *orf0* の DNA 断片の増幅を行った。増幅には *orf0* の上流の forward 鎖の 5' 末端に *Eco*RI サイト (下線) を付したオリゴプライマー #1 (5' -TCTGAATTCAT-GAATGCGAGAACTCC-3') と *orf0* の下流の reverse 鎖の 5' 末端に *Eco*RI サイト (下線) を付したオリゴプライマー #2 (3' -AGCCAAACAAGCCACTCTTAAGCG-5') を用いた。

PCR 法に使用したオリゴヌクレオチドは、DNA 合成機 (Model 380B, Applied Biosystems) を用いて trityl on の条件で合成した。合成した DNA をアンモニアの存

在下、55°C 下で一晩放置して保護基の除去を行い、OPC カートリッジ (Applied Biosystems) を用いて精製した。精製したオリゴヌクレオチドは、減圧濃縮機で乾燥し、TE (Tris-EDTA buffer、pH 8.0) 中に溶解した。

鋳型 DNA として Table 5-1 に示す菌株より 4・2 節 (2) に示す方法により調製した Genomic DNA を使用した。*orf0* の増幅反応は 10 X PCR buffer (Applied Biosystems)、0.5 μ g の鋳型 DNA と 100 μ M の dNTP、1 μ M のオリゴヌクレオチドプライマー #1 および #2 および 0.5 U の Taq DNA polymerase (Applied Biosystems) を含む 50 μ l の反応液中で行った。インキュベーションは Program Temperature Control System (PC-700、アステック) を用いて行った。Taq DNA polymerase 以外の成分と 1 滴のミネラルオイル (ナカライテスク) を専用のチューブに納めて、93°C で 5 分間インキュベートした後に Taq DNA polymerase を添加し、55°C でのアニーリング 90 秒、72°C での伸長反応 90 秒、94°C での変性 45 秒のサイクルを 25 サイクル繰り返した。20 サイクル終了後、70°C で 10 分間伸長反応を行い、反応を終了した。*orf0* の増幅を行った反応液を別のエッペンドルフチューブに移してクロロフォルムで残ったミネラルオイルを抽出、除去した。さらに、DNA 精製用フィルターカップ SUPREC™-02 (宝酒造) でろ過して過剰のプライマー DNA および dNTP を除去した。

(5) プラスミドの接合伝達

大腸菌 S17-1 株 から *Pseudomonas* 菌株への各種プラスミドの導入は、filter mating 法⁽⁹⁸⁾ により行った。プラスミド供与菌株である各大腸菌株および受容菌株である *Pseudomonas* 菌株を各々 LB プレート上で 30°C 下、一晩培養したものを 1 ml の LB 培地に 1 白金耳別々に懸濁した。菌体の懸濁液のうち 0.5 ml ずつ混合して 30°C、15 分間保温したものをニトロセルロースフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m、日本ミリポア) でろ過した。フィルターを LB プレート上に移してフィルター上に残った菌体を 30°C で一晩培養した。フィルター上の菌体を白金耳を用いて 1 ml の滅菌水中に懸濁し、懸濁液のうち 5-100 μ l を 30 μ g/ml の テトラサイクリン (SIGMA) を添加した BSM-Suc プレート上に塗抹した。これを 30°C で一晩培養して、

プラスミドを受容した *Pseudomonas* 菌株のコロニーを得た。組換えプラスミドの導入によって新たに取得した菌株を Table5-1 に示す。

(6) *orf0* 破壊株の構築

orf0 破壊株の構築は Fig.5-2 に示す方法に従って行った。すなわち、5・2 節 (1) において構築した pSUPB101 を大腸菌 S17-1 株に導入して形質転換し、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株へのプラスミドの導入を 5・2 節 (5) に示した方法と同様に、接合伝達によって行った。そのうち pSUP101 上の *orf0* または *bphA1* 遺伝子と KF707 株の染色体上の同遺伝子間の 1 箇所において相同組換えが起こして染色体上に pSUP101 が組み込まれた菌株 (Single crossover) の選択は、30 μ g/ml のテトラサイクリン (和光純薬) および 20 μ g/ml のゲンタマイシン (和光純薬) を含む BSM-Suc プレート上で行った。さらに得られた菌株を 3 ml の L-broth により培養し、12 時間ごとに培養液を滅菌水で希釈して BSM-Suc-Tc plate に塗布し、30°C で 2 日間培養した後に、出現したコロニーを BSM-Suc-Tc-Gm plate に接種して、30°C で 4 日間培養して生育の有無を確認した。このような方法により、染色体上に導入された pSUP101 上の *orf0* または *bphA1* 遺伝子と KF707 株の染色体上の同遺伝子間において再び相同組換えを起こし、染色体上から pSUP101 が欠失して、中心付近に Tc^R が導入された *orf0* が組み込まれた菌株 (Double crossover) が得られた。

(7) サザンハイブリダイゼーションによる *orf0* 破壊株の遺伝子構造の確認

構築した *orf0* 破壊株より調製した Genomic DNA を制限酵素 *Xho*I で消化し、アガロースゲル (0.7 %) により電気泳動をおこなった。泳動した DNA 断片は Southern の方法により Biotinylated B membrane (Pall) へ移行した。DNA プローブは pSUPB30 より 3.8 kb *Bam*HI-*Eco*RI 断片をアガロースゲルから GeneClean kit (フナコシ) を利用して回収し、使用した。プローブ DNA のラベリングと DNA の相同性の検出は 4・2 節 (2) に述べた方法によって行った。

(8) ビフェニル資化能の確認

各組換え *Pseudomonas* 菌株のビフェニル資化能を調べるために、BP を唯一の炭素源とする BSM 培地中での生育を経時的に調べた。組換え *Pseudomonas* 菌株を 3 ml の BSM-Suc 液体培地にて対数増殖期になるまで 30°C で前培養した。これらの培養液のうち 1 ml を 100 mg の BP を添加した 500 ml 三角フラスコ中の BSM 培地 (100 ml) に接種した。30°C 下、振とう機上で培養し、20 時間毎に培養液 1 ml をとって 660 nm における濁度を測定した。

(9) 環開裂黄色化合物への変換活性の測定

P. pseudoalcaligenes KF707 株および *orf0* 破壊株 KF7095株、KF715 株 *bphD* をトランスポゾン Tn5-B21 により遺伝子破壊を行った KF7065 株による BP からの環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。使用した菌株は上記に示す通りである。上記の菌株を BP を炭素源とする培地 100 ml 中で OD₆₆₀ が約 3 になるまで培養し、4,000 rpm、10 分間の遠心分離によって集菌した。これを 100 ml の 50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中に懸濁し、再び同条件で集菌した。さらに、OD₆₆₀ が 1.0 になるように同緩衝液中に懸濁し、これを静止菌体として以後の実験に使用した。

100 ml 三角フラスコ中に 20 ml の静止菌体を分注し、エタノール中に溶解または希釈した BP (0.25M) を終濃度 0.5 mM になるように添加した。30°C 下、回転振とう機上で振とうし、経時的に 1 ml の懸濁液をあらかじめ 100 μl の 100 mM EDTA (pH 8.0) を分注したエッペンドルフチューブに移した。これを、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して菌体を除去した。上清の吸光度変化を測定し、黄色環開裂化合物生成の有無を調べた。基質に対する環開裂化合物の生成は、434 nm の波長で測定した。

(10) 環開裂黄色化合物 (HPDA) の調製

ビフェニル環開裂黄色化合物 (HPDA、Fig.1-1 化合物IV) は、*bphC* 遺伝子にコードする 23DHBP dioxygenase の環開裂ジオキシゲナーゼ活性を利用して調製した。*bphC* を含むプラスミド pMFB5⁽²⁷⁾ を保持した *P. aeruginosa* PAO 1161 株の静止菌体の懸濁液 (OD₆₆₀ 1.0) 50 ml に 23DHBP (和光純薬工業) を終濃度 0.5 mM になる

ように添加して 30℃ で 30 分間保温して調製した。菌体を遠心分離で除去し、上清を加水分解酵素活性の測定用の反応液として用いた。HPDA の濃度は、分子吸光係数 13,400 (434 nm) を用いて計算した。⁽⁶⁵⁾

(11) 環開裂黄色化合物加水分解酵素活性の測定

orf0 破壊株の環開裂化合物加水分解酵素の活性は、環開裂黄色化合物 (HPDA) の減少量を吸光度を測定することによって求めた。環開裂化合物加水分解酵素活性測定に用いた粗酵素は BP、または Suc を添加した BSM プレート上で 12 時間培養した菌体を以下のように処理して調製した。すなわち、プレート上の菌体を白金耳を使って 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中に懸濁し、同緩衝液で洗浄した後に 1-2 ml の 10 % のエタノールを含む同緩衝液に懸濁して超音波破碎機 (UCD130、Tosho Electric) で菌体を破碎した。15,000rpm で 10 分間遠心分離して得られた上清を粗酵素液として使用した。粗酵素液中のタンパク質濃度は、Lowry法⁽⁸⁰⁾ で測定した。環開裂化合物加水分解酵素活性の測定の方法は以下の通りである。5・2 節 (10) の方法で調製した 70 μ M の HPDA 2 ml に粗酵素液 20 μ l を添加して、30℃ 下、1 分間、分光光度計 (UV-2200、島津製作所) にセットしたセル中でインキュベートした。反応前後で 434 nm (HPDA) における吸光度の減少を測定した。30℃ 下、1 分間に 1 μ mole の基質を減少させる酵素活性を 1 unit とした。

(11) *bphD* 遺伝子の導入株の構築

プラスミドのビフェニル/PCB 分解菌への導入は、5・2 節 (5) に示した方法と同様に、大腸菌 S17-1 株からの接合伝達により行った。pKFD330 導入株の選択は、100 μ g/ml の硫酸ストレプトマイシンを含む BSM-Suc プレート上で行った。各組換えプラスミドを導入して得られた菌株を Table5-1 に示した。

5・3 実験結果

5・3・1 KF707 株 *bphA1* 上流領域の塩基配列

P. pseudoalcaligenes KF707 株に存在する *bphA1* 上流領域の 1.6 kb の DNA 塩基配列を決定した。(Genbank accession No. D85852)

orf0 の開始コドンから *bphA1* 遺伝子の開始コドンの領域は LB400 株の *bphA1* 遺伝子上流領域の塩基配列と 83.3 %、また *orf0* 遺伝子の開始コドンから上流の領域については 38 % の低い相同性を示し、LB400 株の *bph* 遺伝子の転写開始点付近の塩基配列⁽²⁰⁾ は異なっていた。(Fig. 5-4) しかしこの領域には Fig. 5-3 に示すように 1 つの Open reading frame (読み枠) *orf0* が存在した。*orf0* は 738 bp、GC 含量が 57.5 mol%、推定されるアミノ酸配列は 245 アミノ酸残基からなり、アミノ酸配列より計算した分子量は 276557 Da であった。また塩基配列より推定される *orf0* のアミノ酸配列は *P. cepacia* LB400 株の *orf0* の推定されるアミノ酸配列⁽²⁰⁾ と 80.0 %、*Bacillus subtilis* の Gluconate オペロンの転写制御因子である *gntR* のアミノ酸配列⁽²³⁾ と 28 % の相同性を示した。

orf0 の open reading frame の約 100 bp 上流には *Escherichia coli* の δ^{70} 因子結合の保存配列である -10 Sequence ($T_{80}A_{95}t_{45}A_{60}a_{50}T_{96}$) と相同なプロモーター様配列 (5' -TATAAATATAAATAT-3') が存在した。

5・3・2 ビフェニル/PCB 分解菌の *orf0* の存在確認

ビフェニル/PCB 分解菌から Genomic DNA を抽出し、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *orf0* 遺伝子の塩基配列より合成したオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法によりビフェニル/PCB 分解菌の *orf0* の存在について解析を行い、その結果を Fig. 5-5 に示す。

KF707 株の *bph* 遺伝子と同一か極めて類似している KF701、KF703、KF710、KF714、KF715 株については KF707 株と同じサイズである 0.7 kb の DNA 断片の増幅が認められた。一方、KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群とはほとんど相同性を示さない KF704、KF712、Q1、M5 株については相同な DNA 断片の増幅が認められなかった。

5・3・3 *orf0* 破壊株の遺伝子構造の解析

P. pseudoalcaligenes KF707 株の *orf0* に Tc^R を導入した *orf0* 破壊株 KF7095 株の Genomic DNA を抽出し、制限酵素 *Xho*I で消化後、pSUPB30 の 3.8 kb *Bam*HI-*Eco*RI 断片をプローブとしてサザン解析を行った。

その結果、KF707、KF7095 株ともに pSUPB30 フラグメントと相同性を示す DNA 断片は認められなかった。一方、pSUPB30 の Tc^R を含む DNA 断片をプローブとしたサザン解析から、KF707 株は相同性を示す DNA 断片は認められなかったが、KF7095 株については Tc^R を含むフラグメントと相同性を示す DNA 断片が認められ、*orf0* に Tc^R が挿入されていることを確認した。

5・3・4 *orf0* 破壊株のビフェニル資化能

P. pseudoalcaligenes KF707 株の 染色体上に存在する *orf0* に Tc^r を導入した菌株 *P. pseudoalcaligenes* KF7095 株の BP を炭素源とした場合の生育を調べた。野生型の KF707 株は BP を唯一の炭素源として生育したが、*orf0* 破壊株は BP を炭素源とする液体培地中での生育は認められなかった。次に KF707 株と *orf0* 破壊株および KF715 株の環開裂黄色化合物加水分解酵素 (HPDH) をコードする *bphD* 遺伝子をトランスポゾン Tn5-B21 により遺伝子破壊を行った KF7065 株の BSM-Suc-BP plate での生育を調べた。その結果、KF707 株、KF7095 株、KF7065 株はともに生育が認められたが、KF7095 株、KF7065 株については Fig. 5-6 に示すような環開裂黄色化合物の蓄積が認められた。

5・3・5 *orf0* 破壊株の環開裂黄色化合物の生成量

5・3 節 (4) に示すように *orf0* 破壊株 KF7095 株は BSM-Suc-BP plate で培養した際に環開裂黄色化合物の蓄積が認められた。そこで、KF707 株、*orf0* 破壊株

KF7095 株、KF7065 株 (KF715 *bphD*::Tn5-B21) 株の静止菌体による BP に対する環開裂黄色化合物への生成量を調べた。

KF707 株の静止菌体は BP からの環開裂黄色化合物の生成は認められなかったが、*orf0* 破壊株 KF7095 株、KF7065 株の静止菌体は迅速に BP から環開裂黄色化合物を生成した。また、*orf0* 破壊株 KF7095 株と KF7065 株の静止菌体による BP からの環開裂黄色化合物の生成量は類似していた。

5・3・6 *orf0* 破壊株のビフェニル代謝系酵素の活性

各種 KF707 株の *bph* 遺伝子にトランスポゾンを導入したトランスポゾン変異株 KF733 株、KF744 株、KF748 株と KF707 株の *orf0* に Tc^R を導入した *orf0* 破壊株 KF7095 株について GST、ADH、HPDA の活性を測定し、野生型の KF707 株と比較した。KF707 株の *bph* 遺伝子をトランスポゾン Tn5-B21 により遺伝子破壊を行った KF733 株 (KF707 *bphA* :: Tn5-B21) は BphA (Biphenyl dioxygenase)、BphB (Biphenyl dihydrodiol dehydrogenase)、BphC (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase)、KF744 株 (KF707 *bphB* :: Tn5-B21) は BphB,C、KF748 株 (KF707 *bphC* :: Tn5-B21) は BphC の酵素活性が認められなかったが、BphX0 (GST)、BphX2 (ADH)、BphD (HPDA) の酵素活性が認められた。

一方、*orf0* 破壊株 KF7095 株は、BphA、BphB、BphC の酵素活性は認められたが、BphX0、BphX2、BphD の酵素活性は認められなかった。

5・3・7 *bphD* 遺伝子導入株のビフェニル資化能

KF707 株の *orf0* に Tc^R を導入した *orf0* 破壊株 KF7095 株へ広宿主域ベクター pKF330 に KF707 株由来の HPDA をコードする遺伝子 (*bphD*) を挿入したプラスミド pKFD330 を導入した菌株 KF7131 株について、BP を唯一の炭素源として培養した場合の生育を調べ、野生型の KF707 株と *orf0* 破壊株の KF7095 と比較した。

orf0 破壊株の KF7095 株 は BP を唯一の炭素源として生育しないが、pKFD330

を保有する *orf0* 破壊株 KF7131 株は BP を炭素源とした BSM-BP-plate 上で生育が認められた。また BSM-Suc-BP plate において環開裂黄色化合物の蓄積は認められなかった。(Table5-2)

Table.5-2 Growth characteristics of the strains KF707 and their mutants and recombinant strains

Growth medium or addition	strain		
	KF707 (wt)	KF7095	KF7131
BP	++	-	++
Suc + BP	++	++	++

Suc; SuccinateNa, BP; Biphenyl

5・4 考 察

決定した *P. pseudoalcaligenes* KF707 株 *bphA1* 上流領域の DNA 塩基配列から、*P. cepacia* LB400 株の *orf0* と同じサイズ 738 bp からなり、そのアミノ酸配列と 80.0 % の相同性を示す Open reading frame (読み枠) *orf0* の存在が認められた。KF707 株と LB400 株の他の *bph* 遺伝子の各遺伝子コンポーネントが 95 - 100 % の極めて高い相同性を示すことから *orf0* は比較的低い相同性を示している。

また KF707 株と LB400 株の *bphA1* 上流領域の DNA 塩基配列の比較から、*bphA1* 遺伝子から下流の領域は 96 % 以上の極めて高い相同性を示すのに対し、*orf0* の開始コドンから *bphA1* 遺伝子の開始コドンまでの領域が 83.3 %、*orf0* の開始コドン上流の領域は塩基配列の相同性は全く認められなかった。このことから *orf0* の推定される開始コドンの上流付近が *bph* 遺伝子の 5'・末端領域にあたるものと考えられる。一方、Mondello らは LB400 株の *bph* 遺伝子には *orf0* の終止コドンと *bphA1* 遺伝子の開始コドンの間の領域から 2 箇所、*orf0* の上流から約 40 bp から 1 箇所

に転写開始点が存在することを示している。⁽²⁰⁾ また Taira らは KF707 株の *bph* 遺伝子 *bphA1* の開始コドンから約 100 bp 上流に転写開始点が存在することを明らかにした。⁽¹⁰⁹⁾ 上記の研究結果から KF707 株と LB400 株の *orf0* の転写開始領域を含む約 40 bp 上流からは塩基配列の相同性は全く認められなかった。しかし、KF707 株の *orf0* の開始コドンの約 100 bp 上流にはプロモーター様配列 (5' -TATAAAT-ATAAATAT-3') が存在し、両菌株の *bph* 遺伝子の *orf0* 上流領域からの転写開始部位は異なるものと考察した。

次に各種のビフェニル/PCB 分解菌の染色体 DNA を鋳型にした PCR により、KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群と同一か極めて類似している菌株に *orf0* をコードする DNA 断片の増幅が認められた。このことは *orf0* がビフェニル/PCB 分解菌に保存されており、*bph* 遺伝子とともに水平伝搬していることを示唆した。

KF707 株の *orf0* に Tc^R を導入して *orf0* を破壊した菌株は、ビフェニル資化能を失い、BP から環開裂黄色化合物を蓄積した。また *orf0* 破壊株は BphX0、X2、D の活性は存在せず、ビフェニル代謝系酵素の発現に影響が生じた。*orf0* 破壊株と KF707 株の *bph* 遺伝子をトランスポゾン Tn5-B21 により遺伝子破壊した菌株のビフェニル代謝系酵素活性の比較検討から、KF707 株 *bphABC* 遺伝子と *bphX0X1X2X3D* 遺伝子の発現は異なる転写開始点からの転写によるものと考えられ、*orf0* はそのうち *bphX0X1X2X3D* 遺伝子の転写および発現に関与しているものと考察した。

以上の結果から KF707 株には LB400 株の *orf0* と相同性を示す ORF が存在し、ビフェニル代謝系酵素の発現調節に関与している遺伝子コンポーネントであるものと考察した。

5・5 小 括

P. pseudoalcaligenese KF707 株の *bphA1* の上流 1.6 kb の塩基配列を決定した。その結果、LB400 株の *orf0* と同じ 738 bp からなり、アミノ酸レベルで 80.0 % の高いホモロジーを示す読み枠 *orf0* の存在が認められた。しかし LB400 株の *bph* 遺伝子の *orf0* の転写開始領域を含む約 40 bp 上流からは塩基配列の相同性は全く認

められなかった。LB400 株の *orf0* の DNA 塩基配列よりプライマーを合成し、各種のビフェニル/PCB 分解菌の染色体 DNA を鋳型にして PCR により、11 菌株のうち KF707 株のビフェニル代謝遺伝子群と同一か極めて類似している菌株 5 株に *orf0* をコードする DNA 断片の増幅が認められ、ビフェニル/PCB 分解菌に広く *orf0* が存在することが明らかとなった。

次に KF707 株の *orf0* に Tc^R を導入して構築した *orf0* 破壊株は、BP を唯一の炭素源として生育することができず、また BP から環開裂黄色化合物を生成し、蓄積することを確認した。さらに、*orf0* 破壊株に KF707 株の *bph* 遺伝子 *bphD* を広宿主域ベクターにより導入、発現した菌株は BP を唯一の炭素源として生育することを確認した。

一方、KF707 株の *bph* 遺伝子をトランスポゾン Tn5-B21 により遺伝子破壊を行った菌株 KF733 株 (KF707 *bphA* :: Tn5-B21) は BphA (Biphenyl dioxygenase)、BphB (Biphenyl dihydrodiol dehydrogenase)、BphC (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase)、KF744 株 (KF707 *bphB* :: Tn5-B21) は BphB、C、KF748 株 (KF707 *bphC* :: Tn5-B21) は BphC の酵素活性が認められなかったが、BphX0 (GST)、BphX2 (ADH)、BphD (HPDA) の活性は認められた。しかし、*orf0* 破壊株については BphA、B、C の酵素活性は存在したが、BphX0、X2、D の活性は認められなかった。

以上の結果から、KF707 株には LB400 株の *orf0* と相同性を示す Open reading frame *orf0* が存在し、ビフェニル代謝系酵素の発現調節に関与しているものと考えした。

Table 5-1 Bacterial strains used in this chapter

strain and plasmid	Relevant description	Source or reference
Strain		
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1</i>	Takara shuzo
S17-1	<i>pro, thi, recA, hsdR,</i> chromosomally integrated RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	(98)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>		
KF707	wild type, BP ⁺	(39)
KF7095	<i>orf0</i> :: Tc ^r , BP ⁺	This study
KF7131	pKFD330, Sm ^r	
<i>Pseudomonas putida</i>		
KF715	wild type, BP ⁺	(60)
KF7065	<i>bphD</i> :: Tn5-B21, Tc ^r , BP ⁺	(30)
<i>Pseudomonas fluorescence</i>		
KF703	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>		
Q1	wild type, BP ⁺	(38)
<i>Pseudomonas cepacia</i>		
LB400	wild type, BP ⁺	(14)
<i>Pseudomonas</i> sp.		
KF710	wild type, BP ⁺	(29)
KF712	wild type, BP ⁺	(29)
KF714	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		
KF701	wild type, BP ⁺	(29)
Unidentified strain		
KF709	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Alcaligenes</i> sp.		
KF711	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Moraxella</i> sp.		
KF704	wild type, BP ⁺	(29)
<i>Rhodococcus</i> sp.		
M5	wild type, BP ⁺	(37)
Plasmid		
pUC118	Ap ^r	(120)
pSUPB30	Tc ^r , Gm ^r , Cm ^r	(98)
pSUPB101	<i>orf0</i> :: Tc ^r :: <i>bphA1</i> (KF707) in pSUPB30, Tc ^r , Gm ^r , Cm ^r	This study
pKFD330	<i>bphD</i> (KF707) in pKF330, Sm ^r	
pKTF18	<i>bphA1A2A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	(109)
pUKF18	<i>orf0bphA1A2A3A4BC</i> in pUC19, Ap ^r	This study

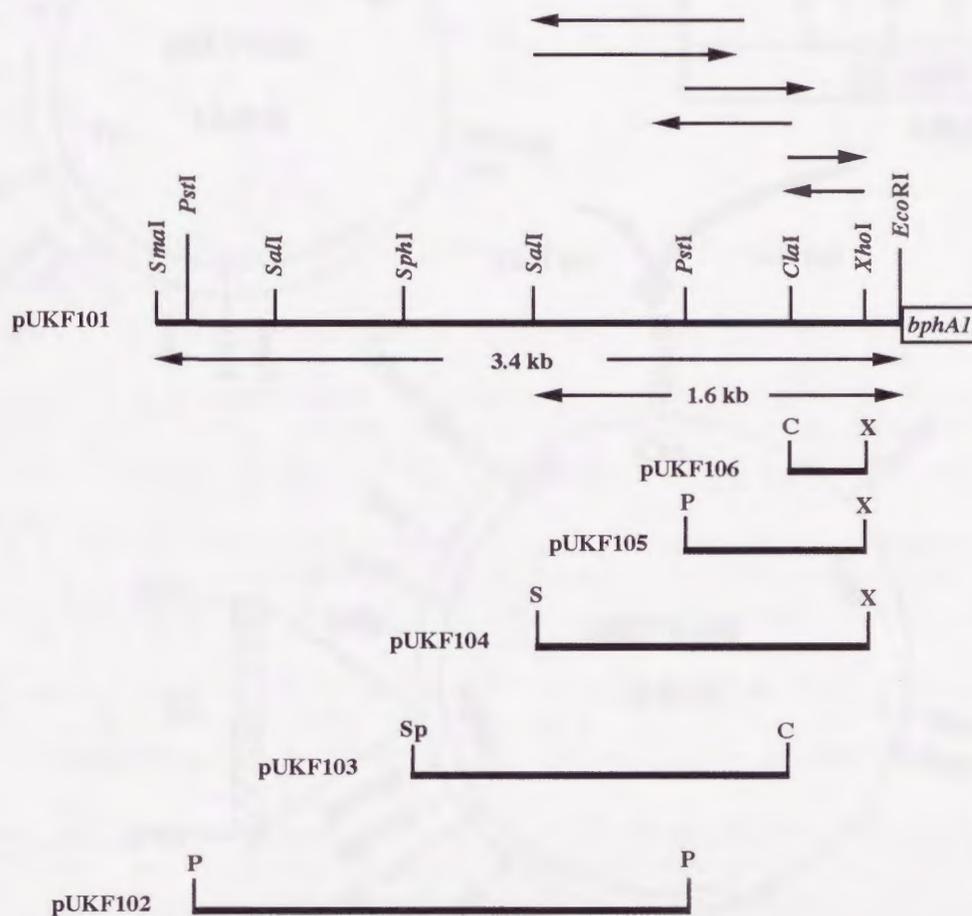


Fig. 5-1 Restriction endonuclease maps and sequencing strategies for the upstream of *P. pseudoalcaligenes* KF707 *bphA1*

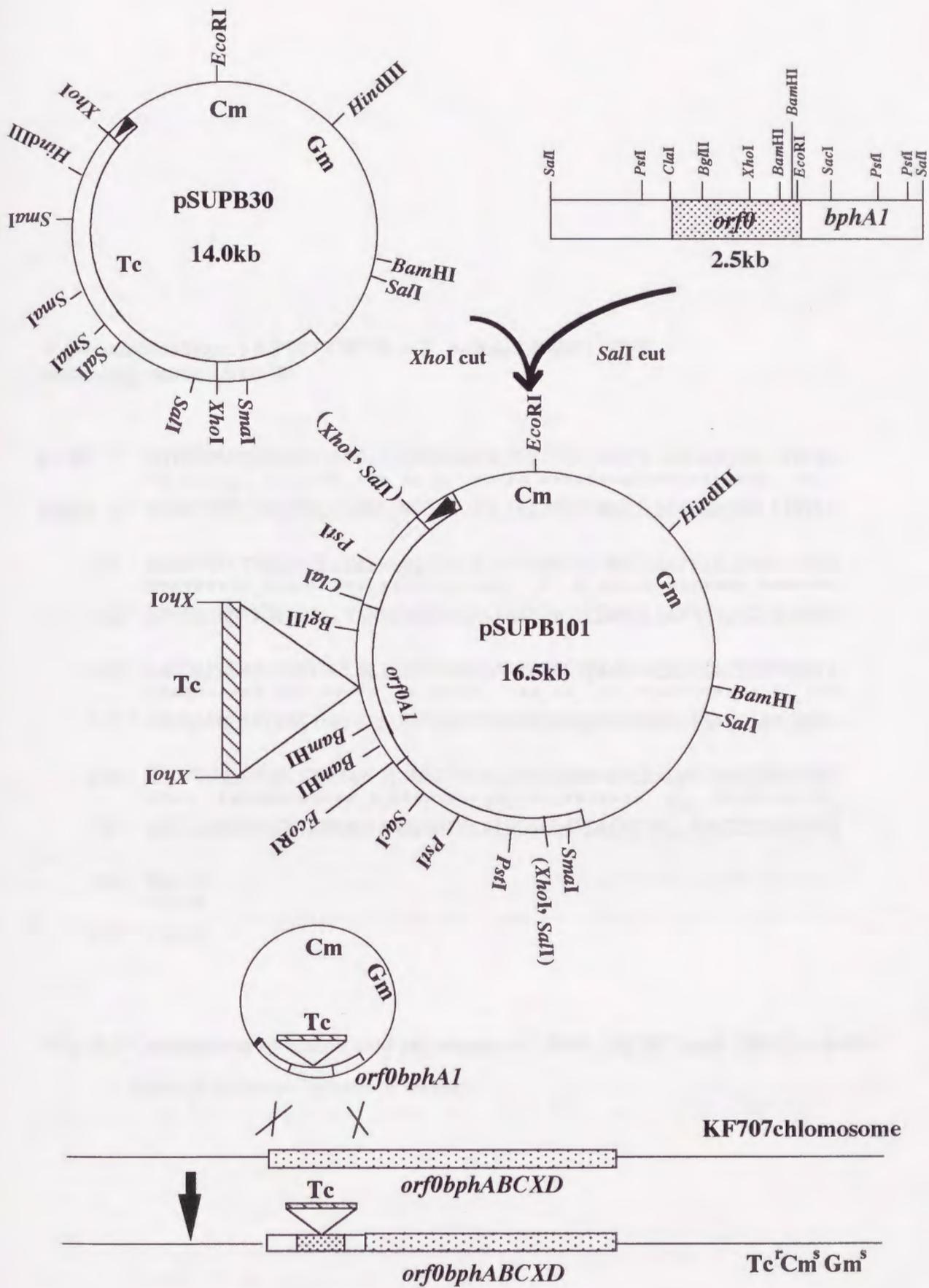


Fig. 5-2 Distrupction of *orf0* in *bph* operon of *P. pseudoalcaligenes* KF707

P. pseudoalcaligenes KF707 ORF0 vs *P. putida* LB400 ORF0

Homology score : 80.0 %

```
KF707 1' MNTRTPSGVAMAGEKSFSDASTVPRAKMRSLEIVTFQRLRADIVEGRLAAGSRLGVEDLK
** .*** . . . . * . * .*** .*** .** * .***** .***** .***** .*****
LB400 1" MNARTPNSLTMGGDKSFADASPVIANVRSLEATFQRLRADIVEGRLAAGSRLAIEDLK

61' SRYEVSGGTMREALSLLVAENLVQTQAQRGFPCDPNVLGDMRDLAATRIALESEALRQSV
***** .***** .***** .***** . * * .***** .*****
61" SRYEVSGGTVREALSLLVANNLVQTQAQRGFHVTPMSLDDMRDLAATRIALECEALRQSV

121' LNGDAWEARIVSSFHRLSLIEEPTMRDPARWFNEWEPVNRGFHEALISACSSVWIRRF
***** .*** .***** . * .***** . * . * . * .***** . * .***
121" LNGDAWEARVVSSYHRLSLLDERTMRDPVHLFNQWEQANRDFHEALISACSSAWTQRFL

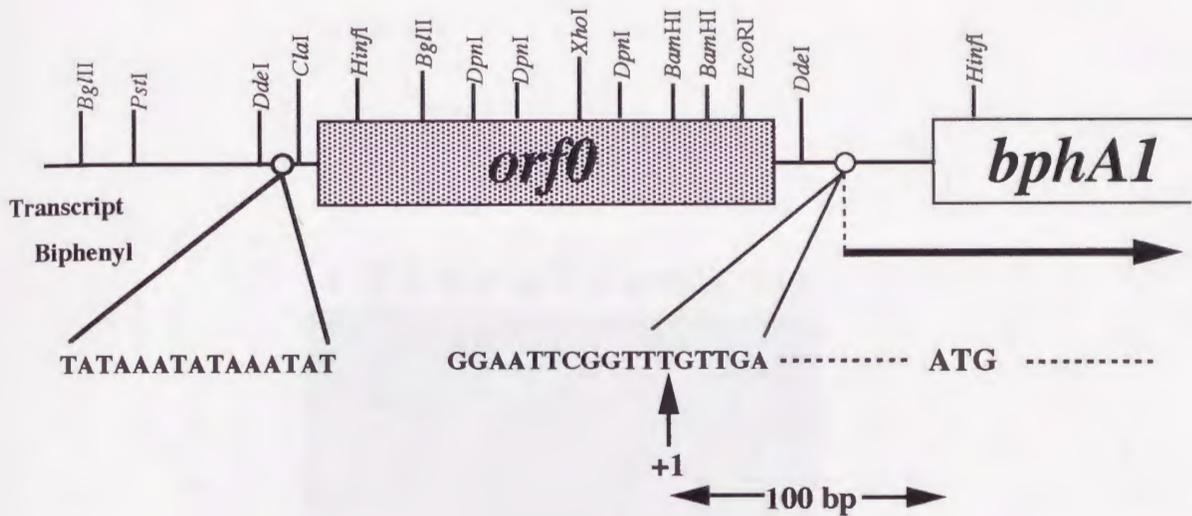
181' SILYVHMERYRRLTAMHNPPTNRVHEEHLALRDSALARDAERCAALMAEHIESSISVVR
**** .***** . * .***** .***** . * .*****
181" SILYLQMERYRRLTAMHNRPARNVHEEHLALRDSALARDAERCTELLRMHIESSISVVRQ

241' FGLLR
*****
241" FGLLR
```

Fig. 5-3 Comparison of amino acid sequences of ORF0 (KF707) and ORF0 (LB400)

Identical residues are indicated by asterisks

P. pseudoalcaligenes KF707



P. cepacia LB400

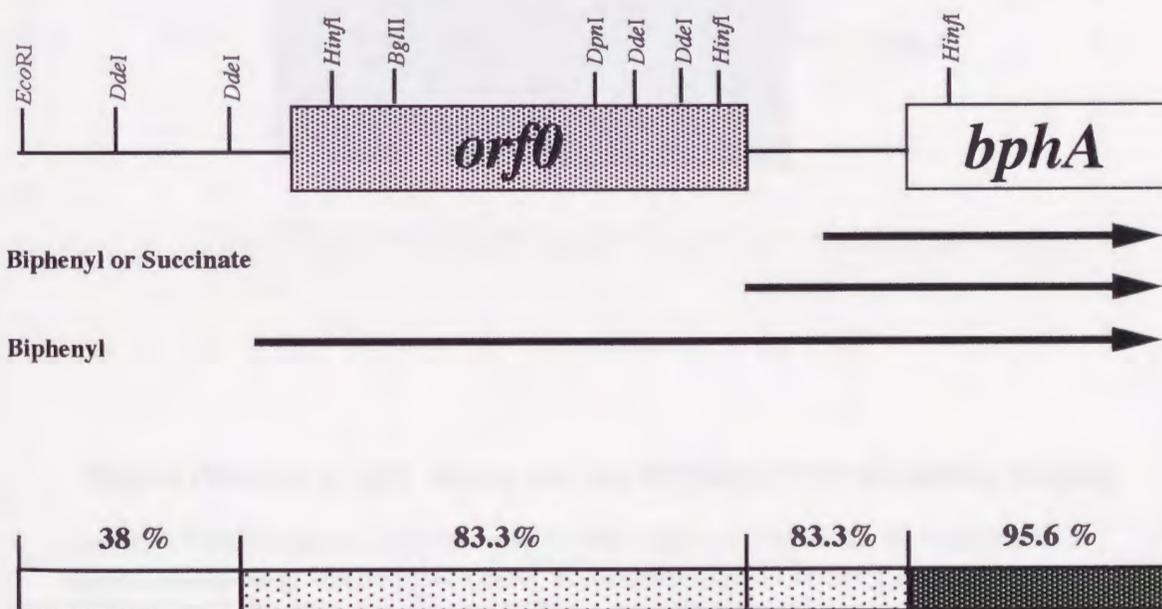


Fig.5-4 Comparison of *bphA1* upstream region between KF707 *bph* operon and LB400 *bph* operon

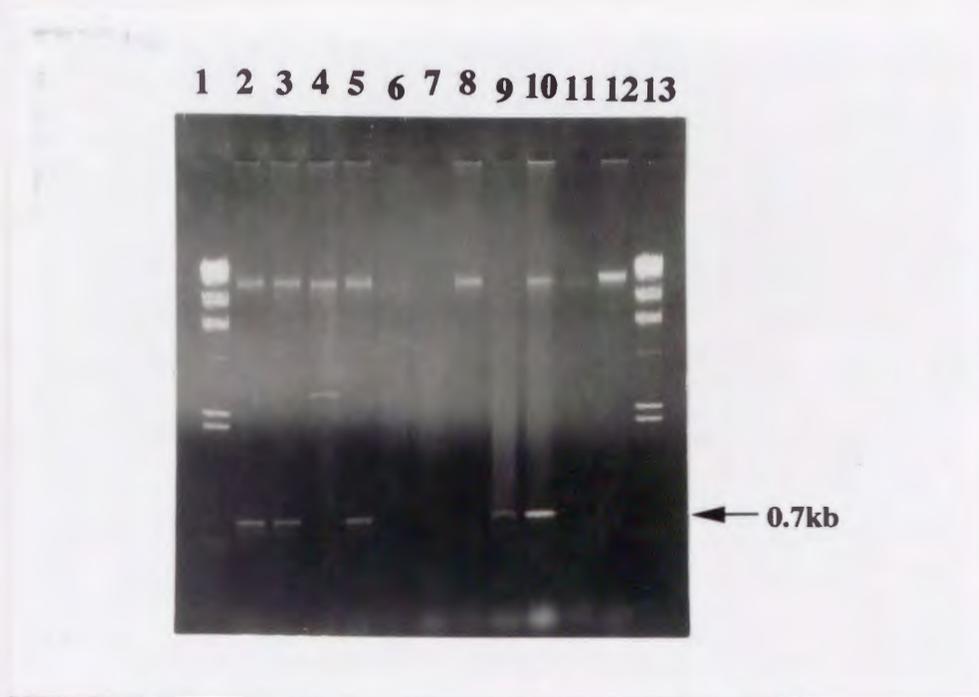


Fig.5-5 Presence of *orf0* among various Biphenyl / PCB degrading bacteria

Lane 1, λ /HindIII ; Lane 2, *Achromobacter* KF701; Lane 3, *Pseudomonas* sp. strain KF703;
 Lane 4, *Moraxella* sp. strain KF704; Lane 5, *P. pseudoalcaligenes* KF707; Lane 6, Unidentified strain
 KF709; Lane 7, *Pseudomonas* sp. strain KF710; Lane 8, *Pseudomonas* sp. strain KF712; Lane 9,
Pseudomonas sp. strain KF714; Lane 10, *P. putida* KF715; Lane 11, *P. paucimobilis* Q1; Lane 12,
Arthrobacter sp. strain MS; Lane 13, λ / HindIII

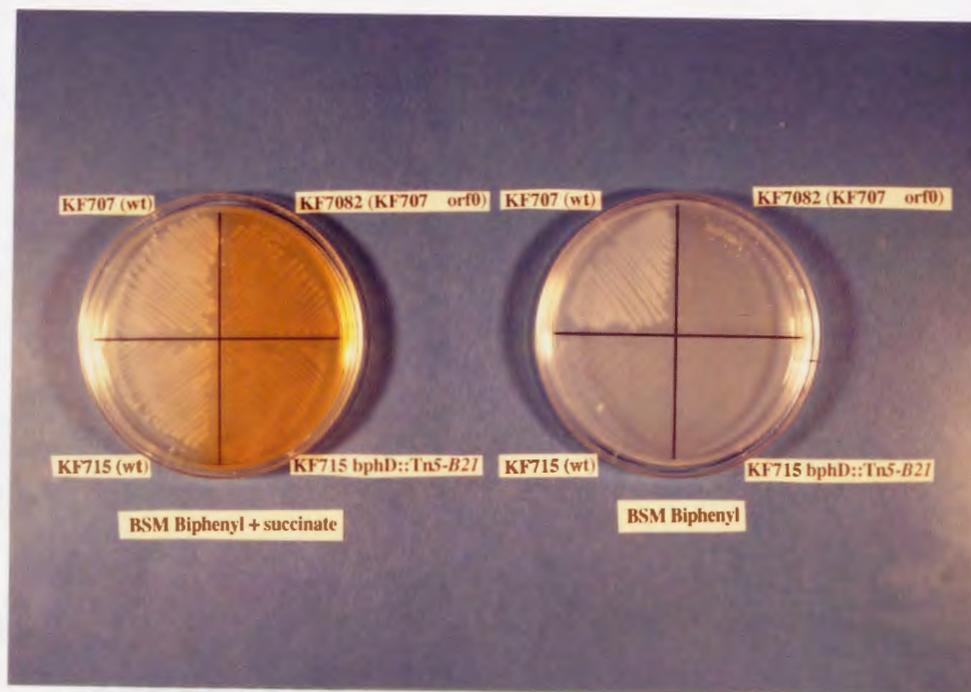


Fig.5-6 Growth on biphenyl of *P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. putida* KF715 and their mutants

BSM biphenyl + Succinate; Basal salt medium containing succinate and biphenyl vapor,
 BSM biphenyl; Basal salt medium containing biphenyl vapor

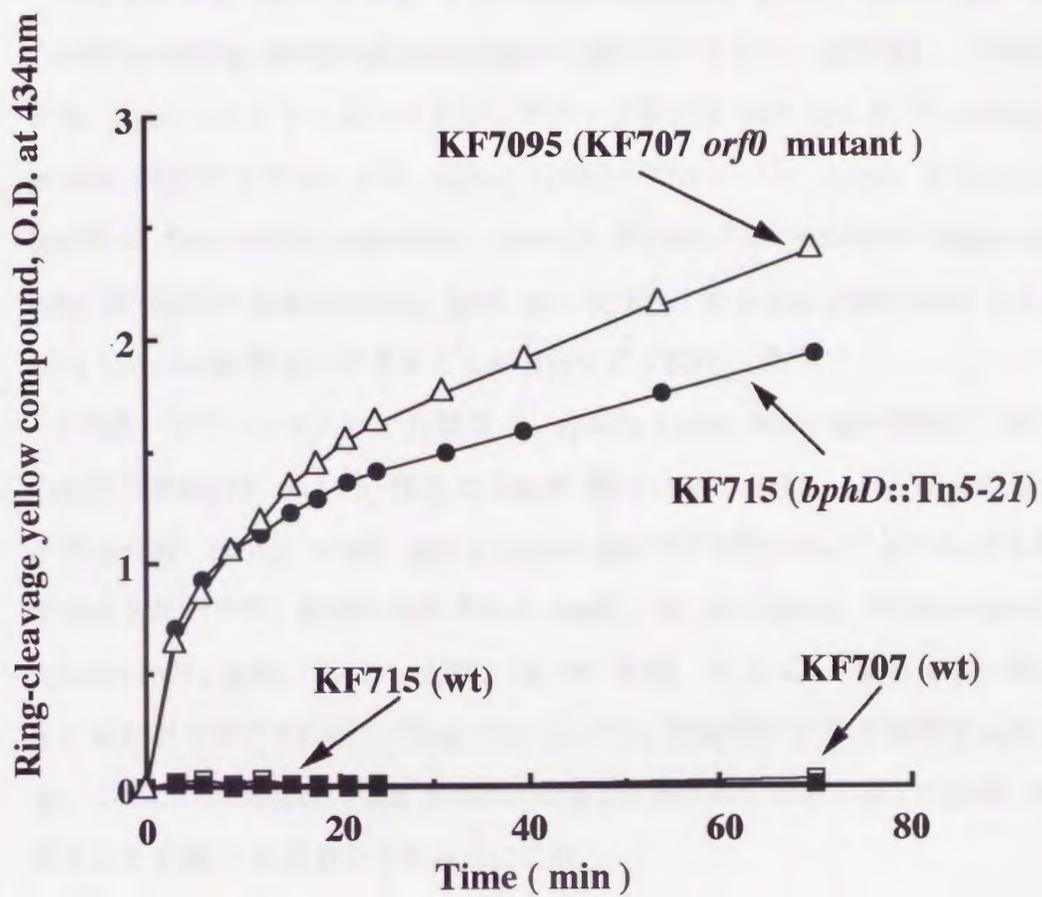


Fig.5-7 Production of the ring cleavage yellow compound by *orf0*-distrupted strain of *P. pseudoalcaligenes* KF707

6・1 緒言

ビフェニル/ PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 遺伝子は (*orf0*)*bphA1A2*(*orf3*)*A3A4BCXOX1X2X3D* の遺伝子クラスターを形成し、その塩基配列から *bphA1* はビフェニルジオキシゲナーゼ複合系 (BP Dox) の terminal dioxygenase 成分大サブユニット、*bphA2* は同小サブユニット、*bphA3* は ferredoxin、*bphA4* は ferredoxin reductase、*bphB* は Biphenyl dihydrodiol dehydrogenase、*bphC* は 23DHBP dioxygenase、*bphD* は 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid hydrolase をコードすることが明らかにされた。^(28,109)

その後、ビフェニル/ PCB 分解菌 *P. cepacia* LB400 株の *bph* 遺伝子 (*orf0*)*bphAE* (*orf1*)*FGBCKHJID* (以下、便宜上 LB400 株の *bphA*、*bphE*、*orf1*、*bphF*、*bphG* 遺伝子を *bphA1*、*bphA2*、*orf3*、*bphA3*、*bphA4* 遺伝子と表記する。) についても塩基配列が決定され^(20,64,65)、KF707 株のそれと BphA1, 95.6%; BphA2, 99.5%; BphA3, 100%; BphA4, 100%; BphB, 99.3%; BphC, 99.7%; BphD, 97.6 % の極めて高い相同性を示すことが明らかにされた。(Fig.6-1) しかし、両菌株の PCB 分解特性は大きく異なり、このことは両菌株の塩素置換部位の異なる芳香環に対する酸素添加能力の差異によることを第 2 章において明らかにした。

本章では両菌株のビフェニル代謝系をコードする遺伝子コンポーネント間で比較的相同性の低い *orf0* と *bphA1* 遺伝子を相互に交換したハイブリッド遺伝子クラスターを構築し、ハイブリッド代謝系酵素を発現する大腸菌による各種 PCB 異性体からの環開裂黄色化合物への変換活性の測定と PCB 分解産物の同定を行い、両菌株の PCB 分解特性の差異に関与する遺伝子コンポーネントの特定を試みた。

6・2 実験材料および方法

(1) PCR 法による *orf0* の増幅

P. pseudoalcaligenes KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の *orf0* のクローニングは PCR (Polymerase chain reaction) 法による DNA 断片の増幅により行った。増幅には *orf0* の上流の forward 鎖の 5' 末端に *EcoRI* サイト (下線) と *Sac I* サイト (点線) を付したオリゴプライマー #3 (5' -TTGAATTC GAGCTCATG AATGCGAGA ACTCC -3') と *orf0* の下流の reverse 鎖の 5' 末端に *EcoRI* サイト (下線) と *Sac I* サイト (点線) を付したオリゴプライマー #4 (3' -CCTCTGCAATTTA GTA CTCGAG CTTAAG AG -5') を用いた。PCR 法に使用したオリゴヌクレオチドは、5・2 節 (4) に示す方法に従って合成した。KF707 株 *orf0* の鋳型 DNA として (*orf0*)*bphA1A2*(*orf3*)*A3A4BC* を含む pUKF18 を使用した。また LB00 株 *bphA1* 遺伝子の鋳型 DNA として General Electric 社 Research and Development center より供与を受けた pGEM453⁽²⁰⁾ を使用した。*orf0* の増幅反応は 10 X PCR buffer (宝酒造)、0.05 μ g の鋳型 DNA と 100 μ M の dNTP、1 μ M のオリゴヌクレオチドプライマー #3 と #4、および 0.5 U の *Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems) を含む 50 μ l の反応液中で行った。*orf0* の増幅反応は 5・2 節 (4) に示す方法に従って行った。

(2) ハイブリッド遺伝子クラスターの構築

ハイブリッド遺伝子クラスターおよび野生型の KF707 株由来の *bph* 遺伝子、LB400 株由来の *bph* 遺伝子を挿入断片として持つプラスミド、pHKF101、pHKF102、pHKF103、pHKF104 構築の手順を以下に示した。

pHKF101 は pKTF18 の *Sac I* 断片と上記の方法によりクローニングした KF707 株由来の *orf0* を含む *Sac I* 断片を交換することにより構築した。

pHKF102 は pKTF18 の *Sac I* 断片と上記の方法によりクローニングした LB400 株由来の *orf0* を含む *Sac I* 断片を交換することにより構築した。

pHKF103 は pKTF18 からマルチクローニングサイトに存在する *Bam*HI サイトと *bphA1* 遺伝子の終止コドンと *bphA2* 遺伝子の開始コドンの間に存在する *Bgl*III サイトを利用して *bphA1* を含む *Bam*HI-*Bgl*III 断片と LB400 株の *orf0* と *bphA1* 遺伝子を含む pGEM453 由来の *Bgl*III 断片を交換することにより構築した。

pHKF104 は pGEM455⁽²⁰⁾ より *bphA2A3A4BC* 遺伝子を含む *EcoRI*-*SacI* 断片を

pUC118の *EcoRI*-*SacI* サイトに導入し、pHKF141 を構築し、さらに pHKF141 の *EcoRI* サイトに pGEM453 から *orf0* および *bphA1* 遺伝子を含む *EcoRI* 断片を挿入して構築した。(Fig.6-2)

(3) ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子の構築

pHKF11、pHKF12、pHKF13、pHKF14 はそれぞれ pHKF101、pHKF102、pHKF103、pHKF104 にコードする *bphB* と *bphC* 両遺伝子の一部を含む 1.3 kb の *PpuMI*-*PpuMI* 断片を欠失することにより構築した。(Fig.6-2)

(4) ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌の環開裂ジオキシゲナーゼ活性の測定

23DHBP dioxygenase 活性測定は以下の手順に従って行った。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に 23DHBP (和光純薬工業) を 100 μ M になるように溶解した反応液 2 ml に示した方法で調製した粗抽出液 20 μ l を添加して 25°C で 1 分間、分光光度計 (UV-2200、島津製作所) にセットしたセル内でインキュベートした。環開裂化合物の生成をそれぞれの吸収極大波長における吸光度によりそれぞれ測定した。基質から生成した環開裂化合物の測定波長及び分子吸光係数は、434 nm、13.200 (23 DHBP)⁽⁶⁵⁾ を用いた。なお、1分間に 1 μ mole の環開裂化合物を生成する酵素活性を 1 unit とした。

(5) PCB に対する環開裂黄色化合物への変換活性の検討

4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。使用した菌株は上記に示す通りである。

ハイブリッド遺伝子クラスターおよび野生型のビフェニル代謝遺伝子保有大腸菌菌体を用いて、PCB に対する環開裂黄色化合物変換活性を測定した。使用した菌株は上記に示す通りである。上記の菌株を 30 μ g/ml AP および 40 μ g/ml IPTG を含む LB 培地 100 ml 中で OD₆₆₀ が約 3 になるまで培養し、4,000 rpm、10 分間の遠心分離によって集菌した。これを 100 ml の 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に懸濁

し、再び同条件で集菌した。さらに、 OD_{660} が 1.0 になるように同緩衝液中に懸濁し、これを静止菌体として以後の実験に使用した。100 ml 三角フラスコ中に 20 ml の静止菌体を分注し、エタノール中に溶解または希釈した 4,4'-CB または 2,5,4'-CB (5 mg/ml) を終濃度 20 ppm になるように添加した。30℃ 下、回転振とう機上で振とうし、経時的に 1 ml の懸濁液をあらかじめ 100 μ l の 100 mM EDTA (pH 8.0) を分注したエッペンドルフチューブに移した。これを、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して菌体を除去した。上清の吸光度変化を測定し、環開裂黄色化合物生成の有無を調べた。各基質に対する環開裂化合物の生成は、4,4'-CB に対して 412 nm、に対して 2,5,4'-CB に対して 398 nm の各波長で測定した。

(6) PCB 分解活性の測定

ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼおよび野生型のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌菌体による PCB 分解活性を測定した。使用した菌株は上記に示す通りである。

上記の菌株を 30 μ g/ml Ap、40 μ g/ml IPTG を含む LB 培地 100 ml 中で OD_{660} が約 3 になるまで培養し、4,000 rpm、10 分間の遠心分離によって集菌した。これを 100 ml の 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に懸濁し、再び同条件で集菌した。さらに、 OD_{660} が 1.0 になるように同緩衝液中に懸濁し、これを静止菌体として以後の実験に使用した。100 ml 三角フラスコ中に 20 ml の静止菌体を分注し、エタノール中に溶解した 4,4'-CB、2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB (5 mg/ml) を終濃度 20 ppm になるように添加した。回転振とう機上で 30℃ 24 時間振とうし、濃塩酸を添加して酸処理したのち (pH 1.0)、5 ml の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後に、遠心濃縮機 (アトー) により酢酸エチルを蒸発させた。残った固体を少量の酢酸エチルに溶解し、N,O-bis-(trimethylsilyl)-acetamide (BSA, 東京化成工業) を加えて trimethylsilyl (TMS) 化し、1 μ l を GC-MS (QP-5000, 島津製作所) に供した。担体は silicon OV-1 (ジーエルサイエンス) を用い、カラムは 140℃ から 300℃ まで 10℃/min で昇温した。

6・3 実験結果

6・3・1 ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌による環開裂ジオキシゲナーゼ活性

野生型の KF707 株の *bph* 遺伝子およびハイブリッド遺伝子クラスター pHKF101 保有大腸菌菌体による BphC (23DHP dioxygenase) の 23DHP に対する酵素活性の測定を行った。ハイブリッド遺伝子クラスターを含む pHKF102、pHKF103、pHKF104 保有する大腸菌菌体は、野生型の KF707 株の *bph* 遺伝子を含む pHKF101 を保有する大腸菌菌体と大きな相違は認められなかった。従って、遺伝子クラスターの組換えによって、*bphC* 遺伝子の発現レベルには影響が生じていないことを確認した。(Table 6-2)

Table.6-2 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase activity in *E.coli* cells expressing wild type *bph* gene cluster or hybrid gene clusters

Plasmid	Activity (mU / mg of protein)
	2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase
pHKF101	2029
pHKF102	1984
pHKF103	3062
pNKF104	3669

6・3・2 ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌による PCB に対する環開裂黄色化合物への変換活性

ハイブリッド遺伝子クラスター保有大腸菌の静止菌体による 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性を調べた結果を Fig.6-3 に示した。

orf0bphA1A2A3A4BC (KF707) を含む pHKF101、*orf0* (LB400)*bphA1A2A3A4BC* を含む pHKF102 保有大腸菌の静止菌体は 4,4'-CB を迅速に分解し、環開裂黄色化合物へと変換したが、*orf0bphA1* (LB400)*A2A3A4BC* を含む pHKF103、*orf0bphA1A2A3A4BC* (LB400) を含む pHKF104 保有大腸菌の静止菌体は 4,4'-CB からの環開裂黄色化合物へと変換は認められなかった。また、pHKF101、pHKF102 保有大腸菌の静止菌体は 2,5,4'-CB を迅速に分解し、環開裂黄色化合物へと変換したが、pHKF103、pHKF104 保有大腸菌の静止菌体は 2,5,4'-CB から環開裂黄色化合物への変換はほとんど認められなかった。

以上のように *P. pseudoalcaligenes* KF707 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (BphA1) をコンポーネントの一部とする BphA1A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性は大きく、一方 *P. cepacia* LB400 株 ビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (BphA1) をコンポーネントの一部とする BphA1 (LB400)A2A3A4BC および BphA1A2A3A4BC (LB400) を発現する大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対する環開裂黄色化合物への変換活性はほとんど認められなかった。

6・3・3 ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌による PCB 分解特性

ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌の静止菌体による 4,4'-CB、2,5,2',5'-CB に対する分解特性を調べた結果を Fig.6-4、5 に示した。

KF707 株 *orf0bphA1A2A3A4* (KF707) を含む pHKF11 およびハイブリッドジオキシゲナーゼ遺伝子 *orf0* (LB400)*bphA1A2A3A4* (KF707) を含む pHKF12 を保有する大腸菌は共に 4,4'-CB から分解産物として芳香環の 2,3 位へ酸素が添加した 4,4'-dichloro-hydroxybiphenyl を生成した。一方、*P. cepacia* LB400 株のビフェニルジ

オキシゲナーゼ遺伝子 *orf0bphA1A2A3A4* (LB400) を含む pHKF14 およびハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *orf0bphA1* (LB400)*A2A3A4* (KF707) を含む pHKF13 を保有する大腸菌による 4,4'-CB からの分解産物は認められなかった。(Fig. 6-6) さらに、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *orf0 bphA1A2A3A4* (KF707) を含む pHKF11 およびハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *orf0* (LB400)*bphA1A2A3A4* (KF707) を含む pHKF12 を保有する大腸菌による 4,4'-CB からの分解産物は認められなかったのに対し、*P. cepacia* LB400 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *orf0bphA1A2A3A4* (LB400) を含む pHKF14 およびハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *orf0bphA1* (LB400)*A2A3A4* (KF707) を含む pHKF13 を保有する大腸菌は、共に分解産物として 2,5-dichlorophenyl ring の 3,4 位へ酸素が添加した 2,5,2',5'-tetrachloro-hydroxybiphenyl と 4-chlorophenyl ring の 2,3 位へ酸素が添加して脱塩素化した 5(or 2),2',5'-trichloro-2,3(or 5,6)-dihydroxy biphenyl を生成した。

6・4 考 察

KF707 株 BP Dox を発現する大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB を迅速に環開裂黄色化合物へ分解したのに対し、LB400 株 BP Dox を発現する大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB を環開裂黄色化合物へ分解せず、ともに野生型のビフェニル/PCB 分解菌と類似した変換活性を示した。

また KF707 株 BP Dox を発現する大腸菌は 4,4'-CB に対して分解活性を示したが、2,5,2',5'-CB に対して分解活性を示さず、また LB400 株 BP Dox を発現する大腸菌は 4,4'-CB に対して分解活性を示さないが、2,5,2',5'-CB に対して分解活性を示した。以上の結果から、両菌株の PCB 分解特性にはビフェニル代謝系酵素が関与することを明らかにした。

ハイブリッド代謝系 *BphA1* (LB400)*A2A3A4* (KF707) を発現する大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して LB400 株 BP Dox を発現する大腸菌と同じく、2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位または 3,4 位へ酸素を添加した分解産物を生成した。この

ことから BP Dox の大サブユニット BphA1 が PCB 分解特性に関与していることを明らかにした。

Haddock らは LB400 株の BP Dox による 3-CB、2,2'-CB、2,5,2'-CB、3,3'-CB に対する酸素添加部位について調べ、2,5-dichlorophenyl ring とともに phenyl、2-chlorophenyl、3-chlorophenyl ring の 2,3 位または 3,4 位へ酸素を添加することができることを示し、PCB 異性体の芳香環の塩素置換部位と BP Dox の酸素添加部位との相関関係について明らかにした。⁽⁵⁰⁾ 今回の結果はそのような PCB 異性体の芳香環の塩素置換部位と BP Dox の酸素添加能力との相関関係が BP Dox の大サブユニット BphA1 により決定されていることを示している。

一方、KF707 株と LB400 株の BphA1 間には 19 アミノ酸配列の相違と 1 つのアミノ酸残基の欠失が存在する。(Table 1-2) それらの相違のいくつかが起因となって BP Dox の塩素置換部位の異なる芳香環に対する酸素添加能力の差異を生じ、両菌株の PCB 分解特性を生じているものと考察した。

6・5 小 括

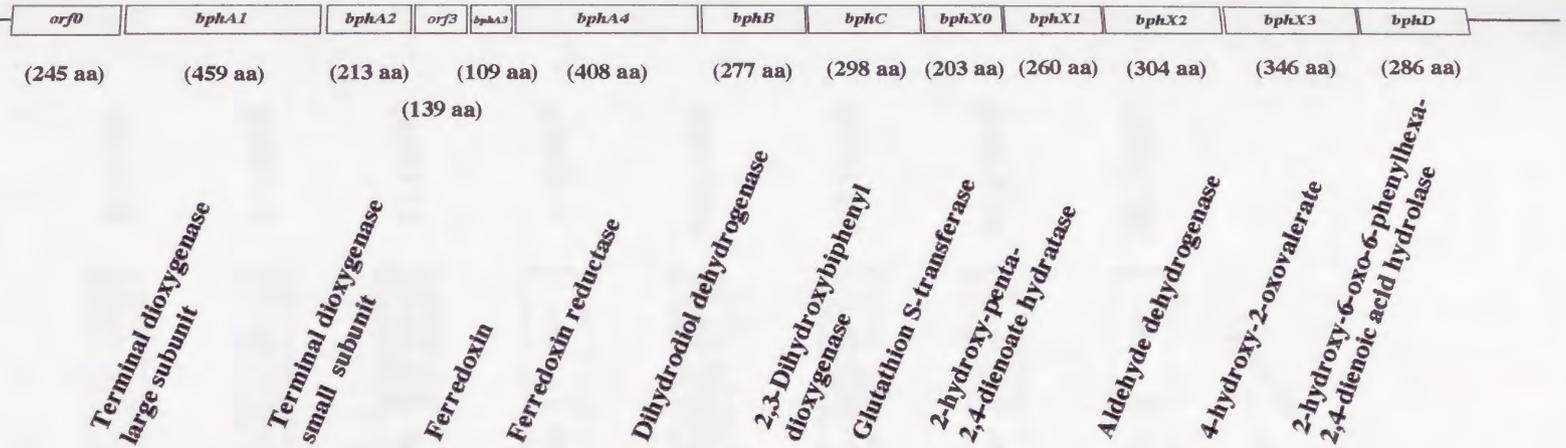
両菌株の BP Dox の機能特性を明らかにすることを目的として KF707 株と LB400 株の *bph* 遺伝子のコンポーネント間で比較的相同性の低い *orf0* と *bphA1* を相互に交換し、種々のハイブリッド遺伝子クラスターを構築した。

そのうちハイブリッド代謝系 BphA1 (LB400)A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は、LB400 株のビフェニル代謝系を発現する大腸菌と同様に 4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して環開裂黄色化合物変換活性は認められなかった。一方、KF707 株のビフェニル代謝系を発現する大腸菌は 2,5,2',5'-CB に対して分解活性を示さなかったが、ハイブリッド代謝系 BphA1 (LB400)A2A3A4 (KF707) を発現する大腸菌はそれを分解し、LB400 株のビフェニル代謝系を発現する大腸菌と同じく、2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位または 3,4 位へ酸素が添加した分解産物を生成した。以上の結果から BP Dox の大サブユニット BphA1 が各種芳香族化合物の分解特性に関与しているものと考察した。

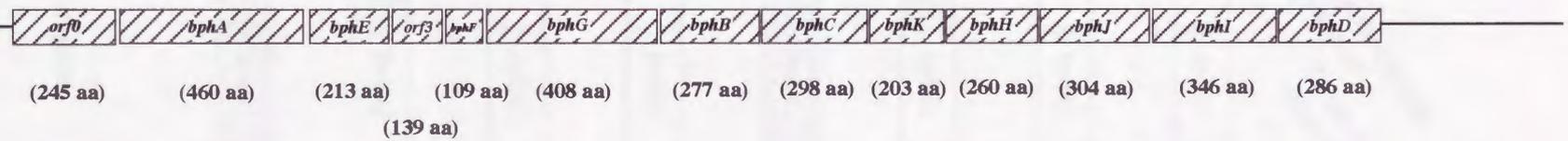
Table 6-1 Plasmids used in this chapter

Plasmid	Relevant description	Source or reference
pUC118	Ap ^r	(98)
pGEM453	<i>orf0bphA1</i> in pUC18, Ap ^r	(20)
pGEM455	<i>bphA2A3A4BCX0X1X2X3D</i> in pUC18, Ap ^r	(20)
pKTF18	<i>bphA1A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	(109)
pHKF11	<i>orf0bphA1A2A3A4</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF12	<i>orf0</i> (LB400) <i>bphA1A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF13	<i>orf0bphA1</i> (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF14	<i>orf0bphA1A2A3A4</i> (LB400) in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF101	<i>orf0bphA1A2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF102	<i>orf0</i> (LB400) <i>bphA1A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF103	<i>orf0bphA1</i> (LB400) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pHKF104	<i>orf0bphA1A2A3A4BC</i> (LB400) in pUC118, Ap ^r	This study

KF707 *bph* operon



LB400 *bph* operon



84

Identity : 80.0 95.6 99.5 99.3 100 100 99.3 99.7 99.5 99.2 100 99.4 97.6

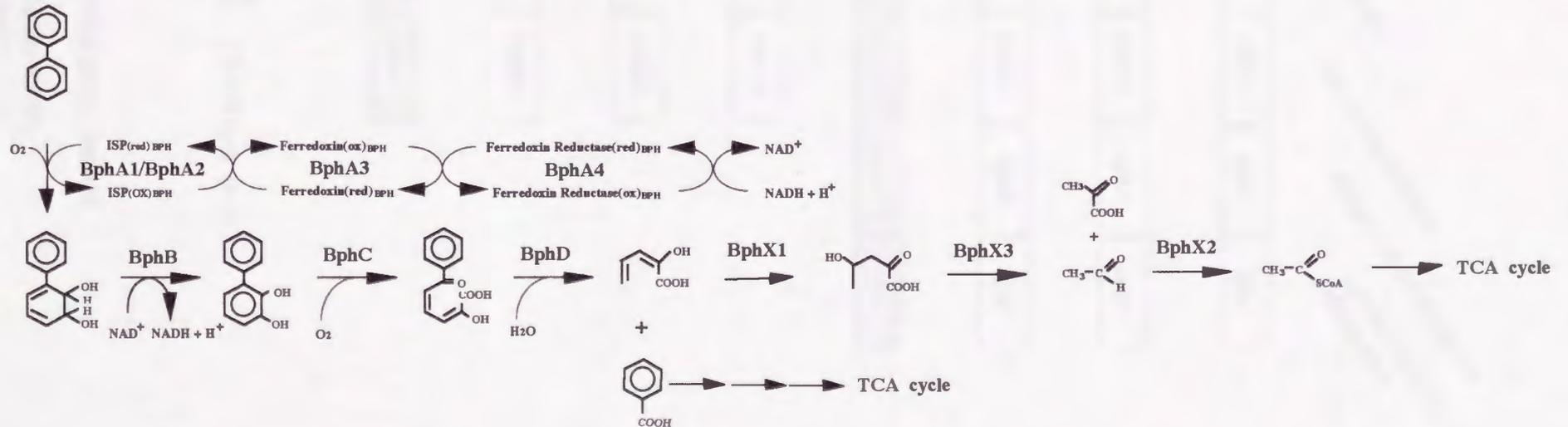


Fig. 6-1 Biphenyl catabolic pathway by *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400 and organizations of their *bph* operons



Fig.6-2 Schematic representation of hybrid gene clusters.

Open boxes show *bph* genes from *P. pseudoalcaligenes* KF707,
shaded boxes show *bph* genes from *P. cepacia* LB400.

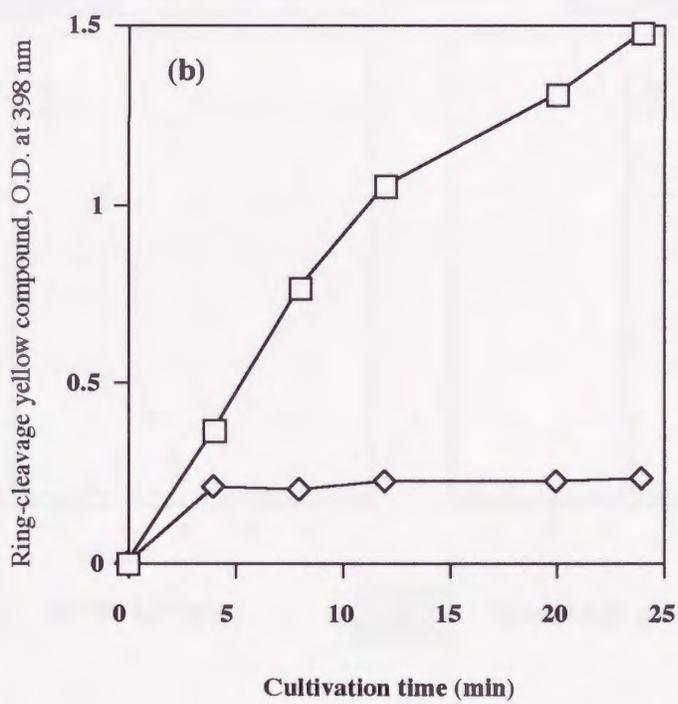
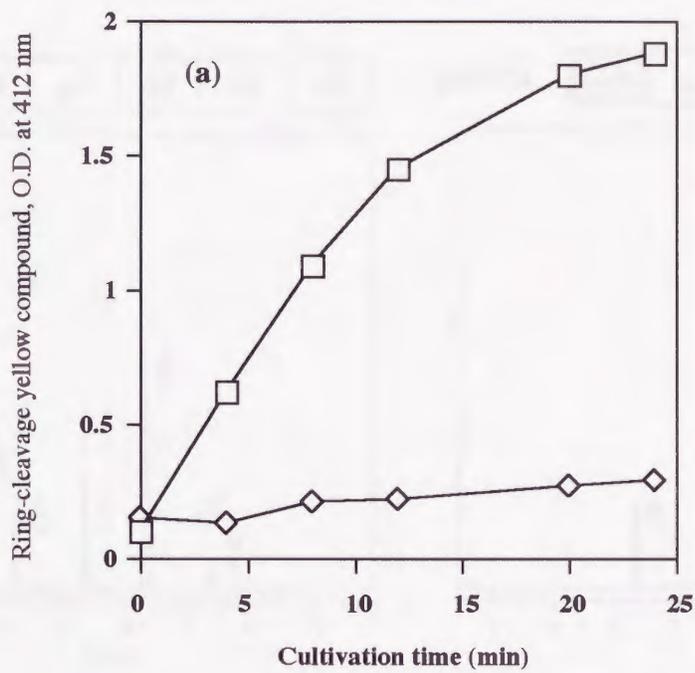


Fig.6-3 Degradation of (a) 4,4'-dichlorobiphenyl and (b) 2,5,4'-trichlorobiphenyl by *E.coli* carrying pHKF101(□) or pHKF102(◇)

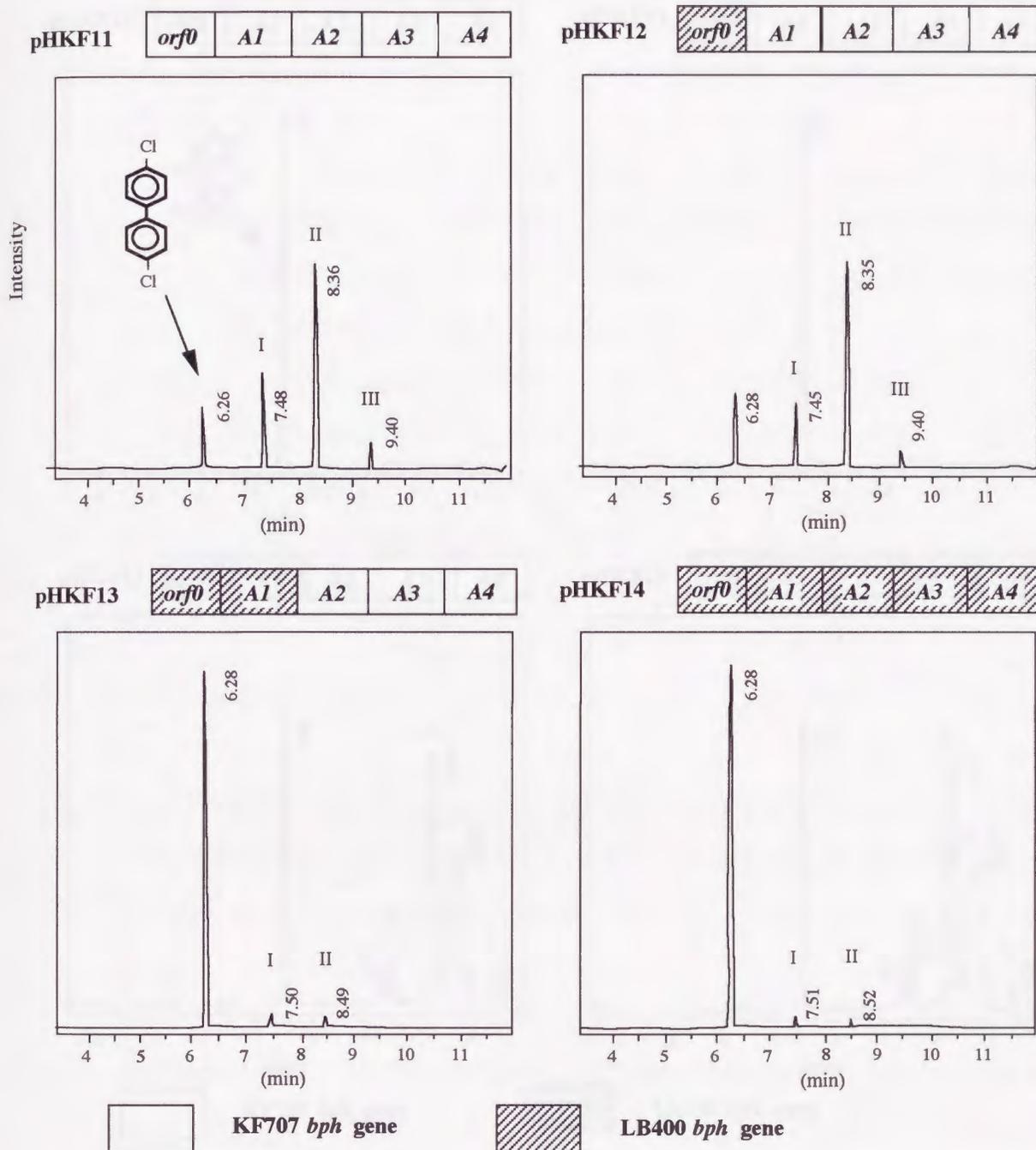


Fig.6-4 Analysis of metabolites produced from 4,4'-dichlorobiphenyl by GC-MS

The GC peaks corresponding to TMS-derivatives of 4,4'-dichloro-2,3-dihydroxy biphenyl (I,II) and 4,4'-dichloro-2,3,,2',3'-tetrahydroxy biphenyl (III)

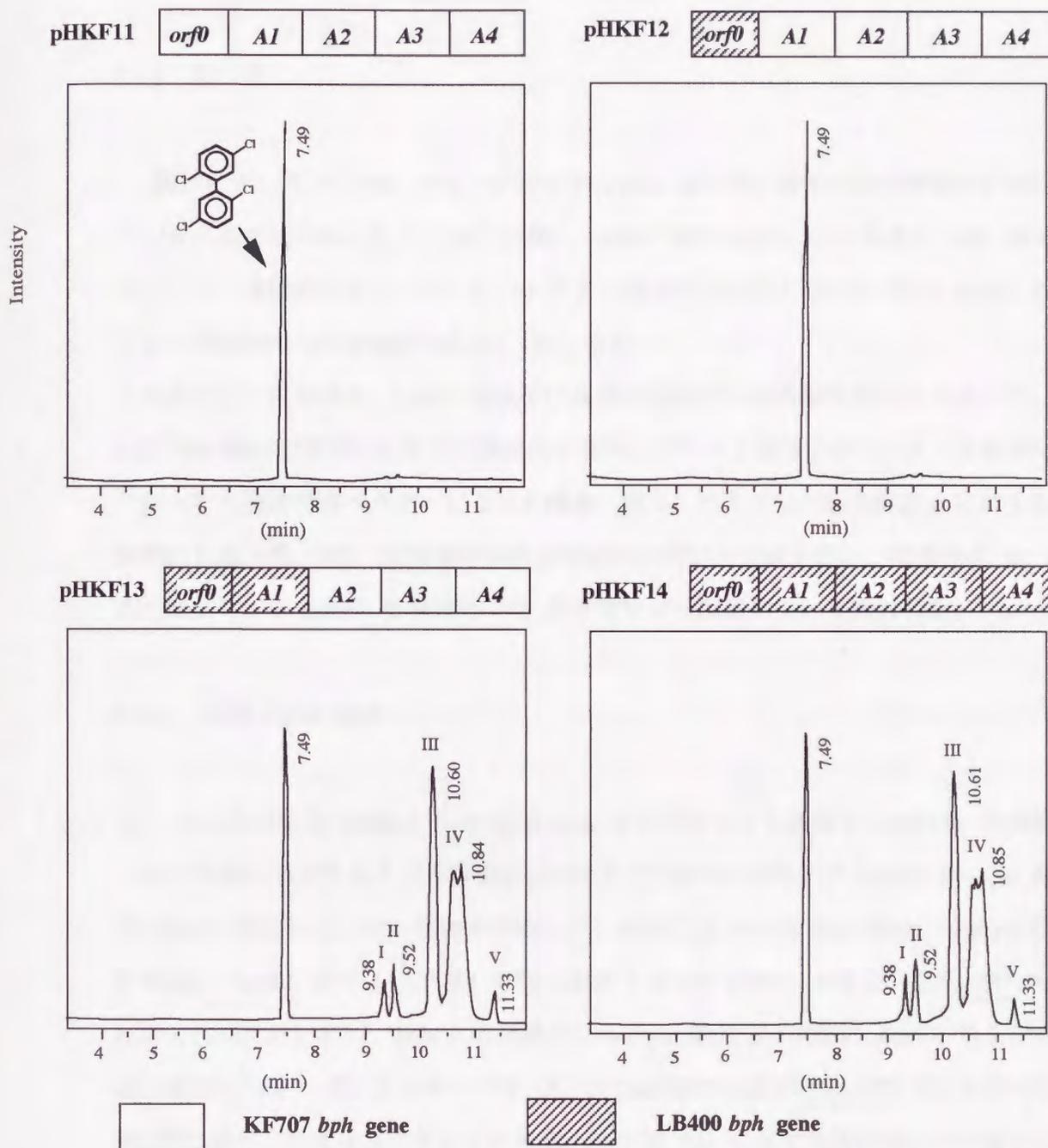


Fig.6-5 Analysis of metabolites produced from 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl by GC-MS

The GC peaks corresponding to TMS-derivatives of 2,5,2',5'-tetrachloro-hydroxybiphenyl (I,II), 5(or 2),2',5'-trichloro-2,3(or5,6)-dihydroxy biphenyl (III,IV) and 2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxy biphenyl (V)

第 7 章 キメラ遺伝子クラスターの構築とキメラ代謝系の機能解析

7・1 緒言

前章において BP Dox の大サブユニット BphA1 が PCB 異性体の分解特性に関与していることを明らかにした。KF707 株と LB400 株の BphA1 はそれぞれ 459 および 460 アミノ酸残基であり、互いに 19 アミノ酸配列の相違と KF707 株の BphA1 に 1 アミノ酸配列の欠失が認められる。(Fig. 7-1)

本章では、両菌株の *bphA1* 遺伝子に共通に存在する制限酵素部位を利用して、互いに DNA 断片を交換してアミノ酸配列を置換したキメラ遺伝子クラスターを構築し、それらが大腸菌発現ベクターにより大腸菌へ導入したキメラ代謝系酵素を発現する大腸菌による各種 PCB 異性体からの分解産物の同定と定量を行い、両菌株の BP Dox の大サブユニット BphA1 の構造と PCB 分解特性との関係について検討した。

7・2 実験方法と材料

(1) PCR 法による Biphenyl dioxygenase 大サブユニット遺伝子 (*bphA1*) の増幅

キメラ遺伝子クラスターの構築を目的として KF707 株および LB400 株 *bph* 遺伝子 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を合成した。増幅には *bphA1* の上流の forward 鎖の 5' 末端に *EcoRI* サイト (下線) を付したオリゴプライマー #5 (5'-CCGAATTC AAGG-AGACGTTGAATCATG-3') と *bphA1* の下流の reverse 鎖の 5' 末端に *EcoRI* サイト (下線) を付したオリゴプライマー #6 (3'-TCTAGACAGTTGGCCTTCTTAAGTT-5') を用いた。PCR 法に使用したオリゴヌクレオチドは、5・2 節 (4) に示す方法に従って合成した。

KF707 株 *bphA1* 遺伝子の鋳型 DNA として *bphA1A2A3A4BC* を含む pKTF18 を使用した。また LB00 株 *bphA1* 遺伝子の鋳型 DNA として General Electric 社 Research and development center より供与を受けた pGEM453 を使用した。*bphA1* 遺伝子の増幅反応は 10 X PCR buffer (宝酒造)、0.05 μ g の鋳型 DNA と 100 μ M の dNTP、1 μ M のオリゴヌクレオチドプライマー #5 および #6 および 0.5 U の

Taq DNA polymerase (Applied Biosystems)を含む 50 μ l の反応液中で行った。

bphA1 遺伝子の増幅反応は5・2節(4)に示す方法に従って行った。

(2) キメラ遺伝子クラスターの構築

野生型の *bph* 遺伝子およびキメラ遺伝子クラスターを挿入断片として持つプラスミド pMKF11-12 および pMKF101-108 は以下の手順で構築した。(Fig.7-2)

pMKF11 は pKTF18 の *bphA1* を含む領域を pKTF18 のマルチクローニングサイトに存在する *EcoRI* サイトと *bphA1* と *bphA2* 遺伝子の間に存在する *EcoRI* サイトを利用して *bphA1* を含む *EcoRI* 断片を除去し、代わりに上記の方法により得た KF707 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を *EcoRI* で処理し挿入して構築した。

pMKF12 は同様に処理を行った pKTF18 に上記の方法により得た LB400 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を *EcoRI* で処理し、挿入して構築した。

pMKF101 は pGEM453 のマルチクローニングサイトに存在する *SalI* サイトと *bphA1* の中心付近に存在する *SalI* サイトを利用して *bphA1* 5'-領域を含む *SalI* 断片を除去し、代わりに KF707 株 *orf0* の一部と *bphA1* の一部を含む領域を含む *SalI* 断片を挿入して pMKF1011 を構築した。さらに構築したキメラピフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット BphA1 をコードする遺伝子を含む pMKF1011 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pMKF101 を構築した。

pMKF102 は pHKF13 のベクターに存在する *ScaI* サイトと *bphA1* 遺伝子に存在する *ScaI* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *ScaI* 断片を除去し、代わりに pJHF108 の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域と *bphA2A3A4* を含む *ScaI* 断片を挿入して pMKF1021 を構築した。さらに構築したキメラピフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット BphA1 をコードする遺伝子を含む pMKF1021 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pMKF102 を構築した。

pMKF103 は pMKF102 の *bphA1* 遺伝子に存在する *AccIII* サイトと *bphA4* 遺伝子に存在する *AccIII* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *AccIII* 断片を除去し、代わりに pKTF10 の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域と *bphA2A3A4* を含む *AccIII* 断片を挿入して pMKF1031 を構築した。さらに構築したキメラピフェニ

ルジオキシゲナーゼ大サブユニット *BphA1* をコードする遺伝子を含む pMKF1031 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pMKF103 を構築した。

pMKF104 は上記の方法により得た LB400 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を *EcoRI* で処理し pHSG396 へ挿入して構築した pHSG400 のマルチクローニングサイトに存在する *BamHI* サイトと *bphA1* 遺伝子に存在する *AccIII* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *AccIII-BamHI* 断片を除去し、代わりに pKTF18 の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *AccIII-BamHI* 断片を挿入して pMKF1041 を構築した。さらに構築したキメラビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット *BphA1* をコードする遺伝子を含む pMKF1041 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pMKF104 を構築した。

pMKF105 は pCKF12 の *bphA1* 遺伝子に存在する *AccIII* サイトと *bphA4* 遺伝子に存在する *AccIII* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *AccIII* 断片を除去し、代わりに pKTF10 の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域と *bphA2A3A4* を含む *AccIII* 断片を挿入して pMKF1051 を構築した。さらに構築したキメラビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット *BphA1* をコードする遺伝子を含む pMKF1051 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pMKF105 を構築した。

pMKF106 は pCKF12 のベクターに存在する *ScaI* サイトと *bphA1* 遺伝子に存在する *ScaI* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *ScaI* 断片を除去し、代わりに pMKF11 の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域と *bphA2A3A4BC* を含む *ScaI* 断片を挿入して pMKF106 を構築した。

pMKF107 は上記の方法により得た KF707 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を *EcoRI* で処理し、pHSG396 へ挿入して構築した pHSG707 のマルチクローニングサイトに存在する *SaII* サイトと *bphA1* 遺伝子に存在する *SaII* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *SaII* 断片を除去し、代わりに上記の方法により得た LB400 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を *EcoRI* で処理し pHSG396 へ挿入して構築した pHSG400 のマルチクローニングサイトに存在する *SaII* サイトと *bphA1* 遺伝子に存在する *SaII* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *SaII* 断片を挿入して pMKF1071 を構築した。さらに構築したキメラビフェニルジオキシゲナーゼ大サブ

ユニットBphA1 をコードする遺伝子を含む pMKF1071 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pMKF107 を構築した。

pMKF108 は pMKF101 のベクターに存在する *ScaI* サイトと *bphA1* 遺伝子に存在する *ScaI* サイトを利用して *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *ScaI* 断片を除去し、代わりに pMKF11 の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域と *bphA2A3A4BC* を含む *AccIII* 断片を挿入して pMKF108 を構築した。

(3) キメラピフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子の構築

pCKF11-12 および pCKF101-108 はそれぞれ pMKF11-12 および pMKF101-108 にコードされる *bphB* と *bphC* 両遺伝子の一部を含む 1.3 kb の *PpuMI-PpuMI* 断片を欠失させることによって構築した。

(4) 大腸菌菌体抽出液による変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

キメラピフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子および野生型のピフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を保有する大腸菌株を 30 $\mu\text{g/ml}$ Ap および 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG を含む LB 培地 20 ml 中で対数増殖期後期まで培養して 4,000 rpm、10 分間の遠心分離によって集菌した。これを 2% SDS、5% β -メルカプトエタノールを含む 62.5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 中に懸濁し、3 分間、100°C で処理した後に、菌体を超音波破碎機 (UDCD-130、Tosho Electric) を使って 10 分間破碎した。10,000rpm で 5 分間遠心分離で得られた上清に 1/10 volume の 70% のグリセロールと 0.05% のプロモフェノールブルーを含む 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) と混合して 12.5% 変性ポリアクリルアミドゲルを使用した変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動は、20 mM で行った。泳動後、ゲルを coomassie brilliant blue R-250 で染色、脱色した。なお、分子量マーカーとして Dalton mark VII-L™ (SIGMA) を使用した。

(5) 大腸菌菌体抽出液の未変性ポリアクリルアミド電気泳動

キメラピフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子および野生型のピフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を保有する大腸菌株を 30 $\mu\text{g/ml}$ Ap および 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG を含む LB 培

地 20 ml 中で対数増殖期後期まで培養して 4,000 rpm、10 分間の遠心分離によって集菌した。これを 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 中に懸濁し、再び同条件で集菌した。次に、600 μ l の 10 % エタノールを含む同緩衝液中に懸濁して、菌体を超音波破碎機 (UDCD-130、Tosho Electric) を使って 10 分間破碎した。さらに 10,000rpm で 10 分間遠心分離で得られた上清を 50,000 rpm で 1 時間遠心分離して残りの沈殿を除去した。得られた抽出液に等量の 20 % のグリセロールと 0.02 % のプロモフェノールブルーを含む 10 mM Tris-HCl (pH 6.8) と混合して 5-20 % のポリアクリルアミド濃度勾配ゲル (NPG520-E、アトー) を使用した未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動は、20 mA で行った。泳動後、ゲルを coomassie brilliant blue R-250 で染色、脱色した。なお、分子量マーカーとしてタチナタマメウレアーゼ (272 kDa)、ウシ血清アルブミン 2 量体 (132 kDa) および単量体 (66 kDa)、ニワトリ卵白アルブミン (45 kDa)、ウシ赤血球炭酸デヒドラターゼ (29 kDa) を使用した。

(6) PCB 分解活性の測定

6・2 節 (6) に示した方法に従って行った。

7・3 実験結果

7・3・1 キメラビフェニルジオキシゲナーゼ系の遺伝子産物の確認

ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼおよびキメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む各プラスミドを保有する大腸菌菌体抽出液による変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果を Fig. 7-3 に示す。図に示した結果を DNA 塩基配列から各遺伝子産物の分子量 (Table 1-2) と対照することにより、pCKF11-12、pCKF101-108 を保有するすべての大腸菌菌体において、BphA1 (51 kDa)、BphA2 (25 kDa) に相当するバンドをそれぞれ確認することができた。またすべての大腸菌菌体における BphA1、BphA2 に相当するバンドはほぼ等しい濃度が認められた。

7.3.2 キメラビフェニルジオキシゲナーゼ系のサブユニット構成

キメラビフェニルジオキシゲナーゼ系のサブユニット構成を調べることを目的として、ハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼおよびキメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11-12、pCKF101-108 ベクターを保有する大腸菌の菌体抽出液について未変性ポリアクリルアミド電気泳動を行った。

野生型の KF707 株ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *bphA1A2A3A4* を含む pCKF11 ベクター保有菌株の抽出液からはビフェニルジオキシゲナーゼ成分 BphA1::BphA2 のヘテロ 4 量体と 6 量体に相当するバンドを検出した。

またハイブリッドビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *bphA1* (LB400)A2A3A4 を含む pCKF12 保有大腸菌の抽出液からも Biphenyl dioxygenase 成分 BphA1::BphA2 のヘテロ 4 量体と 6 量体に相当するバンドを検出した。

一方、各キメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF101-108 ベクター保有大腸菌の菌体抽出液については pCKF11 および pCKF12 ベクター保有菌株の抽出液と同じ大きさの Biphenyl dioxygenase 成分 BphA1-BphA2 のヘテロ 3 量体と 6 量体に相当するバンドを検出した。(Fig.7-4)

7.3.3 キメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子保有大腸菌による PCB 分解特性

各種キメラジオキシゲナーゼ系の PCB 分解特性を調べることを目的として、ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11、pCKF12 ベクターおよび各キメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF101-108 ベクターを保有する大腸菌の静止菌体による 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB に対する分解産物の同定と定量を行った結果を Table 7-2 に示した。

KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *bphA1A2A3A4* を含む pCKF11 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB から 4-chlorophenyl ring の 2,3 位へ分子状酸素が添加され、酸性条件下において脱水酸化した 4,4'-dichloro-hydroxybiphenyl を生成

し、2,5,4'-CB から 4-chlorophenyl ring の 2,3 位へ分子状酸素が添加され、酸性条件下において脱水酸化した 2,5,4'-trichloro-hydroxybiphenyl を生成し、その全分解産物に対する割合は 91 % を示した。また同時に 2,5,4'-CB から 2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位へ分子状酸素が添加され、脱塩素化した 5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 9 % の割合で生成が認められたが、2,5,2'5'-CB からの分解産物は認められなかった。

ハイブリッドジオキシゲナーゼ遺伝子 *bphA1* (LB400)A2A3A4 を含む pCKF12 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB からの分解産物は認められなかったが、2,5,4'-CB に対して 2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位へ分子状酸素が添加され、脱塩素化した 5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 65 % の割合で、2,5-dichlorophenyl ring の 3,4 位へ分子状酸素が添加された 2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 35 % の割合で生成した。また 2,5,2'5'-CB に対して 2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位へ分子状酸素が添加され、脱塩素化した 5(or 2),2',5'-trichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 80 % の割合で、2,5-dichlorophenyl ring の 3,4 位へ分子状酸素が添加された 2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 20 % の割合で生成した。

KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントII, III, IV を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF101 を保有する大腸菌菌体と KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントIII, IV を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF102 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB からハイブリッドジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF12 を保有する大腸菌菌体と同じ分解産物を生成し、その割合も類似していた。

KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントIII を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF103 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB から分解産物として 4,4'-dichloro-hydroxybiphenyl を生成し、また 2,5,4'-CB から 2,5,4'-trichloro-hydroxybiphenyl を 43 %、2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 25 %、5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxy-

biphenyl を 32 % の割合で生成した。さらに 2,5,2'5'-CB から 5(or 2),2',5'-trichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 87 %、2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 13 % の割合で生成し、pCKF11 や pCKF12 を保有する大腸菌菌体に比べて幅広い分解活性を示した。

KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントIV を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF104 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB から分解産物として 4,4'-dichloro-hydroxybiphenyl を生成し、また 2,5,4'-CB から 2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 6 %、5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 94 % の割合で生成した。さらに 2,5,2'5'-CB から 5(or 2),2',5'-trichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 80 %、2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 20 % の割合で生成し、pCKF11, pCKF12 を保有する大腸菌菌体と異なる分解活性を示した。

KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントI, II, III を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF105 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB から分解産物として 4,4'-dichloro-hydroxybiphenyl を生成し、また 2,5,4'-CB から 2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 23 %、5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 63 %、2,5,4'-trichloro-hydroxybiphenyl を 14 % の割合で生成した。さらに 2,5,2'5'-CB から 5(or 2),2',5'-trichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 80 %、2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 20 % の割合で生成し、pCKF103 を保有する大腸菌菌体と異なる分解特性を示した。

KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントI, II を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF106 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB から分解産物として 4,4'-dichloro-hydroxybiphenyl を生成し、また 2,5,4'-CB から 5(or 2),4'-dichloro-2,3(or 5,6) dihydroxybiphenyl を 10 %、2,5,4'-trichloro-hydroxybiphenyl を 90 % の割合で生成したのに対して、2,5,2'5'-CB から は分解産物が生成せず、KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した分解特性を示した。

一方、KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントI を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF107 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB のすべての PCB に対する分解活性は認められなかった。また KF707 *bphA1* 遺伝子のフラグメントI, III, IV を LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のフラグメントと交換したキメラジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF108 を保有する大腸菌菌体についても同様に 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB のすべての PCB に対する分解活性は認められなかった。

7・4 考 察

キメラピフェニルジオキシゲナーゼ系 BphA1-I, II (KF707)/BphA1-III (LB400)/BphA1-IV (KF707)A2A3A4 および BphA1-I, II, III (KF707)/BphA1-IV (LB400)A2A3A4、さらにBphA1-I, II, III (LB400)/BphA1-IV (KF707)A2A3A4を発現する大腸菌菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB を共に分解し、幅広い PCB 分解特性を示し、塩素置換部位の異なる芳香環に対する酸素添加能が野生型のそれと著しく変化した。(Table7-2)

このことから BphA1 の C 末端領域に認められる 10 アミノ酸配列の相違のなかに PCB 分解特性の決定に関与するアミノ酸残基が存在するものと考察した。また構築したキメラピフェニルジオキシゲナーゼは野生型のピフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を保有する大腸菌菌体に比べて幅広い PCB 分解特性を示した。よってキメラ BP Dox はアミノ酸残基が置換したことにより芳香環に対する触媒能に関与する触媒部位の立体構造が改変し、塩素置換部位の異なる芳香環に対する触媒能の特異性が緩慢になったものと考察した。

一方、キメラジオキシゲナーゼ系 BphA1-I (LB400)/BphA1-II, III, IV (KF707)A2A3A4 および BphA1-I (KF707)/BphA1-II (LB400)/BphA1-III, IV (KF707)A2A3A4を発現する大腸菌はピフェニルや PCB に対する分解活性は認められず、BphA1 の N 末端領域に存在するアミノ酸残基のなかに、ピフェニルジオキシゲナーゼの機能に重要な役割を果たしているアミノ酸残基が存在するものと考察した。

7・5 小 括

KF707 株と LB400 株の *bphA1* 遺伝子に共通に存在する制限酵素部位を利用して、互いに DNA 断片を交換することによりアミノ酸配列を置換したキメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を構築し、キメラビフェニルジオキシゲナーゼ発現大腸菌による各種 PCB 異性体からの分解産物の同定と定量を行った。

キメラジオキシゲナーゼ系 BphA1-I, II (KF707)/BphA1-III (LB400)/BphA1-IV (KF707)A2A3A4、BphA1-I, II, III (KF707)/BphA1-IV (LB400)A2A3A4、および BphA1-I, II, III (LB400)/BphA1-IV (KF707)A2A3A4 を発現大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB を共に分解し、両菌株の野生型のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を保有する大腸菌と比べて幅広い PCB 分解特性を示した。

また 2,5,4'-CB に対して芳香環 4-chlorophenyl ring の 2,3 位および 2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位と 3,4 位に酸素を添加し、塩素置換部位の異なる芳香環に対する酸素添加能は野生型 BP Dox と著しく異なっていた。

よって BphA1 の C 末端領域に存在する 10 アミノ酸配列の相違のなかに PCB 分解特性の決定に関与するアミノ酸残基が存在するものと考察した。

Table 7-1 Plasmids used in this chapter

Plasmid	Relevant description	Source or reference
pUC118	Ap ^r	(98)
pKTF18	<i>bphA1A2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	(109)
pGEM453	<i>orf0 bphA1</i> (LB400) in pUC18, Ap ^r	(20)
pHSG707	<i>bphA1</i> (KF707) in pHSG396, Cm ^r	This study
pHSG400	<i>bphA1</i> (LB400) in pHSG396, Cm ^r	This study
pCKF11	<i>bphA1A2A3A4</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF12	<i>bphA1</i> (LB400) <i>A2A3A4</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF101	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>bphA1</i> -II, III, IV (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF102	<i>bphA1</i> -I, II (KF707) / <i>bphA1</i> -III, IV (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF103	<i>bphA1</i> -I, II (KF707) / <i>bphA1</i> -III (LB400) / <i>bphA1</i> -IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF104	<i>bphA1</i> -I,II,III (KF707) / <i>bphA1</i> -IV (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF105	<i>bphA1</i> -I,II,III (LB400) / <i>bphA1</i> -IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF106	<i>bphA1</i> -I, II (LB400) / <i>bphA1</i> -III, IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF107	<i>bphA1</i> -I (LB400) / <i>bphA1</i> -II, III, IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF108	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>bphA1</i> -II (LB400) / <i>bphA1</i> -III, IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF11	<i>bphA1A2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF12	<i>bphA1</i> (LB400) <i>A2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF101	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>bphA1</i> -II, III, IV (LB400) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF102	<i>bphA1</i> -I, II (KF707) / <i>bphA1</i> -III, IV (LB400) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF103	<i>bphA1</i> -I, II (KF707) / <i>bphA1</i> -III (LB400) / <i>bphA1</i> -IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF104	<i>bphA1</i> -I,II,III (KF707) / <i>bphA1</i> -IV (LB400) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF105	<i>bphA1</i> -I,II,III (LB400) / <i>bphA1</i> -IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF106	<i>bphA1</i> -I, II (LB400) / <i>bphA1</i> -III, IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF107	<i>bphA1</i> -I (LB400) / <i>bphA1</i> -II, III, IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF108	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>bphA1</i> -II (LB400) / <i>bphA1</i> -III, IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF201	<i>bphA2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study

Table 7-2 Mode of dioxygenation of various modified BP Dox for 4,4'-CB, 2,5,4'-CB and 2,5,2',5'-CB

plasmid	Substrate	degradation pattern			
		relative degradation ability *	mode of dioxygenation	accumulated metabolite (number of chlorine)	Relative yield (%)
pCKF11	4, 4'-CB	100	2,3-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (2)	100
	2, 5, 4'-CB	40	2',3'-dioxygenation	2',3'-dihydrodiol (3)	91
			2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	9
2, 5, 2', 5'-CB	ND		no metabolite		
pCKF12	4, 4'-CB	ND		no metabolite	
	2, 5, 4'-CB	91	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	65
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	35
	2, 5, 2', 5'-CB	100	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	80
3,4-dioxygenation			3,4-dihydrodiol (4)	20	
pCKF102	4, 4'-CB	ND		no metabolite	
	2, 5, 4'-CB	90	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	65
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	35
	2, 5, 2', 5'-CB	100	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	80
3,4-dioxygenation			3,4-dihydrodiol (4)	20	
pCKF103	4, 4'-CB	15	2,3-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (2)	100
	2, 5, 4'-CB	32	2',3'-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (3)	43
			2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	32
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	25
	2, 5, 2', 5'-CB	44	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	87
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (4)	13
pCKF104	4, 4'-CB	19	2,3-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (2)	100
	2, 5, 4'-CB	40	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	94
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	6
	2, 5, 2', 5'-CB	13	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	80
3,4-dioxygenation			3,4-dihydrodiol (4)	20	
pCKF105	4, 4'-CB	26	2,3-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (2)	100
	2, 5, 4'-CB	100	2',3'-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (3)	14
			2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	63
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	23
	2, 5, 2', 5'-CB	24	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	80
3,4-dioxygenation			3,4-dihydrodiol (4)	20	
pCKF106	4, 4'-CB	100	2,3-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (2)	100
	2, 5, 4'-CB	37	2',3'-dioxygenation	2',3'-dihydrodiol (3)	90
			2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	10
	2, 5, 2', 5'-CB	ND		no metabolite	

* The relative degradation of E.coli cells carrying respective plasmid was compared for respective PCB congeners.

KF707 BphA1	1 MSSSIKEVQGAPVKWVTNWTPEAIRGLVDQEKGLLDPRIYADQSLYELEL	50
LB400 BphA1	1 MSSAIKEVQGAPVKWVTNWTPEAIRGLVDQEKGLLDPRIYADQSLYELEL	50
	* ERVFGRSWLLLGHESHVPETGDFLATYMGEDPVVMVRQKDKSIKVFLNQC	
	51 ERVFGRSWLLLGHESHVPETGDFLATYMGEDPVVMVRQKDKSIKVFLNQC	100
	51 ERVFGRSWLLLGHESHVPETGDFLATYMGEDPVVMVRQKDKSIKVFLNQC	100
	101 RHRGMRICRSDAGNAKAFTCSYHGWAYDIAGKLVNVPFEKEAFCDKKEGD	150
	101 RHRGMRICRSDAGNAKAFTCSYHGWAYDIAGKLVNVPFEKEAFCDKKEGD	150
	151 CGFDKAEWGPLQARVATYKGLVFANWDVQAPDLETYLGDARPYMDVMLDR	200
	151 CGFDKAEWGPLQARVATYKGLVFANWDVQAPDLETYLGDARPYMDVMLDR	200
	201 TPAGTVAIGGMQKWVPCNWKFAAEQFCSDMYHAGTMSHLSGILAGMPPE	250
	201 TPAGTVAIGGMQKWVPCNWKFAAEQFCSDMYHAGTTTHLSGILAGIPPE	250
	* * * * *	
	↓ <i>Sal</i> I ↓ <i>Sca</i> I	
	251 MDLSHAQVPTKGNQFRAGWGGHSGWVDEPGMLAVMGPVKVTQYWTEGP	300
	251 MDLSQAQIPTKGNQFRAAWGGHSGWYVDEPGSLLAVMGPVKVTQYWTEGP	300
	* * * * *	
	↓ <i>Acc</i> III	
	301 AADLAEQRLGHT-MPVRRMFGQHMSVFPTCSFLPAINTIRTWHPRGPNEI	349
	301 AAELAEQRLGHTGMPVRRMVGQHMTIFPTCSFLPTFNNIRIWHPRGPNEI	350
	* * * * *	
	350 EVWAFTLVDADAPAEIKEEYRRHNI RTFSAGGVFEQDDGENWVEIQGLR	399
	351 EVWAFTLVDADAPAEIKEEYRRHNI RNFSAGGVFEQDDGENWVEIQGLR	400
	* 400 GYKAKSQPLNAQMGLGRSQTGHPDFPGNVGYVYAEAAARGMYHHWMRMMS	449
	401 GYKAKSQPLNAQMGLGRSQTGHPDFPGNVGYVYAEAAARGMYHHWMRMMS	450
	450 EPSWATLKPW	
	451 EPSWATLKPW	

Fig.7-1 Comparison of amino acid sequences between KF707-BphA1 and LB400-BphA1

Astarisks indicate the different amino acids and deletion.
 Arrows indicate the common and unique restriction sites of *Sal*I, *Sca*I and *Acc*III within the both *bphA1* genes.

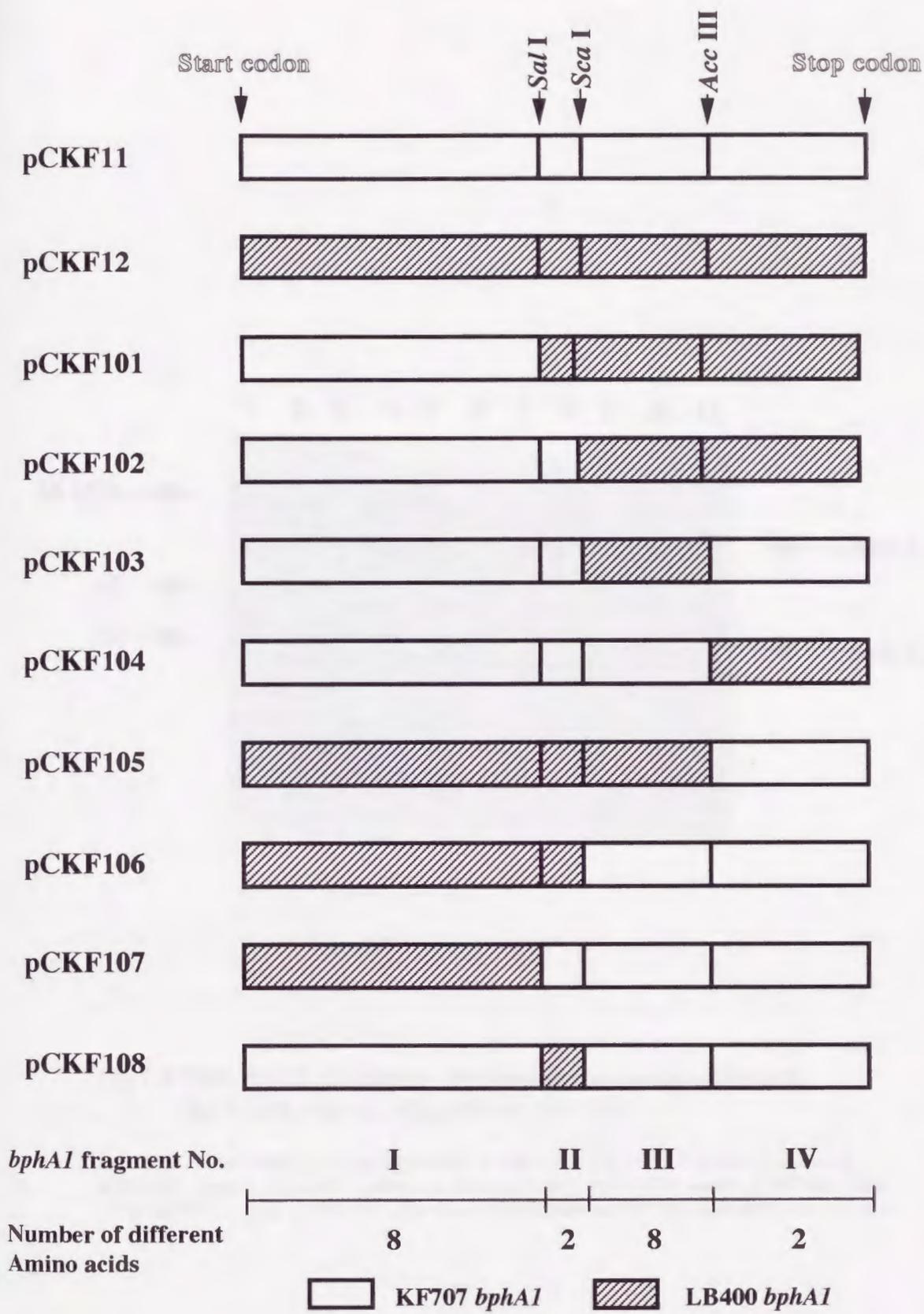


Fig.7-2 Construction of chimeric BphA1 between *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *P. cepacia* LB400.

Common and unique restriction sites of *SalI*, *ScaI* and *AccIII* are indicated within *bphA1* genes, generating four fragments I, II, III and IV. Numbers of different amino acids within these fragments are indicated at the bottom.

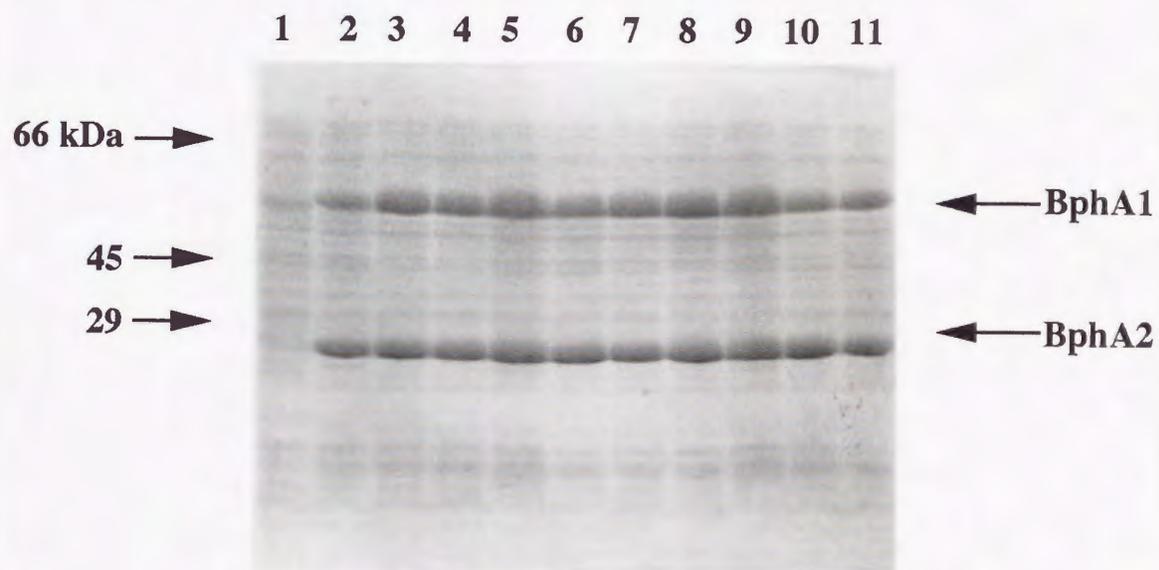


Fig.7-3 SDS-PAGE of chimeric biphenyl dioxygenases expressed by *E. coli* cells carrying various plasmids.

Lane1 , pUC118 (control) ; Lane 2, pCKF11 ; Lane3, pCKF12 ; Lane4, pCKF101; Lane 5, pCKF102 ; Lane 6, pCKF103 ; Lane 7, pCKF104 ; Lane8, pCKF105 ; Lane9, pCKF106 ; Lane 10, pCKF107 ; Lane11, pCKF108 ; The sizes of molecular markers are indicated at the leftmost.

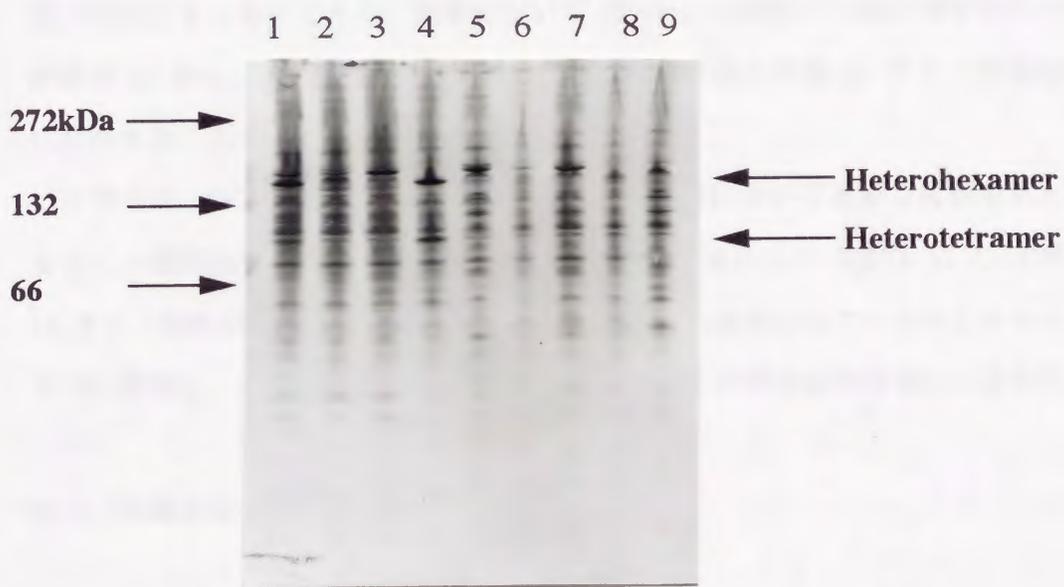


Fig.7-4 Non-denaturing PAGE of cell extracts over-expressed by hybrid and chimeric dioxygenase genes

Lane1 , pUC118 (control) ; Lane 2, pCKF11 ; Lane3, pCKF12 ; Lane4, pCKF101 ;
 Lane 5, pCKF102 ; Lane 6, pCKF103 ; Lane 7, pCKF104 ; Lane 8, pCKF105 ; Lane 9, pCKF106.
 The *E.coli* cells carrying pCKF107 and pCKF108 also produced almost the amount of BphA1 and
 BphA2 (data not shown). The sizes of molecular markers are indicated at the leftmost.