

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 :

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

KF707 株と LB400 株の PCB 分解特性の差異は BP Dox の芳香環に対する酸素添加能の相違によるものであり、前章において BP Dox の機能の相違に関するアミノ酸残基が BP Dox 大サブユニット BphA1 の C 末端領域の相違 10 アミノ酸配列のなかに存在することを明らかにした。(Fig. 8-2)

本章では KF707 株と LB400 株の PCB 分解特性において重要な役割を果たしているアミノ酸残基を特定するために、BP Dox 大サブユニット BphA1 の C 末端領域の 10 アミノ酸配列を部位特異的変異法により置換した変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ系を構築し、それらを発現する大腸菌による PCB 分解産物の同定と定量を行った。

8・2 実験方法と材料

(1) 部位特異的変異の導入

部位特異的変異の導入は、Dengらの方法⁽¹⁸⁾に基づいたキット (U. S. E. Mutagenesis kit, Pharmacia) を利用して行った。

変異の導入に使用したオリゴヌクレオチドのデザインは Table 8-2 に示した。また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 5・2 節 (4) に示した方法に従って合成および精製を行った。

鋳型 DNA として pSKF11-15 については pCKF11、pSKF101-109 については pCKF102 を使用した。また、部位特異的変異の導入の確認は 3・2 節 (5) に示す方法に従って DNA 塩基配列の決定により行った。

(2) 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

変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pSKF11 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は 7・2 節 (4) に示した方法に従って行った。

(3) PCB 分解活性の測定

変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pSKF11-15 および pSKF101-109 を保有する大腸菌の静止菌体による PCB 分解活性の測定は 7・2 節 (6) に示した方法に従って行った。

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

変異型ビフェニル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、変異型ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pSKF11-15 および pSKF101-109 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。(Table 8-3)

キメラビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 *bphA1*-I, II (KF707)/*bphA1*-III, IV (LB400) A243A4 を含む pCKF101 に対して部位特異的変異法により DNA 塩基配列に変異を導入し、*BphA1* のアミノ酸配列を LB400 株型から KF707 株型へ置換した変異型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のうち、アミノ酸配列を Glu-303 から Asp へ置換した pSKF101、Gly-313 を欠失した pSKF102、Val-320 から Phe へ置換した pSKF103、Thr-325 から Ser へ置換した pSKF104、Thr-335 から Ala へ置換した pSKF105、Phe-336 から Ile へ置換した pSKF106、Asn-338 から Thr へ置換した pSKF107、Thr-325、Ile-326 から Ser、Val へ置換した pSKF108 を保有する大腸菌菌体は、pSKF101 を保有する大腸菌と類似した分解特性を示した。

一方、アミノ酸配列を Thr-335、Phe-336、Asn-338、Ile-341 から Ala、Ile、

Thr、Thr へ置換した pSKF109 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、また 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 53 %、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 47 % の割合で生成した。さらに、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 93 % 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 7 % の割合で生成し、pCKF101 を保有する大腸菌と異なる分解特性を示した。

次に、野生型の KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11 に対して BphA1 のアミノ酸配列を KF707 型から LB400 型へ置換した変異型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のうち、アミノ酸配列を Ser-324 から Thr へ置換した pSKF12、Val-325 から Ile へ置換した pSKF13、Thr-340 から Ile へ置換した pSKF14 を保有する大腸菌菌体は pCKF11 を保有する大腸菌と類似した分解特性を示した。

しかし、アミノ酸配列を Thr-376 から Asn へ置換した pSKF15 を保有する大腸菌菌体は 4,4'-CB から 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 93 %、2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxybiphenyl を 7 % 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 を保有する大腸菌と異なる分解特性を示した。

一方、野生型の KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11 に対して BphA1 のアミノ酸配列を KF707 型から LB400 型へ置換した変異型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のうち、アミノ酸配

列を Met-283 から Ser へ置換した pSKF11 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。

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

変異型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. 8-1 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、pSKF11 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 BphA1、BphA2 に相当するバンドは KF707 株ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF101 を保有する大腸菌のものとはほぼ等しい濃度が認められた。

8・4 考 察

アミノ酸配列を Thr-376 から Asn へ置換した変異型 BP Dox 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、野生型の KF707 株の BP Dox を発現する大腸菌と比べて幅広い PCB 分解特性を示した。(Table 8-3) このことは KF707 株 BP Dox 大サブユニット BphA1 の Thr-376 が PCB 分解特性において重要な役割を果たしている KF707 株と LB400 株の BP Dox の機能の相違に関与しているアミノ酸残基であることを示した。

またアミノ酸配列を Thr-376 から Asn へ置換した変異型 BP Dox を発現する大腸菌菌体は 芳香環 4-chlorophenyl ring の 2,3 位および 2,5-dichlorophenyl ring の 2,3 位と 3,4 位に酸素を添加した。(Table 8-3)

一般に基質特異性の拡張効果は置換アミノ酸の荷電の影響は少なく、置換アミノ酸分子の大きさと疎水性に相関する傾向が見られるものとされている。⁽⁹⁰⁾ このことから Thr-376 から分極した原子間結合をもつ官能基からなる親水性残基の Asn へ置

換したことにより、BP Dox の芳香環に対する触媒能に関与する部位が改変し、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変化することにより、PCB 分解特性が変化したものと考察した。

一方、Erickson と Mondello らは LB400 株の BP Dox 大サブユニット BphA1 の Thr-335、Phe-336、Asn-338、Ile-341 を KF707 株 BphA1 型の Ala、Ile、Thr、Thr へ置換した変異型 BP Dox は幅広い PCB 分解特性を獲得したことを示した。⁽²¹⁾ 上記の研究結果において、キメラビフェニルジオキシゲナーゼ BphA1-I, II (KF707) / BphA1-III, IV (LB400) A2A3A4 の BphA1 のアミノ酸配列を Thr-335、Phe-336、Asn-338、Ile-341 から Ala、Ile、Thr、Thr へ置換した変異型 BP Dox 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、上記の結果と類似した傾向を示している。

また、Thr-340 のみを Ile へ置換した変異型 BP Dox は野生型の BP Dox との顕著な機能の相違は認められず、よって KF707 株 BphA1 の Ala-334、Ile-335、Thr-337 は Thr-376 と同様に PCB 分解特性の決定に関与しているものと考察した。(Fig.8-2) 以上の結果、KF707 株と LB400 株の PCB 分解特性は著しく異なるが、それらは BP Dox の大サブユニット BphA1 のわずかなアミノ酸残基の置換に起因することを明らかにした。

一方、KF707 株 BP Dox 大サブユニット BphA1 のアミノ酸配列を Met-283 から Ser へ置換した変異型 BP Dox を発現する大腸菌菌体は酵素タンパク質の発現しているのにも拘わらず、BP および 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB のすべての PCB に対する分解活性が認められなかった。このことはアミノ酸配列を Met-283 から Ser へ置換したことにより BP Dox の活性部位あるいはタンパク質の立体構造が変化したことにより BP Dox が失活したものと考察した。

近年、多数のビフェニル/PCB 分解菌が分離され、遺伝的および生化学的解析が行われているが、それらの菌株は異なる PCB 分解特性を示すのにも拘わらず、その *bph* 遺伝子が高い相同性を示すことが明らかにされている。^(19,91) 上記の研究結果はビフェニル代謝系酵素のわずかな構造の変化が起因となり、PCB 分解特性が改変することを示し、これらのビフェニル/PCB 分解菌の機能進化メカニズムを明らかに

した。またこの結果は同時にビフェニル代謝系酵素の構造に DNA シャフリング^(102, 103) や部位特異的置換により人為的にわずかな変化を与えることにより、幅広い PCB 分解特性を有する BP Dox を構築できる可能性を示している。

8・5 小 括

変異型 BP Dox の PCB 分解特性を調べることを目的として、変異型 BP Dox を発現する大腸菌菌体による 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。

キメラ BP Dox BphA1-I, II (KF707)/BphA1-III, IV (LB400)A2A3A4 の大サブユニット BphA1 のアミノ酸配列を LB400 型から KF707 型である Thr-335、Phe-336、Asn-338、Ile-341 から Ala、Ile、Thr、Thr へ置換した変異型 BP Dox を発現する大腸菌および KF707 株の BP Dox 大サブユニット BphA1 のアミノ酸配列を Thr-376 から Asn へ置換した変異型 BP Dox を発現する大腸菌菌体は 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB をともに分解し、野生型 BP Dox を発現する大腸菌と比べて幅広い PCB 分解特性を示した。また芳香環 4-chlorophenyl ring および 2,5-dichlorophenyl ring に対してともに酸素添加能を示した。

よって、KF707 株 BP Dox BphA1 の Thr-376 および Ala-334、Ile-335、Thr-337 が KF707 株と LB400 株の BP Dox の機能の相違に関与し、両菌株の PCB 分解特性の決定に関与しているものと考察した。

Table 8-1 Plasmids used in this chapter

plasmid	Relevant description	Source or reference
pUC118	Ap ^r	
pCKF202	<i>bphA2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF11	<i>bphA1A2A3A4</i> (KF707) 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
pSKF11	pCKF11 (Met 283 Ser)	This study
pSKF12	pCKF11 (Ser 324 Thr)	This study
pSKF13	pCKF11 (Val 325 Ile)	This study
pSKF14	pCKF11 (Thr 340 Ile)	This study
pSKF15	pCKF11 (Thr 376 Asn)	This study
pSKF101	pCKF102 (Glu 303 Asp)	This study
pSKF102	pCKF102 (Gly 313 deletion)	This study
pSKF103	pCKF102 (Val 320 Phe)	This study
pSKF104	pCKF102 (Thr 325 Ser)	This study
pSKF105	pCKF102 (Thr 335 Ala)	This study
pSKF106	pCKF102 (Phe 336 Ile)	This study
pSKF107	pCKF102 (Asn 338 Thr)	This study
pSKF108	pCKF102 (Thr 325 Ser , Ile 326 Val)	This study
pSKF109	pCKF102 (Thr 335 Ala, Phe 336 Ile, Asn 338 Thr, Ile 341 Thr)	This study

Table 8-2 Oligoprimers used for site-directed mutagenesis

Amino acid change	Oligoprimers used
LB400 sequence → KF707 sequence	
Glu 303 Asp	5'-GCGCTGTTCCGCAAG <u>GTC</u> CGGCAGCCGGACCC-3' Asp
Gly 313 deletion	5'-GCGTCGAACCGGCAT <u>TGGTGTG</u> CCCCAGGCG-3' deletion
Val 320 Phe	5'-CATGTGCTGGCCG <u>AA</u> CATGCGTCGAACCGG-3' Phe
Thr 325 Ser	5'-AGGTCGGGAAGAT <u>GCT</u> CATGTGCTGGCCGA-3' Ser
Thr 335 Ala	5'-CCGGATGTTGTTGAAG <u>GCG</u> GGGCAGGAATGAACA-3' Ala
Phe 336 Ile	5'-GATCCGGATGTTGTTGA <u>TTGGT</u> GGGCAGGAATGA-3' Ile
Asn 338 Thr	5'-GGTGCCAGATCCGGAT <u>GCT</u> GTTGAAGGTGGGCA-3' Thr
Thr 325 Ser Ile 326 Val	5'-AGGTCGGGAAGAT <u>CGCT</u> CATGTGCTGGCCGA-3' Val Ser
Thr 335 Ala Phe 336 Ile Asn 338 Thr Ile 341 Thr	5'-CGGGTGCCAG <u>GCT</u> CCGGAT <u>GCT</u> GTTGA <u>TGGC</u> GGGCAGGAAT-3 Thr Thr Ile Ala
KF707 sequence → LB400 sequence	
Met 283 Ser	5'-CACCGCCATGAG <u>TGA</u> GCCCGGCTCGTCGAC-3' Ser
Ser 324 Thr	5'-GGTCGGCGAAGAAC <u>CGT</u> CATGTGCTGGCCGAC-3' Thr
Val 325 Ile	5'-AGGTCGGGAAGAT <u>TGCT</u> CATGTGCTGGCC-3' Ile
Thr 340 Ile	5'-CGCGGGTGCCAG <u>AT</u> CCGGATGGTGTGGA-3' Ile
Thr 376 Asn	5'-CCTGCGGAGAA <u>GTT</u> TGCGGATGTTGTGCC-3' Asn

Table 8-3 Mode of dioxygenation of various mutant BP Dox for 4,4'-CB, 2,5,4'-CB and 2,5,2',5'-CB

plasmid	Substrate	GC-MS			
			mode of dioxygenation	accumulated metabolite	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	
pCKF102	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	
pSKF15 (Thr 376 Asn)	4, 4'-CB	72	2,3-dioxygenation	2,3-dihydrodiol (2)	100
	2, 5, 4'-CB	98	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	93
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	7
	2, 5, 2', 5'-CB	90	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	80
3,4-dioxygenation			3,4-dihydrodiol (4)	20	
pSKF109 (Thr 335 Ala Phe 336 Ile Asn 338 Thr Ile 341 Thr)	4, 4'-CB	5		no metabolite	
	2, 5, 4'-CB	64	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (2)	53
			3,4-dioxygenation	3,4-dihydrodiol (3)	47
	2, 5, 2', 5'-CB	45	2,3-dioxygenation	2,3- or 5,6-catechol (3)	93
3,4-dioxygenation			3,4-dihydrodiol (4)	7	

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

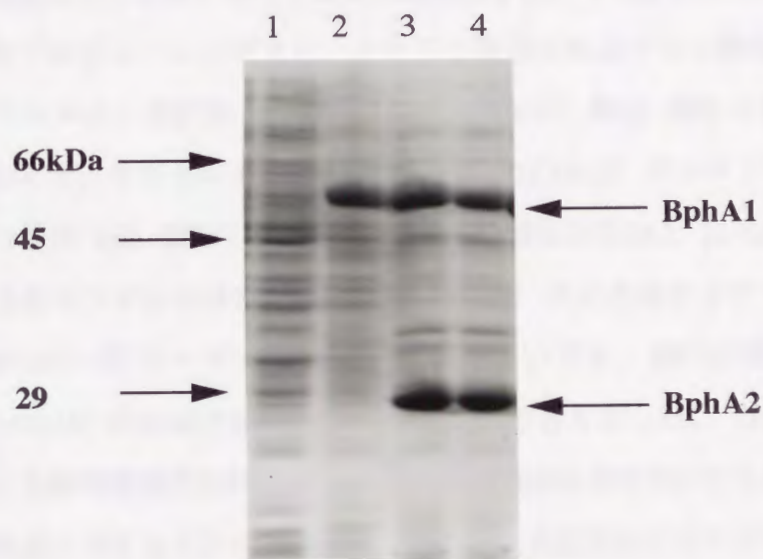


Fig.8-1 SDS-PAGE of mutant biphenyl dioxygenases expressed by *E. coli* cells carrying various plasmids.

Lane1 , pUC118 (control) ; Lane 2, pCKF202 ; Lane3, pCKF11 ; Lane4, pSKF11

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末端ジオキシゲナーゼの構築と機能解析

9・1 緒言

近年、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、多様な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た。^(67, 75, 89, 97)トルエン資化菌 *Pseudomonas putida* F1 株は異なる基質特異性を有するにも拘わらず、そのトルエン代謝遺伝子 *todC1C2BADE* のコードする遺伝子産物⁽¹²³⁾は KF707株の *bph* 遺伝子 *bphA1A2A3A4BC* の遺伝子産物と 55-63% の高い相同性を示す。またナフタレン分解系プラスミド NAH7 上に存在するナフタレン代謝遺伝子 *nahAaAbAcAd* をコードする遺伝子産物についても KF707株の *bph* 遺伝子 *bphA1A2A3A4BC* の遺伝子産物と 20-30% の相同性を示した。(Table9-2)

さらに各種芳香族化合物分解菌の末端酸素添加酵素についても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り、遺伝子産物のポリペプチド間のアミノ酸配列の比較から、末端酸素添加酵素大サブユニットおよび ferredoxin 成分における鉄-イオウクラスターの結合部位等、活性発現に必須と予想される共通のアミノ酸残基が保存していることが明らかとなっている。^(55, 68)

一方、Hirose らは KF707 株 BphA1 と F1 株 TodC1 を交換したハイブリッドジオキシゲナーゼ系 TodC1 (F1)BphA2A3A4 を構築し、各種芳香族化合物に対して両親菌株 Dox と比べて幅広い分解能を示す新規分解能を有する分解系酵素を構築した。^(63, 32)

本章ではビフェニル、トルエン、ナフタレン代謝系を材料にして、各遺伝子コンポーネントを組換えたハイブリッド代謝系を構築し、機能解析を試みた。

9・2 実験材料と方法

- (1) *Rhodococcus* sp. M5 株の Genomic DNA の抽出

Rhodococcus sp. M5 株を 0.2~0.02 % の BP と 5g/l の Suc を含む BSM 培地 200 ml で 30℃、14 時間で振とう培養し、集菌後、最終濃度 0.1 mg/ml の Protease K と 50 mg リゾチームを含む 9 ml の TES (20mM トリス、100mM EDTA、50 mM NaCl、25 % Suc、pH 8.0) に懸濁した。37℃ で 5 分間保温後、さらに 1 ml の 10 % SDS を 1 ml と 1 mg の Protease K を加え、37℃ で一晩保温し、溶菌した。さらに 5M NaCl を 1.8 ml 加え懸濁した後に、CTAB/NaCl を 1.5 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。そのうち一部について 260 nm の吸光度を測定して濃度を決定した。

(2) PCR 法による *Rhodococcus* sp. M5 株のビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*bpdC1*) の増幅

芳香環ジオキシゲナーゼのハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子の構築を目的として *Rhodococcus* sp. M5 株 ビフェニル代謝遺伝子 *bpdC1* 遺伝子の PCR 産物を合成した。増幅には *bpdC1* の上流の forward 鎖の 5' 末端に *Bam*HI サイト (下線) を付したオリゴプライマー #7 (5'-CCGGATCCAGAAAGGAATCTGAGAATG-3') と *bphA1* の下流の reverse 鎖の 5' 末端に *Bam*HI サイト (下線) を付したオリゴプライマー #8 (3'-CTACAGAGCCGGACTCGGCCCTAGGCG-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。鋳型 DNA として前節に示した方法により調製した *Rhodococcus* sp. M5 株 Genomic DNA を使用し、*bpdC1* 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。

(3) PCR 法によるナフタレン分解系プラスミド NAH7 のナフタレンジオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*nahAc*) の増幅

芳香環ジオキシゲナーゼのハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子の構築を目的としてナフタレン分解系プラスミド NAH7 のナフタレンジオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*nahAc*) の PCR 産物を合成した。増幅には *nahAc* の上流の forward 鎖の 5' 末端に *Sac*I サイト (下線) を付したオリゴプライマー #9 (5'-AGAGTC-

GAGCTCCCTAGCGCGTAACTAC-3')と *nahAc* の下流の reverse 鎖の 5' 末端に *Bgl*III サイト (下線) を付したオリゴプライマー #10 (3'-CTAGCGATTGTCTGCTCTCTAGAGTCACA-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。

鋳型 DNA としてナフタレン分解系プラスミド NAH7 を含む pQR156 を使用し、*nahAc* 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。

(4) ハイブリッド遺伝子クラスターの構築

pMKF13 は *P. putida* KF715 株の *bphA1* 遺伝子を含む領域を pYH13 の *bphA1* 遺伝子上流に存在する *Eco*RI サイトと *bphA1* と *bphA2* 遺伝子の間に存在する *Eco*RI サイトを利用して pCKF201 へ挿入して構築した。

pMKF14 は pKTF18 の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* 遺伝子を除去し、上記の方法により得た *Rhodococcus* sp. M5 株 *bpdC1* 遺伝子の PCR 産物を *Bam*HI で処理し、挿入して構築した。

pWH101 は pKTF18 の *bphA1* 遺伝子の開始コドン付近に存在する *Sac*I 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* 遺伝子を除去し、上記の方法により得たナフタレン分解系プラスミド NAH7 のナフタレンジオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 *nahAc* 遺伝子の PCR 産物を *Sac*I と *Bgl*III で処理し、挿入して構築した。(Fig. 9-1)

(5) ハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子の構築

pCKF13、pCKF14、pWH11 はそれぞれ pMKF13、pMKF14、pWH101 にコードする *bphB* と *bphC* 両遺伝子の一部を含む 1.3 kb の *Ppu*MI-*Ppu*MI 断片を欠失することによって構築した。(Fig. 9-1)

(6) 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

構築したハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子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は 7・2 節 (4) に示した方法に従って行った。

(7) 大腸菌菌体抽出液による未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

構築したハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を保有する大腸菌菌体抽出液による未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 7・2 節 (5) に示した方法に従って行った。

(8) 環開裂ジオキシゲナーゼ活性の測定

構築したハイブリッド遺伝子クラスターを保有する大腸菌の静止菌体による環開裂ジオキシゲナーゼ活性の測定は 6・2 節 (4) に示した方法に従って行った。

(9) 芳香族化合物分解活性の測定

pMKF11、pMKF12、pMKF13、pMKF14、pJHF10、pWH101 を保有する大腸菌菌体による BP、Tol、Ben、4-C1BP、4-MeBP、OPP、DM 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。上記の菌株を 30 $\mu\text{g/ml}$ Ap および 40 $\mu\text{g/ml}$ 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または希釈した BP、Tol、Ben、4-C1BP、4-MeBP、OPP、DM (0.25 M) 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。なお、各環開裂黄色化合物の蓄積は、BP 434 nm、Tol 388 nm、Ben 375 nm、4-C1BP 438 nm、4-MeBP 437 nm、

OPP 435 nm、DM 395 nm の吸収極大波長における吸光度を経時的に測定することにより行った。

(10) PCB に対する環開裂黄色化合物変換活性の測定

構築したハイブリッド遺伝子クラス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 に対する環開裂黄色化合物変換活性の測定は 6・2 節 (5) に示した方法に従って行った。

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

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を調べることを目的として、KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11 および各ハイブリッド末端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。(Fig.9-2)

KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11 保有大腸菌の抽出液からは 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、KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子の *bphA1* から *P. putida* KF715 株の *bphA1* へと交換したハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pMKF13 保有大腸菌の抽出液からも同様に terminal 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、KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子の *bphA1* から *Rhodococcus* sp. M5 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子の *bpdC1* へと交換したハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pMKF14 保有大腸菌の抽出液については terminal dioxygenase 成分 BpdC1::BphA2 のヘテロ 4 量体に相当するバンドを検出した。

また KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子の *bphA1* からナフタレン分解系プラスミド NAH7 の *nahAc* 遺伝子へと交換したハイブリッド末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pWH11 保有大腸菌の抽出液については terminal dioxygenase 成分 NahAc::BphA2 のヘテロ 4 量体に相当するバンドを検出した。

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

野生型の *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 遺伝子とハイブリッド遺伝子クラスターを含む各プラスミドを保有する大腸菌菌体による *bphC* 産物である 23DHBP dioxygenase 活性の測定を行った。

KF707 株の *bph* 遺伝子を含む pMKF11 保有大腸菌菌体およびハイブリッド遺伝子クラスターを含む pMKF12、pMKF13、pMKF14、pWH101、pJHF10 を保有する大腸菌菌体は、pMKF11 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。(Fig. 9-3)

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

各種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 BP、4-C1BP、4-MeBP、DM、OPP、Tol、Ben の環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。(Fig. 9-3)

野生型の *P. pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 遺伝子クラスターを含む pMKF11 を保有する大腸菌菌体は、BP、4-C1BP、4-MeBP、DM に対して環開裂黄色化合物への高い変換活性を示したが、OPP、Tol、Ben に対しては、変換活性を示さなかった。

構築したハイブリッド遺伝子クラスターを保有する大腸菌菌体のうち、ハイブリッド遺伝子クラスター *bphA1* (LB400)A2A3A4BC を含む pMKF12 を保有する大腸菌菌体は、BP に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した変換活性を示した。しかし、

4-C1BP に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比べて約 75 %、また 4-MeBP に対しても約 30 % の低い変換活性を示した。一方、DM に対しては環開裂黄色化合物への変換活性は確認されなかった。しかし、OPP に対しては pCKF11 を保有する大腸菌菌体と異なり、変換活性が認められた。

ハイブリッド遺伝子クラスター *bphA1* (KF715)*A2A3A4BC* を含む pMKF13 を保有する大腸菌菌体は、BP、4-C1BP、4-MeBP、DM に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比べて約 30 % の低い変換活性を示した。しかし OPP、Tol、Ben に対して変換活性を示さず、pMKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した基質特異性を示した。

ハイブリッド遺伝子クラスター *todC1* (F1)*bphA2A3A4BC* を含む pJHF10 を保有する大腸菌菌体は、BP、4-C1BP、4-MeBP、DM、Tol、Ben に対して変換活性を示し、pMKF11 を保有する大腸菌菌体とは異なり幅広い変換活性を示した。

ハイブリッド遺伝子クラスター *bpdC1* (M5)*bphA2A3A4BC* を含む pMKF14 を保有する大腸菌菌体は、BP、4-C1BP、4-MeBP、DM に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体に対して変換活性を示したが、OPP、Tol、Ben に対して変換活性を示さず、各種芳香族化合物に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した基質特異性を示した。

一方、ハイブリッド遺伝子クラスター *nahAc* (NAH7)*bphA2A3A4BC* を含む pWH101 を保有する大腸菌菌体は、すべての芳香族化合物に対して変換活性は認められなかった。

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

各種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 BP、4,4'-CB、2,5,4'-CB の環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。(Fig.9-4)

野生型の *P.pseudoalcaligenes* KF707 株の *bph* 遺伝子クラスターを含む pMKF11 を保有する大腸菌菌体は、BP、4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して環開裂黄色化合物への高い変換活性を示した。

ハイブリッド遺伝子クラスター *bphA1* (LB400)*A2A3A4BC* を含む pMKF12 を保有する大腸菌菌体は、BP に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した変換活性を示

したが、2,5,4'-CB に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比べて約 10 % の低い変換活性を示した。一方、4,4'-CB に対しては変換活性は認められなかった。

ハイブリッド遺伝子クラスターを保有する大腸菌菌体のうち、ハイブリッド遺伝子クラスター *bphA1*(KF715)*A2A3A4BC* を含む pMKF13 を保有する大腸菌菌体は、BP、2,5,4'-CB に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比べて約 40 % の比較的低い変換活性を示した。一方、4,4'-CB に対しては変換活性は認められなかった。

さらに、ハイブリッド遺伝子クラスター *bpdC1*(M5)*bphA2A3A4BC* を含む pMKF14 を保有する大腸菌菌体は、BP、4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比べて約 10 % の比較的低い変換活性を示した。

一方、ハイブリッド遺伝子クラスター *todC1*(F1)*bphA2A3A4BC* を含む pJHF10 と *nahAc*(NAH7)*bphA2A3A4BC* を含む pWH101 を保有する大腸菌菌体は、4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して変換活性は認められなかった。

9・4 考 察

各種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芳香族化合物と PCB からの変換活性を測定した。ハイブリッド代謝系 *BphA1*(LB400)*A2A3A4BC* を発現する大腸菌は OPP を環開裂黄色化合物へ変換したが、4-MeBP、DM を環開裂黄色化合物へ変換せず、野生型の KF707 株 ビフェニル代謝系 *BphA1A2A3A4BC* を発現する大腸菌と異なる変換活性を示した。(Fig.9-3) 第 6 章において KF707 株 BP Dox は 4-chlorophenyl ring に、また LB400 株 BP Dox は 2,5-dichlorophenyl ring に対して高い酸素添加能力を示すことを明らかにした。よって野生型の KF707 株 BP Dox は芳香環の 4 位に置換基が存在する 4-ClBP、4-MeBP に、LB400 株 *bphA1* 遺伝子を導入したハイブリッド末端 Dox は芳香環の 2 位に置換基が存在する OPP に環開裂化合物への高い変換活性を示したものと考察した。

ハイブリッド代謝系 *BphA1*(KF715)*A2A3A4BC* を発現する大腸菌は芳香族化合物に対して KF707 株 ビフェニル代謝系 *BphA1A2A3A4BC* を発現する大腸菌と類似した基質特異性を示した。しかし、PCB に対する変換活性は大きく異なっていた。(Fig.9-4)

このことから、KF707 株と KF715 株の *bphA1* 遺伝子が極めて高い相同性を示すのにも拘わらず、両菌株の BP Dox の塩素置換部位の異なる芳香環に対する触媒能が異なるものと考察した。

Rhodococcus sp. M5 株 のビフェニル代謝遺伝子 *bpdC1C2BADE*⁽¹¹⁷⁾ は KF707 株の *bph* 遺伝子 *bphA1A2A3A4BCD* の遺伝子産物と約 60 %、トルエン分解菌 *P. putida* F1 株のトルエン代謝遺伝子 *todC1C2BADE* の遺伝子産物と約 70 % の相同性を示し、F1 株のトルエン代謝遺伝子に比較的高い相同性を示す。しかし、M5 株 のビフェニル代謝系酵素は BP を分解するが、Tol を分解しないことが明らかにされている。ハイブリッド代謝系 BpdC1 (M5)BphA2A3A4BC を発現する大腸菌は芳香族化合物に対して KF707 株 ビフェニル代謝系 BphA1A2A3A4BC を発現する大腸菌と類似した基質特異性を示したが、各種 PCB 異性体に幅広い変換活性を示した。よって M5 株 BpdC1 が KF707 株 BP Dox の他のコンポーネントと野生型の KF707 株 BP Dox と新規な分解能を有するハイブリッド末端 Dox を構成しているものと考察した。

Hirose らは F1 株 *todC1* 遺伝子を導入したハイブリッド遺伝子クラスター *todC1bphA2A3A4BC* を構築し、それを発現する大腸菌は BP、Tol、Ben などの幅広い芳香族化合物に分解活性を示すことを明らかにした。⁽⁵⁵⁾ ハイブリッド代謝系 TodC1 (F1) BphA2A3A4BC を発現する大腸菌による PCB 変換活性の測定をおこなったが、いずれの化合物に対しても変換活性は認められず、PCB に対する分解能が KF707 株 BP Dox と大きく異なっていた。(Fig. 9-4)

一方、NahAc (NAH7)BphA2A3A4BC を発現する大腸菌は芳香族化合物に対して分解活性が認められなかった。このことは NahAc が他の末端 Dox 大サブユニットのコンポーネントと比べて KF707 株 BP Dox BphA1 との相同性が低く、活性を発現する酵素タンパク質を形成できなかったものと考察した。

以上のように様々な芳香環末端 Dox 大サブユニットを導入することにより、野生型の KF707 株 BP Dox とは異なる分解能を有するハイブリッド代謝系酵素を構築することができた。近年、数多くの芳香族化合物分解菌から末端 Dox 遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定されているが、その末端 Dox 大サブユニットのアミノ酸配列の詳細な比較から、活性発現に必須と考えられる Rieske center 結合部位⁽⁸⁵⁾

の共通配列 Cys-X-His-X₁₆₋₁₇-Cys-X₂-His や鉄-硫黄クラスターの結合部位の共通配列 Glu-X₃₋₄-Asp-X₂-His-X₄₋₅-His が存在することが明らかにされている。⁽⁶⁸⁾ このことは今後各種芳香族化合物分解菌末端 Dox から新規な代謝能を有するさまざまな組み合わせのハイブリッド代謝系を構築することができる可能性を示すものと考察した。

9・5 小 括

諸種の芳香環分解系酵素は分解特性には明確な差異が認められるものの、各コンポーネント間で高い相同性が認められる。この分解特異性は末端ジオキシゲナーゼ大サブユニット（鉄イオウタンパク質 ISP）が大きく関与している。

そこで KF707 BP Dox の大サブユニット（BphA1）をビフェニル、トルエン、ナフタレンの芳香環末端 Dox ISP と交換し、ハイブリッド末端 Dox を構築した。ハイブリッド末端 Dox は会合体を形成し、それらのハイブリッド代謝系酵素を発現する大腸菌は各種芳香族化合物に対して野生型のビフェニル代謝系酵素を発現する大腸菌と異なる分解活性を示した。

よって芳香環分解系のコンポーネントを組み合わせることにより、様々な組み合わせのハイブリッド代謝系を構築することができた。

Table 9-1 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
<i>Rhodococcus</i> sp.		
M5	wild type, BP ^r	(37)
Plasmid		
pUC118	Ap ^r	(98)
pJHF101	<i>todC1</i> (F1) A2A3A4 in pUC118, Ap ^r	(63)
pJHF10	<i>todC1</i> (F1) A2A3A4BC in pUC118, Ap ^r	(63)
pYH13	<i>bphA1A2A3A3BC</i> (KF715) in pUC119, Ap ^r	(60)
pQR156	<i>nahAaAbAcAd</i> in pBGS18, Km ^r	(97)
pWH11	<i>nahAc</i> (NAH7) <i>bphA2A3A4B</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pWH101	<i>nahAc</i> (NAH7) <i>bphA2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pHSG715	<i>bphA1</i> (KF715) in pHSG396, Cm ^r	This study
pCKF11	<i>bphA1A2A3A4</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF12	<i>bphA1</i> (LB400) A2A3A4 in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF13	<i>bphA1</i> (KF715)A2A3A4 in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF14	<i>bpdC1</i> (M5) A2A3A4 in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF11	<i>bphA1A2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF12	<i>bphA1</i> (LB400)A2A3A4BC in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF13	<i>bphA1</i> (KF715)A2A3A4BC in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF14	<i>bpdC1</i> (M5) A2A3A4BC in pUC118, Ap ^r	This study

Table 9-2 Comparison of sequence similarity in amino acids of various terminal dioxygenase components

Component	KF707		F1			M5			G7 (NAH7)		
	Product	a.a.size	Product	a.a.size	Similarity (%)	Product	a.a.size	Similarity (%)	Product	a.a.size	Similarity (%)
Large subunit	BphA1	459	TodC1	450	65	BpdC1	462	62	NahAc	449	32
Small subunit	BphA2	213	TodC2	187	60	BpdC2	187	54	NahAd	194	21
Ferredoxin	BphA3	109	TodB	107	60	BpdB	109	53	NahAb	107	39
Ferredoxin reductase	BphA4	408	TodA	410	53	BpdA	413	55	NahAa	328	23

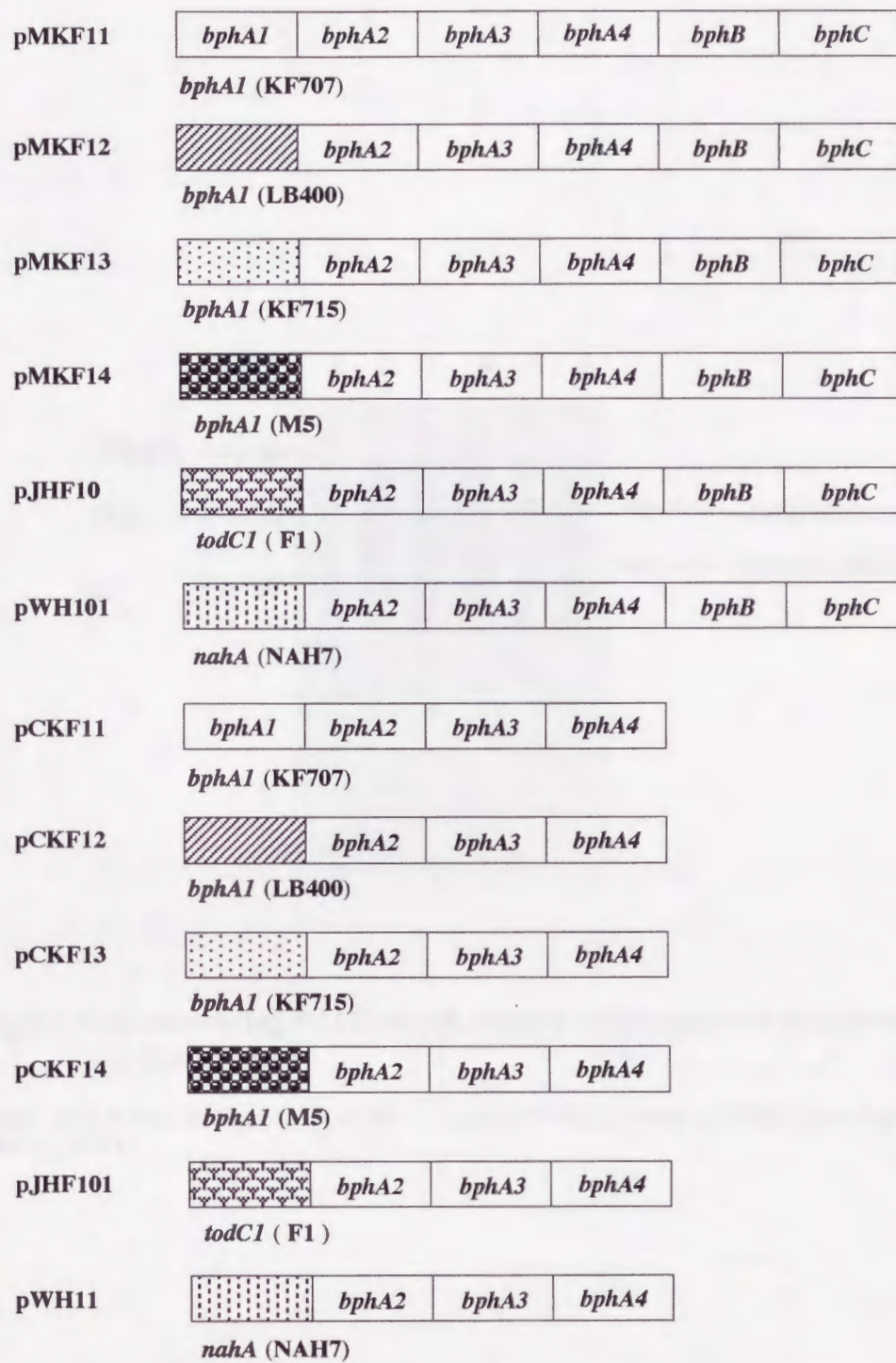


Fig.9-1 Schematic representation of construction of hybrid gene clusters.

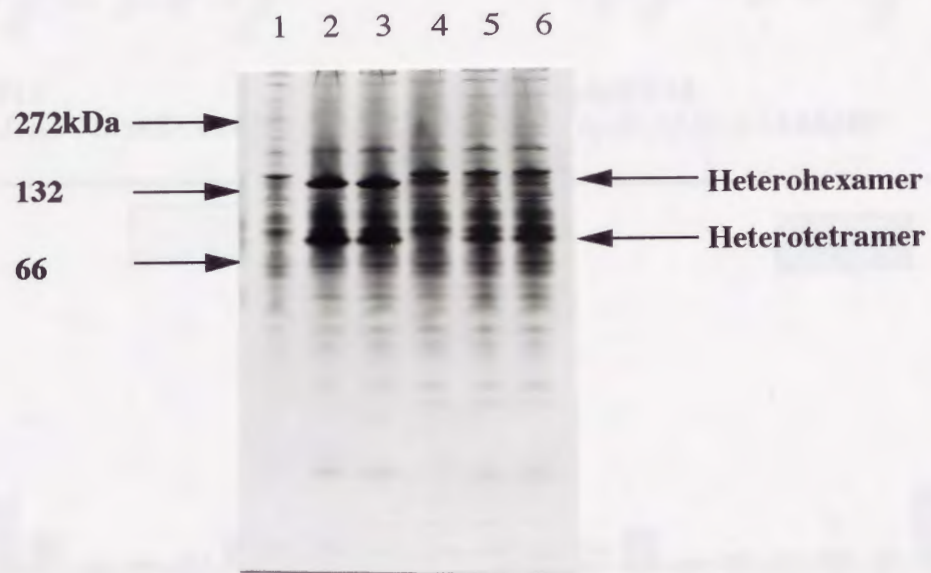


Fig.9-2 Non-denaturing PAGE of cell extracts over-expressed by hybrid dioxygenase gene

Lane1 , pUC118 (control) ; Lane 2, pCKF11 ; Lane3, pCKF12 ; Lane4, pCKF13; Lane 5, pCKF14 ; Lane 6, pWH11

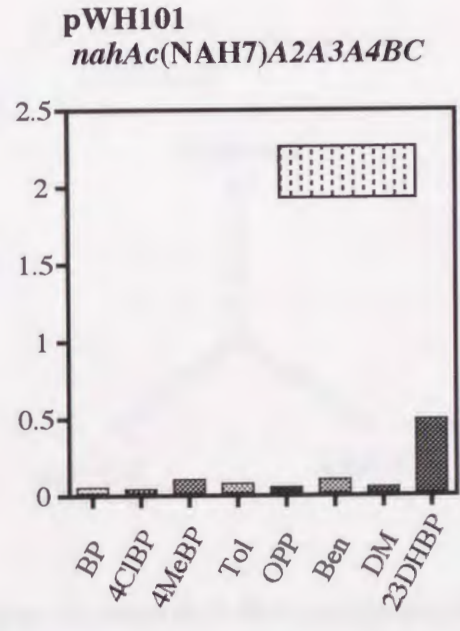
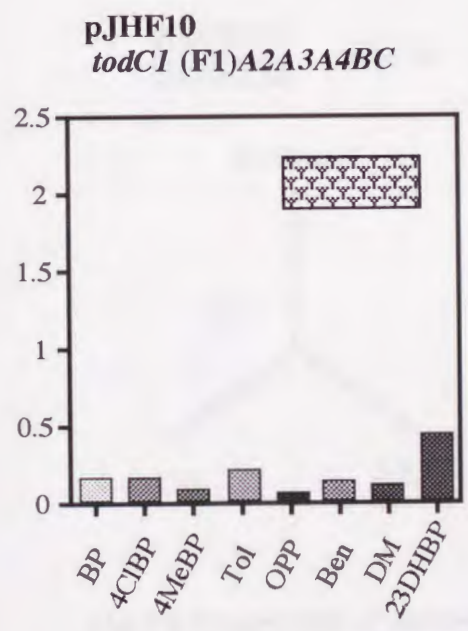
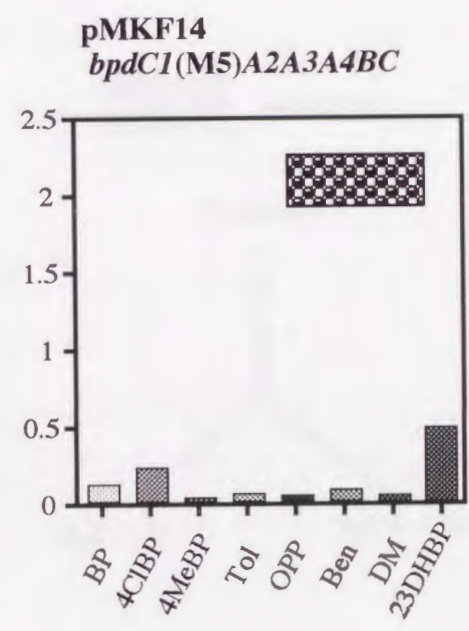
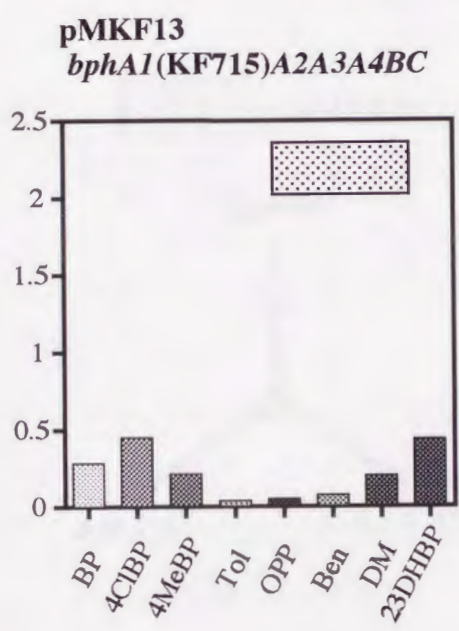
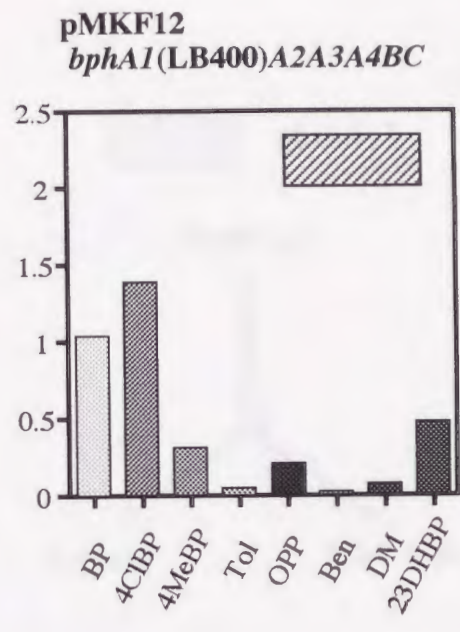
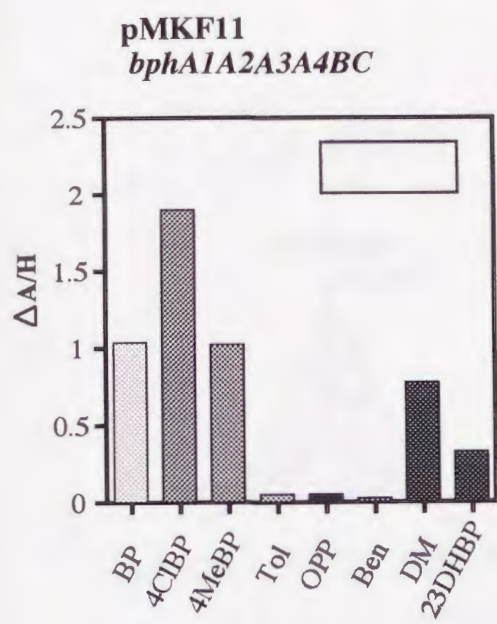


Fig.9-3 Production of ring-*meta* cleavage compounds from various aromatic compounds by the *E. coli* carrying hybrid operons

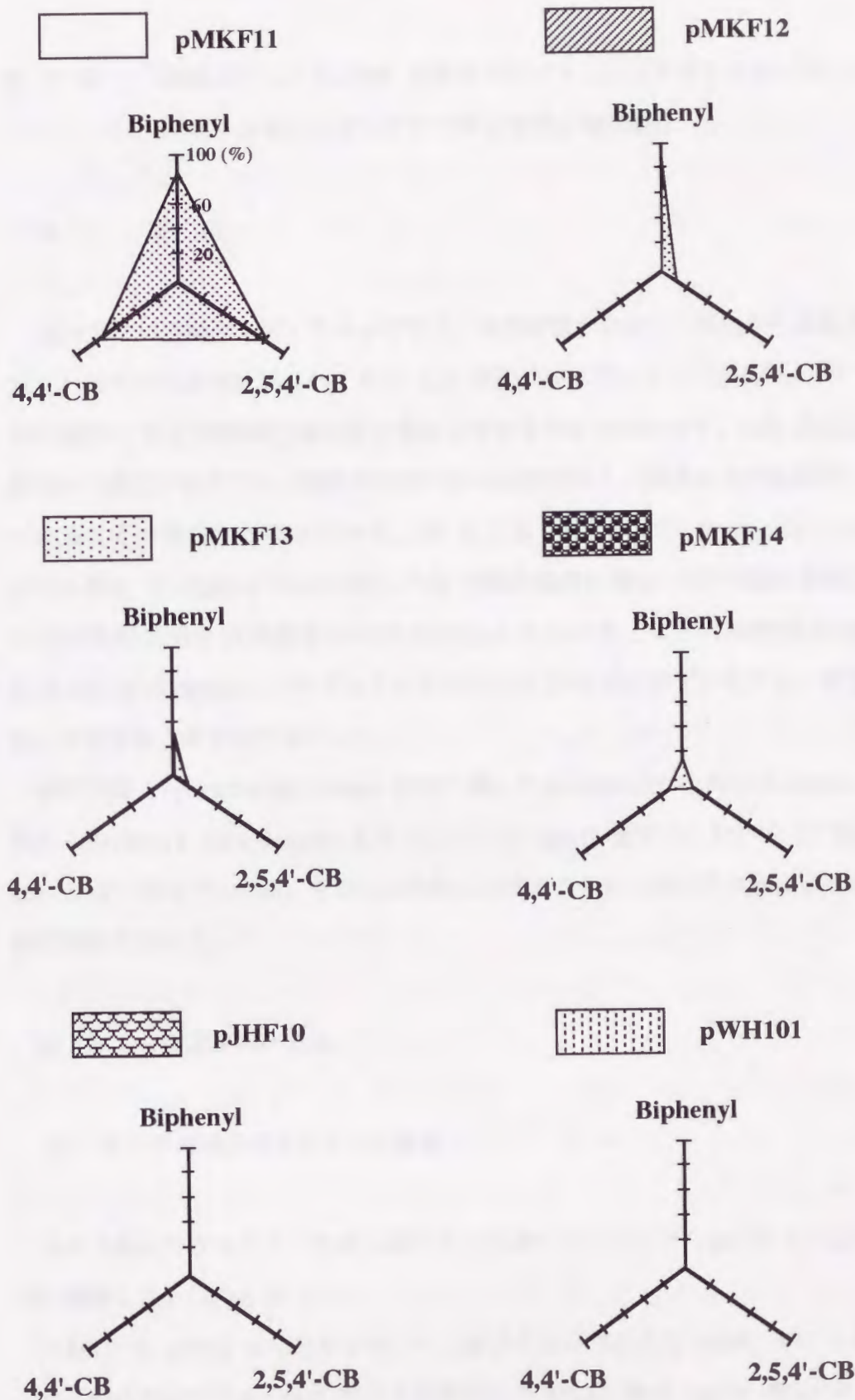


Fig.9-4 Production of *meta*-cleavage compounds from 4,4'-dichlorobiphenyl, 2,5,4'-trichlorobiphenyl by the *E. coli* carrying hybrid gene clusters

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

現在までに各地の土壌、アルカリ環境、有機溶媒やシロアリ体内から多数のビフェニル/PCB 分解菌が分離され、その *bph* 遺伝子がクローニングされた。^(78,108) それらの菌株の PCB 分解特性は大きく異なっているのにも拘わらず、*bph* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性は比較的高く、構造および機能的に類似していることが明らかとなっている。第 6,7,8 章において *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株の PCB 分解特性の差異は PCB の塩素置換部位の異なる芳香環に対する酸素添加能の相違によるもので、これは初期酸素添加酵素 Biphenyl dioxygenase 大サブユニット (BphA1) に存在するわずかなアミノ酸配列の差異に起因することを明らかにした。

本章では *P. pseudoalcaligenes* KF707 株、*P. putida* KF715 株、*P. cepacia* LB400 株の Biphenyl dioxygenase 大サブユニット *bphA1* 遺伝子において 5'-領域 (0.7 kb) と 3'-領域 (0.6 kb) を相互に交換した種々のキメラ遺伝子クラスターの構築と機能解析を試みた。

10・2 実験材料と方法

(1) キメラ遺伝子クラスターの構築

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 pBKF11-14 は以下の手順で構築した。(Fig.10-1)

pBKF11 は pYH13 のマルチクローニングサイトに存在する *EcoRI* サイトと *bphA1* の中心付近に存在する *SaII* サイトを利用して KF715 株の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *EcoRI*-*SaII* 断片を pUC118 のマルチクローニングサイトに存在する

EcoRI-*SaII* サイトに導入して構築した pYH7151 の *SaII* サイトへ pKTF18 の KF707 株の *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *SaII* 断片を挿入して pBKF1011 を構築した。さらに構築したキメラ末端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 pBKF1011 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pBKF11 を構築した。

pBKF12 は pYH13 のマルチクローニングサイトに存在する *EcoRI* サイトと *bphA1* の中心付近に存在する *SaII* サイトを利用して KF715 株の *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *SaII* 断片を pHSG396 のマルチクローニングサイトに存在する *SaII* サイトに導入して構築した pYH7152 の *SaII* サイトへ KF707 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を含む pHSG707 を *SaII* で処理し、KF707 株の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *SaII* 断片を pYH7151 へ挿入して pBKF1021 を構築した。さらに構築したキメラ末端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 pBKF1021 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pBKF12 を構築した。

pBKF13 は pYH13 のマルチクローニングサイトに存在する *EcoRI* サイトと *bphA1* の中心付近に存在する *SaII* サイトを利用して KF715 株の *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *SaII* 断片を pHSG396 のマルチクローニングサイトに存在する *SaII* サイトに導入して構築した pYH7152 の *SaII* サイトへ *P. cepacia* LB400 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を含む pHSG400 を *SaII* で処理し、LB400 株の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *SaII* 断片を pYH7152 へ挿入して pBKF1031 を構築した。さらに構築したキメラ末端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 pBKF1031 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pBKF13 を構築した。

pBKF14 は pYH13 のマルチクローニングサイトに存在する *EcoRI* サイトと *bphA1* の中心付近に存在する *SaII* サイトを利用して KF715 株の *bphA1* 遺伝子の 3'-末端領域を含む *SaII* 断片を pUC118 のマルチクローニングサイトに存在する *SaII* サイトに導入して構築した pYH7151 の *SaII* サイトへ *P. cepacia* LB400 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を含む pHSG400 を *SaII* で処理し、LB400 株の *bphA1* 遺伝子の 5'-末端領域を含む *SaII* 断片を pYH7151 へ挿入して pBKF1041 を構築した。さらに構築したキメラ末端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 pBKF1041 由来の *EcoRI* 断片を pCKF201 へ挿入して pBKF14 を構築した。

(2) 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

構築した各プラスミド上にコードされているキメラ末端ジオキシゲナーゼ系の発現および検出は、7・2 節 (4) に記述した方法に従って行った。

(3) 大腸菌菌体抽出液による未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

構築した各プラスミド上にコードされているキメラ末端ジオキシゲナーゼ系のサブユニット構成を調べるために、大腸菌菌体抽出液による未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を、7・2 節 (5) に記述した方法に従って行った。

(4) 環開裂ジオキシゲナーゼ活性の測定

キメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子クラスターを保有する大腸菌の静止菌体の環開裂ジオキシゲナーゼ活性の測定は 6・2 節 (4) に示した方法に従って行った。

(5) 芳香族化合物分解活性の測定

キメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子クラスターを保有する大腸菌の静止菌体による芳香族化合物分解活性は 9・2 節 (10) で示した方法に従って測定を行った。

(6) PCB に対する環開裂黄色化合物の変換活性の測定

キメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子クラスターを保有する大腸菌の静止菌体による PCB に対する環開裂黄色化合物の変換活性は 9・2 節 (11) で示した方法に従って測定を行った。

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

キメラ末端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. 10-2 に示す。

pBKF101-104 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した。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。

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

キメラ末端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、各キメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pBKF101-104 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。(Fig. 10-3)

その結果、野生型の KF707 株のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を含む pCKF11 ベクター保有する大腸菌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。

一方、キメラ末端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の菌体抽出液については pCKF11 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 4 量体と 6 量体に相当するバンドを検出した。

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

野生型の *P. pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニル代謝系遺伝子とキメラ遺伝子クラスターを含む各プラスミドを保有する大腸菌菌体による *bphC* 産物である 23DHP dioxygenase 活性の測定を行った。

KF707 株の *bph* 遺伝子を保有する大腸菌菌体およびキメラ遺伝子クラスターを保有する大腸菌菌体は、pMKF11 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。(Fig.10-4)

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

各種キメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子クラスター保有大腸菌の静止菌体による BP、4-C1BP、4-MeBP、DM、OPP、Tol、Ben の環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。(Fig.10-4)

構築したキメラ遺伝子クラスターを保有する大腸菌菌体のうち、*bphA1-I* (KF707) / *bphA1-II, III, IV* (LB400) *A2A3A4BC* を含む pMKF101 を保有する大腸菌は BP に対して KF707 株の *bphA1A2A3A4BC* を含む pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比較して約 15 %、また 4-C1BP に対して約 10 % の極めて低い変換活性を示した。また、他の芳香族化合物に対しては変換活性を示さなかった。

bphA1-I (KF715) / *bphA1-II, III, IV* (LB400) *A2A3A4BC* を含む pBKF13 を保有する大腸菌菌体は、BP に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比較して約 50 %、また 4-C1BP に対して約 25 % の比較的低い変換活性を示した。一方、4-MeBP に対しては変換活性は認められなかった。

bphA1-I (KF707) / *bphA1-II, III, IV* (KF715) *A2A3A4BC* を含む pBKF11 を保有する大腸菌菌体は BP、4-C1BP、4-MeBP、DM に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比較して約 1.3 倍の高い変換活性を示した。また、他の芳香族化合物に対しては変換活性を示さず、pMKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した変換活性を示した。

また *bphA1-I* (KF715) / *bphA1-II, III, IV* (KF707) *A2A3A4BC* を含む pBKF12 を保有する大腸菌は BP、4-C1BP、4-MeBP、DM に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と類似した変換活性を示した。

一方、*bphA1-I* (LB400) / *bphA1-II, III, IV* (KF707) *A2A3A4BC* を含む pMKF107 および *bphA1-I* (LB400) / *bphA1-II, III, IV* (KF715) *A2A3A4BC* を含む pBKF14 を保有する大腸菌は芳香族化合物に対して変換活性を示さなかった。

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

各種キメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子クラスター保有大腸菌の静止菌体による BP、4,4'-CB、2,5,4'-CB の環開裂黄色化合物への変換活性を測定した。(Fig. 10-5)

野生型の KF707 株の *bphA1A2A3A4BC* を含む pMKF11 を保有する大腸菌菌体は、BP、4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して高い変換活性を示した。

キメラ遺伝子クラスター *bphA1-I* (KF707)/*bphA1-II, III, IV* (LB400) *A2A3A4BC* を含む pMKF101 および *bphA1-I* (KF715)/*bphA1-II, III, IV* (LB400) *A2A3A4BC* を含む pBKF13 を保有する大腸菌菌体は、BP に対して pMKF101 を保有する大腸菌菌体と類似した変換活性を示したが、2,5,4'-CB に対して約 10 % の比較的低い変換活性を示した。一方、4,4'-CB に対しては変換活性は認められなかった。

またキメラ遺伝子クラスター *bphA1-I* (KF707)/*bphA1-II, III, IV* (KF715) *A2A3A4BC* を含む pBKF11 および *bphA1-I* (KF715)/*bphA1-II, III, IV* (KF707) *A2A3A4BC* を含む pBKF12 を保有する大腸菌菌体は、BP、4,4'-CB、2,5,4'-CB に対して pMKF11 を保有する大腸菌菌体と比べて約 1.3 倍の高い変換活性を示した。

一方、キメラ遺伝子クラスター *bphA1-I* (LB400)/*bphA1-II, III, IV* (KF707) *A2A3A4BC* を含む pMKF107 およびキメラ遺伝子クラスターを *bphA1-I* (LB400)/*bphA1-II, III, IV* (KF715) *A2A3A4BC* 含む pBKF14 を保有する大腸菌は PCB に対して変換活性を示さなかった。

10・4 考 察

構築したキメラ末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を保有する大腸菌菌体のうち、*bphA1-I* (715)/*bphA1-II, III, IV* (707) *A2A3A4BC* を含む pBKF12 を保有する菌株は KF707 株の *bphA1A2A3A4BC* を含む pMKF11 を保有する菌株の 1.3 倍、*bphA1* (KF715) *A2A3A4BC* を含む pMKF13 を保有する菌株の 4.3 倍の高い分解活性を示した。前章において pMKF13 を保有する菌株は pMKF11 を保有する菌株と類似した芳香族化合物の分解活性を示したが、PCB に対する変換活性に相違が認められた。このことは KF707 株及

び KF715 株 BP Dox の一次構造は極めて高い相同性を示すのにも拘わらず、塩素置換部位の異なる芳香環に対する触媒能が異なることを示している。また、KF707 株 BP Dox の BphA1 の N 末端領域と KF715 株 BP Dox のそれを交換することにより、わずかに存在する相異なるアミノ酸配列が導入され、BP Dox の触媒部位が改変され、塩素置換部位の異なる芳香環に対する触媒能が変化したものと考察した。

構築したキメラ末端 Dox 遺伝子クラスターを保有する大腸菌菌体のうち、*bphA1*-I (KF707)/*bphA1*-II, III, IV (LB400)A2A3A4BC を含む pMKF101 を保有する菌株は 4,4'-CB に分解活性は認められないが、2,5,2',5'-CB に分解活性が認められ、PCB に対して広範な分解特性を示した。このことは KF707 株 BphA1 の C 末端領域を LB400 株のそれと交換することにより BP Dox の分解特性が LB400 株 BP Dox と類似したものに改変したことを示し、BP Dox の基質特異性は BphA1 の C 末端領域が決定するものと考察した。

一方、Pellizari らは各地の土壌中から BP または Nah を炭素源として多くの土壌細菌を分離し、それらの Dox 遺伝子の構造と PCB 分解特性の相関関係について調べた。その結果、PCB 分解特性が著しく異なっているのにも拘わらず、Dox 遺伝子が極めて高い相同性を示す多数の菌株を分離した。⁽⁹¹⁾上記の結果から、そのような多様な PCB 分解特性を有するビフェニル/PCB 分解菌の出現は共通の祖先に由来する BP Dox 遺伝子への DNA 突然変異の導入や遺伝子置換などの変異の導入に起因する機能進化によるものと推考される。

以上のようにビフェニル/PCB 分解菌の分解特性に関与する遺伝子コンポーネントの一部を交換することによって人為的に変異を導入し、野生型の BP Dox とは異なる新規な分解特性を有する BP Dox を構築することができた。さらに構築した遺伝子コンポーネントを野生型のビフェニル/PCB 分解菌に導入することにより、新規な分解能を有するビフェニル/PCB 分解菌を構築できるものと考えられる。

10・5 小 括

各種ビフェニル/PCB 分解菌の *bphA1* 遺伝子間において 5'-領域 (0.7 kb) と

3'-領域 (0.6 kb) を相互に交換し、種々のキメラ遺伝子クラスターを構築した。

そのうち、BphA1 (KF707) /A1 (KF715) A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は、BP に対して KF707 BP Dox 発現する大腸菌の 1.3 倍、BphA1 (KF715) /A2A3A4BC (KF707) 発現する大腸菌の 4.3 倍の高い分解活性を示した。また、BphA1 (KF707) /A1 (LB400) A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は、KF707 BP Dox 発現する大腸菌と比べて高塩化ジフェニル (tetra-, pentachlorobiphenyl) を含め PCB に対して広範な分解スペクトルを示した。

このように極めて相同性が高いにも拘わらず、PCB 分解特性に関与する遺伝子コンポーネントの一部を交換することにより、新規分解能を有する分解系酵素を構築することができた。

Table 10-1 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 pUC118, Ap ^r	(20)
pCKF11	<i>bphA1A2A3A4</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF12	<i>bphA1</i> (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF13	<i>bphA1</i> (KF715) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF101	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>A1</i> -II,III,IV (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF107	<i>bphA1</i> -I (LB400) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF101	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF715) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF102	<i>bphA1</i> -I (KF715) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF707) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF103	<i>bphA1</i> -I (KF715) / <i>A1</i> -II,III,IV (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF104	<i>bphA1</i> -I (LB400) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF715) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF11	<i>bphA1A2A3A4 BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF12	<i>bphA1</i> (LB400) <i>A2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF13	<i>bphA1</i> (KF715) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF101	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>A1</i> -II, III,IV (LB400) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pMKF107	<i>bphA1</i> -I (LB400) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF11	<i>bphA1</i> -I (KF707) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF715) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF12	<i>bphA1</i> -I (KF715) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF707) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF13	<i>bphA1</i> -I (KF715) / <i>A1</i> -II,III,IV (LB400) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pBKF14	<i>bphA1</i> -I (LB400) / <i>A1</i> -II,III,IV (KF715) <i>A2A3A4BC</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pCKF201	<i>bphA2A3A4BC</i> (KF707) in pUC118, Ap ^r	This study

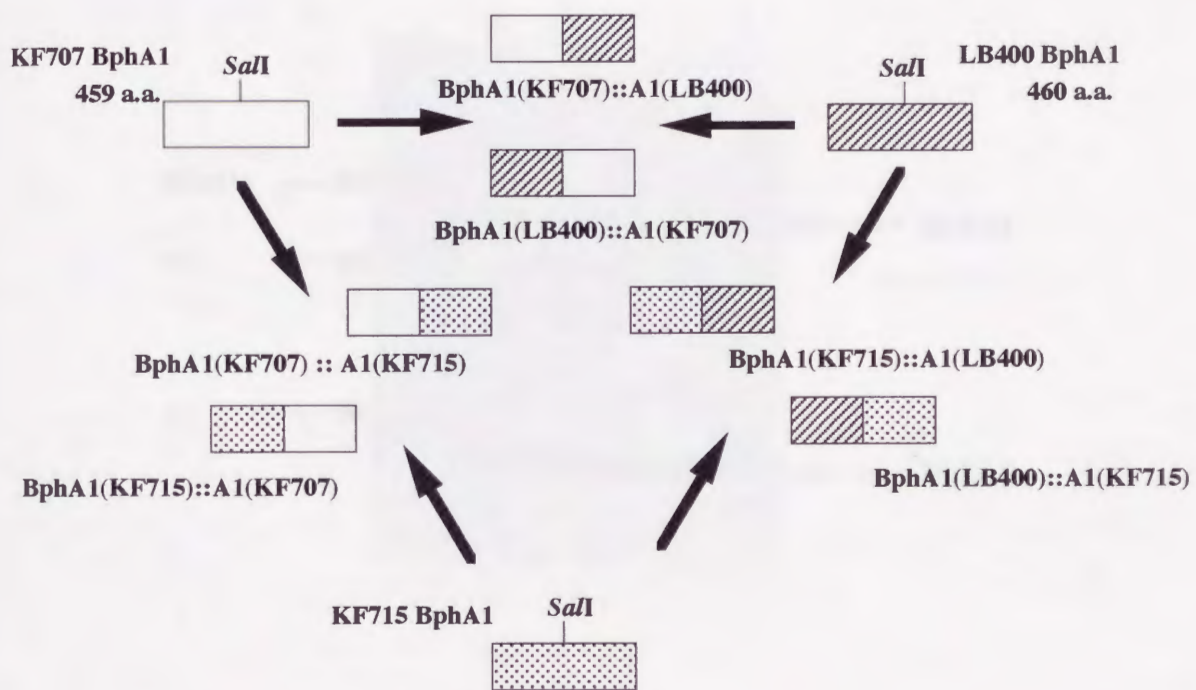


Fig. 10-1 Construction of chimeric dioxygenases derived from various aromatic compound degrading strains



Fig.10-2 SDS-PAGE of chimeric biphenyl dioxygenases expressed by *E. coli* cells carrying various plasmids.

Lane1 , pUC118 (control) ; Lane 2, pCKF11 ; Lane3, pBKF101 ; Lane4, pBKF102 ; Lane5, pBKF103 ; Lane6, pBKF104 ;

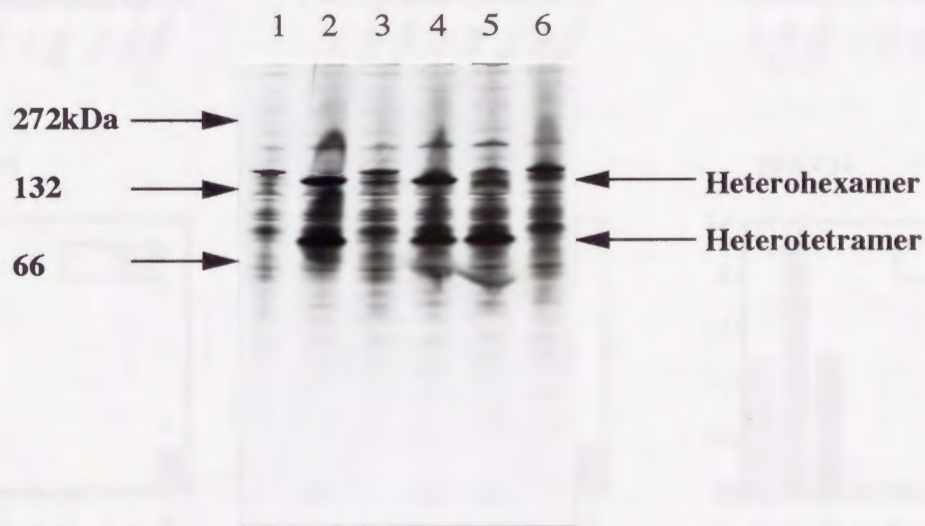


Fig.10-3 Non-denaturing PAGE of cell extracts over-expressed by chimeric dioxygenase gene

Lane1 , pUC118 (control) ; Lane 2, pCKF11 ; Lane3, pBKF101 ; Lane4, pBKF102 ; Lane5, pBKF103 ; Lane6, pBKF104 ;

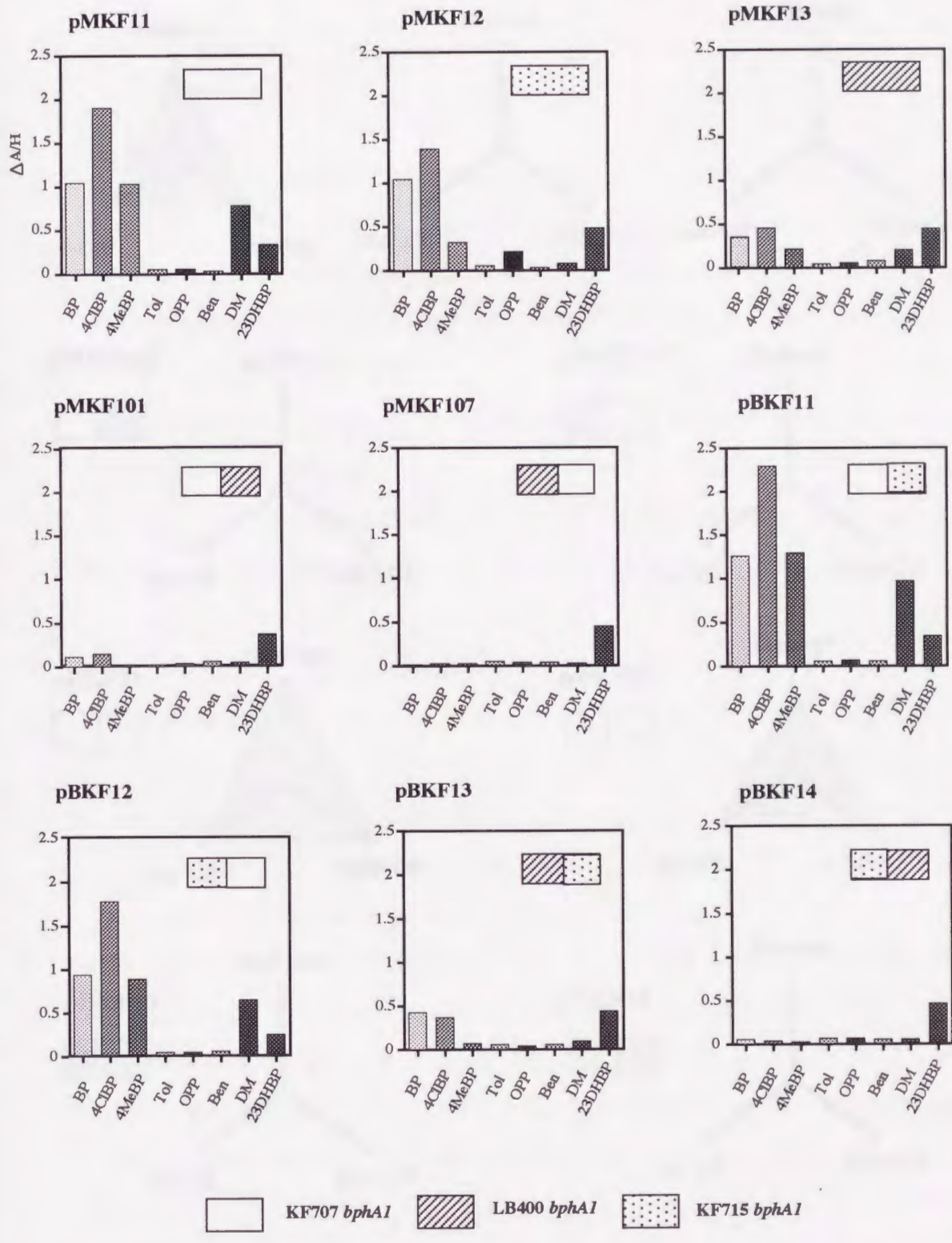


Fig.10-4 Production of ring-cleavage compounds from various aromatic compounds by the *E. coli* cells carrying chimeric gene clusters

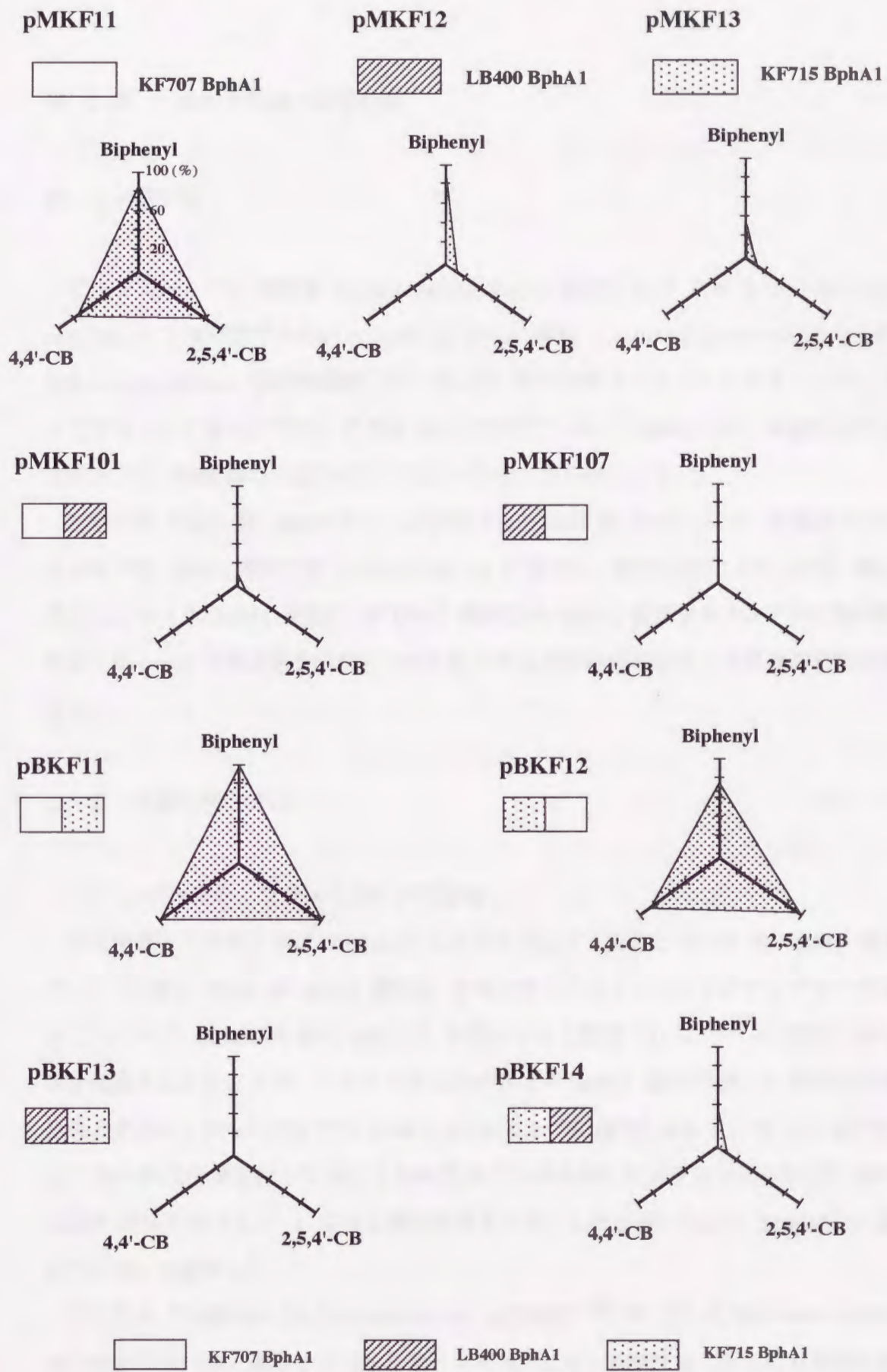


Fig.10-5 Production of ring-cleavage yellow compounds from 4,4'-dichlorobiphenyl, 2,5,4'-trichlorobiphenyl the *E. coli* cells carrying chimeric gene clusters

11・1 緒言

ビフェニル/PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株は PCB を 2,3-dioxygenation により分解するが、*P. cepacia* LB400 株は 2,3-dioxygenation とともに 3,4-dioxygenation 活性が認められ、幅広い PCB 分解スペクトルを示す。このことはビフェニルジオキシゲナーゼ (BP Dox) 大サブユニット BphA1 の C 末端部分に存在するアミノ酸配列の相違に起因することを先に明らかにした。

本章では KF707 株 *bphA1* の 5' 末端領域と LB400 株 *bphA1* の 3' 末端領域からなるキメラ *bphA1* 遺伝子を Suicide vector に連結し、接合伝達により KF707 株に導入し、キメラ *bphA1* 遺伝子が KF707 株染色体 *bphA1* 遺伝子とランダムに相同組換えを起こした各種菌株を取得し、PCB に対する分解特性が改変した菌株の取得を試みた。

11・2 実験材料と方法

(1) 使用菌株、プラスミドおよび培地

使用菌株とプラスミドは Table 11-1 に示した。5' 末端を KF707 株 *bphA1* 遺伝子、3' 末端が LB400 株 *bphA1* 遺伝子由来のキメラビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (BphA1) を含む pRKF101 を保有する大腸菌 S17-1⁽⁹⁸⁾ と KF707 株を接合伝達することにより、プラスミドと染色体上の *bphA1* 遺伝子が 1 箇所でも相同組換えを起こしたもののなかから Single crossover 株 KF707-S21 を、さらに KF707-S21 株の継代培養を行うことにより染色体上に導入されたプラスミドと KF707 株の *bphA1* 遺伝子がさらに 1 箇所でも相同組換えを起こした菌株 Double crossover 株 KF707-D34 を取得した。

プラスミド pRKF101 は Suicide vector pSUPB30⁽⁷⁶⁾ の Tc^R と Suicide vector pSUPB21⁽⁷⁶⁾ の *lacZ* 遺伝子を *Xho*I サイトを利用して、交換することにより構築した

pSUPB301 の *EcoRI* サイトに、pCKF102 由来のキメラピフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする *bphA1* 遺伝子を含む *EcoRI* 断片を挿入することにより構築した。(Fig. 11-1)

(2) プラスミドの接合伝達と組換え菌の選択

プラスミド pRK101 を保有する大腸菌 S17-1 株から KF707 株 への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大腸菌 S17-1 株および受容菌株である KF707 株を各々 LB プレート上で 30℃ 下、一晚培養したものを 1 ml の LB 培地に 1 白金耳を別々に懸濁した。菌体の懸濁液のうち 0.5 ml ずつ混合して 30℃、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 μm 、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℃ で一晚培養した。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 μl を終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ の ゲンタマイシン (和光純薬)、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) を含む BSM-Suc プレート上に塗抹した。これを 30℃ で一晚培養して、プラスミド pRK101 が KF707 株の染色体と 1 箇所相同組換えを起こし、 β -galactosidase 遺伝子 (*lacZ*) が導入されることにより X-gal を分解して青色を示す菌株を得た。(Fig. 11-1) 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 Table 11-1 に示す。

(3) Double crossover 株の取得

Single crossover 株において、導入された pRK101 上のキメラピフェニルジオキシゲナーゼ *bphA1* 遺伝子と KF707 株染色体上の *bphA1* 遺伝子の間で再び相同組換えが生じ、KF707 株染色体上の *bphA1* 遺伝子およびゲンタマイシン耐性遺伝子と β -galactosidase 遺伝子 (*lacZ*) を含むプラスミドベクターが欠失した Double crossover 株の取得は以下に示す方法によって行った。

すなわち、Single crossover 株を L-broth 3 ml へ接種し、30℃ 下で一晚培養する。培養液のうち 30 μl を新たな L-broth 3 ml へ接種し、約 10 世代について継

代培養を行う。その際、12 時間ごとに培養液を 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) を含む BSM-Suc プレート上に塗抹し、白色を示す菌株を取得した。さらに得られた菌株を終濃度 20 μ g/ml の ゲンタマイシン (和光純薬)、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) を含む BSM-Suc プレート上に接種して、ゲンタマイシン感受性であることを確認した。(Fig.11-1)

(4) サザンハイブリダイゼーション

KF707 株、KF707-S21 株、KF707-D34 株より 4・2 節(2) に示す方法に従って調製した 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 Biodyne B nylon membrane (Pall) へ移行した。DNA プロブは以下の方法で調製した。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。プロブ DNA のラベリングおよび DNA の相同性の検出は、4・2 節(3) に示す方法に従って行った。

(5) PCB 分解産物の同定

組換え菌 KF707-D34 株の 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行った。組換え菌 KF707-D34 株より 2・2 節(2) に示した方法により静止菌体を調製し、2・2 節(3) に示す方法により分解産物の同定を行った。

(6) PCB 分解スペクトルの測定

PCB 異性体の混合物である Kaneclor 300 (ナカライテスク) に対する組換え菌 KF707-D34 株の分解活性の測定を Furukawa らの方法⁽⁴⁴⁾ に従って行った。

組換え菌 KF707-D34 株の静止菌体を 2・2 節(2) に示した方法により調製し、100 ml 三角フラスコ中に 5 ml の静止菌体を分注し、エタノール中に溶解した Kaneclor 300 (5mg/ml) を終濃度 100 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、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、1 μ l を GC-MS (QP-5000、島津製作所) に供した。担体は silicon OV-1 (ジールサイエンス) を用い、カラムは 150°C から 10°C/min で昇温した。

(7) KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子のクローニング

KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子の PCR 産物を合成し、クローニングを行った。増幅には 7・2 節 (1) で合成したオリゴヌクレオチドを使用した。

鋳型 DNA は 4・2 節 (2) に示した方法に従って抽出した KF707-D34 株 Genomic DNA を使用し、7・2 節 (1) に示す方法に従って *bphA1* 遺伝子の増幅反応を行った。

さらに PCR 産物をアガロースゲル (1.0 %) により電気泳動を行い、泳動した 1.6 kb の DNA 断片をアガロースゲルから GeneClean kit (フナコシ製) を使用して回収し、制限酵素処理した後に、大腸菌発現ベクター pHSG396 の マルチクローニングサイト *EcoRI* へ導入し、pQKF101 を構築した。

(8) KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子保有大腸菌菌体抽出液の変性ポリアクリルアミド電気泳動

KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子を保有する大腸菌菌体抽出液の変性ポリアクリルアミド電気泳動は 7・2 節 (4) に示す方法に従って行った。

(9) KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

3・2 節 (5) に示す方法に従って KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定を行った。

11・3 実験結果

11・3・1 組換え型ピフェニルジオキシゲナーゼ産生株 KF707-D34 の遺伝子構造

KF707 株、KF707-S21 株および KF707-D34 株から Genomic DNA を抽出し、制限酵

素 *XhoI* で消化後、pSUPB30 ベクターの *BamHI-EcoRI* 断片をプローブとしてサザン解析を行った。

pSUPB30 ベクターの DNA 断片をプローブとしたサザン解析から、KF707-S21 株については約 23 kb の相同な DNA 断片が認められたが、KF707 株、KF707-D34 株については相同な DNA 断片が認められなかった。

このことから KF707-D34 株は相同組換えにより導入されたゲンタマイシン耐性遺伝子や *lacZ* 遺伝子が再度の相同組換えにより欠失した Double crossover 株であることを確認した。

11・3・2 ビフェニル資化能の測定

KF707-S21 株と KF707-D34 株の BP に対する資化能を調べた。両菌株は BSM-BP plate により生育し、また BP を炭素源とする液体培地中においても KF707-S21 株、KF707-D34 株ともに生育が認められた。このことから両菌株は BP を唯一の炭素源として生育することを確認した。

11・3・3 PCB 分解産物の特定

KF707-D34 株の静止菌体による 4,4'-CB、2,5,4'-CB および 2,5,2',5'-CB の分解産物の同定を行った。(Fig. 11-2, Table 11-2)

KF707-D34 株は 2,5,4'-CB より最終分解産物として 4-chlorobenzoic acid (compound b-I in Fig. 11-2) 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 (b-VII, VIII in Fig. 11-2)、dihydrodiol 中間体 (b-II, III in Fig. 11-2)、dihydroxy compound 中間体 (b-IV in Fig. 11-2) を生成した。

また、4,4'-CB より KF707-D34 株は最終分解産物として環開裂黄色化合物 (a-II in Fig. 11-2) を生成した。一方、2,5,2',5'-CB より 2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxybiphenyl (c-I in Fig. 11-2) を生成した。

11・3・4 Kaneclor 300 分解特性

KF707 株、LB400 株、KF707-D34 株の静止菌体による PCB 異性体の混合物である Kaneclor 300 の分解活性の測定を行った。(Fig.11-3) KF707 株は Kaneclor 300 のうち、dichlorobiphenyl (peak 1,2,3) を完全に分解し、trichlorobiphenyl (peak 4,5,6,7,8,9,10,11) および tetrachlorobiphenyl (peak 12,13) についても分解活性が認められた。

また、LB400 株は dichlorobiphenyl (peak 1,2,3) および trichlorobiphenyl (peak 4,5) の一部を完全に分解した。また trichlorobiphenyl (peak 6,7,8,9,10,11) および tetrachlorobiphenyl (peak 12,13,15,16,17,18,20,23,25) についても分解活性が認められた。

一方、KF707-D34 株については dichlorobiphenyl (peak 1,2,3) を完全に分解したが、tri- および tetrachlorobiphenyl についてはその一部 (peak 8,9,10,11,12,13) のみに分解活性が認められた。しかし、KF707 株、LB400 株とは異なり tri- および tetrachlorobiphenyl (peak 8,9,10,11,12,13) に対して極めて高い分解活性が認められた。

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

KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子を含む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。pQKF101 を保有する大腸菌菌体において、BphA1 (51 kDa) に相当するバンドを確認した。

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

KF707-D34 株 *bphA1* 遺伝子を決定し、KF707 株 及び LB400 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列との比較を行った。

Fig. 11-4 に示すように KF707-D34 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列は開始コドンの A (アデニン) から 1049 番目の A まで KF707 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列と一致していたが、1065 番目の C (シトシン) から 1126 番目の A までは LB400 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列と一致した。

その結果、KF707-D34 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列から予想される BphA1 のアミノ酸配列は KF707 株のそれと 1 アミノ酸残基の配列が Thr-376 (KF707) → Asn (LB400) への置換していることを明らかにした。

11・4 考 察

KF707 株 *bphA1* の 5' 末端領域と LB400 株 *bphA1* の 3' 末端領域からなるキメラ *bphA1* 遺伝子を接合伝達により KF707 株に導入し、キメラ *bphA1* 遺伝子が KF707 株染色体 *bphA1* 遺伝子と相同組換えを起こし、4,4'-CB、2,5,2',5'-CB を共に分解し、2,5,4'-CB に対して 2,3- 及び 3,4-dioxygenation の両活性を示す KF707-D34 株を構築した。Suyama らは KF707 株の染色体上の *bphA1* 遺伝子を *P. putida* F1 株の分解特性に関与する Toluene dioxygenase 大サブユニット遺伝子 *todC1* と相同組換えにより遺伝子コンポーネントを交換し、BP、Tol、Ben を分解、資化すると共に TCE (Trichloroethene) を効率よく分解するハイブリッド分解菌を取得した。⁽¹⁰⁶⁾ 今回用いた手法は *in vivo* において BphA1 の C 末端領域のアミノ酸配列がランダムに置換した組換え菌を得ることができ、多様な分解特性を保持する菌株を取得することができる点に特徴があり、また X-gal を含む L-plate を用いることにより、Single crossover 株から安定な遺伝子構造を保持する Double crossover 株を簡便に取得することができた。

以上のように、分解特性に関与する遺伝子コンポーネントをビフェニル/PCB 分解菌へ導入し、*in vivo* において染色体上の遺伝子コンポーネントと相同組換えを起こした新規な分解特性を有するビフェニル/PCB 分解菌を育種する手法は従来の方法に

比べて短時間に多様な分解特性を有する数多くの変異体を取得することができた。

従って、各種芳香環分解菌の末端 Dox 大サブユニット遺伝子は数多くクローニングされ、塩基配列が決定されているが、機能の相違にも拘わらず、それらの相同性は高いことが明らかとなっており、様々な芳香環分解菌の遺伝子コンポーネントを分解特性の異なる芳香環分解菌へ導入することにより、さらに様々な分解能の有する環境微生物の育種を行うことができるものと考察した。

11・5 小 括

ビフェニル/ PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株 *bphA1* の 5' 末端領域と *P. cepacia* LB400 株 *bphA1* の 3' 末端領域からなるキメラ *bphA1* 遺伝子を Suicide vector に連結し、接合伝達により KF707 株に導入し、キメラ *bphA1* 遺伝子が KF707 株染色体 *bphA1* 遺伝子と相同組換えを起こした菌株を取得した。

そのうち KF707-D34 株は KF707 株と LB400 株間で分解能が異なる 4,4'-、2,5,2',5'-CB を共に分解し、2,5,4'-CB を 2,3- 及び 3,4-dioxygenation の両活性により分解した。また PCB mixture である KC 300 の tri-, tetrachlorobiphenyl に対して高い分解活性を示し、両親菌株と異なる PCB 分解スペクトルを示した。

一方、KF707-D34 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列を決定し、Thr-376 (KF707) が Asn (LB400) へ置換していることを確認した。

以上の結果から、*in vivo* における遺伝子コンポーネントの相同組換えにより新規な分解能を有するビフェニル/ PCB 分解菌が取得することができた。

Table 11-1 Bacterial strains and plasmids used in this chapter

Strain and Plasmid	Relevant description	Source or reference
Strain		
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	wild type, BP ⁺	(39)
	KF707-S21 BP ⁺ , single crossover recombinant, Gm ^r , LacZ ⁺	This study
	KF707-D34 BP ⁺ , double crossover recombinant, Gm ^s , LacZ ⁻	This study
<i>Pseudomonas cepacia</i> LB400	wild type, BP ⁺	(14)
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac proAB)</i> [F' <i>proAB lacIq DM15 traD36</i>]	Takara Shuzo
S17-1	<i>pro thi hsdR</i> , chromosomally integrated RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	(98)
Plasmid		
pUC118	Ap ^r	(121)
pHSG396	Cm ^r	(110)
pSUPB30	Tc ^r , Gm ^r , Cm ^r	(99)
pSUPB301	Gm ^r , Cm ^r , lacZ ⁺	This study
pCKF102	<i>bphA1</i> -I, II (KF707) / <i>bphA1</i> -III, IV (LB400) <i>A2A3A4</i> in pUC118, Ap ^r	This study
pRKF101	<i>bphA1</i> -I, II (KF707) / <i>bphA1</i> -III, IV (LB400) in pSUP301, Gm ^r , LacZ ⁺	This study
pQKF101	<i>bphA1</i> (KF707-D34) in pHSG396, Cm ^r	This study

Table 11-2 Metabolite from 4,4'-CB, 2,5,4'-CB and 2,5,2',5'-CB by *P. pseudoalcaligenes* KF707-D34

Strain	Substrate	GC-MS			
		Peak in Fig.	Compound	Mol. mass	No. of chlorine substitutions
KF707-D34	4,4'-CB	a-I	4-chlorobenzoic acid	228	1
	2,5,4'-CB	b-I	4-chlorobenzoic acid	228	1
		b-II,III	2,5,4'-trichloro-3(or 4)-hydroxy biphenyl (dehydration product from 3,4-dihydrodiol)	344	3
		b-IV	dichloro-hydroxy biphenyl (dehydration product from 2,3-dihydrodiol)	310	2
		b-V,VI	2 (or 5),4' -dichloro-2,3-dihydroxy biphenyl	398	2
		b-VII	2,5,4'-trichloro-3,4-dihydroxy biphenyl	432	3
		b-VIII	ring meta-cleavage compound	464	3
	2,5,2',5'-CB	c-I	2,5,2',5'-tetrachloro-3,4-dihydroxy biphenyl (3,4-catechol)	466	4

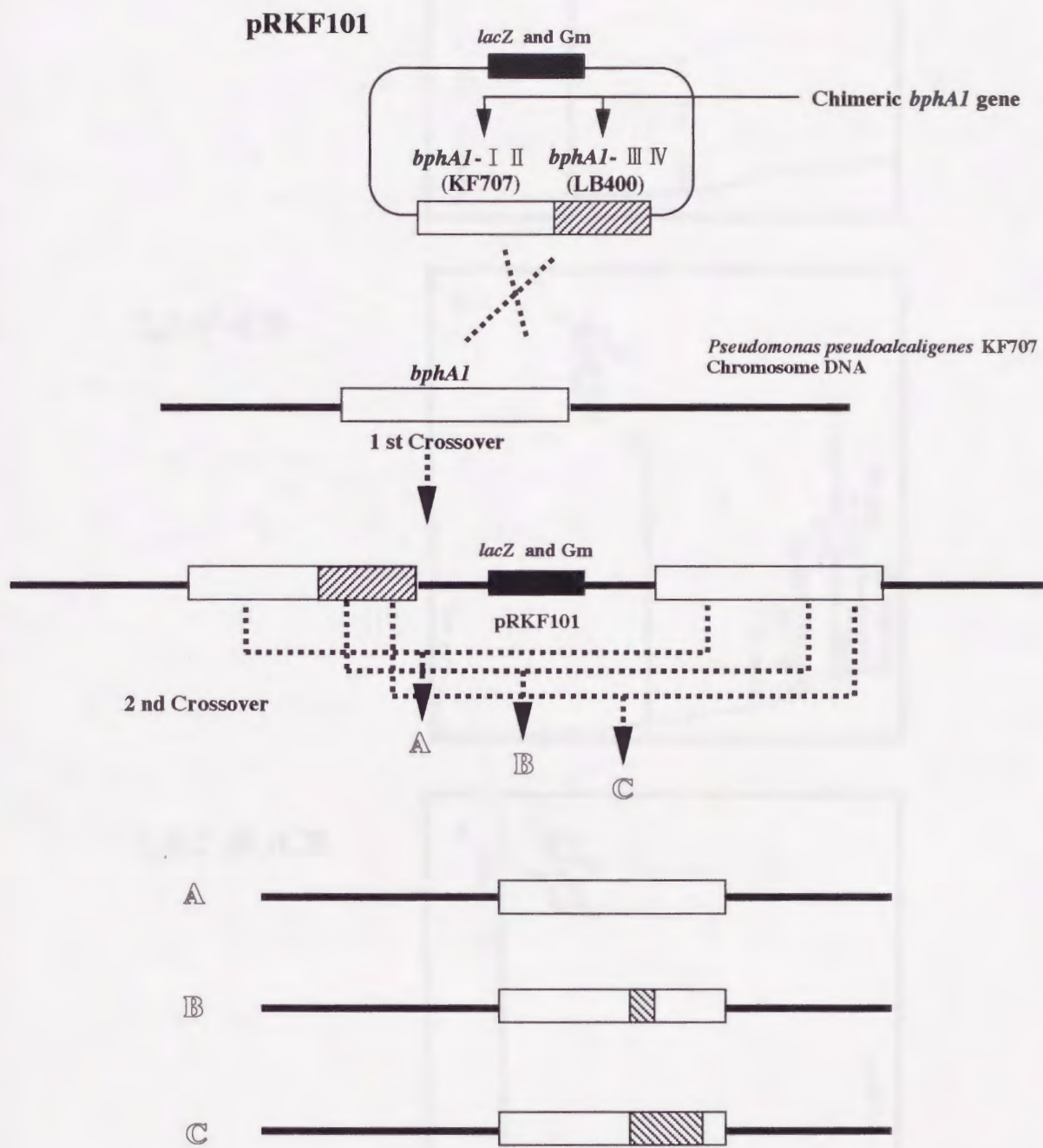
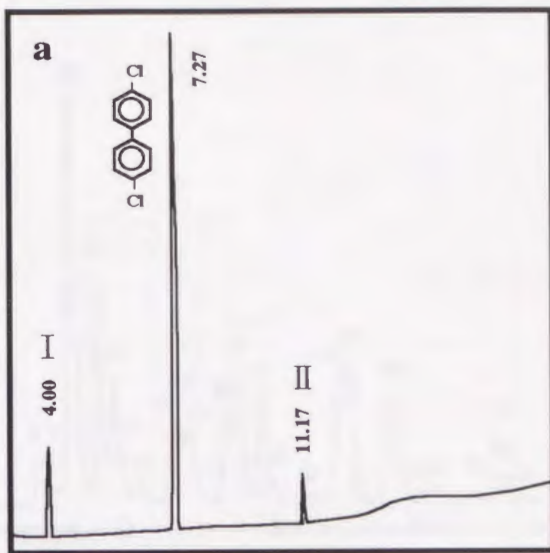
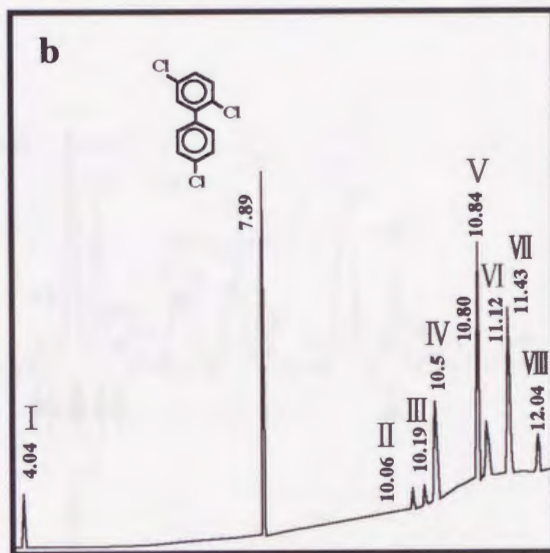


Fig.11-1 Schematic representation of homologous recombinations between pRKF101 and the chromosomal *bph* DNA of *P. pseudoalcaligenes* KF707 by single crossover and subsequent second internal crossover

4,4' -CB



2,5,4' -CB



2,5,2',5' -CB

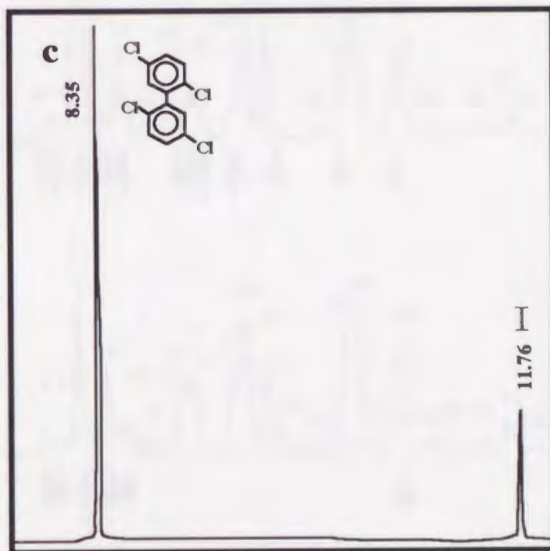


Fig.11-2 GC-MS analyses of the metabolites from 4,4'-CB, 2,5,4'-CB, and 2,5,2',5'-CB by strain KF707-D34

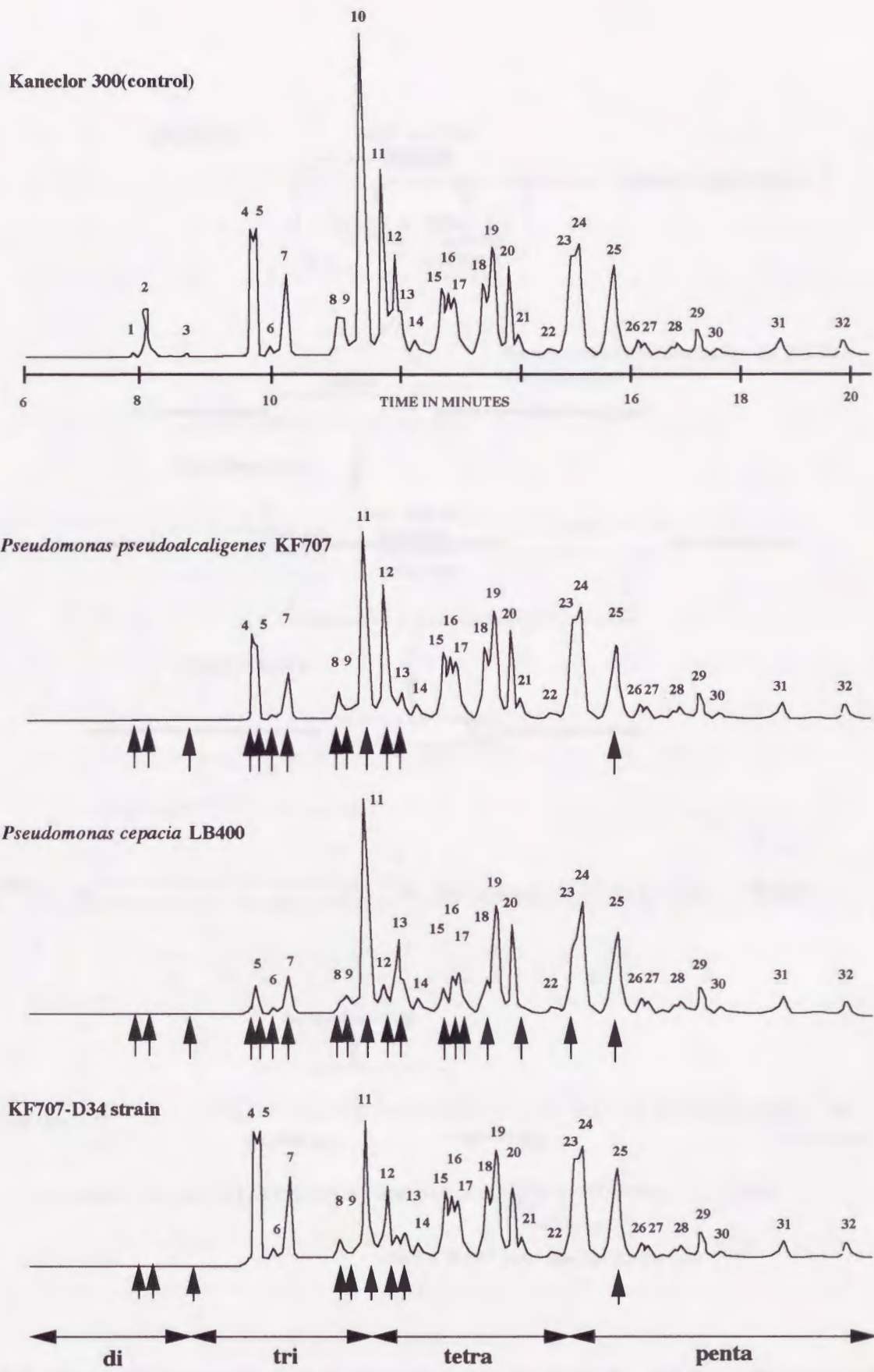


Fig.11-3 Degradation of Kaneclor 300 by the strain KF707, LB400, and recombinant strain KF707-D34

本研究では、PCB 分解特性に大きな差異が存在するビフェニル/ PCB 分解菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *P. cepacia* LB400 株のビフェニル/ PCB 代謝オペロンを比較検討し、PCB 分解特性の決定に関与しているビフェニル代謝酵素の機能と構造を特定するとともに、それらの知見をもとに新規分解系酵素の構築とビフェニル/ PCB 分解菌の育種を行ったものである。以下にその概要を述べる。

KF707 株と LB400 株の 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認められず、両菌株のビフェニル代謝系は芳香族化合物に対する分解および資化性が異なることを明らかにした。

次に KF707 株と LB400 株による 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 株は変換活性は認められず、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る傾向を示した。

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、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ものと考察した。従って両菌株の 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起因するものと考察した。(第 2 章)

決定した DNA 塩基配列から、KF707 株の *bphX* 領域には 4 つの読み枠 (ORF) が認められた。アミノ酸配列のホモロジー検索よりそれぞれの ORF は 2-hydroxy penta-2,4-dienoate hydratase (BphX1), Acetaldehyde dehydrogenase (BphX2), 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (BphX3) をコードし、BP からの環開裂化合物の加水分解より生成する 2-hydroxy-penta-2,4-dienoate を Acetyl-CoA へ代謝に関与する遺伝子群であるものと考察した。(第 3 章)

KF707 株の Glutathione S-transferase をコードする *bphX0* 遺伝子を含む DNA 断

片をプローブとしたサザン解析により、各種ビフェニル/PCB分解菌のゲノムに相同なDNA領域が認められ、*bphX0* 遺伝子は他の *bph* 遺伝子とともに水平伝搬しているものと考察した。

一方、KF707 株及び KF715 株 *bph* 遺伝子の塩基配列から、*P. putida* KF715 株の *bphX* 領域は欠失により失われたものと考察した。しかしサザン解析から *P. putida* KF715 株の *bphD* 遺伝子の下流領域に KF707 株 *bphX1X2X3* 遺伝子と相同な領域が存在することを確認した。

以上のように *bphX0* および *bphX1X2X3* 遺伝子は各種ビフェニル/PCB分解菌に存在するが、その遺伝子配置は菌株により大きく異なることを明らかにした。(第4章)

KF707 株の *bphA1* 遺伝子上流領域の塩基配列を決定し、LB400 株の *orf0* とアミノ酸レベルで 80.0% の高いホモロジーを示す読み枠 *orf0* の存在を確認した。

次に各種ビフェニル/PCB分解菌の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、*orf0* がビフェニル/PCB分解菌に広く存在することを確認した。

さらに構築した KF707 株の *orf0* 破壊株はビフェニル資化能を失い、ビフェニルから環開裂黄色化合物を蓄積した。また、*bphX* 遺伝子群と *bphD* 遺伝子の発現産物の酵素活性が失われており、*orf0* は *bph* 遺伝子の発現調節に関与する可能性を示した。(第5章)

KF707 株と LB400 株の *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。

ハイブリッド代謝系 BphA1 (LB400)A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は、4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB に対して LB400 株のビフェニル代謝系を発現する大腸菌と類似した環開裂黄色化合物変換活性を示した。また 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ことを明らかにした。(第6章)

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 断片を交換してアミノ酸配列を置換したキメラ BP Dox 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。

そのうち BphA1-I, II (KF707)/BphA1-III (LB400)/BphA1-IV (KF707)A2A3A4 および BphA1-I, II, III (KF707)/BphA1-IV (LB400)A2A3A4 発現大腸菌、BphA1-I, II, III (LB400)/BphA1-IV (KF707)A2A3A4 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 BP Dox 発現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 の芳香環 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に野生型のそれと著しい相違が認められた。

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。(第 7 章)

部位特異的変異法により BphA1 の C 末端領域のアミノ酸残基を置換した変異型 BP Dox を構築し、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。

BphA1 のアミノ酸配列を LB400 型である Thr-335、Phe-336、Asn-338、Ile-341 から KF707 型の Ala、Ile、Thr、Thr へ置換した変異型 BP Dox 発現大腸菌と BphA1 のアミノ酸配列を KF707 型である Thr-376 から LB400 型の Asn へ置換した変異型 BP Dox 発現大腸菌は 4,4'-CB、2,5,4'-CB、2,5,2',5'-CB をともに分解し、野生型 BP Dox を発現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 の芳香環 4-chlorophenyl ring および 2,5-dichlorophenyl ring に対してともに酸素添加能が認められた。

よって KF707 株 BP Dox BphA1 の Thr-376 および Ala-334、Ile-335、Thr-337 が BP Dox の機能の相違に関与し、両菌株の PCB 分解特性の決定に重要な役割を果たしているものと考察した。(第 8 章)

分解特性に大きく関与する諸種の芳香環末端ジオキシゲナーゼ末端 Dox 大サブユニット (鉄イオウタンパク質 ISP) を交換したハイブリッド代謝系酵素を構築し、機能解析を行った。

KF707 BP Dox の ISP (BphA1) をビフェニル、トルエン、ナフタレン代謝系の芳

香環末端 Dox ISP と交換したハイブリッド末端 Dox は会合体を形成し、それらを発現する大腸菌は各種芳香族化合物に対して様々な分解活性を示した。

このことから各種芳香環分解菌末端 Dox を組換えることにより新規な分解能を有する多様な組み合わせのハイブリッド代謝系を構築できるものと考察した。(第 9 章)

KF707 株、KF715 株、LB400 株 *bph* 遺伝子の 5'-領域 (0.7 kb) と 3'-領域 (0.6 kb) を相互に交換し、種々のキメラ末端 BP Dox を構築した。

そのうち、BphA1 (KF707) /A1 (KF715) A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は、BP に対して KF707 BP Dox を発現する大腸菌の 1.3 倍、BphA1 (KF715) /A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌の 4.3 倍の高い分解活性を示した。

また、BphA1 (KF707) /A1 (LB400) A2A3A4BC (KF707) を発現する大腸菌は、KF707 BP Dox を発現する大腸菌と比べて高塩化ビフェニル (tetra-, pentachlorobiphenyl) を含め PCB に対して広範な分解スペクトルを示した。

このように PCB 分解特性に関与する遺伝子コンポーネントの一部を交換することにより、新規分解能を有する BP Dox を構築することができた。(第 10 章)

KF707 株 *bphA1* 遺伝子の 5' 末端領域と *P. cepacia* LB400 株 *bphA1* 遺伝子の 3' 末端領域からなるキメラ *bphA1* 遺伝子を KF707 株に導入して、KF707 株染色体 *bphA1* 遺伝子とランダムに相同組換えを起こした各種菌株を取得した。

取得した菌株のうち KF707-D34 株は KF707 株と LB400 株の間で分解能が異なる 4,4'-, 2,5,2',5'-CB を共に分解し、2,5,4'-CB を 2,3- 及び 3,4-dioxygenation の両活性により分解した。また PCB mixture である KC 300 の tri-, tetrachlorobiphenyl に対して高い分解活性を示した。一方、KF707-D34 株の *bphA1* 遺伝子の DNA 塩基配列を決定し、Thr-376 (KF707) →Asn (LB400) へ置換していることを確認した。(第 11 章)

以上の結果からビフェニル/PCB 分解菌および芳香環分解菌の機能進化メカニズムの一環を明らかにし、進化的メカニズムを実験的に生起し、新規代謝系酵素の構築と新規分解能を有するビフェニル/PCB 分解菌の育種を行った。それらの研究結果についての考察は各章ごとに述べた通りである。最後に、これらの一連の結果に基づき考

察ならびに今後の展望について述べる。

米国ハドソン川の上流には、1977年の調査で134トンのPCBの存在が報告されている。そのハドソン川の河川土壌から分離されたLB400株はPCBに対して極めて幅広い分解特性を示す。⁽¹¹⁾ 上記の研究結果からKF707とLB400株の分解系酵素の構造は極めて相同性が高く、共通の祖先から由来しているものと考えられるが、KF707とLB400株のPCB分解特性の差異はBP Dox大サブユニットBphA1のC末端領域へのわずかな変異の導入によるBP Doxの機能進化によることを明らかにした。遺伝子への点変異の導入により酵素の基質特異性が変化することはP450、tRNA synthetase、 β -lactamaseなどの研究から報告されている。⁽¹⁶⁾ またNegoroらは人工化合物であるナイロンオリゴマーに対する分解酵素が別の機能を有していた酵素への点変異の導入により出現したことを明らかにしている。⁽⁸⁸⁾ PCBは生物に対して突然変異を誘発する強力な変異源であることから、そのような環境において適応進化した結果、LB400株は強力な分解系酵素をコードする代謝遺伝子を獲得したのと考えられる。しかし、PCBが変異源として作用したと考えるそのような点変異のみでは長い年月が必要であり、PCBが環境中に出現してから約70年であることから考えると基質特異性の進化にいたる進化過程を点変異のみでは説明することはできない。一方、KF707株とLB400株の**bphA1**遺伝子の塩基配列の相違は5'-末端領域の10bpに存在する2bpの塩基配列の相違以外は全て421bpの領域に存在する。このことから他の芳香環代謝遺伝子が遺伝子転移により導入し、相同組換えにより遺伝子置換が行われたか、あるいは最近明らかにされた"slipped-strand mispairing"と呼ばれるプロセス⁽⁷⁹⁾ではるかに速く変異が導入され、適応進化がなされた可能性が考えられる。

このように環境微生物は土壌中において環境に適応するために、長い年月をかけて分解系遺伝子及び酵素の多様性を生じた。^(116, 114) 上記の研究結果はそのような多様性を獲得した分子進化的メカニズムを明らかにし、自然において長い年月をかけて進められた現象を人為的に短時間に再現し、新たな機能を持つ分解系遺伝子および酵素を作り出すことを可能にしたものである。よってこれらの研究は様々な環境微生物の機能改変を行ううえでも適用できるモデルケースを提示しているともいえるであろう。

現在、各種分解系酵素タンパク質の精製^(27, 50, 66, 81, 104, 105)とその立体構造の解析^(53, 95)が行われており、今後、酵素タンパク質の構造-機能相関が明らかになり、分解系酵素の機能進化の過程がさらに詳細に解明されるものと考えられる。そして将来的に環境中へ放出された環境汚染物質に対して強力な分解能を有する様々な分解系酵素の構築と分解菌の育種が行われ、それらが環境汚染物質を分解、除去するバイオリメデイエーションに応用されるであろう。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました九州大学農学部教授古川謙介博士に深甚なる謝意を表します。

本研究中、終始有益なる御助言、御激励を賜りました九州大学農学部助教授吉野貞蔵博士、九州大学農学部助手後藤正利博士ならびに九州大学農学部技官南里信也博士に深甚なる謝意を表します。

さらに、本研究にご協力頂きました宮崎大学工学部助手の廣瀬遵博士、東和科学株式会社の陶山明子さん、財団法人化学品検査協会の小林亜希子さん、九州大学農学部発酵化学講座の西哲人氏、熊丸哲也氏、高橋幸裕氏、渡辺崇人氏ならびに末永光氏をはじめとする諸氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Ahmed, M., and D.D.Focht. 1973. Degradation of chlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* 19: 47-52.
- (2) Asturias, J.A., Diaz, E. and Timmis, K.N. 1995. The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from Gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenase from Gram-negative bacteria, *Gene*. 156: 11-18.
- (3) Asturias, J. A., and K. N. Timmis. 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* 175: 4631-4640.
- (4) Ausubel, M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 1992. *Current protocols in molecular biology*, vol. I. Greene Publishing Associates, New York.
- (5) Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F.C.H. Franklin, M.M. Bagdasarian, J. Frey and K.N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*. 16:237-247.
- (6) Bagdasarian, M., and Timmis, K. N. 1982. Host ; vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 96 : 47-67.
- (7) Bartilson, M., and V. Shingler. 1989. Nucleotide sequence and expression of catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. CF600. *Gene*. 85:233-238.
- (8) Bedard, D.L., and M.L. Haberl. 1990. Influence of chlorine substitution pattern the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains. *Microb. Ecol.* 20 : 87-102
- (9) Bedard, D.L., M.L. Haberl, R.J. May, and M.J. Brennan. 1987. Evidence for novel mechanism of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 1103-11127.
- (10) Bedard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M.L. Haberl, and C.

Johnson. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 761-7681.

(11) Bedard, D.L., R. E. Wagner, M. J. Brennan, M.L. Haberl, and J.F. Brown, JR. 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 1094-1102.

(12) Bedzyk, L.A., N.B. Shoemaker, K.E. Young, and A.A. Sayers 1992. Insertion and excision of *Bacteroides* conjugative chromosomal elements. *J. Bacteriol.* 174:166-172.

(13) Booth, J., e. Boyland, and P. Sims. 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugation with glutathione. *Biochem. J.* 79:516-524.

(14) Bopp, L.H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1 : 23-29

(15) Boronin A. M., T. V. Tsoi, I. A. Koshleva, M. U. Arinbasarov, S. A. Selifonov, and A. G. Kozlovsky. 1989. Cloning of the primary steps of naphthalene oxidation in *Escherichia coli* cells. *Genetika* 25:226-237.

(16) Clarke P.H. 1984. The evolution of degradation pathways. p.11-27. in *Microbial degradation of organic compounds*, (D.T. Gibson ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.

(17) Chung, S.-Y., M. Maeda, E. Song, K. Horikoshi, and T. Kudo. 1994. A gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* strain TA421, isolated from a termite ecosystem. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 : 2111-2113.

(18) Deng, W.P., and J.A. Nickoloff. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200:81-88.

(19) Eltis, L.D., and J.T. Bolin. 1996. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* 178:5930-5937. (2)

(20) Erickson, B.D., and F.J. Mondello. 1992. Nucleotides sequencing and transcriptional mapping of genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent

- polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. J. Bacteriol. 174 : 2903-2912
- (21) Erickson, B.D., and F.J. Mondello. 1993. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3858-3862
- (22) Fish, K.M. 1996. Influence of Aroclor 1242 concentration on polychlorinated biphenyl biotransformations in hudson river test tube microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 62 :3014-3016.
- (23) Fujita, Y., T. Fujita, Y. Miwa, J. Nihashi, and Y. Aratani. 1986. Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 261:13744-13753.
- (24) Furukawa, K. 1982. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls. in Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants (Chakrabarty, A.M., ed) pp.33-57, CRC Press, Boca Raton, FL
- (25) Furukawa, K. 1986. Modification of PCBs by bacteria and other microorganism, p. 89-99. In J. Waid (ed.), PCBs and the environment. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- (26) Furukawa, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship PCB-degrading bacteria. Biodegradation 5 : 289-300
- (27) Furukawa, K., and N. Arimura. 1987. Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene. J. Bacteriol. 169: 924-927.
- (28) Furukawa, K., and N. Arimura, and T. Miyazaki. 1987. Nucleotide sequence of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. J. Bacteriol. 169 : 427-429
- (29) Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism : some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. J. Bacteriol. 171 : 5467-5472

- (30) Furukawa, K., S. Hayashida, and K. Taira. 1991. Gene-specific transposon mutagenesis of the biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation-controlling *bph* operon in soil bacteria. *Gene* 98 : 21-28
- (31) Furukawa, K., S. Hayashida, and K. Taira. 1992. Biochemical and genetic basis for the degradation of polychlorinated biphenyls in soil bacteria, p. 259-267. In E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- (32) Furukawa, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Nakamura. 1994. Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase. *J. Bacteriol.* 176 : 2121-2123
- (33) Furukawa, K., J. Hirose, N. Kimura, S. Yoshino, S. Hayashida. 1993. Gene structural diversity as an index of natural gene transfer. p. 337-341. In R. Gurrero, and P. Allio (ed.), *Trend in microbial ecology*. Spanish Society for Microbiology.
- (34) Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki, and S. Hayashida. 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon). *J. Bacteriol.* 175 : 5224-5232
- (35) Furukawa, K., and N. Kimura. 1995. Biochemistry and genetics of PCB metabolism. *Environ. heal. Perspec.* 103: 21-23
- (36) Furukawa, K., N. Kimura, R. Iwakiri, A. Nishi, and A. Suyama. 1996. Construction of hybrid operons conferring expanded capability for degrading aromatic hydrocarbons and chlorinated compounds. pp. 81-94. In Nakazawa, T., K. Furukawa, D. Haas, S. Silver. (Eds), *Molecular biology of Pseudomonads*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- (37) Furukawa, K., F. Matsumura, and K. Tonomura. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degradation polychlorinated biphenyls. *Agric. Biol. Chem.* 42:543-548.
- (38) Furukawa, K., J. R. Simon, and A. M. Chakrabarty. 1983. Common induction and regulation of biphenyl, xylene/toluene, and salicylate catabolism in *Pseudomonas*

paucimobilis. J. Bacteriol. 154. 1356-1362.

(39) Furukawa, K., and T. Miyazaki. 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. J. Bacteriol. 166 : 392-398.

(40) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1982. Bacterial degradation polychlorinated biphenyls (PCB) and their metabolites. In Snyder, Parke, Kocsis, Jollow, Gibson and Witmer. Biological reactive intermediates-II, part A (Eds)

(41) Furukawa, K., and H. Suzuki. 1988. Gene manipulation of catabolic activities for production of intermediates of various biphenyl compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 363-369.

(42) Furukawa, K., and K. Taira. 1992. Genes coding for PCB degradation in soil bacteria. Now Future 8:13-16.

(43) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1979. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 38 : 301-310

(44) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1983. Metabolic breakdown of kaneclors (polychlorobiphenyls) and their products by *Acinetobacter* sp. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 140-145.

(45) Furukawa, K., K. Tonomura, and A. Kamibayashi. 1978. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 35 : 223-227.

(46) Gibson, D.T., D.L. Cruden, J.D. Haddock, G.J. Zylstra, and J.M. Brand. 1993. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. J. Bacteriol. 175 : 4561-4564

(47) Gibson, D. T., Zylstra, G. J. and Chauhan, S. 1990. Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski and S. Kaplan (Eds), *Pseudomonas: Biotransformation, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 121-132.

- (48) Habig, W. H., and W. B. Jakoby. 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. *Method in Enzymol.* 77: 398-405.
- (49) Habig, W.H., M. J. Pabst, and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139.
- (50) Haddock, J.D., and D.T. Gibson. 1995. Purification and characterization of oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. bacteriol.* 177:5834-5839.
- (51) Haddock, J.D., J.R. Horton, and D.T. Gibson. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 177 : 20-26
- (52) Haddock, J. D., Nadim, L. M. and Gibson, D. T. 1993 Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 175 : 401-410.
- (53) Han, S., L.D. Eltis, K. N. Timmis, S. W. Muchmore, and J. T. Bolin. 1995. Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading *Pseudomonad*. *Science*, 270 : 976-980.
- (54) Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D.M. (ed) *DNA Cloning*, pp109-136.
- (55) Harayama, S. and Kok, M. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46 : (1992) 565-601.
- (56) Harayama, S., and M. Rejik. 1989. Bacterial aromatic ringcleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* 264: 15328-15333.
- (57) Harayama, S., M. Rejik, A. Wasserfallen, and A. Bairoch. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pNAH7 plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 210:241-247.
- (58) Harthnett, C., E. L. Ngai, and L.N. Ornston. 1990. DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 2,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary

divergence. J. Bacteriol. 172: 956-966.

(59) Hauschild, J.E., E. Masai, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1996. Identification of an alternative 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 and cloning of the gene. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2940-2946.

(60) Hayase, N., K. Taira, and K. Furukawa. 1990. *Pseudomonas putida* KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation : Cloning analysis, and expression in soil bacteria. J. Bacteriol. 172 : 1160-1164.

(61) Heigler, B. S., J. J. Arensdorf, and D. D. Focht. 1995. Catabolic characteristics of biphenyl-utilizing isolates which cometabolize PCBs. Biodegradation 6: 75-82.

(62) Hirose, J., N. Kimura, A. Suyama, A. Kobayashi, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1994. Functional and structural relationship of various extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas* origin. FEMS Microbiol. 118:273-278.

(63) Hirose, J., A. Suyama, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1994. Construction of hybrid biphenyl (*bph*) and toluene (*tod*) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenase. Gene 138 : 27-33

(64) Hofer, B., S. Backhaus, and K.N. Timmis. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. Gene 144 : 9-16

(65) Hofer, B., D. Eltis, D.N. Dowling, and K.N. Timmis. 1993. Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. Gene 130 : 47-55

(66) Hurtubise, Y., D. Barriault, J. Polowski, and M. Sylvestre. 1995. Purification and characterization of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. J. Bacteriol. 177:6610-6618.

(67) Irie, S., Doi, S., Yorifuji, M. and Yano, K. 1987. Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 169 :5174-5179.

- (68) Jiang, H., R.E. Parales, N.A. Lynch, and D.T. Gibson. 1996. Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit toluene dioxygenase : potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *J. Bacteriol.* 178: 3133-3139.
- (69) Kellog, S.T., D.K. Chatterjee, A.M. Chakrabarty. 1981. Plasmid-assisted molecular breeding : new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science.* 214:1133-1135.
- (70) Kikuchi, Y., Y. Nagata, M. Hinata, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1994. Identification of the *bphA4* gene encoding ferredoxin reductase involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176: 1689-1694.
- (71) Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi, and K. Yano. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoate in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 171:2740-2747.
- (72) Kimura, N., and K. Furukawa. 1995. Construction of chimera biphenyl dioxygenases and functional analysis, p. 102. In *Abstracts of Pseudomonas: Fifth International Symposium on Pseudomonas*, Tsukuba, Japan.
- (73) Kimura, N., H. Kato, A. Nishi, and K. Furukawa. 1996. Analysis of substrate range of biphenyl-catabolic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 : 220-223
- (74) Kuhm, A. E., A. Stoz, and H.-J. Knackmuss. 1991. Metabolism of naphthalene by the biphenyl-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biodegradation* 2:115-120.
- (75) Kurkela, S., Lehtvaslaiho, H., Palva, E. T. and Teeri, T. H. 1988. Cloning nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene* 73: 355-362.
- (76) Labes, M., A. Puhler, and R. Simon. 1990. A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. *Gene* 89:37-46.

- (77) Lau, P. C. K., H. Bergeron, D. Labbe, Y. Wang, R. Brousseau, and D. T. Gibson. 1994. Sequence and expression of the *todGIH* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene*. 146:7-13.
- (78) Lau, P. C. K., J. Garnon, D. Labbe and Y. Wang. 1996. Location and sequence analysis of a 2-hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase-encoding gene (*bpdF*) of the biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation pathway in *Rhodococcus* sp. M5. *Gene*. 171:53-57.
- (79) Levison, G., and G. A. Gutman . 1987. Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution . *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- (80) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265
- (81) Lynch, N., H. Jiang, and D. T. Gibson. 1996. Rapid purification of oxygenase component of toluene dioxygenase from a polyol-responsive monoclonal antibody. *Appl Environ. Microbiol.* 62 : 2133-2137.
- (82) Maeda M., S. -Y. Chung, E. Song, and T. Kudo. 1995. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl Environ. Microbiol.* 61 : 549-555.
- (83) Maniatis, T. E., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning : A laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor, NY.
- (84) Masai, E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 2079-2085
- (85) Mason, R. J., and R. Cammack. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46 : 277-305
- (86) Menn, F. M., G. J. Zylstra, and D. T. Gibson. 1991. Location and sequence of the *todF* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1. *Gene* 104:91-94.

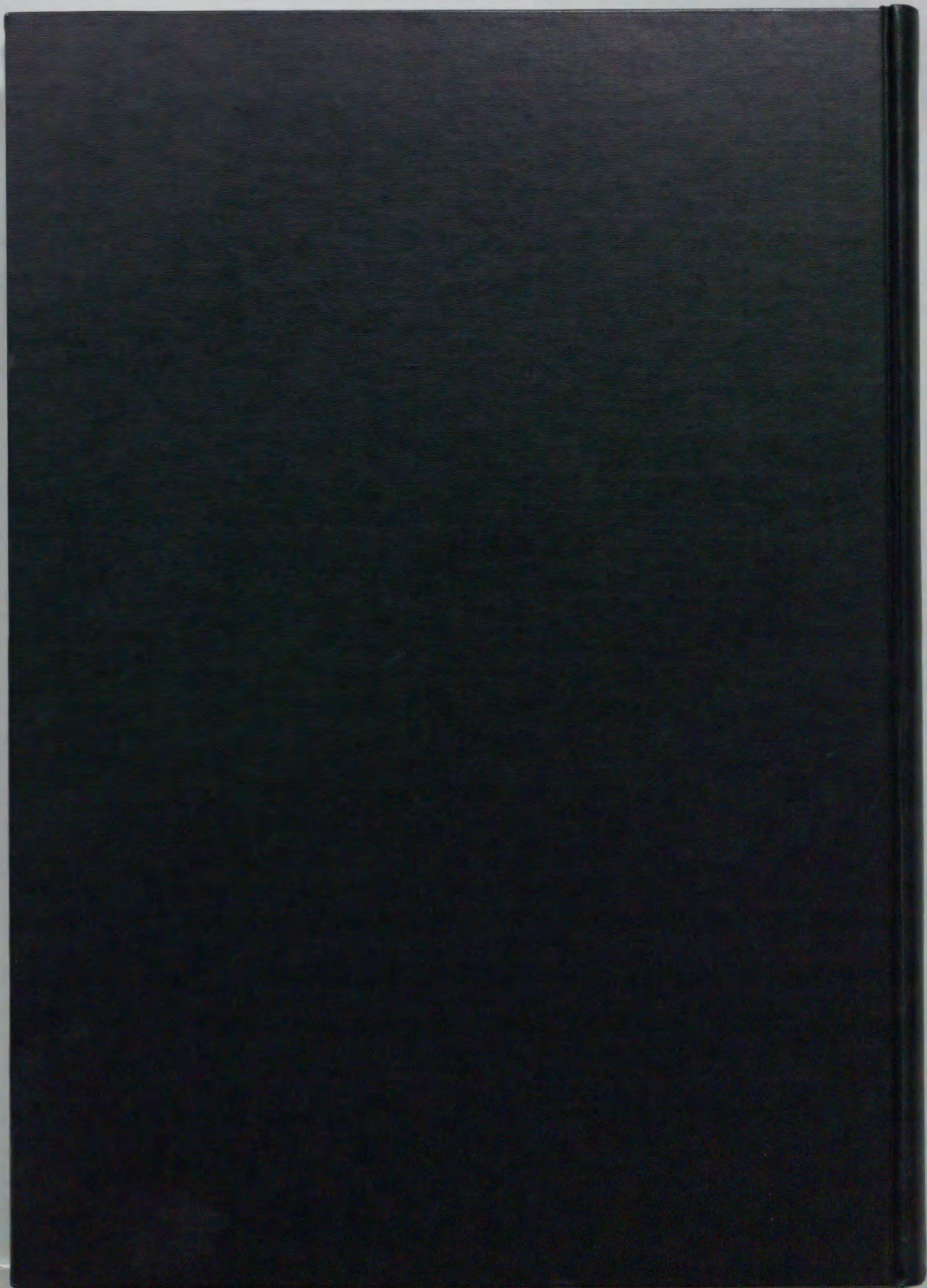
- (87) Mokross, H., E. Schmidt, and W. Reineke. 1990. Degradation of 3-chlorobiphenyl by *in vivo* constructed hybrid pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* 71:179-186.
- (88) Negoro, S., S. Nakamura, H. Kimura, K. Fujiyama, YuZ. Zhang, N. Kanzaki, and Hi. Okada. 1984. Construction of hybrid genes of 6-aminohexanoic acid-oligomer hydrolase and its analogous enzyme. *J. Biol. Chem.* 259:13648-13651.
- (89) Neidle, E.L., Hartet, C., Ornston, L.N., Bairoch, A. and Reik, M.: Nucleotide sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationship among multicomponent oxygenase. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 5385-5395.
- (90) 太田, 崎山, 鈴木 1993. 新化学実験講座1, タンパク質VII - タンパク質工学, 東京化学同人
- (91) Pellizari, V.H., S. Bezborodnikov, J. F. Quensen III, and J. M. Tiedje. 1996. Evaluation of strains isolated by growth on naphthalene and biphenyl for hybridization of genes to dioxygenase probes and polychlorinated biphenyl-degrading ability. *Appl Environ. Microbiol.* 62 : 2053-2058.
- (92) Pickett, C. B., A.Y.H. Lu. 1989. Glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 58:743-764.
- (93) Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- (94) Seeger, M., K.N. Timmis, and B. Hofer. 1995. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Appl Environ. Microbiol.* 61 : 2654-2658.
- (95) Senda, T., K. Sugiyama, H. Narita, T. Yamamoto, K. Kimbara, M. Fukuda, M. Sato, K. Yano, and Y. Mitui. 1996. Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Mol. Biol.* 255:735-752.
- (96) Shingler, V., J. Polowski, and U. Marklund. 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of

Pseudomonas sp. strain CF600.174:711-724.

- (97) Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W. -c., Cruden, D. L., Gibson, D. T. and Zylstra G. J 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4. *Gene* 127 :31-37.
- (98) Simon, R., U.Priefer, and A. Puhler.1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-791.
- (99) Simon, R., J. Quandt, and W. Klipp.1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene*. 80:161-169.
- (100) Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- (101) Springael, D., S. Krepa, and M. Mergeay. 1993. Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5. *J. Bacteriol.* 175:1674-1681.
- (102) Stemmer, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*. 370:389-390.
- (103) Stemmer, W. P. C. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Sci. USA.* 91:10747-10751.
- (104) Subramanian, V., Liu, T., Yeh, W. K. and Gibson, D. T. 1979. Toluene dioxygenase. purification of an iron-sulfur protein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1131-1139.
- (105) Subramanian, V., Liu, T., Yeh, W., Seder, C. M., Wackett, L. P. and Gibson, D. T. 1985. Purification and properties of ferredoxin TOL. *J. Biol. Chem.* 260 : 2355-2363.
- (106) Suyama, A., R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, and Furukawa, K. 1996. Engineering hybrid *Pseudomonads* capable of utilizing wide range of aromatic hydrocarbons and of efficient degradation of Trichloroethylene. *J. Bacteriol.* 178 :

- (107) Sylvestre, M., and M. Sondossi. 1994. Selection of enhanced polychlorinated biphenyl-degrading bacterial strains for bioremediation : consideration of branching pathways. in *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals* (Chaudhry, G.R., ed) pp.47-73, Dioscorides Press, Portland, Oregon
- (108) Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, and K. Furukawa. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry* 27:3990-3996.
- (109) Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1992. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267 : 4844-4853
- (110) Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. and Hashimoto-Gotoh, T. 1987. High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for lacZ alpha-complementation and chloramphenicol-or kanamycin-resistance selection. *Gene.* 61:63-74.
- (111) Tan, H.-M., and C.-M. Cheong. 1994. Substitution of the ISP α subunit of biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* results in a modification of the enzyme activity. *Biochim. and Biophys. Res. Comm.* 204:912-917.
- (112) Tan, H.-M., H.-Y. Tang, C.L. Joannou, N.H. Abdel-Wahab, and J.R. Mason. 1993. The *Pseudomonas putida* ML2 plasmid-encoded genes for benzene dioxygenase are unusual in codon usage and low in G+C content. *Gene.* 130:33-39.
- (113) Timmis, K.N., R.J. Steffan, and R. Unterman. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:525-557.
- (114) van der Meer, J.R., W.M. de Vos, S. Harayama, and A.J.B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbial Rev.* 56 : 677-694
- (115) van der Meer, J.R., A.J.B. Zehnder and W.M. de Vos. 1991. Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. bacteriol.* 173:7077-7083.
- (116) van der Meer, J.R., A.J.B. Zehnder and W.M. de Vos., S. Harayama, and A. J.

- Zehnder. 1992. Molecular mechanism of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56:677-694.
- (117) Wang, Y., Garnon, J., Labbe, D., Bergeron, H. and Lau, P.C.K. 1995. Sequence and expression of the *bpd C1C2BADE* genes involved in the initial steps of biphenyl/chlorobiphenyl degradation by *Rhodococcus* sp. M5. *Gene*. 164:117-122.
- (118) Wang, Y., P. C. K. Lau, and D. K. Button. 1996. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2169-2173.
- (119) Wang, Y., M. Rawlings, D.T. Gibson, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, P. C. K. Lau. 1995. Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol. Gen. Genet.* 246:570-579.
- (120) Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 : 103-119
- (121) Yates, J.R. and R.J. Mondello. 1989. Sequence similarities in the genes encoding polychlorinated biphenyl degradation by *Pseudomonas* strain LB400 and *Alcaligenes eutrophus* H850. *J. Bacteriol.* 171 : 1733-1735.
- (122) Zablutowicz, R.M., R.E. Hoagland, and M.A. Locke, and W. J. Hickey. 1995. Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by *Rhizosphere* bacteria. 61:1054-1060.
- (123) Zylstra, G. J. and Gibson, D. T. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* 264 : 1490-14946.
- (124) Zylstra, G. J., McCombie, W.R., Gibson, D. T. and Finwtt, B. 1988. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon. *Appl Environ. Microbiol.* 54 :1498-1503.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

