

氏名	伊藤虹児
学位(専攻分野の名称)	博士(農芸化学)
学位記番号	甲第755号
学位授与の日付	平成30年3月20日
学位論文題目	POPs分解菌 <i>Nocardioides</i> sp. PD653株における好氣的 HCB 脱塩素分解酵素遺伝子群に関する研究
論文審査委員	主査 農学博士 高木和広* 教授・博士(農学) 五十君 静信 教授・博士(農芸化学) 田中 尚人 准教授・博士(農学) 横田 健治 名誉教授・農学博士 岡田 早苗

論文内容の要旨

序章

Hexachlorobenzene (C₆Cl₆; HCB) は1945年以降に世界各地で使用された有機塩素系殺菌剤の主成分である。HCBの土壤中における半減期は3~6年程度と推定され、生物に対する慢性毒性や環境中における残留性、生物濃縮性、長距離移動性を示すことなどから、2001年にストックホルム条約で残留性有機汚染物質 (POPs; Persistent Organic Pollutants) に指定され、適切な処理が求められている。しかしながら、現代社会においても汚染現場が存在し、早急に対処すべき問題となっている。当研究室では好気条件下のHCB汚染現場におけるバイオレメディエーション技術確立を目指し、HCBを好氣的に脱塩素し、無機化できる *Nocardioides* sp. PD653株を材料として研究を開始した。PD653株はHCBの他、pentachlorophenol (C₆HCl₅O; PCP), β-hexachlorocyclohexane (C₆H₆Cl₆; β-HCH) および低塩素化 polychlorinated biphenyl (PCBs) といったPOPsに対しても脱塩素分解能を示し、HCB分解代謝系では初発の脱塩素反応によってPCPが生成することが明らかとなっている。この反応に関わるメカニズムは不明であるが、これを解明し、*in situ* で効率よく利用できればHCB汚染レベルの低減が期待できる。また、PCPの分解代謝系は一部のグラム陰性細菌で詳細に研究されているが、グラム陽性菌ではPCP分解機構が異なるという説が提唱されており、PD653株も含め、グラム陽性細菌におけるPCP分解メカニズムに興味を持たれる。PCPは2015年にPOPsに指定されており、国内にもppmオーダーの汚染現場が存在することから、PCP分解メカニズム解明も重要であると言える。そこで本研究ではPD653株によるHCB分解代謝系に関与する酵素遺伝子群の単離と解析を目的とした。

第一章 HCB 脱塩素分解酵素遺伝子の探索

当研究室ではPD653株を液体培地で継代する過程で、初発のHCB脱塩素能に欠陥をもつ

*客員教授 国立研究開発法人 農研機構

PD653-B2 株を単離している。PD653 株と PD653-B2 株の代謝能を比較すると、PD653 株は HCB, PCP 脱塩素能を有するのに対し、PD653-B2 株は PCP の脱塩素能のみを維持していた。更に、HCB のアナログである殺菌剤 pentachlorobenzene ($C_6Cl_5NO_2$; PCNB) に対する両株の分解能を調べたところ、PD653 株は脱ニトロ化が可能であったが、PD653-B2 株では PCNB を脱ニトロ化せずに pentachloroaniline ($C_6H_2Cl_5N$; PCA) へ還元していた。以上のことから、PD653-B2 株では HCB・PCNB の初発の分解反応に関与する遺伝子群が欠損している可能性が考えられた。そこで両株の比較ゲノム解析を行うことにより PD653 株のみに保持される遺伝子の検出を試みた。その結果、PD653 株のみに保存される約 72-kb の遺伝子領域が見つかり、その領域内は 96 の遺伝子コード領域 (CDS) が予測された。PD653-B2 株ではこの約 72-kb の領域に該当する部分に、約 60-kb の全く異なる領域が存在しており、PD653 株から PD653-B2 株へ派生する間にゲノム再編成が起きたことが示唆された。

比較ゲノム解析で見出した 96 の CDS のうち PD653_2187, PD653_2188, PD653_2189 にそれぞれフラビンタンパク質と関連したアノテーションが与えられ、これらは近接していた。細菌による芳香族化合物分解機構においてフラビンタンパク質が関与するケースが多く報告されているため、3 つの CDS を HCB 脱塩素反応に関与する候補遺伝子として選抜した。以後、候補遺伝子 PD653_2189, PD653_2188, PD653_2187 を便宜的にそれぞれ ORF1, ORF2, ORF3 と表現する。ORF1 の推定アミノ酸配列は、POPs の一種である endosulfan sulfate の分解代謝に関与する FMN₂-dependent monooxygenase (Ese) と 49%の相同性を示した。Ese は two-component flavin diffusible monooxygenase (TC-FDM) family に分類されている。更に、ORF1 の推定アミノ酸配列は luciferase-like ドメインを有することが分かった。このドメインは還元型フラビンと O₂ を基質とする bacterial luciferase family タンパク質に存在する。ORF2 の推定アミノ酸配列は、EDTA 分解代謝に関与する TC-FDM family のタンパク質である FMN oxidoreductase (EmoB) と 37%の相同性を示した。ORF3 の推定アミノ酸配列は flavin reductase-like ドメインを有することが分かった。

3 つの ORF がオペロンを形成するかどうかを調べるため、PD653 株の RNA を用いて合成した cDNA を鋳型とし、各遺伝子間領域を挟むよう設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、ORF1-ORF2 と ORF2-ORF3 のそれぞれの遺伝子間領域が増幅されたことから、候補遺伝子はオペロンを形成することが分かった。

候補遺伝子の遺伝子産物の HCB 分解活性は組換え大腸菌を用いて評価した。IPTG で誘導した組換え大腸菌を HCB 初期濃度 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ に調製した培地に接種したところ、ORF1~ORF3 をそれぞれ単独で発現させた場合は HCB 分解活性が示されなかった一方で、ORF1 と ORF3 の共発現系で顕著な活性が見られ、分解率は 68.7%だった。一方で ORF2 と ORF3, または ORF1 と ORF2 の共発現系では顕著な活性が示されなかった。また、3 つの ORF を共発現させた場合、分解率は 83%だった。HCB の減少に伴い増加するピークを HPLC で検出したた

め、UPLC-MS で分析したところ、PCP を同定した。このことから HCB が脱塩素・水酸基付加し、PCP へ変換されていることが明らかとなった。さらに、 $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ PCNB を初期基質とした分解試験でも同様に PCP が生成した。以上の結果より、ORF2 の機能については明らかにできなかったが、HCB の脱塩素反応および PCNB の脱ニトロ反応を触媒する酵素本体は ORF1 にコードされることが考えられた。また、ORF3 は ORF1 の遺伝子産物の活性に関与するタンパク質をコードすることが示唆された。よって ORF1, ORF2, ORF3 をそれぞれ *hcbA1*, *hcbA2*, *hcbA3* と命名した。

hcbA1 は推定アミノ酸配列から monooxygenase であることが予測されたため、組換え大腸菌を用いて嫌気条件下 ($[\text{O}_2] < 0.5 \text{ mg L}^{-1}$) における HCB 分解活性を測定した。その結果、HCB 分解活性は示されず、 O_2 を導入すると活性が復元したことから、HCB の脱塩素反応が monooxygenase によって触媒されている可能性が示された。

第二章 PCP 分解酵素遺伝子の単離・同定

PCP 分解酵素遺伝子群は基質によって誘導されると仮説を立て、 $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ HCB 暴露区、非暴露区における PD653 株の発現プロファイルを RNA-seq によって比較した。その結果、HCB 暴露区において有意に発現量が増加した 48 の遺伝子を検出した。これらのうちアノテーション情報および遺伝子構造から 3 つの隣接する CDS, PD653_1112~PD653_1114 を候補遺伝子として選抜した。以降、PD653_1112, PD653_1113, PD653_1114 を便宜的にそれぞれ ORF1p, ORF2p, ORF3p とする。

ORF1p~ORF3p の推定アミノ酸配列はそれぞれ *Mycobacterium tuberculosis* 由来の protein Rv1155, *Nocardioides* 属由来の hypothetical protein, *Burkholderia cepacia* AC1100 株より同定された 2,4,6-trichlorophenol monooxygenase (TftD) と相同性を示した。TftD は基質となる dichlorophenol を脱塩素・水酸基付加する反応を 2 回触媒する。

3 つの ORF がオペロンを形成するかどうかを調べるため、PD653 株の RNA を用いて合成した cDNA を鋳型とし、各遺伝子間領域を挟むよう設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、ORF1p-ORF2p と ORF2p-ORF3p の遺伝子間領域がそれぞれ増幅されたことから、候補遺伝子はオペロンを形成することが分かった。

RNA-seq によって見出した候補遺伝子の遺伝子産物による PCP 分解活性を組換え大腸菌によって評価した。PCP 初発濃度 $9.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ に対し、ORF1p~ORF3p をそれぞれ単独で発現させた場合は活性が認められなかったが、ORF1p と ORF3p または ORF2p と ORF3p の共発現系において PCP が検出限界以下まで減少した。これらの結果と推定アミノ酸配列の解析結果をふまえると、ORF3p が PCP 分解酵素をコードすることが考えられる。また、ORF1p と ORF2p の遺伝子産物は共に ORF3p にコードされた酵素の活性を向上させる機能を持つことが示唆された。以上の結果より、ORF1p~ORF3p をそれぞれ *hcbB1*, *hcbB2*, *hcbB3* と命名

した。しかしながら本実験では PCP の分解産物を検出するに至らなかった。そこで、PD653 株（野生株）が PCP を tetrachloro-*p*-hydroquinone ($C_6H_2Cl_4O_2$; TeCH)に変換すること、HcbB3 の推定アミノ酸配列が TftD と相同性を示したことに着目し、脱塩素・水酸基付加反応が 2 回行われていると仮説を立てた。まず PCP が *p*-hydroxylation によって TeCH へ変換されているかを調べるため、組換え大腸菌による PCP 分解反応液に K_2CO_3 と無水酢酸を添加し、酢酸エチルで抽出した。この有機層を乾固後、ヘキササンで定容して GC-MS 分析に供したところ、アセチル化した TeCH を検出したことから、PCP が TeCH へ変換されていることが明らかとなった。次に、HcbB1/HcbB3 共発現大腸菌に 0.5mM TeCH を暴露すると、培養液が 30 分で紫色を呈し、trichlorohydroxy-*p*-benzoquinone ($C_6HCl_3O_3$; TCHQ) が生成したことが示唆された。そこで、合成した TCHQ と紫色を呈したサンプルの上清を UPLC-MS 分析に供したところ、両者は一致したマススペクトルを示したことから、*hcbB* 遺伝子群によって PCP が TeCH を介し TCHQ まで変換されることが明らかとなった。

RNA-seq の結果の再評価および *hcbB* 遺伝子群の転写誘導性を調べる目的で HCB, PCP, TeCH, 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone ($C_6H_4Cl_2O_2$; DiCH) をそれぞれ 10 mg L^{-1} に暴露した PD653 株から RNA を抽出し、RT-qPCR による相対定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)で *hcbB3* の発現解析を行った。*hcbB3* は塩素化合物を含まない対照区と比較し、HCB 存在下で最も発現量が増加し、HCB 暴露後 2 時間で最大 675 倍まで亢進した。また、TeCH 存在下でも発現量が最大 217 倍に増加した。一方で *hcbA* 遺伝子群の発現量は変動しなかったことから、本実験では構成的な発現であることが示唆された。PD653 株の休止菌体を用いた PCP 分解試験では、誘導無の休止菌体における PCP 分解速度が $0.19\ \mu\text{mol L}^{-1}\ \text{h}^{-1}$ だったのに対し、TeCH 誘導区では $1.68\ \mu\text{mol L}^{-1}\ \text{h}^{-1}$ だったことから PCP 分解速度が約 10 倍向上した。

総 括

これまで好氣的な HCB 脱塩素反応は *Pseudomonas putida* 由来 CYP101 変異体による反応のみが知られており、ナチュラルオカレンスの細菌による HCB 脱塩素分解代謝系のメカニズムは謎に包まれていた。本研究では PD653 株を用いて、これまで謎だった好氣的 HCB 脱塩素反応を触媒する酵素をコードする遺伝子群 (*hcbA*) を初めて単離・同定した。また、グラム陽性細菌由来の新規 PCP 分解酵素遺伝子群 (*hcbB*) の単離・同定に成功した。2 つの遺伝子群はどちらもフラビンタンパク質をコードする共通の特徴を見出し、*hcbB* 遺伝子群は HCB と TeCH によって誘導されることが分かった。

難分解性有機化合物で汚染された環境のバイオレメディエーションを有効なものにするためには、導入した分解菌の動態や生態を解明することが重要となるが、本研究で報告された分解酵素遺伝子は、土着微生物の HCB および PCP に対する分解ポテンシャルを定量する上で一つの指標とすることができる。また、環境中から RNA を抽出し、分解酵素遺伝子を

標的とした RT-qPCR による発現解析を行うことによって、バイオレメディエーションのために導入した分解菌の HCB・PCP 分解活性の変動を把握することに繋がる。このようにして得られる環境中の遺伝子発現に関する情報と同時に、環境因子や対象化合物の分解量を測定することにより、*in situ* バイオレメディエーション技術の最適化が可能となる。さらに、HCB や PCP より毒性が低い TeCH のような誘導基質を用いてあらかじめ分解活性を向上させた PD653 株を導入することにより、土壌残留 PCP の分解率改善が期待される。

基礎研究的な側面では、*hcbA1* をマーカーとしてスクリーニングに利用することで、新たな HCB 脱塩素分解菌を単離し、好氣的 HCB 脱塩素分解菌が生息する環境について生態学的な知見の取得や分解遺伝子の起源を探る手がかりになると期待される。

審査報告概要

本研究では、世界初の好氣的 hexachlorobenzene (HCB) 脱塩素分解菌である *Nocardioides* sp. PD653 における HCB 脱塩素酵素遺伝子 *hcbA1A2A3* およびグラム陽性細菌由来では初となる pentachlorophenol (PCP) 分解酵素遺伝子 *hcbB1B2B3* の同定について報告した。好氣的 HCB 脱塩素酵素遺伝子の探索では、PD653 と HCB 分解能に欠陥を持つ PD653-B2 のドラフトゲノムを比較し、PD653 特有の 96 の候補遺伝子が得られた。そのうち 3 つの遺伝子について、組換え大腸菌による HCB 分解活性を評価したところ、初発 HCB 脱塩素反応を触媒する酵素をコードすることが分かり、*hcbA1A2A3* と命名した。PCP 分解酵素遺伝子群の探索では、HCB 依存的に発現量が増加した遺伝子の中から 3 つの遺伝子を選抜した。組換え大腸菌によって候補遺伝子の PCP 分解活性を評価したところ顕著な分解活性が示されたことから、*hcbB1B2B3* と命名した。本研究で同定した *hcbA* および *hcbB* 遺伝子群はいずれも推定アミノ酸配列の解析から two component-flavin diffusible monooxygenase (TC-FDM) タンパク質であることが示唆され、残留性有機汚染物質 (POPs) のような高度に塩素置換された人為起源の有機化合物に対し好気性細菌が利用する分解代謝機構の一端を明らかとした。

これらの得られた研究成果は国際問題かつ早急な対応が求められる POPs 汚染現場の環境修復において、バイオレメディエーションの効率化へ貢献可能であり、審査員一同は博士(農芸化学)の学位を授与する価値があると判断した。