

**POPs 分解菌 *Nocardioides* sp. PD653 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**

2018 年

伊藤 虹児

目次.....	1
略称.....	3
序章.....	4
第一章 HCB 脱塩素分解酵素遺伝子群の単離・同定	16
1□1. 緒言.....	16
1□2. 材料および方法.....	16
(1) 材料.....	16
(2) 分析方法.....	16
(3) 菌株・プラスミドおよび培地.....	17
(4) DNA の取り扱い.....	20
(5) PD653-B2 の同定.....	20
(6) ドラフトゲノムシーケンス解析.....	20
(7) 推定アミノ酸配列の解析.....	23
(8) <i>hcbA</i> 遺伝子群発現プラスミドの構築.....	23
(9) 組換え大腸菌による HCB 分解試験.....	25
(10) 嫌気条件下における HCB 分解試験.....	25
(11) RT-PCR.....	25
1□3. 結果.....	26
(1) PD653 と HCB 分解能に欠陥をもつ PD653-B2 の代謝能の比較.....	26
(2) PD653 と PD653-B2 の比較ゲノム解析.....	28
(3) 塩基配列および推定アミノ酸配列の解析.....	36
(4) <i>hcbA</i> 遺伝子群のオペロン構造.....	36
(5) 組換え大腸菌による HCB 分解試験.....	41
(6) 酸素分子が HCB 分解活性に及ぼす影響.....	44
1□4. 考察.....	45
第二章 PCP 分解酵素遺伝子群の単離・同定	49
2□1. 緒言.....	49
2□2. 材料および方法.....	49
(1) 菌株・プラスミドおよび培地.....	49
(2) RNA の取り扱い.....	49
(3) RNA-seq.....	52

(4) 塩基配列および推定アミノ酸配列の解析	53
(5) 組換え大腸菌による新規 PCP 分解酵素遺伝子の発現系構築	53
(6) 組換え大腸菌による PCP 分解	55
(7) PCP 分解代謝における中間産物 TeCH の検出.....	55
(8) TeCH の代謝産物 2,3,5-trichloro-6-hydroxy- <i>p</i> -benzoquinone (TCHQ) の同定	55
(9) 分析方法	55
(10)TCHQ の合成	56
(11)RT-PCR および RT-qPCR.....	58
2□3. 結果.....	60
(1) RNA-seq による推定 PCP 分解酵素遺伝子群の同定	60
(2) 候補遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列の解析	68
(3) 組換え大腸菌による PCP 分解試験	70
(4) PCP 分解代謝産物の同定	72
(5) 下流の代謝産物 TCHQ の同定	73
(6) <i>hcbB</i> オペロンの構造および転写誘導性	75
2□4. 考察.....	76
終章 (総合考察).....	80
引用文献.....	85
謝辞.....	97
文献リスト.....	98
SUMMARY	99

略称

HPLC	High pressure liquid chromatography
PCR	Polymerase chain reaction
RT	Reverse transcription
qPCR	Quantitative PCR
TeCH	2,3,5,6-tetrachloro- <i>p</i> -hydroquinone
TCBQ	2,3,5,6-tetrachloro- <i>p</i> -benzoquinone
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
CDS	Coding sequence
TC-FDM	Two component-flavin diffusible monooxygenase
EDTA	2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetic acid

序章

残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants; POPs)

人為起源の有機化合物の中には生体内に濃縮しやすく、環境中で高い残留性を示し、長距離移動性を有することから、一旦環境中に放出されると我々の人体に悪影響を及ぼしかねないものが存在する。図0で示した化合物はそういった性質を示し、かつて農薬として世界各地で使用されたものも多く (図0、1~5 および 8~10)、高度に塩素置換された化学構造が環境中での生残性、生体への毒性に起因する。こういった化合物はストックホルム条約にて残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants; POPs) として登録され、本条約の締約国は製造・使用の禁止、また現存するものに対しては早急な無害化処理が求められる。

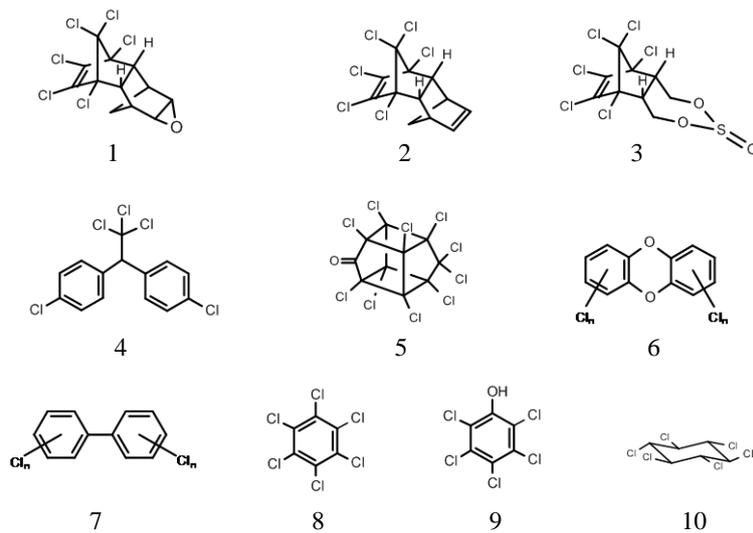


Fig. 0-1 POPs の一部. 1: Dieldrin 2: Aldrin 3: Endosulfan sulfate 4: 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) 5: Chlordecone 6: Dioxin 7: Polychlorinated biphenyl (PCB) 8: Hexachlorobenzene (HCB) 9: Pentachlorophenol (PCP) 10: β -Hexachlorocyclohexane (β -HCH)

HCB

HCB (Fig. 0-1-1, Fig. 0-2a) は 1933 年に初めて導入され、ソルガム、オオムギ、オートムギ、ライムギ、コムギといった作物の黒穂病 (Fig. 0-1b) 対策のための種子消毒に用いられた農薬の主成分である。HCB は世界各地で 1950~1960 年代に使用されていたが、1955~1959 年の間に食糧飢饉となったトルコ南東部において、パン製造の原料となる

小麦の種子に使用された HCB により、約 3000~4000 人の晩発性皮膚ポルフィリン症患者が発生し、10%の患者が死亡する惨劇を引き起こした (Fig. 0-1c)。当時は晩発性皮膚ポルフィリン症が先天性赤血球形成異常によって引き起こされる疾患であると考えられていたが、実際は 1954 年に西ヨーロッパから輸入された殺菌剤(これは特に小麦に寄生するカビ *Tilletia tritici* を標的としていた)を摂取することによって後天的に発症することが Cam らによって初めて指摘された (Cam 1958)。輸入された製剤は Cholorable や Surmesan という名称で、HCB を 10%含有しており、1t の種子に 2kg の割合で使用された。晩発性皮膚ポルフィリン症と HCB の関連が後に動物実験によって証明されたことを機に (Kantermir *et al.*, 1960, Ockner and Schmid, 1961, Wray *et al.*, 1962, Fig. 0-1c)、1970 年代から先進国にて製造・使用の規制が設けられている。HCB の半減期は土壤中で 3~6 年程度と推定され (Beck and Hansen, 1974)、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) に指定されている。しかしながら、現代社会に於いても世界各地で汚染現場が存在し、早急に対処すべき問題となっている (Fig. 0-1d)。とりわけ日本国内に於いては、HCB 自体の農薬登録は無い一方で、国内における 1952~1972 年の PCP 製造の過程で原料として使用された経緯があり (Barber *et al.*, 2005)、製剤中に混入した状態で農耕地に導入されたことによって、HCB と PCP の複合汚染現場が問題となるケースが存在する。

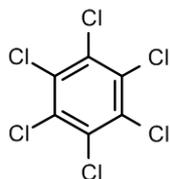
こういった HCB 汚染環境に対し、微生物の代謝能を利用するバイオレメディエーションに関する研究が進められてきたが、高度に塩素化されシンメトリックな構造である HCB は極めて安定であるため、他の化合物と比較して分解微生物の単離報告例が少なく、HCB のバイオレメディエーション研究の進展を阻害している。

PCP

PCP の用途は除草剤、防腐剤、殺菌剤、防汚染剤といった用途であり、世界中で使用されていた (Jorens and Schepens, 1993)。国内に於いては水田の雑草であるノビエ・ウキクサに対して防除効果があったため、1959 年以降普及した。HCB と比較して PCP の土壤中の半減期は 10 週間未満と短い (UNEP 2012)、ミトコンドリア呼吸における酸化リン酸化を阻害することで動植物に毒性を示し (Weinbach, 1954)、特に水生生物に対する高い急性毒性を理由に、各国で製造・使用の規制が設けられ、2015 年に POPs へ登録された。従って、HCB と同様に汚染現場に対する早急な無害化処理が求められてい

る。

(a)



o-benzene (HCB; C₆Cl₆)
-6 years in soil
: Oral LD₅₀ (rat) / 10,000 mg/kg
Oral LD₅₀ (mice) / 4,000 mg/kg

(b)



(c)



FIGURA 3: Porfíria cutânea tardia – Bolhas e lesões ulceradas encimadas por crostas no dorso das mãos

(d)

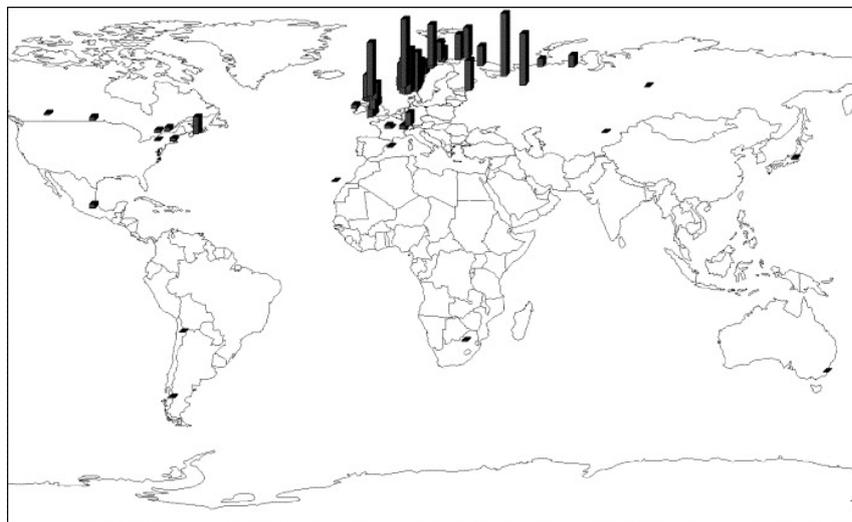
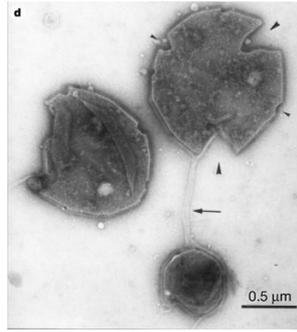


Fig. 0-2 (a) HCB の構造および組成式. (b) コムギの黒穂病 (写真: Agrosup). (c) 晩発性皮膚ポルフィリン症 (Viera and Martins, 2006). (d) 世界各地の表層土 (0-5 cm) における HCB の分布 (Meijer *et al.*, 2003)

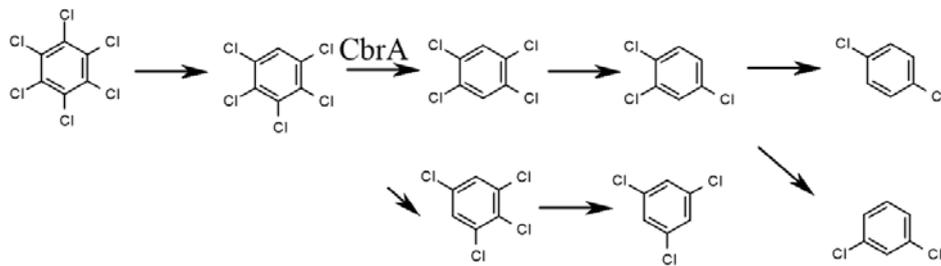
嫌気性細菌による HCB 脱塩素分解

HCB の微生物分解は主に嫌気条件下で還元的脱塩素反応により進行することが知られていた。例えば嫌気的な下水汚泥や混合培養系を用いた HCB の還元的脱塩素分解が報告されており、代謝産物として trichlorobenzene、dichlorobenzene が蓄積している (Chang *et al.*, 1988, Fathepure *et al.*, 1988)。*Dehalococcoides* sp. CBDB1 は世界で最初に単離・同定された HCB 脱塩素分解細菌として最も広く研究されている (Adrian *et al.*, 2000; Leys *et al.*, 2013, Fig. 0-3a)。CBDB1 株はポリ塩化ベンゼンを電子受容体としてエネルギーを獲得する脱ハロゲン呼吸 (organohalide respiration) を介して HCB を脱塩素し、最終産物として 1,3,5-trichlorobenzene、1,3-dichlorobenzene、1,4-dichlorobenzene を生成する (Jayachandran *et al.*, 2003, Fig. 0-3b)。HCB を含め、POPs の低塩素化は環境中の残留性低下や毒性の低減に繋がるため、大変重要なステップであることは明らかである (Table 0-1)。脱ハロゲン呼吸では膜局在性の鉄硫黄タンパク質やコリノイドタンパク質に分類される還元的脱塩素酵素が有機ハロゲン化合物の還元反応を触媒する (Wohlfarth and Diekert, 1997)。脱ハロゲン呼吸を行う多くの嫌気性細菌は還元的脱塩素反応のために培地へのコリノイド (図 0-3c) の供給を必要とするが、この補因子の正確な生理学的意義はよく分かっていない。CBDB1 は pentachlorobenzene (Jayachandran *et al.*, 2003)、1,2,3-trichlorobenzene、1,2,4-trichlorobenzene、tetrachlorobenzene の全ての異性体 (Hölscher *et al.*, 2003) および polychlorinated phenol を脱塩素することができる (Adrian *et al.*, 2007a)。近年、塩化ベンゼンの還元的デハロゲナーゼ遺伝子 *cbrA* が同定された (Adrian *et al.*, 2007b, Fig. 0-3b)。CbrA は 1,2,3,4-tetrachlorobenzene から 1,2,4-trichlorobenzene、1,2,3-trichlorobenzene から 1,3-dichlorobenzene、そして pentachlorobenzene から 1,2,4,5-tetrachlorobenzene への脱塩素反応を触媒するが、HCB を pentachlorobenzene へ脱塩素する酵素は未だ同定されていない。CBDB1 の全ゲノム配列から 32 個の還元的デハロゲナーゼホモログ遺伝子が検出されており (Kube *et al.*, 2005)、嫌気条件下におけるポリ塩化ベンゼンの微生物分解に於いて新たな知見をもたらすことが予測される。しかしながら、実際の汚染現場における応用を考慮した場合、CBDB1 による HCB 分解代謝経路にて蓄積する最終産物は発癌性である点、初期基質から最終産物に変換されるまでの代謝速度が遅い点、絶対嫌気性細菌であるが故に農地のような好気条件下で使用できないといったデメリットが存在する。従って、農地のような好気条件下で HCB を脱塩素分解し、無毒化する代謝能を持つ微生物が求められていた。

(a)



(b)



(c)

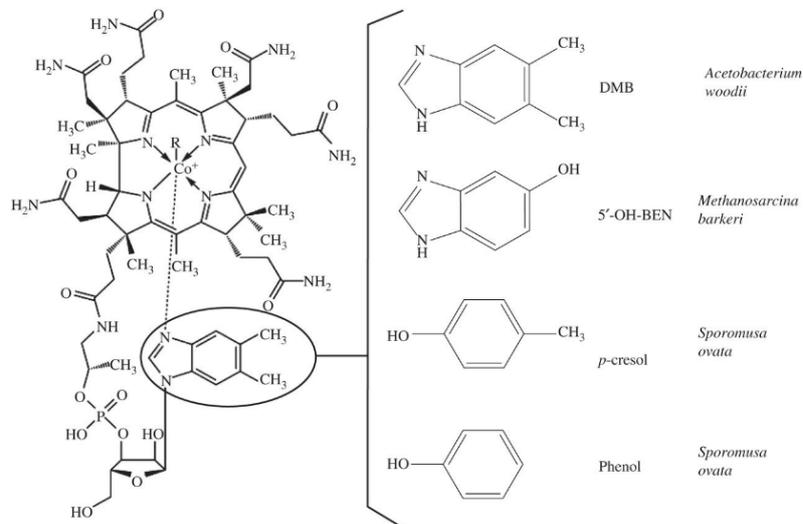


Fig. 0-3 (a) *Dehalococcoides macCarthy* CBDB1 の電子顕微鏡写真 (Adrian *et al.*, 2000). (b) CBDB1 による還元的 HCB 分解代謝経路 (Jayachandran *et al.*, 2003, Adrian *et al.*, 2007b). (c) コリロイドの構造及び下方配位子 (Yan *et al.*, 2013)

好気性細菌によるHCB脱塩素分解

芳香族化合物に対し、好気性細菌ではdioxygenaseによる分解機構が多く報告されている (Furukawa *et al.*, 1989, Asturias *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1995, Nguyen *et al.*, 2011, 2013)。しかしながらdioxygenaseによる反応では、いずれもベンゼン核上に置換されていない炭素を必要とするため (Broderick and O'Halloran, 1991; Feidieker *et al.*, 1994)、ベンゼン核上の全ての炭素が塩素置換されたHCBの場合は分解活性を示さず、HCBにmonooxygenationを行う好気性細菌は全く単離されていない。一方で、PCPなどはflavin-dependent monooxygenaseによる脱塩素・水酸基置換反応によりchlorohydroquinoneの生成を伴う分解が起こる (Orser and Lange, 1994, Lee *et al.*, 1998, Leung *et al.*, 1997, Radehaus and Schmidt 1992)。このことからJonesらはmonooxygenaseに着目し、*Pseudomonas putida*由来のCYP101 (P450_{cam})へF87W/Y96F/V247L変異を導入することでHCBを脱塩素・水酸基置換することが可能な変異体酵素の作製に成功した (Jones *et al.*, 2001)。この反応はNADHから得た電子をputidaredoxinへ輸送するputidaredoxin reductase PdR (*camA*)、PdRから受け取った電子をterminal oxygenase CYP101へ伝達する鉄硫黄タンパク質putidaredoxin Pd (*camB*)、terminal monooxygenase CYP101 (*camC*) のthree-componentによって触媒される (Fig. 0-4a)。F87W/Y96F/V247L変異体酵素にL244Aを導入することでHCBの変換効率は向上し (Chen *et al.*, 2002)、さらにこの変異体をコードする遺伝子を含む遺伝子カセット (*camA*⁺, *camB*⁺, *camC*)をPCP分解菌*Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723へ導入することで、毒性を示す中間体産物の蓄積を伴わないHCBの分解が可能となった (Yan *et al.* 2006)。野外での組換え体の使用はカルタヘナ法によって規制対象となるため実用化されていない一方で、こうしたCYP101変異体による一連の研究により、好気条件下に於いてmonooxygenaseによりHCBが脱塩素されることが十分に可能であることが示された。

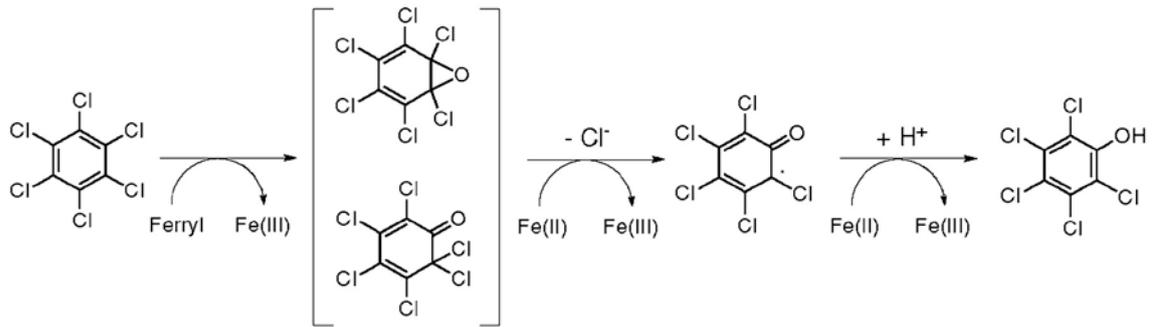
ナチュラルオカレンスの好気性微生物においてもcytochrome P450 monooxygenaseによるHCB分解代謝能が存在するのではないかと考えられていたが、HCBを資化する細菌叢の中で*Azospirillum*属と*Alcaligenes*属が優占する知見があったものの、実際に単離・同定には至っておらず (Liu *et al.*, 2009)、好気性細菌によるHCB分解機構については未だ謎が多い。

上述の背景を踏まえ、高木らはHCBのアナログであり、殺菌剤のpentachlorobenzene (C₆Cl₅NO₂; PCNB)が施用されていた茨城県結城市の畑地土壤に着目した。PCNBはハクサイ、キャベツなどアブラナ科野菜根こぶ病防除に用られた土壤殺菌剤であり、単離源となったハクサイ栽培地帯の畑圃場では1993年当時、過去数十年にわたるPCNBの連

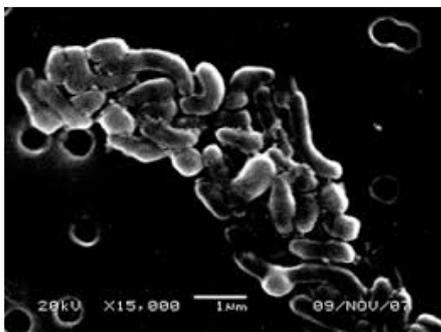
用により殺菌効果が低下していたことから、分解微生物の集積が調査によって明らかとなっていた (高木ら 1993、1994)。PCNB と HCB は共に平面構造および化学的に安定性を有し、ベンゼン骨格上の炭素が全て電気陰性度の高い Cl または NO₂ で置換されているため、類似した電子密度分布を示すと推測できる。実際に PCNB をアナログ基質として土壌・木炭還流法により HCB 脱塩素能を有する細菌の集積を試みた結果、好気条件下で HCB 脱塩素能を示す有機塩素系農薬分解菌群 PD3 が単離され、さらにこの PD3 から世界初の好氣的 HCB 分解能を有する放線菌 *Nocardioides* sp. PD653 が単離・同定された (Takagi *et al.*, 2009, Fig. 0-4b)。PD3 は PD653 の他、*Burkholderia cepacia*、*Methylobacterium* sp.、*Calucobacter* sp. の計 4 種の細菌で構成される微生物群であることが明らかになっており、PD653 のみを用いて集積した木質炭化素材 (Fig. 0-4c) と比較すると、PD3 集積木質炭化素材の方が活発な HCB 分解活性を示す (関谷 2009)。このことは PD3 における何らかの細菌間相互作用が存在することを示し、大変興味深い。

PD653 の分解スペクトルは PCNB と HCB (Takagi *et al.*, 2007)、PCP、低塩素化 PCBs の他、6 つの塩素原子が全てエクアトリアルに位置し、化学的に最も安定なため環境中での残留性が高い β-HCH に対しても分解能を示すことから (unpublished data)、平面構造ないしはそれに近い有機塩素化合物に対する基質特性が高いことが推察される。一方で、HCB を唯一の炭素源とした無機塩液体培地では顕著な増殖が見られないことから、PD653 が HCB 資化性菌であるかどうかは明らかとなっていない。HCB・PCNB の分解代謝では中間産物として PCP、2,3,5,6-tetrachloro-*p*-hydroquinone (TeCH)、2,6-dichloro-*p*-hydroquinone (DiCH) を経由し、最終的に CO₂、Cl⁻ まで無機化・無毒化することが分かっている (Fig. 0-4d)。初発の HCB から PCP への反応は monooxygenase の関与が推察されており、このメカニズムは不明であるが、この分解機構を解明し環境中で効率よく利用することができれば、*in situ* における HCB のバイオレメディエーションが現実味を帯びることは間違いない。

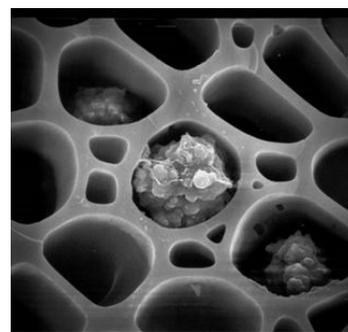
(a)



(a)



(c)



(d)

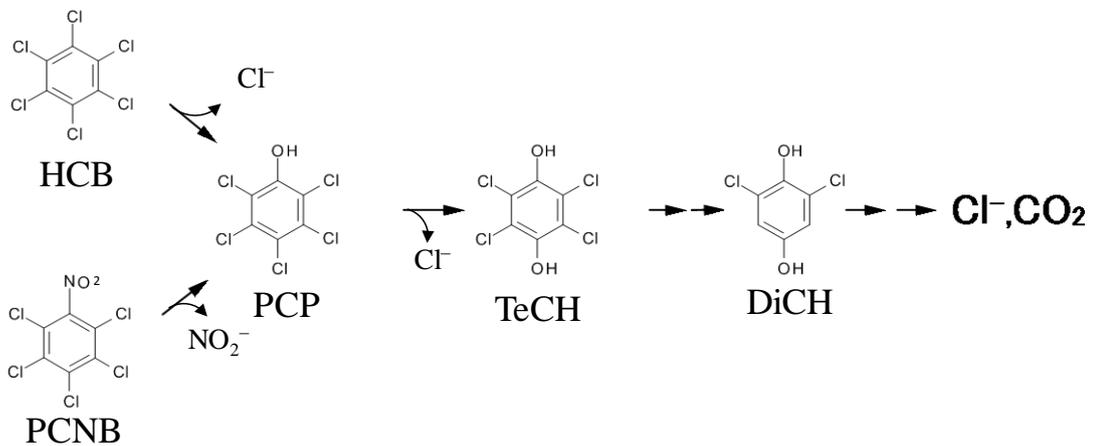


Fig. 0-4 好気条件下におけるHCB脱塩素反応.

(a) CYP101変異体による好氣的HCB脱塩素反応 (Chen *et al.*, 2002). (b) PD653の電子顕微鏡写真. (c) 木質炭化素材に集積したPD653. (d) PD653の好氣的HCB分解代謝経路 (Takagi *et al.*, 2007).

好気性細菌による PCP 脱塩素分解

PCP 分解菌はグラム陰性菌、グラム陽性菌の両方から多くの単離報告例があり (Table 0-2)、グラム陰性細菌 *Sphingobium chlorophenicum* ATCC 39723 株をモデル生物としてメカニズム解明が進められている。ATCC 39723 株では染色体上にコードされる *pcp* 遺伝子群によって PCP 代謝が行われる (Fig. 0-5a)。初発の反応は *pcpB* がコードするフラビンタンパク質 PCP-4 monooxygenase (PcpB; AAF15368) が PCP から 2,3,5,6-tetrachloro-*p*-benzoquinone (TCBQ) への酸化的脱塩素反応を触媒し、次に *pcpD* にコードされた tetrachlorobenzoquinone reductase PcpD は TCBQ を TeCH に還元する。PcpB は flavin-dependent phenol hydroxylase family に属し、このファミリーに特有なロスマンフォールドを有す。Hlouchova らによって提唱された PcpB による PCP メカニズムを Fig. 0-5b に示す。一連の触媒サイクルは NADPH によってプロトン化した還元型フラビンが O₂ と相互作用することで C4a-hydroperoxyflavin を生成し、この一時的に安定な C4a-oxygen adduct から基質に水酸基が導入され、ヒドロキシル化した基質および C4a-hydroperoxyflavin から H₂O が脱離することによって完了する (Hlouchova *et al.*, 2012)。

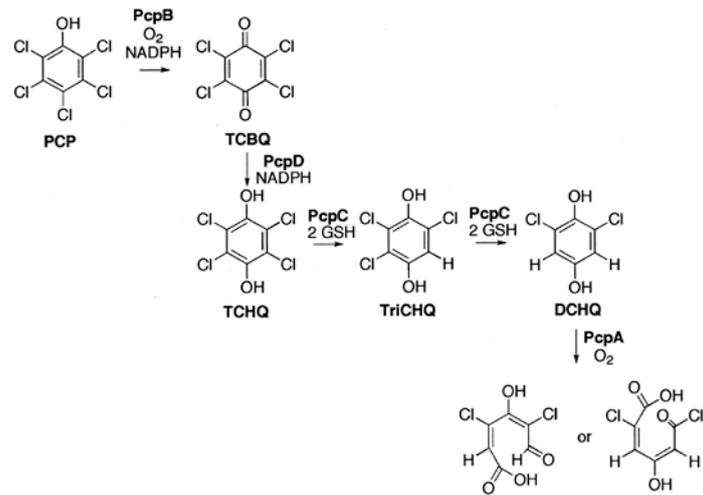
Tirrola らの研究では *pcpB* およびそのアレルが地理的に離れた場所からそれぞれ検出されている (Tirrola *et al.*, 2002a)。また、PCP 汚染サイトから抽出された環境 DNA から *pcpB* が検出された報告例もある (Beaulieu *et al.*, 2000)。従って、*pcpB* が水平伝播によって広く分布していることが示唆されている。しかしながら、*pcp* 遺伝子群が検出されるものは *Novosphingobium* 属、*Sphingomonas* 属、*Sphingobium* 属といった近縁種 (いわゆる sphingomonad) に留まり (Tirrola *et al.*, 2002a)、グラム陽性細菌を含む他属の PCP 分解菌では *pcp* 遺伝子群非依存的なメカニズムが存在すると考えられている (Crawford *et al.*, 2007)。一例として、*Mycobacterium chlorophenicum* PCP-I (NCBI accession no. NR_119093) では membrane associated cytochrome P-450 によって PCP から TeCH への脱塩素・水酸基置換反応が行われていることが報告されている (Uotila *et al.*, 1991)。PD653 も例外ではなく、PCP 以降の代謝経路から PcpB による *para*-hydroxylation が疑われたが、*pcpB* 検出用プライマーセット *pcpB*-G、*pcpB*-D2 (Tirrola *et al.*, 2002b) を用いた PCR では増幅産物が得られなかったことから *pcp* 遺伝子群非依存的なメカニズムが関与している可能性があり、興味を持たれる。

PCP の下流、TeCH や DiCH に関しては土壤中での残留が報告されていないことや、hydroquinone 体が細菌にとって易分解性となることから (Field and Sierra-Alvarez, 2008)、環境中にはこれら化合物に対する分解代謝機構が既に存在することが推察できる。

Table 0-2 これまでに同定された PCP 分解菌と *pcpB* の有無(Crawford *et al.*, 2007, 一部改訂)

Strain name	<i>pcpB</i> Confirmed?	References
Gram-negative bacteria		
<i>Sphingomonas</i> spp. UG25 and UG30	Yes	Leung <i>et al.</i> , (1997)
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> ATCC 33790	Yes	Stanlake and Finn (1982), Ederer <i>et al.</i> , (1997)
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> RA2	Yes	Radehaus and Schmidt (1992), Colores <i>et al.</i> , (1995), Bielefeldt and Cort (2005)
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> SR3	Yes	Resnick and Chapman (1994), Ederer <i>et al.</i> , (1997)
Gram-positive bacteria		
<i>Mycobacterium chlorophenolicus</i>	No	Apajalahti and Salkinoja-Salonen (1986)
<i>Bacillus megaterium</i> CL3	Not reported	Karn <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus cereus</i> ITRC S ₆	Not reported	Chandra <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus</i> sp. ITRC S ₈	Not reported	Chandra <i>et al.</i> , 2008
<i>Kokuria</i> sp. CL2	Not reported	Karn <i>et al.</i> , 2011
<i>Nocardioides</i> sp. PD653	No	Takagi <i>et al.</i> , (2009)

(a)



(b)

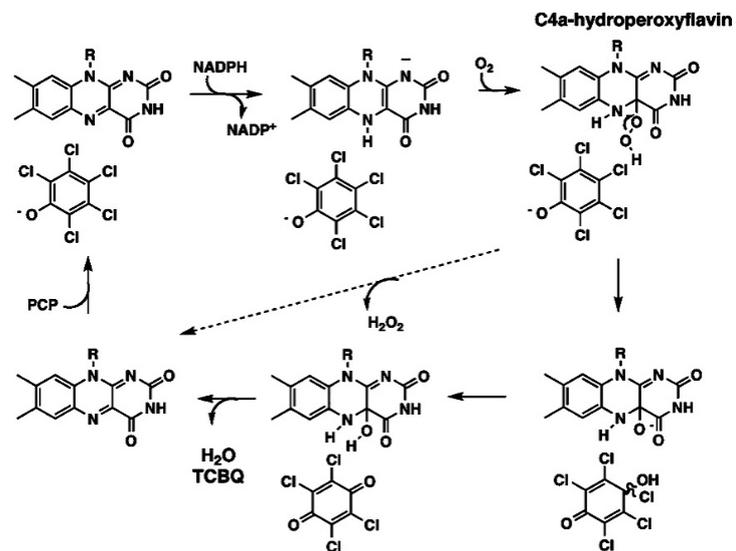


Fig. 0-5 好気性細菌による PCP 分解代謝機構.

(a) ATCC 39723 の *pcp* 遺伝子群依存的な PCP 分解代謝経路 (Dai and Copley, 2004).

(b) Flavin と O₂ を介した PCP の脱塩素・水酸基付加反応 (Hlouchova *et al.*, 2012).

以上のことから、好気条件下の HCB のバイオレメディエーションにおける最大のボトルネックは、HCB の脱塩素・水酸基置換反応による PCP への変換であると言えるが、この反応を触媒するメカニズムは解明されていない。更に、グラム陽性細菌における PCP 分解代謝メカニズムも不明である。これらを解明することはバイオレメディエーションによる HCB・PCP 汚染環境の修復効率を改善するための基盤的知見となり得ると共に、細菌が獲得した HCB 分解能の生理学的意義や起源を考える上で重要なデータとなる。従って、本研究では PD653 をモデル生物とし、HCB と PCP の代謝に関与する一連の遺伝子群の同定を目的とした。

第一章

HCB 脱塩素分解酵素遺伝子群の単離・同定

1□1. 緒言

序章で述べた通り、PD653 がどのようなメカニズムで HCB を分解しているかは謎である。好気性細菌では、HCB のような高度に塩素置換された化合物の脱塩素反応には monooxygenase が関与すると報告されているが、monooxygenation は cytochrome P450 や flavin-dependent monooxygenase、また一部の dioxygenase が行うケースもある。これまでに行った PD653 による HCB 分解試験結果から、非常に早い HCB 分解を触媒する酵素および反応メカニズムを遺伝学的に解明することは、POPs 汚染農地や汚染水のバイオレメデーション技術の向上に資する情報となるだけでなく、また数少ない好気性脱塩素反応の研究成果として学術的にも有意義であると考えている。

当研究室では PD653 を栄養培地にて継代培養を行う過程で、初発の HCB 脱塩素能に欠陥を持つ PD653-B2 が単離された。PD653-B2 は初発 HCB 脱塩素反応を行うことはできないが、PCP 以降の代謝能を保持している。すなわち、PD653 と PD653-B2 のゲノムを比較することで HCB 脱塩素反応に関与する遺伝子の特定に繋がると考えた。そこで本章では、PD653 と PD653-B2 のゲノム DNA 配列の比較から PD653 のみに保存される DNA 配列を探索し、PD653 のみで保存される約 72-kb の遺伝子領域を見出した。その領域内から PD653-B2 で機能欠損した遺伝子の DNA 配列を特定し、遺伝子組換え大腸菌を用いた機能解析によって初発の HCB 脱塩素酵素遺伝子の同定と分子メカニズムの解明を行った。

1□2. 材料および方法

(1) 材料

PCP は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) の製品を用いた。HCB は Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) の製品を用いた。Difco R2A 寒天培地は Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) の製品を用いた。

(2) 分析方法

塩素イオン濃度はイオンクロマトグラフィー (761 Compact IC; Metrohm, Herisau,

Switzerland) で定量した。カラムは IC SI-90 4E (Shodex, Tokyo, Japan) を使用し、1.8 mM Na_2CO_3 、1.7 mM NaHCO_3 の移動相を用いて流速 1.0 min L^{-1} 、 40°C で分析した。HCB、PCP は HPLC-UV (Hewlett-Packard series 1100; Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) で定量した。分析時の吸光度波長は 220 nm とした。分析カラムは Poroshell 120 EC-C18 ($150 \text{ mm} \times 4.6\text{-mm}$ 内径; Agilent Technologies, Tokyo, Japan) を使用し、流速 1.0 min L^{-1} 、カラム温度 40°C 、アイソクラティックモードで分析を行った。HCB 分析時の移動相はアセトニトリル : 0.1% リン酸 = 90:10 を使用し、PCP 分析時は 87:13 を使用した。

(3) 菌株・プラスミドおよび培地

本章で使用した菌株およびプラスミドを Table 1-1 に示した。*Escherichia coli* DH5a は遺伝子操作の宿主として用いた。無機塩培地 (MM) の組成の組成を Table 1-2 に示した。*p*-アミノ安息香酸はフィルター滅菌したものを $50 \mu\text{g L}^{-1}$ となるよう MM に添加した。PD653 と PD653-B2 の前培養には MM に 1 g L^{-1} Glucose、 1 g L^{-1} bacto tryptone を調製したものをを用いた。オートクレーブ後に 10 mL トレースエレメント (Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994, Table 1-3) と *p*-アミノ安息香酸 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ を調製した。大腸菌用の培地として Luria-Bertani (LB) broth (Sambrook and Russel, 2001) を用いた (Table 1-4)。培地には必要に応じて ampicilin (Ap)、X-Gal をそれぞれ $100 \mu\text{l L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{l L}^{-1}$ となるよう添加した。プレート作製時には細菌培地用の寒天を終濃度 1.5% (wt/vol) になるよう添加した。本章で用いた PBS (-) の組成を Table 1-5 に示した。

Table 1-1 本章で用いた菌株およびプラスミド。

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or origin
Strains		
<i>Nocardioides</i> sp. PD653	HCB ⁺ , PCP ⁺	Takagi <i>et al.</i> , 2009
<i>Nocardioides</i> sp. PD653-B2	HCB ⁻ , PCP ⁺	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , l, f80 <i>dlacZ</i> DM15, D(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TOYOBO
Plasmids		
pGEM-T easy	Ap ^r <i>lacZ</i> , pMB1-derived replicon, TA cloning vector	promega
pGEM-T easy/2177-2179	Ap ^r , pGEM-T easy with 2.9-kb PCR-amplified DNA fragment containing ORF1, ORF2 and ORF3 of PD653	This study
pETDuet-1	Ap ^r pBR322-derived ColE1 replication, T7 promoter, two MCS, expression vector	Novagen
pE123N	Ap ^r , pE12N with 0.7 kb PCR-amplified DNA fragment containing ORF3 in MCS2	This study
pE12N	Ap ^r , pETDuet-1with PCR-amplified DNA fragment containing ORF1 and ORF2 in MCS1	This study
pE12N2	Ap ^r , pE1N with PCR-amplified DNA fragment containing ORF2 in MCS2	This study
pE23N2	Ap ^r , pE2N with PCR-amplified DNA fragment containing ORF3 in MCS2	This study
pE13N2	Ap ^r , pE1N with PCR-amplified DNA fragment of ORF3 in MCS2	This study
pE1N	Ap ^r , pETDuet-1with PCR-amplified DNA fragment of ORF1 in MCS1	This study
pE2N	Ap ^r , pETDuet-1with PCR-amplified DNA fragment of ORF2 in MCS1	This study
pE3N	Ap ^r , pETDuet-1with PCR-amplified DNA fragment of ORF3 in MCS1	This study

^a HCB⁺, HCB 分解能有; HCB⁻, HCB 分解能無; PCP⁺, PCP 分解能有; PCP⁻, PCP 分解能無
PCP; Ap^r, ampicilin 耐性有

Table 1-2 無機塩液体培地 (MM) の組成表 (1 L).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.2 g
KH_2PO_4	0.5 g
Trace element	10 mL
<i>p</i> -amino benzoic acid	0.05 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g

Table 1-3 Trace element の組成表 (mg L^{-1})

EDTA	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5
H_3BO_3	30
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
Na_2MoO_4	5
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	50

Table 1-4 LB 培地の組成 (g L^{-1})

Peptone	10
Yeast extract	5
NaCl	5

*寒天培地の場合は 15 g Agar を添加

Table 1-5 PBS (-) の組成表 (g L^{-1})

KH_2PO_4	0.2
NaCl	0.2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	2.9

(4) DNA の取り扱い

PD653 と PD653-B2 の全 DNA は DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて、製造元から供給されているプロトコール中の、リゾチーム処理を用いる行程に従って抽出を行った。

(5) PD653-B2 の同定

PD653-B2 の代謝能を調べるため分解試験を行った。PD653-B2 を前培養培地で $OD_{600} = 1.2$ まで培養し、 $3,000 \times g$ 、 4°C 、10 分で集菌後、MM で一回菌体洗浄した。洗浄した菌体を MM に懸濁し、1 mL 菌体懸濁液を 50 mL 共栓付き三角フラスコへ分注した 9 mL MM へ接種した (初期 $OD_{600} = 1.0$)。この培地に HCB または PCP をそれぞれ 9、6.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ となるよう調製し、180 rpm、 30°C 、9 日間振とう培養した。3 連のサンプルを回収し、600 μL の一部上清をイオンクロマトグラフィー分析した。各塩素化合物濃度を定量するため、18.8 mL のアセトニトリルを混合し、一部上清を $19,000 \times g$ 、10 分で遠心分離したものを HPLC で測定した。

(6) ドラフトゲノムシーケンス解析

Covaris S2-A system (Covaris, Woburn, MA, USA) によって PD653 および PD653-B2 の genomic DNA を約 500 bp に断片化した。シーケンスライブラリを NEBNext DNA library prep master mix for the Illumina platform (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を用いて作製し、このライブラリサンプルを Miseq シーケンサーと Miseq version 3 reagent kit (Illumina KK, Tokyo, Japan) を用いて paired-end シーケンスした (2×300 bp)。PD653 と PD653-B2 の total read base はそれぞれ 2.51、1.90 Gb だった。Raw read は CLC Genomics Workbench version 7.5.1 (Qiagen) を用いてトリミング、*de novo* 解析した。トリミングのパラメーターを以下に示す; ambiguous limit, 2; quality limit, 0.001; 10 5' -terminal nucleotides; 40 3' -terminal nucleotides. *de novo* アセンブリのパラメーターを以下に示す; update contigs, yes; bubble size, 600; minimum contig length, 1,000; automatic word size, 51; perform scaffolding, yes; auto-detect paired distances, yes; mismatch cost, 2; insertion cost, 3; deletion cost, 3; length fraction, 0.5; and similarity fraction, 0.8. アセンブルした PD653 および PD653-B2 のコンティグは DDBJ Microbial Genome Annotation Pipeline (MIGAP; <http://www.migap.org/index.php/en>) でアノテーションし、編集して塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) へ登録した。

PD653 のリファレンス配列となる全ゲノム情報が存在しなかったことから、各コンティグ間の位置関係、距離、方向は不明だった。よって、NCBI のサイト上の記述 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/agp/AGP_Specification/) に順じ、各コンティグを適当に並べ、コンティグ間の距離を 100 N で埋めることにより PD653 のスキファールドを形成した。このスキファールドをリファレンス配列とし、PD653-B2 のコンティグを ABACAS (Assefa *et al.*, 2009) を用いてアセンブリし、ドラフト配列を取得した。HCB 脱塩素反応に関与する遺伝子を検出するため、Mauve (Darling *et al.*, 2004) を用いて PD653 と PD653-B2 をアライメントした。このアライメントから検出された、PD653 のみに保存される遺伝子群から、アノテーションによって候補遺伝子を選抜した。

PD653 のコンティグ 22 および PD653-B2 のコンティグ 26 でミスアセンブリが生じているかどうかを調べるため、Fig. 1-2a で示した領域を解析した。この解析に用いたプライマーの塩基配列を Table 1-6 に示す。領域 b は wt_MS22_F と wt_delta_MS_R のプライマーセットを、領域 c は delta_MS26_F と wt_delta_MS_R のプライマーセットを用いてそれぞれ PCR で増幅した。得られた増幅産物は pGEM-T Easy vector (Promega) にクローニングし、シーケンス解析した。

HCB 分解代謝系の下流で経由するポリ塩化フェノールの代謝に関与し得る遺伝子は、ミネソタ大学 Biocatalysis/Biodegradation Database (http://eawag-bbd.ethz.ch/pcp/pcp_map.html) (Ellis and Wackett, 2012) を用いて解析した。

Table 1-6 本章で使用したプライマー

Primer	5' to 3' ^a
Specific primer used for amplification of candidate genes involved in dechlorination of HCB	
orf1_F	TCAGGACAACACCGACGTCT
orf3_R	ACCTCCTGTGGTGGAGCGGA
orf1-NcoI_mcs1_F	AAAC <u>CCATGGGG</u> CGGGATACCCTTGTACTC
orf1-NcoI_mcs1_R	AAAC <u>CCATGGT</u> CAGGAGAAGATGCCCCG
orf2-NcoI_mcs1_F	AAAC <u>CCATGGG</u> GAACCTCGTCACCGTCATC
orf2-NcoI_mcs1_R	AAAC <u>CCATGGT</u> CATGAGCGAGTGCTTTCCAG
orf2-NdeI_mcs2_F	AAAC <u>ATATGA</u> ACCTCGTCACCGTCATCGGC
orf2_mcs2_R	GTCATGAGCGAGTGCTTT
orf3-BspHI_mcs1_F	AAAT <u>CATGAC</u> CACCTCCGCACCGATC
orf3-BspHI_mcs1_R	AAAT <u>CATGAT</u> CAGGCGGTGGTGAGGCG
orf3-NdeI_mcs2_F	AAAC <u>ATATGA</u> CCACCTCCGCACCGATC
RT-PCR primer	
hcbA1_q_F	TGCCCTGTTGTACTCGATC
hcbA2_q_F	TGAACCTCGTCACCGTCATC
hcbA2_q_R	AACTGGTCGAGGAAGAGCTTG
hcbA3_q_R	TCAAGGGAGACTGAGGTAAAGG
rpoB_q_F	CTGATCGGCAACGAGAAGTGG
rpoB_q_R	TGAACTCCGCGGAGACGTAG
Primer used for amplification to confirm misassembly	
wt_MS22_F	CGCTACTACCAGGTCCTCAA
delta_MS26_F	TACTTCACCTGGTTGAGGGC
wt_delta_MS_R	AGGAGGTCTTCATGATGGTG

^a 制限酵素認識配列を下線で示した。

(7) 推定アミノ酸配列の解析

候補遺伝子と他の細菌由来の推定アミノ酸配列は blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によって比較した。推定アミノ酸配列のアライメントは DDBJ ウェブサイト上の ClustalW によって作成した (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>)。HcbA1 と HcbA3 の 2 次構造は Jpred4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) で予測した (Drozdetskiy *et al.*, 2015)。

(8) *hcbA* 遺伝子群発現プラスミドの構築

本研究で構築したプラスミドおよび使用したプライマーは Table 1-6 に示した。最初に候補遺伝子 ORF1~3 を含む領域を orf1_F と orf3_R のプライマーセットを用いた PCR で増幅し、pGEM-T Easy vector へ挿入したものを、下記の本実験の鋳型とした。

推定好氣的 HCB 脱塩素酵素遺伝子の発現ベクターを構築するため、orf1-NcoI_mcs1_F と orf1-NcoI_mcs1_R のプライマーセットを用いた PCR により ORF1 を増幅した。ORF1 を含む増幅産物を NcoI で消化し、pETDuet-1 の NcoI site (MCS1) にライゲーションした。得られたプラスミドを pE1N と命名した。

pETDuet-1 の NcoI site に ORF2 を導入したプラスミド pE2N は、orf2-NcoI_mcs1_F と orf2-NcoI_mcs1_R のプライマーセットによる PCR 産物を用い、同様の行程で構築した。

pETDuet-1 に ORF3 を導入したプラスミド pE3N は、orf3-BspHI_mcs1_F and orf3-BspHI_mcs1_R のプライマーセットによる PCR 産物を BspHI で消化し、NcoI site へライゲーションすることで構築した。

ORF1 と ORF2 を含む領域を pETDuet-1 に導入したプラスミド pE12N は、orf1-NcoI_mcs1_F と orf2-NcoI_mcs1_R のプライマーセットを用いた PCR 産物を NcoI で消化し、NcoI site へライゲーションすることで構築した。

pETDuet-1 の MCS1 に ORF1、MCS2 に ORF2 を導入したプラスミド pE12N2 は、orf2-NdeI_mcs2_F と orf2_mcs2_R のプライマーセットによる PCR 産物を NdeI で消化し、pE1N の NdeI-EcoRV site へライゲーションすることで構築した。

プラスミド pE123N (MCS1 に ORF1-2、MCS2 に ORF3)、pE13N2 (MCS1 に ORF1、MCS2 に ORF3)、pE23N2 (MCS1 に ORF2、MCS2 に ORF3) は orf3-NdeI_mcs2_F と orf3_R のプライマーセットによる PCR 産物を NdeI で消化し、それぞれ pE12N、pE1N、pE2N の NdeI-EcoRV site へライゲーションすることで構築した。

構築したプラスミドは全て His・tag 非融合タンパク質を発現させるように設計した。

得られたプラスミドはシーケンス解析によって正しく配列が挿入されていることを確認し、*E. coli* BL21 (DE3)へ形質転換した。

E. coli の細胞を $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ のアンピシリン含有 LB へ接種し、 37°C 、210 rpm で一晚培養した。

終夜培養液を $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ アンピシリンと 0.25mM IPTG を含む LB 培地へ接種した。初期 $\text{OD}_{600} = 0.6$ に調整し、 30°C 、210rpm、4 h で遺伝子を誘導した。誘導後の細胞は $1,800 \times g$ 、10min、 4°C にて集菌し、50mL の PBS バッファーで洗浄した。

(9) 組換え大腸菌による HCB 分解試験

洗浄した大腸菌細胞を 1 mL MM に懸濁し、50 mL 共栓付き三角フラスコへ分注した 9 mL MM へ接種し、HCB を $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ に調製した。初期 OD_{600} は 1.8 であり、菌体乾物重量は 0.8 g L^{-1} だった。三角フラスコは 37°C 、210 rpm、12 時間振とう培養した。3 連のサンプルを適当な時点で回収し、20 mL acetonitrile を混合した。このサンプル溶液の一部上清を $19,000 \times g$ 、10 分間遠心分離し、上清を HPLC 分析用サンプルとした。

(10) 嫌条件下における組換え大腸菌の HCB 分解試験

IPTG で誘導した大腸菌培養液 40 mL を PBS バッファーで洗浄し、以降の実験操作を真空排気後に N_2 ガスへ置換したグローブボックス内 (UN-650F, UNICO, Ibaraki, Japan) で行った。 N_2 ガスをパージすることで溶存酸素を除去した MM 1 mL にペレット化した洗浄菌体を懸濁し、50 mL 共栓付き三角フラスコへ分注した 9 mL MM へ 1 mL 接種した後、HCB $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ となるよう調製した。初期 OD_{600} は 9.0 だった。酸素濃度は dissolved oxygen meter (SG6–SevenGo pro dissolved oxygen; Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) を使用し、独立した系で測定した。反応はマグネットスターラーで攪拌しながら室温で行い、反応開始後 3 時間でグローブボックス内を大気に置換し、酸素を再導入した。3 連のサンプルを適当なタイミングで回収し、20 mL の acetonitrile を混合して反応を停止した。対照区として、酸素濃度を低濃度 ($[\text{O}_2] < 0.5 \text{ mg L}^{-1}$) に維持し続け、HCB が脱塩素されるかどうか確認した。サンプルの調製および測定は前節と同様の方法で行った。

(11) RT-PCR

PD653 のシングルコロニーを前培養培地に接種し、対数増殖期後期 ($\text{OD}_{600} = 1.0$) まで 180 rpm、 30°C で振とう培養した。この培養液を共栓付き三角フラスコに分注した新しい前培養培地中に $\text{OD}_{600} = 0.1$ となるよう接種し、振とう培養した。対数増殖期 ($\text{OD}_{600} = 0.3 \sim 0.4$) の PD653 培養液に HCB を添加し、3 時間後に細胞を回収し、液体窒素で凍結して -80°C で保存した。Total RNA の抽出は Sepasol-RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用し、以下に示す行程で行った; 凍結した細胞をリゾチーム 5 mg L^{-1} に調製した 200 μL Tris-EDTA buffer で溶解し、 37°C 、5 分インキュベートした後、直ちに 500 μL Sepasol RNA I を添加した。この混合液をガラスビーズ (直径 100 μm ; 50 mg、直径 1 mm; 30 mg) 入りの 1.5 mL セーフロックチューブへ入れ、ビーズビーターを用いて 5,000 rpm、5 分で破碎した。その後、新たに 500 μL Sepasol RNA I を入れ、後の行程は製造元のプロト

コールに従った。Total RNA 溶液中に残存する genomic DNA を除去するため、recombinant DNase (TaKaRa, Tokyo, Japan) を用いて DNase 処理をした。

精製した total RNA は 1% native agarose gel による電気泳動によって 23S、16S rRNA 由来と考えられる 2 つのバンドを検出し、本実験行程で RNA の分解が起こっていないことを確認した。Total RNA 濃度・純度は NanoDrop ND-8000 system (Thermo Fisher, Lafayette, CO, USA) によって測定した。cDNA の合成は total RNA 1 μg を鋳型とし、ReveTra Ace quantitative PCR RT kit (Toyobo) を用いて製造元のプロトコールに従った。合成した cDNA は 8 倍希釈し、Table 1-5 に示したプライマーによって RT-PCR を行った。RT-PCR に用いたプライマーセットを以下に示す；遺伝子間領域 I は hcbA1_q_F と hcbA2_q_R、遺伝子間領域 II は hcbA2_q_F と hcbA3_q_R で増幅した。rpoB_q_F と rpoB_q_R は RNA polymerase β -subunit をコードするハウスキーピング遺伝子 *rpoB* を標的とし、mRNA control として用いた。PCR 条件は以下に示す条件で行った

Pre-denature	98°C 1.5 min	
Denature	98°C 15 s	} 30 cycles
Annealing	62.5°C 30 s	
Extension	68°C 30 s	
Final extension	68°C 30 s	

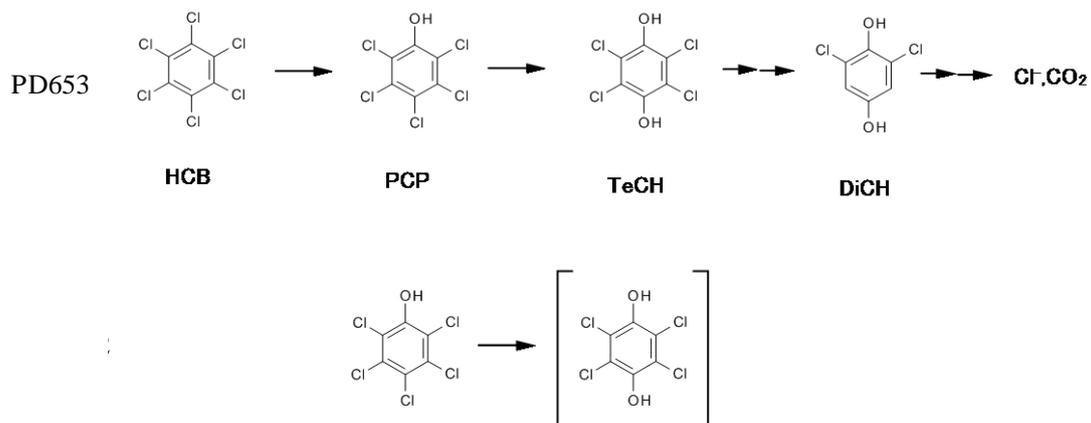
PCR 増幅産物は 1.5% (wt/vol) agarose gel で電気泳動し、pGEM-T easy vector へクローニングしてシーケンス解析に供した。

1□3. 結果

(1) PD653 と HCB 分解能に欠陥をもつ PD653-B2 の代謝能の比較

PD653-B2 を用いた HCB 分解では、HCB 分解活性および Cl^- の蓄積は認められなかった。PCP 分解試験では 2 日以内に初期濃度 $6.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ の PCP が消失し、 Cl^- が $10.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ 蓄積していたことから、PCP 1 分子につき約 2 つの Cl 原子が脱離したことが示された (Fig. 1-1b)。

(a)



(b)

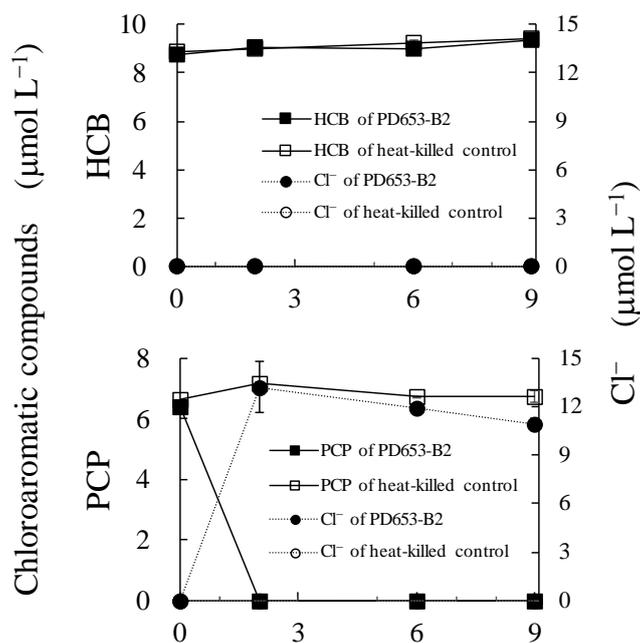


Fig. 1-1 PD653-B2 の分解活性評価.

(a) PD653 と PD653-B2 の HCB・PCP 分解代謝経路。(b) PD653-B2 の代謝能の検討. 塩素化合物の分解および生成した Cl⁻イオンを分析した。全ての値は 3 連の平均値と標準偏差を表記した。

(2) PD653 と PD653-B2 の比較ゲノム解析

PD653-B2 の HCB 分解能の欠失が、ゲノム再編成による代謝遺伝子の欠失であるという仮説を立てた。この仮説は PD653 と、その派生株である PD653-B2 のゲノムを比較し、派生株で欠失している遺伝子領域を同定することで実証した。

PD653 および PD653-B2 のゲノムサイズはそれぞれ約 5.08 Mb (87 contigs)、約 4.99 Mb (81 contigs) だった。両菌株の GC contents は 70.9% だった。アセンブリした PD653 と PD653-B2 のゲノムデータから DDBJ MiGAP で予測された CDS はそれぞれ 5,087、4,968 だった。両菌株のドラフトゲノムを Mauve で比較したところ、PD653 の contig 22 (GenBank accession number BDJG01000022)、1~71,874 bp の位置が PD653-B2 では欠失しており、この領域内には 96 の CDS が存在することが明らかとなった (Fig.1-2a、アスタリスク*で示した領域)。PD653-B2 でこの領域が完全に欠失しているかを調べるため、PD653 の contig 22 に PD653-B2 の raw read を直接マッピングしたところ、完全にアセンブリしたことから、この領域は PD653-B2 のゲノム上で完全に欠失されず、部分的に保持されている可能性が示された (データは示さない)。このことから、contig を生成する際にミスアセンブリが生じたことが推察されたので、Fig. 1-2a 中で示した”b”および”c”の領域を PCR で増幅し、シーケンスを確認した。その結果、b”および”c”の領域は Miseq によるシーケンス解析で得られた配列と一致したため、Fig. 1-2a に示すゲノム構造であると決定した。

PD653-B2 では Fig. 1-2a、アスタリスクで示した領域に該当する配列が、PD653 の contig 64 (Fig. 1-2a、”a”で示した領域) と完全に一致していた。

DDBJ MiGAP によって予測された CDS の一覧を Table 1-7 に示す。この中からアノテーション情報を基に、HCB の初発の脱塩素反応に関わる遺伝子として、3 つの近接した ORF1、ORF2、ORF3 に着目した。ORF1 (PD653_2189) は LLM class flavin-dependent oxidoreductase をコードすることが予測された。ORF2 (PD653_2188) は FMN reductase をコードすることが予測された。ORF3 (PD653_2187) は flavin reductase をコードすることが予測された。好気性細菌による芳香族化合物分解代謝において、マルチコンポーネント型芳香環水酸化酵素が重要な役割を担うケースが知られているため、この 3 つの ORF を候補遺伝子として選出した。

下流の代謝系に関与する可能性のある遺伝子として、PD653_1114 (PD653-B2 では PD653B2_0297) にコードされた 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase が挙げられた。この推定アミノ酸配列は *Burkholderia cepacia* AC1100 株由来の chlorophenol 4-

monooxygenase (TftD) と 54%の相同性を示した (Gisi and Xun, 2003)。この CDS の近傍に flavin reductase をコードする *tftC* は配座していなかったが、推定 flavin reductase 遺伝子が上流に配座していた (PD653 では PD653_1112、PD653-B2 では PD653B2_0299)。この他、*Ralstonia eutropha* JMP134 株由来 2,6-dichlorophenol hydroxylase (TfdB) と 55%の相同性を示すタンパク質をコードする ORF (PD653 では PD653_3537、PD653-B2 では PD653B2_3864) が含まれる遺伝子クラスターが見つかった (Perkins *et al.*, 1990)。また、この ORF の近傍には maleylacetate reductase (TfdF) のホモログをコードする ORF が配座していた (Seibert *et al.*, 1993)。一方で、PCP 分解代謝系に關与する *pcp* 遺伝子群は両菌株のドラフトゲノムから見出されなかった。

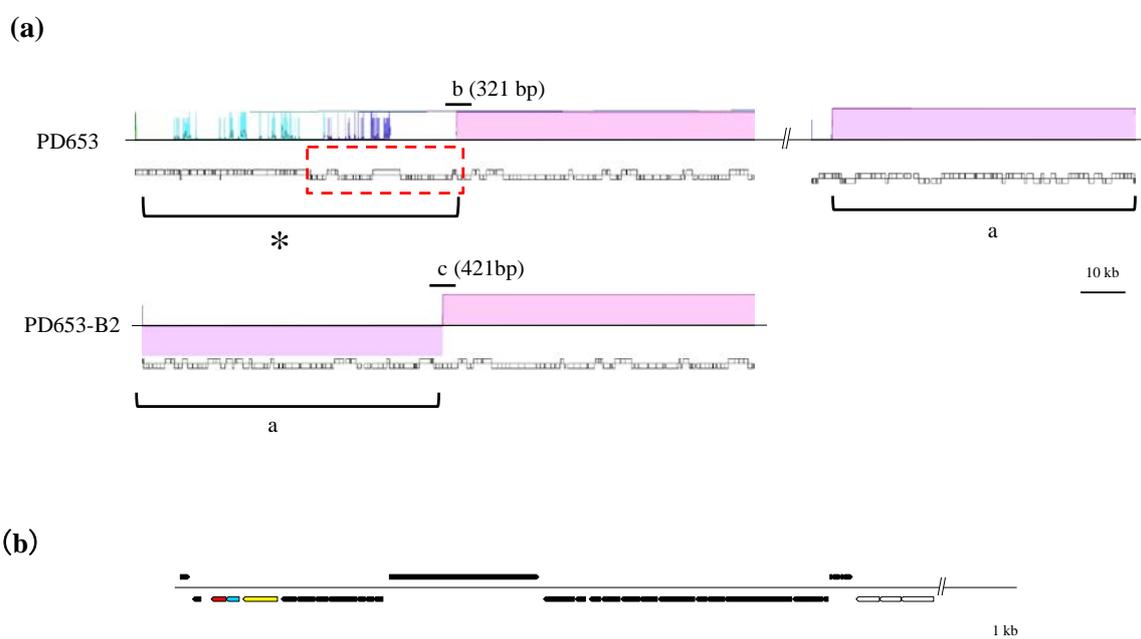


Fig. 1-2 PD653 と PD653-B2 の比較ゲノム解析.

(a) PD653 のみに保存される領域はアスタリスク (*) で示した。転移した領域は “a” で示した。ミスアセンブリを確認するために PCR で増幅した領域をそれぞれ “b” と “c” で示した (b と c の領域のサイズはスケールバーに順じない)。(b) Fig. 1-2a の赤点線で示した領域の遺伝子構造。矢印は ORF のサイズと転写の方向を示す。アスタリスク (*) で示した領域に存在する遺伝子および両株で共通して保存される遺伝子はそれぞれ黒、白で示した。候補遺伝子 ORF1、ORF2、ORF3 はそれぞれ黄色、空色、朱色の矢印で示した。

Table 1-7 PD653 のみに保存される領域にコードされた遺伝子の一覧.

Locus tag	Gene length (bp)	Protein length (AA)	Closest related protein	bit score	E-value	Identity (%)	ID	Organisms
PD653_2118	483	161	RusA family crossover junction endodeoxyribonuclease	129	2.0e-35	51	WP_050670494	<i>Luteipulveratus halotolerans</i>
PD653_2119	771	257	RusA family crossover junction endodeoxyribonuclease	106	5.0e-24	38	WP_064943947	<i>Mycobacterium sp. 852013-50091_SCH5140682</i>
PD653_2120	312	104	Hypothetical protein TPY_2741	112	4.0e-29	53	AEJ40901	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> TPY
PD653_2121	762	254	Site-specific DNA-methyltransferase	325	9.0e-110	63	WP_015297969	<i>Mycobacterium sp. JS623</i>
PD653_2122	300	100	Lsr2 family protein	48.5	5.0e-05	31	WP_029146266	<i>Microbacterium luticocti</i>
PD653_2123	363	121	Hypothetical protein	63.9	4.0e-11	41	WP_028474062	<i>Nocardioides alkalitolerans</i>
PD653_2124	585	195	Adenine methyltransferase	244	9.0e-80	71	WP_074404865	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
PD653_2125	894	298	Hypothetical protein	205	1.0e-62	66	WP_038679418	<i>Pimelobacter simplex</i>
PD653_2126	1680	560	DnaB-like helicase N terminal domain-containing protein	672	0.0	67	SFI85990	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2127	678	226	Hypothetical protein SAMN05216561_11433	273	3.0e-90	64	SFI86065	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2128	456	152	DUF4326 domain-containing protein	109	3.0e-28	47	WP_067955981	<i>Mycobacterium sp. NAZ190054</i>
PD653_2129	309	103	protein of unknown function	100	9.0e-24	59	SDT36843	<i>Jiangella sp. DSM 45060</i>
PD653_2130	270	90	GTPase ObgE	35.4	6.1e+00	73	WP_075711905	<i>Eubacterium sp. 68-3-10</i>

PD653_2131	306	102	Hypothetical protein	120	9.0e-34	61	WP_055962014	<i>Aeromicrobium</i> sp. Leaf291
PD653_2132	204	68	Alkaline phosphatase	35	3.7e+00	50	WP_011847724	<i>Shewanella baltica</i>
PD653_2133	366	122	Hypothetical protein SAMN05216561_11438	39.3	2.1e-01	39	SFI86241	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2134	294	98	Hypothetical protein	45.1	5.0e-04	35	WP_018793587	<i>Salinispora arenicola</i>
PD653_2135	273	91	Bifunctional (p)ppGpp synthetase/ guanosine-3=,5=-bis(diphosphate) 3=-pyrophosphohydrolase	38.1	6.6e-01	32	WP_059580539	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
PD653_2136	186	62	Hypothetical protein SAMN05216561_11439	60.8	3.0e-10	57	SFI86273	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2137	201	67						
PD653_2138	201	67	Hypothetical protein TREMEDRAFT_64958	36.6	1.1e+00	43	XP_007007165	<i>Tremella mesenterica</i> DSM 1558
PD653_2139	1455	485	Hypothetical protein SAMN05216561_11441	522	2.0e-180	57	SFI86340	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2140	297	99	Hypothetical protein	66.2	3.0e-12	42	WP_038676231	<i>Pimelobacter simplex</i>
PD653_2141	156	52	3-Dehydroquinase synthase	33.1	8.4e+00	60	WP_036384679	<i>Muricauda</i> sp. MAR_2010_75
PD653_2142	1482	494	Hypothetical protein	566	0.0	67	WP_018585440	<i>Salinispora arenicola</i>
PD653_2143	1554	518	Hypothetical protein SAMN05216561_11447	701	0.0	70	SFI86582	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2144	198	66	DUF2283 domain-containing protein	56.2	1.0e-08	54	WP_051681722	<i>Cellulomonas</i> sp. HZM
PD653_2145	717	239	HNH endonuclease	114	4.0e-28	38	WP_060921055	<i>Microbacterium paraoxydans</i>

PD653_2146	531	177	Hypothetical protein AHiyo6_03890	80.9	3.0e-15	61	GAP53824	<i>Arthrobacter</i> sp. Hiyo6
PD653_2147	306	102						
PD653_2148	189	63	Hypothetical protein F443_18763	32.7	6.4e+00	48	ETI34804	<i>Phytophthora parasitica</i> P1569
PD653_2149	201	67	Hypothetical protein	55.1	1.0e-08	42	WP_038679443	<i>Pimelobacter simplex</i>
PD653_2150	1068	356	Phage Mu protein F like protein	477	2.0e-166	69	SFI86619	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2151	1254	418	Hypothetical protein SAMN05216561_11449	468	9.0e-161	63	SFI86659	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2152	408	136	Uncharacterized conserved protein	142	2.0e-41	59	SFI86700	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2153	1152	384	Hypothetical protein SAMN05216561_11451	619	0.0	77	SFI86736	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2154	420	140						
PD653_2155	333	111	Hypothetical protein SAMN05216561_11456	105	4.0e-27	58	SFI86932	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2156	435	145	Hypothetical protein SAMN05216561_11453	87.8	2.0e-19	47	SFI86816	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2157	372	124	Phage protein, HK97 gp10 family	141	5.0e-41	58	SFI43596	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2158	495	165	Hypothetical protein SAMN05216561_11455	159	3.0e-47	56	SFI86892	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2159	231	77	Hypothetical protein	51.6	1.0e-06	49	WP_038679463	<i>Pimelobacter simplex</i>
PD653_2160	513	171	Hypothetical protein SAMN05216561_11458	233	3.0e-76	66	SFI87011	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2161	636	212	Hypothetical protein SAMN05216561_11459	171	2.0e-50	47	SFI87042	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>

PD653_2162	180	60	Hypothetical protein SAMN05216561_11460	68.6	2.0e-13	58	SFI87082	<i>Nocardioides psychrotolerans</i>
PD653_2163	3390	1130	Phage tail tape measure protein, TP901 family, core region	415	2.0e-122	48	SDD40725	<i>Auraticoccus monumenti</i>
PD653_2164	1812	604	Hypothetical protein	87	2.0e-14	24	WP_038676804	<i>Pimelobacter simplex</i>
PD653_2165	1014	338	Hypothetical protein	107	1.0e-22	29	WP_038676802	<i>Pimelobacter simplex</i>
PD653_2166	315	105						
PD653_2167	321	107						
PD653_2168	201	67						
PD653_2169	342	114						
PD653_2170	363	121	Hypothetical protein	97.4	3.0e-24	67	WP_056903920	<i>Nocardioides</i> sp. Leaf307
PD653_2171	732	244	Hypothetical protein	80.1	3.0e-14	31	WP_052337072	<i>Nocardioides alkalitolerans</i>
PD653_2172	678	226	Hypothetical protein	77.4	2.0e-13	31	WP_027768815	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ865
PD653_2173	222	74	Hypothetical protein	78.2	1.0e-17	53	WP_026923285	<i>Glycomyces arizonensis</i>
PD653_2174	192	64	Hypothetical protein	76.3	4.0e-17	60	WP_067428397	<i>Nocardioides jensenii</i>
PD653_2175	2709	903	Polysaccharide deacetylase	103	2.0e-19	63	WP_076816728	<i>Frankia</i> sp. NRRL B-16386
PD653_2176	402	134	Hypothetical protein AUJ48_03015	108	7.0e-26	46	OIN95531	<i>Deltaproteobacteria bacterium</i> CG1_02_45_11
PD653_2177	189	63	Hypothetical protein	58.5	2.0e-08	52	WP_018018316	<i>Corynebacterium capitovis</i>
PD653_2178	180	60	MULTISPECIES: hypothetical protein	63.2	4.0e-12	50	WP_056689176	<i>Nocardioides</i>
PD653_2179	924	308	Hypothetical protein	342	1.0e-114	61	WP_041545914	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_2180	174	58	Aryl-alcohol oxidase	35.4	1.9e+00	34	KDQ59695	<i>Jaapia argillacea</i> MUCL 33604
PD653_2181	1068	356	Hypothetical protein	413	2.0e-141	59	WP_056689300	<i>Nocardioides</i> sp. Root140

PD653_2182	681	227	Hypothetical protein	317	6.0e-107	70	WP_011751463	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_2183	504	168	Hypothetical protein	129	4.0e-35	52	WP_043806996	<i>Paenarthrobacter aureescens</i>
PD653_2184	1128	376	Hypothetical protein SAMN05428985_101622	179	2.0e-49	40	SDJ82508	<i>Nocardioides</i> sp. YR527
PD653_2185	369	123	Hypothetical protein	74.3	3.0e-15	45	WP_056689157	<i>Nocardioides</i> sp. Root140
PD653_2186	336	112	Hypothetical protein SAMN04487968_110141	35.8	7.3e+00	62	SFC74443	<i>Nocardioides terrae</i>
PD653_2187	621	207	Flavin reductase	212	4.0e-67	64	WP_071047937	<i>Frankia</i> sp. BMG5.36
PD653_2188	507	169	FMN reductase	212	5.0e-68	68	WP_029112870	<i>Mycobacterium</i> sp. URHB0044
PD653_2189	1356	452	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	538	0.0	58	WP_061291802	<i>Azotobacter vinelandii</i>
PD653_2190	585	195	MULTISPECIES: thermonuclease	252	9.0e-83	70	WP_011776883	<i>Micrococcaceae</i>
PD653_2191	750	250	Hypothetical protein SAMN05216467_2870	209	1.0e-64	55	SFK31985	<i>Cellulomonas</i> sp. KH9
PD653_2192	531	177	Hypothetical protein WILDE_87	60.5	3.0e-08	39	ALY10869	<i>Arthrobacter phage</i> Wilde
PD653_2193	1149	383	Hypothetical protein	258	3.0e-81	70	WP_011751639	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_2194	351	117	Hypothetical protein	38.9	3.8e-01	49	WP_041545943	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_2195	324	108	Hypothetical protein	35.4	5.7e+00	24	WP_006292151	<i>Parascardovia denticolens</i>
PD653_2196	378	126	Hypothetical protein ARZXY2_4076	142	3.0e-41	82	AOY73576	<i>Arthrobacter</i> sp. ZXY-2
PD653_2197	6069	2023	DNA primase	2971	0.0e+00	76	WP_057294205	<i>Nocardioides</i> sp. Soil796
PD653_2198	1233	411	DNA polymerase V	439	1.0e-149	59	SDL33667	<i>Nocardioides</i> sp. YR527
PD653_2199	414	138	DNA polymerase V	97.1	4.0e-23	45	KXS38722	<i>Halomonadaceae bacterium</i> T82-2

PD653_2200	483	161	Hypothetical protein	268	2.0e-90	83	WP_011751413	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_2201	756	252	Hypothetical protein	290	3.0e-96	59	WP_057294213	<i>Nocardioides</i> sp. Soil796
PD653_2202	756	252	Chromosomal replication initiator DnaA	300	3.0e-100	67	WP_056689293	<i>Nocardioides</i> sp. Root140
PD653_2203	723	241	Hypothetical protein	363	2.0e-125	77	WP_011751416	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_2204	1491	497	Membrane protein	867	0.0e+00	87	WP_011776835	<i>Paenarthrobacter aurescens</i>
PD653_2205	465	155	Hypothetical protein	191	2.0e-59	63	WP_067431475	<i>Nocardioides jensenii</i>
PD653_2206	708	236	Hypothetical protein	223	2.0e-70	62	WP_056689283	<i>Nocardioides</i> sp. Root140
PD653_2207	2739	913	Transglycosylase	1288	0.0	72	WP_067431470	<i>Nocardioides jensenii</i>
PD653_2208	483	161	ATP-binding protein	291	1.0e-94	90	WP_067431563	<i>Nocardioides jensenii</i>
PD653_2209	822	274	Hypothetical protein	256	4.0e-81	58	WP_076180369	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
PD653_2210	207	69						
PD653_2211	153	51	Hypothetical protein SAMN05421872_102369	44.7	6.0e-05	49	SDC47105	<i>Nocardioides lianchengensis</i>
PD653_2212	297	99	Hypothetical protein SAMN05421872_101566	58.9	3.0e-09	38	SDC21565	<i>Nocardioides lianchengensis</i>
PD653_2213	297	99	DUF3263 domain-containing protein	127	3.0e-36	70	WP_062101763	<i>Cellulomonas</i> sp. B6

データベース上で相同性を示すタンパク質が検出されなかったものは空欄

(3) 塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

ORF1 と ORF2 の 177 mer の遺伝子間領域に短い ORF (ORF2a) が存在し、この ORF2a の終止コドンと、下流の ORF2 の開始コドンがオーバーラップしていた。同様に、ORF2 の終止コドンは ORF3 の開始コドンとオーバーラップしていた。リボソーム結合部位と推定される GAAGAA ヘキサマーまたは GGAAAG ヘキサマーがそれぞれ ORF2 の 10 bp 上流、ORF3 の 15 bp 上流に見出された。*Streptomyces glaucescens* 由来のものと類似した GCTGGC ヘキサマーが ORF2 の 35 bp 上流または ORF3 の 48 bp 上流に保存されていることから、プロモーター配列であることが推定される (Strohl 1992, Vögtli and Hütter, 1987, Fig. 1-3a)。

ORF1 から推定されるアミノ酸配列は、*Arthrobacter* sp. KW 株において endosulfan と endosulfan-sulfate の分解代謝系に関与する single monooxygenase (Ese) と 49% の相同性を示した (Weir *et al.*, 2006)。Ese は TC-FDM family に属する。ORF1 の推定アミノ酸配列を基に 2 次構造を予測したところ、それらは既存の立体構造が明らかとなっている flavin-dependent monooxygenase と非常に類似した構成を示した (Fig. 1-4)。

ORF2 の推定アミノ酸配列は *Mesorhizobium* sp. BNC1 株より同定された EDTA 分解代謝系に関与する NADH:flavin mononucleotide oxidoreductase (EmoB) と 37% の相同性を示した (Bohuslavsek *et al.*, 2001)。ORF2 の推定アミノ酸配列の N 末端側には flavin binding motif が検出された (Fig. 1-5)。

ORF3 の推定アミノ酸配列は flavin reductase-like domain (smart00903) を有することが blastp で分かった。ORF1 と同様に、ORF3 の遺伝子産物の 2 次構造を予測したところ、 β 4 strand を除き、既知の flavin reductase とほぼ一致した構成であることが分かった (Fig. 1-6)。

(4) *hcbA* 遺伝子群のオペロン構造

HCB に暴露した PD653 から抽出した total RNA を鋳型として、遺伝子間領域 ORF1-ORF2 (I) および ORF2-ORF3 (II) を標的とした RT-PCR で解析した結果、いずれの領域も目的サイズのバンドが増幅され、シーケンス解析によって目的の塩基配列であったことから、3 つの遺伝子はオペロンを形成することが明らかとなった (Fig. 1-3b)。

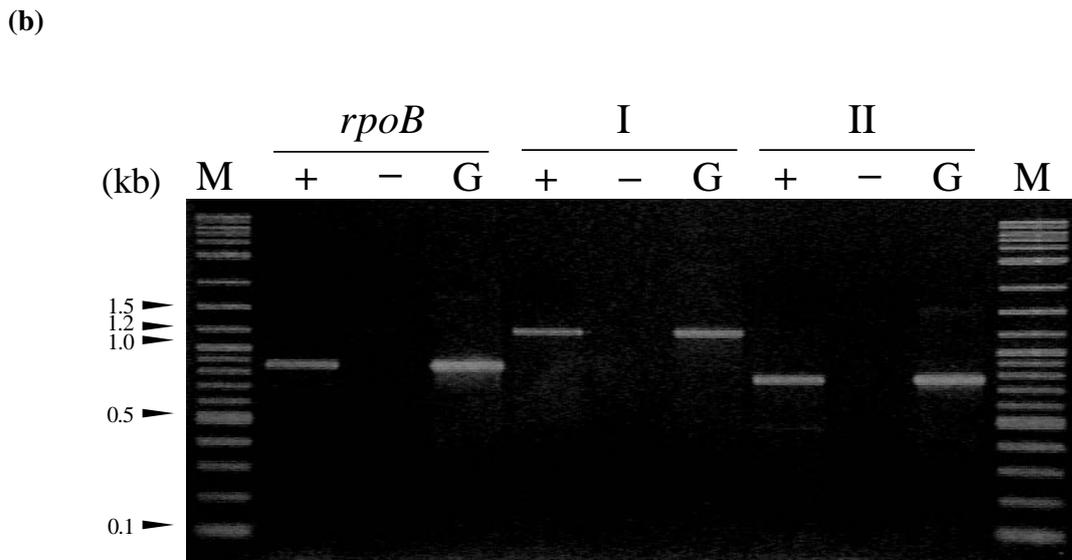
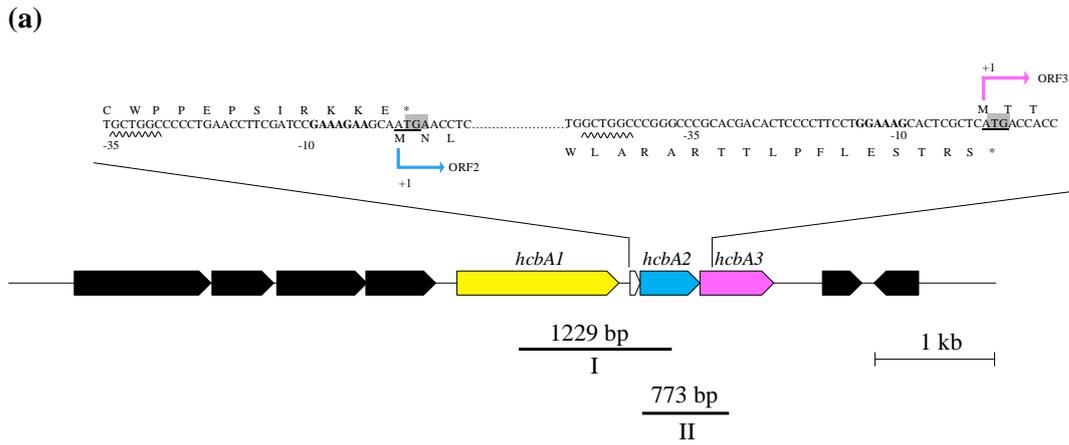


Fig. 1-3 候補遺伝子の構造遺伝子と転写.

(a) HCB 脱塩素反応に関わる候補遺伝子、遺伝子間領域および推定リボソーム結合部位を示した模式図. 開始コドン (ATG または GTG) は下線、終止コドン (TGA) は網掛け、推定リボソーム結合部位を太字でそれぞれ示した。候補遺伝子 ORF1、ORF2、ORF3 および小さな ORF2a をそれぞれ黄色 (*hcbA1*)、空色 (*hcbA2*)、赤紫 (*hcbA3*)、白の矢印で示した。

(b) 候補遺伝子群 (*hcbA1A2A3*) のポリシストロニックな転写様式. 2 つの遺伝子間領域 (I と II) を RT-PCR で解析した。No-RT control および genomic DNA を鋳型とした PCR 産物をそれぞれネガティブ、ポジティブコントロールとして “-”、“G” レーンに示した。HCB を暴露して 3 時間後の PD653 から抽出し、合成した cDNA を鋳型とした増幅産物を “+” レーンで示した。

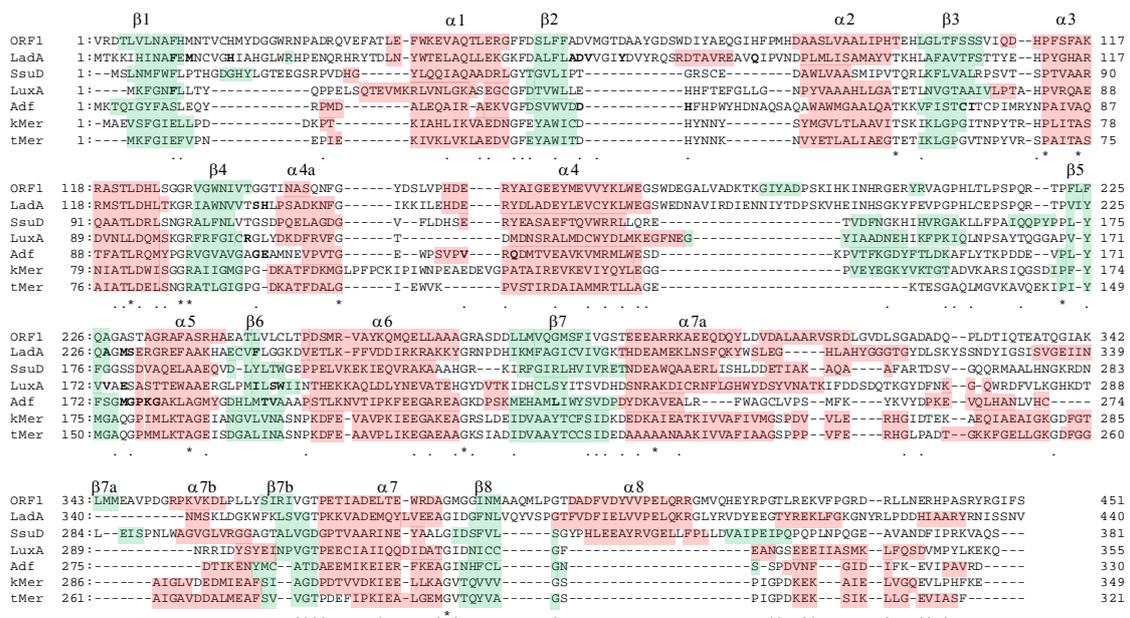


Fig. 1-4 ORF1 の推定アミノ酸配列と他の flavin-dependent monooxygenase との比較。

2次構造のうち β -sheet と α -helices を形成する領域をそれぞれ緑、赤で示した。以下、アライメントに用いた蛋白質の名称および accession number を示す; ORF1 = *Nocardioideis* sp. PD653 の hexachlorobenzene oxidative dehalogenase、LadA = *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 株の long-chain alkane monooxygenase (gi 165761309) (Feng *et al.*, 2007、Li *et al.*, 2008)、SsuD = *Escherichia coli* の alkanesulfonate monooxygenase (gi 2507139) (Eichhorn *et al.*, 2002)、LuxA = *Vibrio harveyi* の alkanal monooxygenase (gi 126509) (Fisher *et al.*, 1996)、Adf = *Methanobacterium thermophilus* の F₄₂₀-dependent secondary alcohol dehydrogenase (gi 47168785) (Aufhammer *et al.*, 2004)、kMer = *Methanobacterium kandleri* の coenzyme F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase (gi 126509) (Shima *et al.*, 2000)、tMer = *Methanobacterium thermoautotrophicum* の coenzyme F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from (gi 13787050) (Shima *et al.*, 2000)。共通のアミノ酸残基および一致の割合が 50%を超えているアミノ酸残基はそれぞれ、アスタリスクとドットで示した。補酵素の結合に関与するアミノ酸残基は太字で示した。

ORF2	1	-----MNLVTVGNPKPSSPTAAAEMLAHRIV--APAGHTVFAVEADLGGQLEHNSFAVTEKERVKARLLIVASPEE	76
G. bronchialis NFR	1	-----MRTTILGNPKPSSPTTAGIDWATALE--ETAPDDVI--DWITLGGSLGKDFEGVAAAVSIVKRSPEHIVASPEE	73
R. jostii FR	1	MVWIAVIRRVVSRPLPSPCSIRPEPPSALGWRGRHARGDEAMKVTIVVAGSNPKPSSPTDRAGLWATAVT--GAAADSTV--DWITLGGSLGKDFDAVAAAVTVASSPQVIVASPEE	114
R. sp. FR	1	-----MAGSNPKPSSPTDRAARVLAATAE--GEPGG-TV--DWITLGGSLGKDFDAVQAAAVTVSSSPQVIVASPEE	67
N. sp. Root190 FR	1	-----MTAGPRTAVVGNPKPSSPTTAAALHVRRLV--GKEDLVV--DIATLGGSLGKDFDTIDDLVTVGCHADVVVAVASPEE	77
F. sp. BCU110501 FR	1	-----MSQCRILSVGNPKPSSPTAAVAEAAVQVVALPPGTAVAEVIWSEELGGSLGKDFDAVKAAVTAMKSAVLLVIVASPEE	82
M. sp. JS623 NFR	1	-----VVVGNPKPSSPTAAAEVLTEKLT--GVAPQHVII--DWVDLGGSLGKDFDAEAKAIVKAASLIVASPEE	70
ORF2	77	KAVVTGELKLELDQFSAGE-IGGITTFDMLLGAAPGHTLAARLTKKPVLEIGCSGDFPALYLLLSAY-DAEDALEGLARARTLPPLESTRS-----	168
G. bronchialis NFR	74	KAVVTGELKLELDQFETSTGLTGVAVPLMLGAAPGSAAPBEVVRPLDGLGATTPAGQLYLDATA-ADPESYLPWIERWRGAILG-----	160
R. jostii FR	115	KASVTGELKLELDQFATDGLKDVVVPLMLGAGPAPAMAPDLPKPKHVLVEICATAPAGLYLDSTY-TTDSRITDYAERWGSLLTAAARTTELS----	210
R. sp. FR	68	KAVVTGELKLELDQFAGDTGLKNVAVPLMLGAGPAPAMAPDLPKPKHVLVEICAVTPAGQLYLDSTY-TTDSRITDYAERWGSLLTAAARTTELS----	163
N. sp. Root190 FR	78	KAVVTGELKLELDQFAAGQ-LSGV-AVPLMLGGPGSILABEHLVPLAHLCVAVPAGLYLDKEY-DDPAAYAGWLERALPIVTRLVTSAA-----	168
F. sp. BCU110501 FR	83	KAVVTGELKLELDQIGQGE-LAGVPTFDVLVAGAPBEALALEVHREPLVETCASGDFRQVFLVSTLADLPAQLDAWAAGNIAAVTALAAAGAAPQLG	182
M. sp. JS623 NFR	71	KAVVTGELKLELDQFSAGE-LAQITTFDMLLGGSYTALAPBLTKRPVLEIGCSGDFPALYLLLSAY-ETSEDLEKMLTVARRFVPAVSS-----	159

Fig. 1-5 ORF2 の推定アミノ酸配列と他の flavin-dependent reductase との比較。

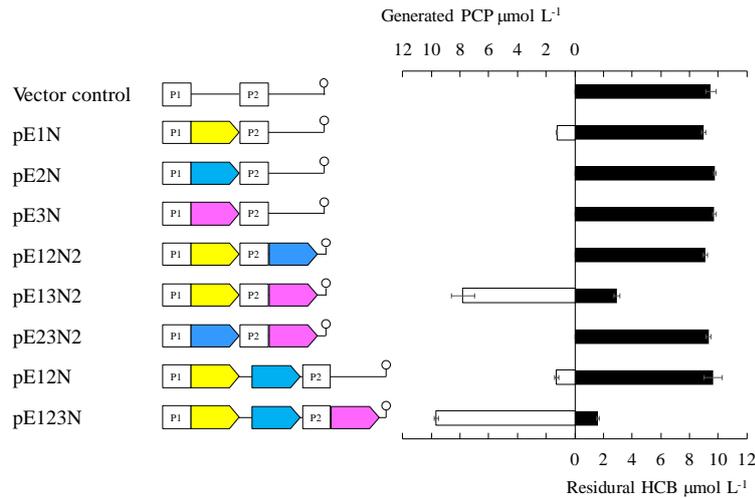
以下、アライメントに用いた蛋白質と、accession number を示す; HcbA2 = *Nocardiooides* sp. PD653 の putative flavin reductase、GNFR = *Geobacillus bronchialis* DSM 43247 の NADPH-dependent FMN reductase (CP001802)、RjFR = *Rhodococcus jostii* RHA1 の probable FMN reductase (CP000431)、RFR = *Rhodococcus jostii* sp. B7740 の FMN reductase from (CP010797)、NFR *Nocardiooides* sp. Root190 の NADPH-dependent FMN reductase (WP_056750166)、FFR = *Frankia* sp. BCU110501 の FMN reductase from (WP_018500322)、MNFR = *Mycobacterim* sp. JS623 の NADPH-dependent FMN reductase (WP_015308976)。共通のアミノ酸残基および一致の割合が 50%を超えているアミノ酸残基はそれぞれ、黒、灰色で示した。

(5) 組換え大腸菌による HCB 分解試験

候補遺伝子 ORF1、ORF2、ORF3 を導入した *E. coli* BL21 (DE3)により、初期濃度 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ の HCB が 12 時間で分解するかを調べた (Fig. 1-7a)。まず、ORF1、ORF2、ORF3 をそれぞれ独立して導入した組換え大腸菌の HCB 分解活性を比較したところ、*E. coli* BL21 (DE3)/pE1N (MCS1 に ORF1 を挿入) が 3.9%の分解率を示し、pE2N (MCS1 に ORF2 を挿入) または pE3N (MCS1 に ORF3 を挿入) を保持する大腸菌は全く分解活性を示さなかった。次に、2つの ORF を導入した大腸菌で活性を比較したところ、*E. coli* BL21 (DE3)/pE13N2 (MCS1 に ORF1、MCS2 に ORF3 を挿入) が 68.7%の分解活性を示したが、他の組み合わせでは分解活性が認められなかった。最も高い分解率を示したのは *E. coli* BL21 (DE3)/pE123N (ORF1 と ORF2 を MCS1、ORF3 を MCS2 に挿入)であり、83.0%だった。

HPLC 分析で HCB 分解活性が認められた *E. coli* BL21 (DE3)/pE123N のサンプルから、代謝物と考えられる未知ピークが検出された (Fig. 1-7b)。このピークはリテンションタイムとマススペクトルが PCP と一致し (Fig. 1-7c)、定量した結果、HCB の減少に伴って化学量論的に等量の PCP が蓄積していることが確認されたことから (Fig. 1-7d 上図)、Fig. 1-7a に示した通り、HCB が脱塩素され PCP へ変換されていることが明らかとなった。本実験における *E. coli* BL21 (DE3)/pE123N の菌体乾重は 0.8 g であり、6 時間以内に HCB $6.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ を分解したことから、菌体乾重あたりの分解速度は $1.44 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。

(a)



(b)

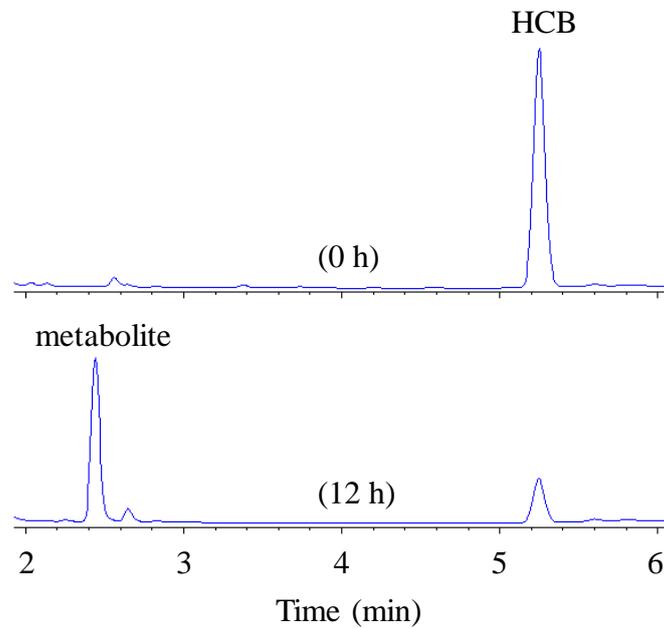
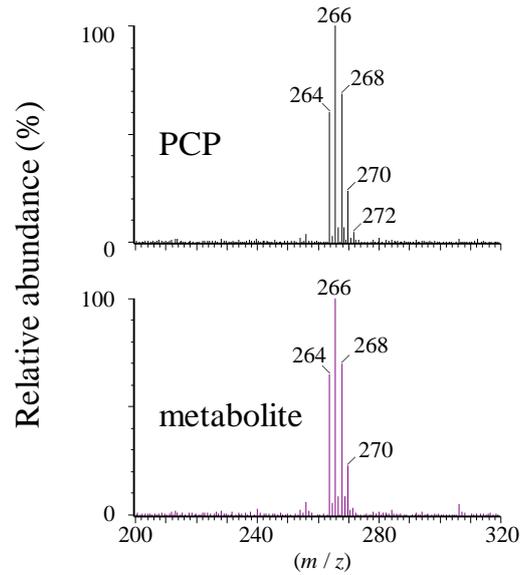


Fig. 1-7 組換え大腸菌による HCB の分解.

(a) 各発現ベクターを導入した組換え大腸菌の HCB 分解活性の比較。培地中の HCB、PCP 濃度をそれぞれ黒、白のバーで示す。エラーバーは 3 連のサンプル間の誤差範囲を示す。各コンストラクトの構成は、ORF1、ORF2、ORF3 をそれぞれ黄、青、赤紫で示した。Stem-loop を模した記号はターミネーターの位置を示す。P1、P2 はそれぞれ T7 promoter-1 と T7 promoter-2 を示す。(b) *E. coli* BL21 (DE3)/pE123N の 0、12 時間におけるサンプルの HPLC クロマトグラム。

(c)



(d)

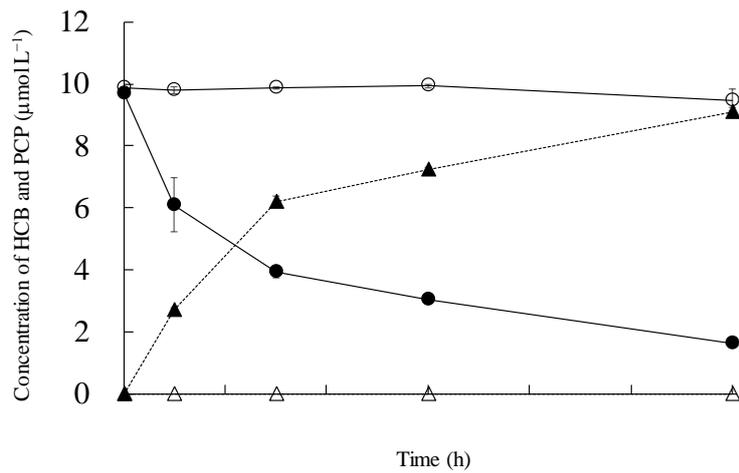


Fig. 1-7 組換え大腸菌による HCB の分解.

(c) PCP の UPLC-MS スペクトラム。上段; PCP 標準品、下段; HCB 分解代謝物。(d) HCB (●)の分解と PCP の生成 (▲) およびベクターコントロールにおける HCB (○)、PCP (△) 濃度の推移。各濃度は 3 連のサンプルの平均を表し、エラーバーは誤差を示す。

(6) 酸素分子が HCB 分解活性に及ぼす影響

HCB 脱塩素活性は酸素濃度によって大きく影響を受けることが分かった (Fig. 1-8)。低酸素濃度条件下では HCB の分解と PCP の生成が見られなかったが、グローブボックス内を大気で置換し、酸素を導入することで活性が復帰した。以上の結果より ORF1、ORF2、ORF3 が初発 HCB 脱塩素反応に関与する遺伝子であることが推察されたので、それぞれ *hcbA1*、*hcbA2*、*hcbA3* と命名した。

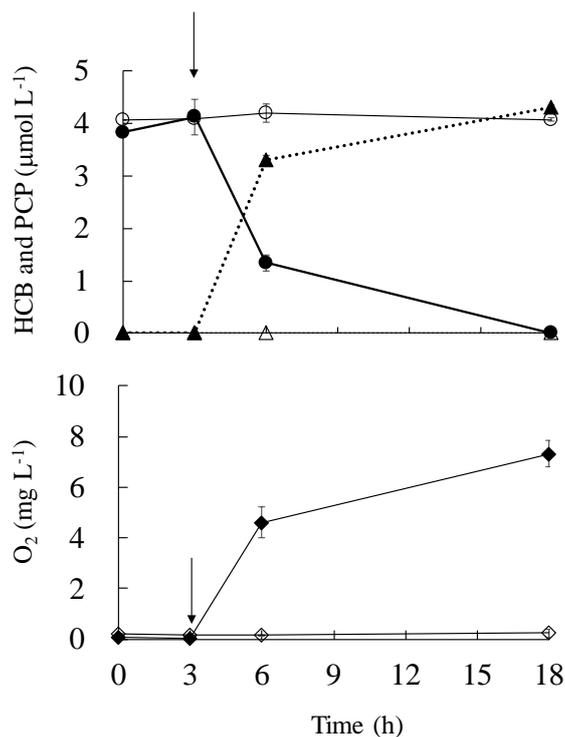


Fig. 1-8 酸素濃度が組換え大腸菌による HCB 分解活性に及ぼす影響.

上図; 低酸素濃度条件下における HCB の分解 (●)と PCP の生成 (▲)。矢印で示した時点でグローブボックス内の N_2 ガスを大気に置換し、酸素を再導入した。下図; 本実験系における酸素濃度の推移。酸素を再導入した実験区 (◆)と、低酸素濃度条件を維持した対照区 (◇) における酸素濃度を示した。

104. 考察

PD653-B2 は PD653 の分解代謝能と比較して、HCB 脱塩素分解能に欠陥がある一方で、PCP 以降の代謝能を維持していることが明らかとなった (Takagi *et al.*, 2007)。このことから、PD653 から PD653-B2 へ派生する間に、HCB の脱塩素反応に関わる遺伝子が欠損したことが示唆された。比較ゲノム解析によって PD653 に保存され、PD653-B2 には存在しないと推測できる約 72-kb の領域 (Fig. 1-2a、アスタリスクで示した領域) が検出された。この対象領域に PD653-B2 の raw read が完全にマッピングされたことからミスアセンブルの可能性が疑われたものの、PCR による塩基配列の確認によって、Miseq から得られたゲノム構造の妥当性が示された。

hcbA 遺伝子群をクローニングした組換え大腸菌による分解試験では HCB を PCP へ変換する反応が確認できた。CYP101 変異体遺伝子を含む遺伝子カセット (*camA*⁺ *camB*⁺ *camC*) を導入した *Spingobium chlorophenolicum* ATCC 32723 による HCB 分解速度は、菌体乾重で 0.67 nmol mg⁻¹ h⁻¹ だったことに対し (Yan *et al.*, 2006)、本研究で作製した *E. coli* BL21 (DE3)/pE123N ではおよそ 2 倍の速度を示した。HcbA1、HcbA2、HcbA3 の推定アミノ酸配列は、Yan らが用いた遺伝子カセットにコードされたタンパク質と全く相同性を示さなかった。

hcbA 遺伝子群が PD653-B2 で欠損していることから、この遺伝子群は HCB の分解代謝系において重要な役割を担っていることが示唆されるが、野生株の表現型が *hcbA* 遺伝子群と直結しているかどうかは遺伝子破壊株および変異復帰株による検証が必要である。

hcbA 遺伝子群はいずれもフラビンタンパク質をコードすることが示された。フラビンタンパク質は天然化合物および人為起源物質の分解代謝の他に、ホルモン、ビタミン、抗生物質の生合成系など、様々な生体反応に関与することが知られている (Ghisla and Massey, 1989)。低酸素濃度条件下における HCB 分解試験の結果から、*hcbA1* は monooxygenase をコードする可能性が大きい (Fig. 1-8)。HcbA1 の分類は luciferase-like domain (IPR011251) を有することから、我々は Huijbersa らの定義により、group C の flavin-dependent monooxygenase が妥当である (Huijbersa *et al.*, 2014)。Luciferase-like domain は様々な細菌由来の bacterial luciferase family に属するタンパク質から発見されており、*Geobacillus thermodenitrificans* MG80-2 の LadA (Feng *et al.*, 2007、Li *et al.*, 2008)、*E. coli* の SsuD (Eichhorn *et al.*, 2002)、*Vibrio harveyi* の LuxA (Fisher *et al.*, 1996)、メタン生古細菌の Adf (Aufhammer *et al.*, 2004)、kMer および tMer (Shima *et al.*, 2000) などで保

存されている。このドメインはそれぞれ8つの α -helix と β -strand によって TIM-barrel fold と呼ばれる特徴的な 3 次構造を形成する (Fig. 1-9)。Luciferase-like domain を有する flavin-dependent monooxygenase は様々な生体反応を触媒する一方で (Table 1-8)、一次構造の類似性は低い、bacterial luciferase と非蛍光性のフラビンタンパク質とで類似した立体構造を持ち、同一のファミリーを構成する (Feng *et al.*, 2007、Li *et al.*, 2008、Eichhorn *et al.*, 2002、Fisher *et al.*, 1996、Aufhammer *et al.*, 2004、Shima *et al.*, 2000)。HcbA1 の推定 2 次構造は他の TIM-barrel fold タンパク質の 2 次構造とほぼ一致することから、類似の 3 次構造を形成することが予測される (Fig. 1-4)。

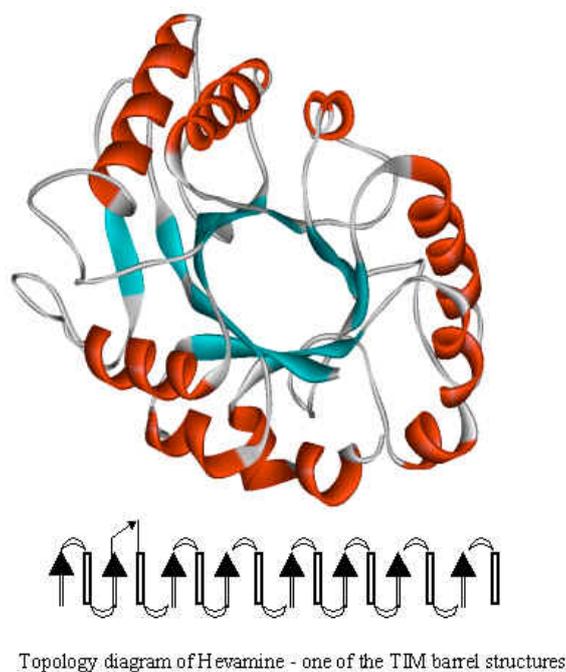


Fig. 1-9 TIM-barrel fold の 2 次構造および 3 次構造.

2 次構造ではそれぞれ 8 つの β -strand と α -helix が交互に分布する。

Table 1-8 Luciferase-like domain をもつ flavin-dependent monooxygenase が触媒する反応

Monooxygenase	Reaction	Reference
LuxA/B or bacterial luciferase	長鎖アルカンの酸化に伴う生物発光	Fisher <i>et al.</i> , 1996
SsuD	Alkanesulfonate の脱スルホン化	Eichhorn <i>et al.</i> , 2002
TmoA	Thibencarb の水酸基付加	Chu <i>et al.</i> , 2017
Adf	第二級アルコールの脱プロトン化	Aufhammer <i>et al.</i> , 2004
kMer, tMer	Methyltetrahydromethanopterin の還元	Shima <i>et al.</i> , 2000
Ese	Endosulfan sulfate の分解	Weir <i>et al.</i> , 2006
LadA	長鎖アルカンの酸化	Li <i>et al.</i> , 2008

hcbA3 は *HcbA1* と関連する flavin reductase component をコードすることが推察される。*HcbA3* の推定アミノ酸配列からは TftC (Xun 1996)、PheA2 (Duffner and Mueller, 1998) および HpaC (Prietto *et al.*, 1993) といった TC-FDM ファミリーに属する flavin-reductase コンポーネントで共通して保存されるドメインが検出された。このドメインを保有するタンパク質は NAD(P)H 依存的なフラビンの還元反応を触媒し、monooxygenase に還元型フラビンを供給する (Gisi and Xun, 2003、Xun, 1996、Duffner and Mueller, 1998、Prietto *et al.*, 1993、Krichner *et al.*, 2003、Galán *et al.*, 2000)。組換え大腸菌による *hcbA1* と *hcbA3* の共発現系の結果と 2 次構造の構成から、*HcbA3* は TC-FDM と類似の 3 次構造を示し、flavin reductase として機能し、*HcbA1* と協調して、フラビンを補因子とした two-component の HCB 脱塩素分解代謝系を構成すると考えられる。

hcbA3 と *hcbA2* は、*hcbA3* の上流がわずかに 3 塩基重複しており、translational coupling による制御が起きていることが示唆された (Fig. 1-3a) (Spanjaard and van Duin, 1989、Sprengel *et al.*, 1985、Adhin and van Duin, 1990、Yoo and RajBhandary, 2008)。このような遺伝子構造は長鎖 *n*-alkane (Whyte *et al.*, 2002)、thiobarbamate (Nagy *et al.*, 1995)、vinyl chloride および ethene (Mattes *et al.*, 2005) を分解するグラム陽性細菌でも報告されている。本研究では *HcbA2* の機能を特定することができなかったが、*hcbA2* が *hcbA* オペロンの一部であり (Fig. 1-3b)、リーディングフレームが *hcbA3* と重複している点から (Fig. 1-3a)、PD653 の菌体内で HCB 分解代謝系の一部を担っているのではないかと推測している。この仮説を明らかとするため、*hcbA* 遺伝子群の遺伝子産物について、タンパク質間相互作用の解析や生化学的解析が求められる。

結論として、好気条件下で HCB と PCNB を PCP へ変換する酵素をコードする *hcbA* オペロンが PD653 のゲノムから発見された。

第二章

PCP 分解酵素遺伝子群の単離・同定

2□1. 緒言

序章で述べた通り、好気性細菌による PCP 分解メカニズムは *sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 由来 *pcp* 遺伝子群が詳細に研究されているが、このメカニズムによって PCP 代謝を行っているのは近縁の *sphingomonad* と呼ばれる細菌であり、PCP 分解菌自体は *sphingomonad* 以外にも多くの種・属が知られているが、それらが *pcp* 遺伝子群依存的な分解代謝系を保持しているかは明らかではない。特にグラム陽性細菌では全く異なる分解代謝系が存在しているのではないかと予測されている。

第一章では PD653 のドラフトゲノムを取得し、*pcp* 遺伝子群のオーソログの検出を試みたものの、そういった遺伝子は存在しなかった。一方で、既知のポリ塩化フェノールの代謝遺伝子のオーソログがいくつか存在することが分かった。PCP 代謝遺伝子を探索する上でこれらのオーソログは有力な候補遺伝子となるが、PD653 が全く予想外の遺伝子を使って PCP 分解代謝を行っている可能性も破棄できない。そこで、本章では RNA-seq による網羅的な遺伝子探索と、組換え大腸菌による異種間発現による活性評価によって、PCP 分解代謝遺伝子の単離・同定を試みた。

2□2. 材料および方法

(1) 菌株・プラスミドおよび培地

HCB は Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)、PCP と DiCH は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。TeCH と TCBQ は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。Mineral salts medium (MM) と Pre-culture medium は前章と同様に調整した (Ito et al. 2017)。大腸菌の培地は Luria-Bertani (LB) を用いた。本研究で使用した菌株とプラスミドを Table 2-1 に示す。*E. coli* DH5 α (TOYOBO, Osaka, Japan) と BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) は pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)、pACYCDuet-1 (Novagen) およびそれらから派生した plasmid の宿主として用いた。

(2) RNA の取り扱い

Total RNA の抽出は前章、1□2(11) にて記述した方法と同様に行った。簡単に述べると、凍結した菌体ペレットを 5 mg L^{-1} lysozyme で 37°C 、5分振とうしながらインキュベートし、その後ガラスビーズと $500 \mu\text{L}$ Sepasol-RNA I (Nacalai tesque) の入ったチューブ内で破碎する。破碎後に新たな $500 \mu\text{L}$ Sepasol-RNA I を添加し、それ以降は製造元のプロトコールに従った。残存する DNA を DNase 処理によって除去し、1% native agarose gel によって RNA が分解していないかを確認した。Total RNA の純度・濃度は ND-8000 (Nano Drop; Thermo Fisher) で確認した。

Table 2-1 本章で用いた株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or origin
Strains		
<i>Nocardiooides</i> sp. PD653	HCB ⁺	13
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , f, f80dlacZDM15, D(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TOYOBO
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _{B(T_B⁻ m_B⁻) <i>gal dcm</i> λ(DE3); T7 RNA polymerase gene under the control of the <i>lacUV</i> promoter}	Novagen
Plasmids		
pGEM-T easy	Ap ^r <i>lacZ</i> , pMB1-derived replicon, TA cloning vector	Promega
pGEM-T easy/1112-1114	Ap ^r , pGEM-T easy with 2.9-kb PCR-amplified DNA fragment containing ORF1, ORF2 and ORF3 of PD653	This study
pACYCDuet-1	Cm ^r pACYC184-derived p15A replicon, T7 promoter, two MCS, expression vector	Novagen
pA1B-2B	Cm ^r , pA1B with PCR-amplified DNA fragment of ORF2 in MCS2	This study
pA1B-3B	Cm ^r , pA1B with PCR-amplified DNA fragment of ORF3 in MCS2	This study
pA2B-3B	Cm ^r , pA2B with PCR-amplified DNA fragment of ORF3 in MCS2	This study
pA1B	Cm ^r , pACYCDuet-1 with PCR-amplified DNA fragment of ORF1 in MCS1	This study
pA2B	Cm ^r , pACYCDuet-1 with PCR-amplified DNA fragment of ORF2 in MCS1	This study
pA3B	Cm ^r , pACYCDuet-1 with PCR-amplified DNA fragment of ORF3 in MCS1	This study

^a HCB⁺, HCB 分解能あり; Ap^r, ampicillin 耐性; Cm^r, chloramphenicol 耐性.

(3) RNA-seq

PD653 における PCP 代謝遺伝子を網羅的に探索する目的で RNA-seq による transcriptome 解析を行った。PD653 の HCB 代謝経路では初発の脱塩素反応により PCP を生成すること (Takagi *et al*, 2009) と、HCB によって PCP 代謝遺伝子群が誘導される可能性があるため、HCB を初期基質としてレスティングセル試験を行った。培養後の細胞を 6,000 ×g、4°C、10 分で集菌し、MM 培地で菌体洗浄をした後、同じ培地に懸濁したものをレスティングセルとして調整した。レスティングセルの懸濁液 10 mL (OD₆₀₀ = 1.0) を 50 mL glass-stopped Erlenmeyer flask へ分注し、アセトンで調製した HCB 2000 ppm ストック溶液を 50 μL 添加し、10 mg L⁻¹ (35.11 μmol L⁻¹) に調整した。レスティングセルにアセトン 50 μL のみを添加し、HCB を含まないもの対照区として設置した。フラスコは rotary shaker にて 30°C、180 rpm で培養した。HCB 添加後 8h の菌体を 19,000 ×g、4°C、5 分でペレット化し、液体窒素で凍結させ、使用するまで -80°C で保管した。

凍結したペレットより total RNA を抽出し、RiboZero bacteria kit (Illumina KK, Tokyo, Japan) 使用し、製造元のプロトコールに従ってリボソーム RNA を除去することで mRNA を精製した。次に、精製した mRNA を鋳型とした mRNA ライブラリーを作製するため、NEBNext prep kit for Illumina (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を使用した。プロトコールを変更して、逆転写反応にランダムヘキサマーを用いた。2 度の合成反応後、Covaris S2 sonication system (Covaris, Woburn, CA, USA) を使用して 2 本鎖 cDNA を平均 300 bp に断片化した。この断片を用い、HiSeq2500 system で 100 サイクルのペアエンドシーケンスを行った (Illumina)。操作手順はメーカーの仕様書に従った。シーケンス反応終了後、raw data を Illumina analysis pipeline (CASAVA 1.8.0) を用いて解析した。取得された RNA-seq リードは CLC Genomics Workbench ver. 9.5. を使用し、以下に示すパラメーターでトリミングした; Phred quality score >30, terminal 15 nucleotides from 5' end and 2 nucleotides from 3' end were removed as well as truncated reads of less than 30 nucleotides length. トリミングした read は CLC Genomics Workbench ver. 9.5. (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用し、PD653 のドラフトゲノム (accession number: BDJG01000001-BDJG01000087) へマッピングした。以下にパラメーターを示す; length fraction = 0.7; similarity fraction = 0.9; maximum number of hits for a read = 1.

各遺伝子の発現レベルは、それぞれの遺伝子にマッピングしたリードを定量し、reads per kilobase million (RPKM) へ補正することによって算出した。本実験で取得した original sequence read は DDBJ の DRA/SRA データベース上で公開した (accession number

PRJDB6176)。

(4) 塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

本研究で同定した PCP 4-monooxygenase と reductase component の推定アミノ酸配列は BLAST によって他のバクテリア由来の遺伝子と比較を行った。推定アミノ酸配列のアライメントは DDBJ の ClustalW program を用いて行った (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>)。

(5) 組換え大腸菌による新規 PCP 分解酵素遺伝子の発現系構築

新規 PCP 分解酵素発現用プラスミドの構築に用いたプライマー配列を Table 2-2 に示す。ORF1 を導入した pA1B はそれぞれ hcbB1_NcoI_F と hcbB1_NcoI_R のプライマーセットを用いて増幅した PCR 産物を pACYCDuet-1 の MCS1 (NcoI-site) へ In-fusion cloning (Clontech, Japan) によって挿入することで構築した。

ORF2 を導入した pA2B および ORF3 を導入した pA3B はそれぞれ hcbB2_NcoI_F と hcbB2_NcoI_R のプライマーセットまたは hcbB3_NcoI_F と hcbB3_NcoI_R のプライマーセットを用いて、pA1B と類似の行程で作成した

pACYCDuet-1 の MCS1 に ORF1, MCS2 に ORF2 を導入した pA1B-2B を構築するため、ORF2 を hcbB2_NdeI_F と hcbB2_XhoI_R プライマーセットを用いて増幅した。増幅した ORF2 を含む PCR 産物を In-fusion cloning によって pA1B の MCS2 (NdeI-XhoI site) へ挿入した。pA1B-3B (ORF1 at MCS1 and ORF2 at MCS2) を構築するため、hcbB3_NdeI_F と hcbB3_XhoI_R プライマーセットを用いて増幅した ORF3 を含む PCR 産物を pA1B の MCS2 (NdeI-XhoI site) へ導入した。pA2B-3B (ORF2 at MCS1 and ORF3 at MCS2) を構築するため、hcbB3_NdeI_F と hcbB3_KpnI_R プライマーセットを用いて増幅した ORF3 を含む PCR 産物を pA2B の MCS2 (NdeI-XhoI site) へ導入した。

構築したプラスミドはシーケンス解析によって目的の配列であることを確認し、*E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換した。発現ベクターを保持する大腸菌を $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol の LB 培地へ接種し、 37°C 、210rpm で終夜培養した。終夜培養液を $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol、IPTG 0.25 mmol L^{-1} に調整した新しい LB 培地へ $\text{OD}_{600} = 0.6$ となるよう接種し、 37°C 、210 rpm で 4 h 誘導を行った。

Table 2-2 本章で使用したプライマー。

Specific primers used for amplification of candidate genes involved in degradation of PCP		Reference
hcbB1_NcoI_F	AGGAGATATAACCATGAACGAGGCAGAGCACAAAG	This study
hcbB1_NcoI_R	TGGCTGCTGCCCATGTCATGACTTTCCGTAAACCC	This study
hcbB2_NcoI_F	TGGCTGCTGCCCATGCTAATTGGCCCACGACGG	This study
hcbB2_NcoI_R	AGGAGATATAACCATGACCTCCATGTCGTCCGTC	This study
hcbB2_NdeI_F	AAGGAGATATACATATGACCTCCATGTCGTCCG	This study
hcbB2_XhoI_R	CTTTACCAGACTCGACTAATTGGCCCACGACGG	This study
hcbB3_NcoI_F	AGGAGATATAACCATGATGATCCGGACCGGGGAA	This study
hcbB3_NcoI_R	TGGCTGCTGCCCATGCTAACGCGCTGCGGCGGA	This study
hcbB3_NdeI_F	AAGGAGATATACATATGATCCGGACCGGGGAAC	This study
hcbB3_XhoI_R	CTTTACCAGACTCGACTAACGCGCTGCGGCGGA	This study
hcbB3_KpnI_R	TTACCAGACTCGAGGCTAACGCGCTGCGGCGGA	This study
RT-PCR and RT-qPCR primers		
hcbB1_RT_F	ACGTGGTCTACGCCTTTGAC	This study
hcbB2_RT_F	TCTTGGACAGCTACCACGTATG	This study
hcbB2_RT_R	CACGAAAGCTACTTGTTCTCCC	This study
hcbB3_q_F	GAGCTTCAGGATCTGATGACCT	This study
hcbB3_q_R	CCGTCGAACTTCCTGATGAT	This study
rpoB_q_F2	CTGATCGGCAACGAGAAGTGG	This study
rpoB_q_R2	TGAACTCCGCGGAGACGTAG	This study
rpoB_q_F	AGATCTCCGAACCACTCGAA	Ito <i>et al.</i> , 2017
rpoB_q_R	TGTTGATCTTGTAGCGACCG	Ito <i>et al.</i> , 2017

(6) 組換え大腸菌による PCP 分解

洗浄後の IPTG 誘導大腸菌細胞を 1 mL の MM に懸濁し、PCP を $9.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ に調製した MM 4 mL を含む 50 mL 共栓付き三角フラスコへ接種した。初期 OD_{600} は 3.0 だった (菌体乾重量 = 1.17 g L^{-1})。サンプルは 37°C 、210rpm、4 h で培養後、10 mL acetonitrile を混合し、上清を HPLC で測定した。試験は 3 連で行った。

(7) PCP 分解代謝における中間産物 TeCH の検出

IPTG で 4 h 誘導した BL21 (DE3) / pA1B-3B の培養液 20 mL を $1,600 \times g$ 、 4°C 、10 分で集菌し、5 mL Tris-HCl buffer (pH 7.5) に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎装置 (VP-300N, TAITEC, Saitama, Japan) を用いて $20 \text{ s} \times 6$ 回 (20 s インターバル)、氷上にて破碎し、 $10,000 \times g$ 、 4°C 、30 分で遠心分離した。この操作により取得した上清を可溶性画分とし、50 mL 共栓付き三角フラスコへ 5 mL 分注し、PCP = $37.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ に調製した。また、等モルのアスコルビン酸ナトリウムを添加した。この三角フラスコを 210 rpm、 30°C 、3h 振とうし、反応終了後 1.5 mL 1M K_2CO_3 と 500 μL 無水酢酸、室温で 10 分静置してアシル化反応を行った。20 mL 酢酸エチルで抽出、無水硫酸ナトリウムによる脱水後、乾固して、500 μL の hexane に定容し、GC-MS で測定した。

(8) TeCH の代謝産物 2,3,5-trichloro-6-hydroxy-*p*-benzoquinone (TCHQ) の同定

1 mM IPTG で 4 h 誘導した 50 mL *E. coli* BL21 (DE3)/pA2B-3B を $10,000 \times g$ 、 4°C 、10 分で集菌し、PBS(-)で洗浄した。洗浄菌体を 1 mL MM に懸濁したものを、50 mL 共栓付き三角フラスコに分注した 9 mL の同様の培地に接種し、TeCH = 0.5 mmol L^{-1} に調製した。この三角フラスコを 210 rpm、 37°C 、2 時間で培養し、適当な時点で 700 μL 一部上清をサンプリングした。反応を停止させる目的で、アセトニトリル : 1 mol L^{-1} HCl = 1:1 (vol/vol) で調製した溶媒 100 μL を加え、 $19,000 \times g$ 、10 分で遠心分離した上清を HPLC にて測定した。

(9) 分析方法

PCP および代謝物濃度は HPLC-UV (HP1100, Hewlett-Packard) で測定した。PCP、TCBQ、TeCH の定量に用いた UV 波長はそれぞれ 210、292、304 nm とした。

TCHQ の同定は ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a Micromass Quattro micro API Tandem Quadrupole system (Waters) を用いた。マスによる測

定は以下に記す条件で行った; ESI(-), capillary voltage 3.3 kV, cone voltage 32 V, source temperature 80°C, desolvation temperature 200°C, cone gas flow 50 L h⁻¹, and desolvation gas flow of 800 L h⁻¹. ネガティブイオンモードにおける検出は $m/z = 75-500$ の範囲で行った。分離は Poroshell 120 EC-C18 column (150 mm long, 4.6 mm inner diameter; Agilent Technologies) で行った。移動相は以下に示す 2 種の溶媒を用いた; 移動相 A, 20 mM ammonium acetate (pH 6.8); 移動相 B, 20 mM ammonium acetate-acetonitrile (pH 6.8)。溶出は流速 0.4 mL min⁻¹ のアイソクラティックモードで移動相 A:移動相 B = 40:60 にて行った。

アセチル化 TeCH のスペクトル取得は HP6890 GC system と HP5973 mass selective detector を接続し、30-m fused DB5-MS カラム (J&W Scientific, Folsom, CA) を装備した GC-MS で行った。昇温プログラムは 120°C から開始し、210°C まで 20°C min⁻¹、290°C まで 10°C min⁻¹、320°C まで 25°C min⁻¹ で行った。

(10) TCHQ の合成

TCHQ の合成は Hancock らの報告に従って行った (Hancock *et al.*, 1962)。簡単に述べると、2 mol L⁻¹ NaOH (17.5 mL, 35 mmol) を氷冷しながらスターラーで攪拌し、2,3,5,6-tetrachloro-*p*-benzoquinone (C₆Cl₄O₂; TCBQ, Mw: 245.88, 500 mg, 2.03 mmol) を少しずつ溶解させた。TCBQ を完全に溶解させた後、2 mol L⁻¹ HCl (17.5 mL, 35 mmol) を pH 5~6 になるまで滴下し、深い紫色の結晶を析出させた。この結晶を桐山ロートで吸引濾過し、氷冷した DW で洗浄し、*in vacuo* で乾固した。合成した TCHQ の ¹³C NMR スペクトラは JEOL ECX 400 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。ケミカルシフト (δ) は溶媒ピークを内部標準として補正した (DMSO-*d*₆, 39.5 ppm)。 δ_c (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) = 176.0, 166.4, 164.7, 145.0, 132.2, 106.8 だった (Fig. 2-1)。

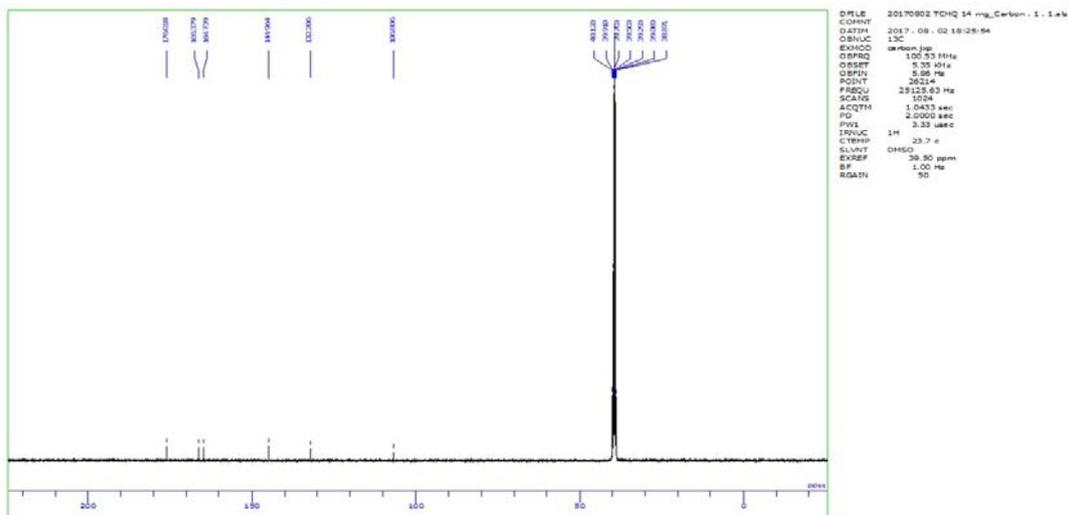


Fig. 2-1 TCHQ の DMSO-d6 中における ^{13}C -NMR スペクトル (ppm).

(11) RT-PCR および RT-qPCR

Pre-culture medium にて late exponential phase ($\sim OD_{600} = 1.0$)まで増殖させた PD653 を 8,000 rpm, 10 min, 4°Cで集菌し、MM で菌体洗浄した。洗浄後の菌体ペレットを $OD=10$ となるよう MM に懸濁し、50 mL Erlenmeyer flask に分注した 9 mL MM へ 1 mL ($OD_{600} = 1.0$) 接種した。この培地中に基質濃度 10 mg L^{-1} となるようそれぞれの化合物の stock solution を 50 μL 接種し、180 rpm, 30°Cで 8 h 振とう培養した。50 μL アセトンのみを添加した区をコントロールとした。各基質添加後 0, 2, 4, 8h の時点で三角フラスコを回収し、培養液を 8,000 rpm、4°C、5 分でペレット化後、液体窒素にて凍結・-80°Cで保管した。凍結後のペレットから抽出した total RNA 147.6 ng を鋳型とし、ReverTra Ace qPCR RT master mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた cDNA 合成を以下に示す条件で行った; 37°C for 15 min followed by, 50 °C for 15 min, and 98°C for 5 min. 合成した cDNA 1 μL を RT-PCR または RT-qPCR の鋳型とした。

新規 PCP 代謝遺伝子群 *hcbB1B2B3* がオペロンを形成しているかを検証するために RT-PCR で用いた primer の配列を Table 2-2 に示す。*hcbB1-hcbB2* の遺伝子間領域は *hcbB1_q_F* と *hcbB2_q_R* primer set により増幅した。*hcbB2-hcbB3* 遺伝子間領域は *hcbB2_q_F* と *hcbB3_q_R* primer set により増幅した。RT-PCR は cDNA を鋳型とし、GO-Taq DNA polymerase (Promega) と上述の primer pair を用いて以下に記す条件で行った ;

Pre-denature	95°C for 2 min	} 30 cycles
Denature	98°C for 30 s	
Annealing	60°C for 30 s	
Extension	72°C for 1.5 min	
Final extension	72°C for 2 min.	

PCR 産物は 1.5% (wt/vol) アガロースゲル電気泳動の後 pGEM-T easy vecotr ヘクローニングし、シーケンス解析に供した。

RT-qPCR は THUNDER BIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO)と RT-qPCR 用 primer set, *hcbB3_q_F* と *hcbB3_q_R* (*hcbB3* を標的)、*hcbA1_q_F* と *hcbA1_q_R* (*hcbA1* を標的) *rpoB_q_F* と *rpoB_q_R* (*rpoB* を標的) を用いた 20 μL スケールにて行った。伸長反応条件は pre-incubation 95°C, 60 s, 40 cycle の 95°C, 15 s, 55°C, 30 s, 72°C, 60 s で、annealing 後に蛍光検出した。これらの反応の後に transition 0.2°C s^{-1} で融解曲線を作製し、 T_m 値のピークより非特異的な増幅が認められないことを確認した (Fig. 2-2)。全ての RT-qPCR 反応は LightCycler96 (Roche Diagnostics Applied Science, Indianapolis, IN, USA)で行った。

反応後の増幅産物が目的サイズであるかことを 1% (w/v) agarose gel による電気泳動で確認した後、バンドを切り出して pGEM-T easy vector へクローニングし、シーケンス解析を行った。その結果、目的配列が得られたことから primer の特異性が担保されていることが分かった。また cDNA 合成反応液を 10 倍ずつ希釈した 5 段階の鋳型濃度によって検量線を作製し、PCR 効率が適切であることを確認した ($r^2 = 0.999$; slope, -3.55 for *hcbB3*, $r^2 = 0.993$; slope, -3.16 for *rpoB*).

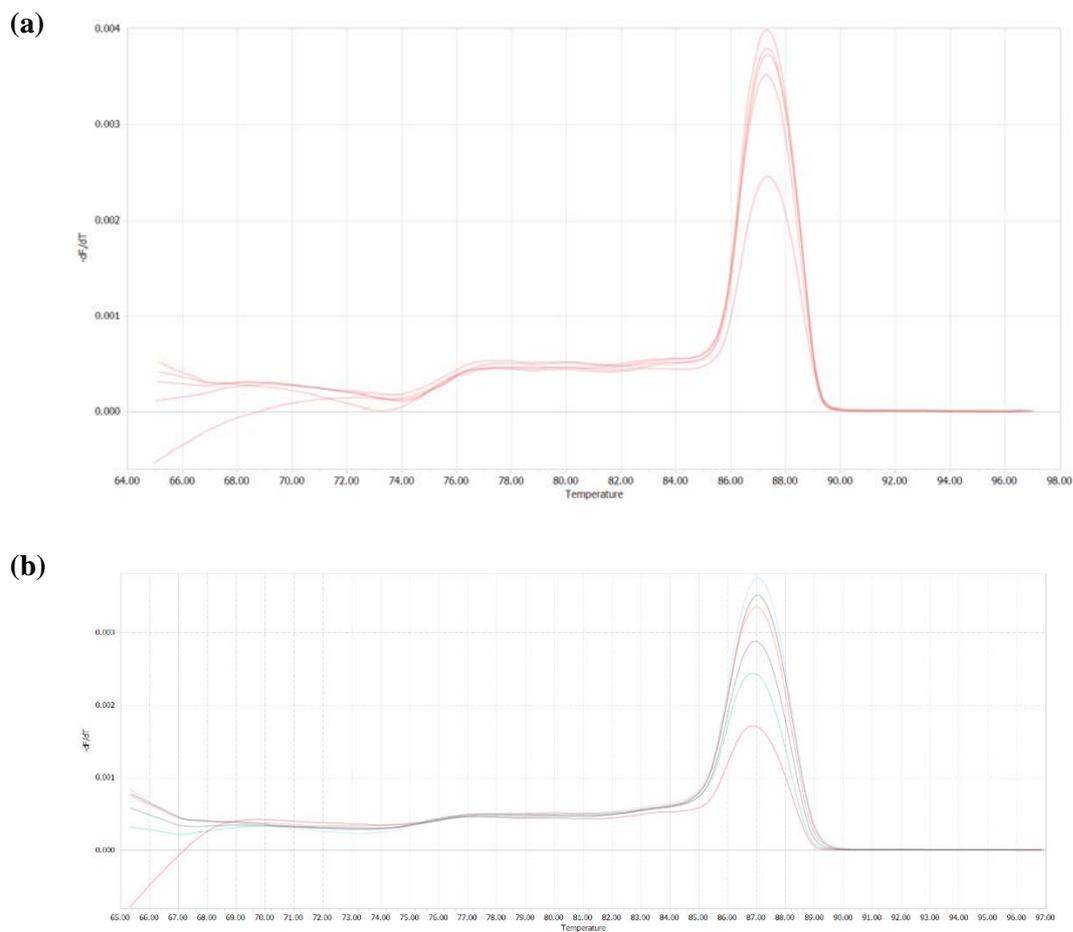


Fig. 2-2 RT-qPCR に用いた primer の融解曲線.

(a) *rpoB*_q_F と *rpoB*_q_R のプライマーセット。(b) *hcbB3*_q_F と *hcbB3*_q_R のプライマーセット。

2-3. 結果

(1) RNA-seq による推定 PCP 分解酵素遺伝子群の同定

対照区と比較して実験区では 47 の遺伝子の発現量が有意に上昇していることが明らかとなった($P > 0.05$, Table 2-3)。それらの殆ど (38/47) は contig 11 (GenBank accession no. BDJG01000011.1) に配座しており、PD653_1060-1068、PD653_1108-1125、PD653_1131-1161 という 3 つのクラスターが HCB 存在下において高発現していることが確認された (Fig. 2-3)。PD653_1112, PD653_1113, PD653_1114 はそれぞれ Pyridoxine 5'-phosphate oxidase、Sugar phosphate isomerases/epimerases、Aromatic ring hydroxylase というアノテーションが MiGAP によって振られていた。

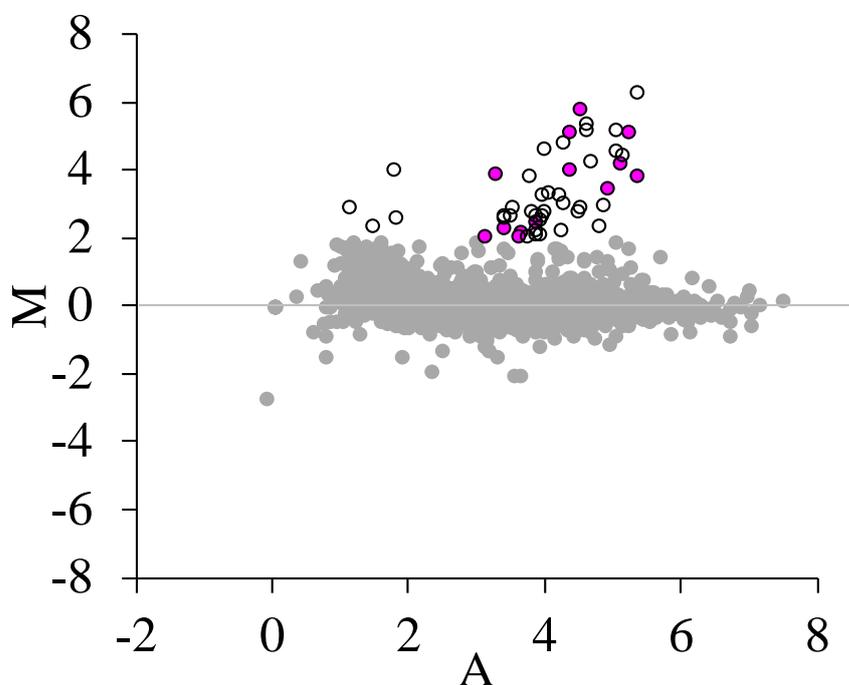


Fig. 2-3 PD653 における HCB 暴露後 8 時間で発現量が変動した遺伝子.

得られたリードを PD653 のドラフトゲノム (accession no. BDJG01000001 to BDJG01000087) へマッピングし、RPKM へ変換した。縦軸 (M) = $\log_2(\text{HCB 暴露区の RPKM}) - \log_2(\text{HCB 非暴露区の RPKM})$ 、横軸 (A) = $\{\log_2(\text{HCB 暴露区の遺伝子 A の RPKM}) - \log_2(\text{HCB 非暴露区の遺伝子 A の RPKM})\} / 2$ として M/A plot を作成し、発現量が 4 倍以上 ($\log_2 \geq 2$) になっているもの (o) の中から候補遺伝子 (●) をスクリーニングした。

Table 2-3 HCB 存在下で発現量が増加した遺伝子の一覧

Locus tag	Fold induction	Predicted function	Closest related protein	Identity (%)	Accession no.	Organisms
PD653_1060	8	Hypothetical protein	Hypothetical protein CF8_0913	52	EON25013.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1061	5	Hypothetical protein	NAD-dependent malic enzyme	77	OJH68642.1	<i>Streptomyces viridifaciens</i>
PD653_1062	10	SAF domain-containing protein	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	77	WP_018155833.1	<i>Demetria terragena</i>
PD653_1063	7	Hypothetical protein	Hypothetical protein	66	WP_036490206.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1064	7	Type II secretion system protein E	Type II secretion system protein E	69	EON25017.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1065	6	Integral membrane protein	Integral membrane protein	68	EON25018.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1066	6	Type II secretion system protein	Type II secretion system protein	73	EON25019.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1067	1	Hypothetical protein	Hypothetical protein ASE01_16845	50	KRB75034.1	<i>Nocardioides</i> sp. Root190

PD653_1068	7	TadE family protein	TadE family protein	63	EON25020.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1069	3	Predicted transcriptional regulator	Hypothetical protein GA0115240_11986	54	SCD69461.1	<i>Streptomyces</i> sp. DvalAA-14
PD653_1070	1	Flp pilus assembly protein TadG	TadE family protein	65	EON25021.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1071	6	Superoxide dismutase	Hypothetical protein CF8_0923	69	EON25022.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1072	6	Peptidoglycan-binding LysM	Peptidoglycan-binding LysM	68	EON25023.1	<i>Nocardioides</i> sp. CF8
PD653_1108	14	GntR family transcriptional regulator	Transcriptional regulator, GntR family	78	ABL83953.1	<i>Nocardioides</i> sp. JS614
PD653_1109	16	Flavin reductase domain protein FMN-binding protein	Putative oxidase	61	CND52477.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

PD653_1110	4	HTH-type transcriptional regulator MalT	HTH-type transcriptional regulator MalT	74	KMO66989.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1111	1	ATPase AAA				
PD653_1112	55	Pyridoxine 5'-phosphate oxidase	Putative pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	65	KMO83753.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1113	34	Hypothetical protein	Xylose isomerase-like TIM barrel	50	KMO83752.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1114	11	4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase	FADH(2)-dependent monooxygenase TftD	84	KMO66988.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1115	19	Hypothetical protein	Cupin domain protein	74	KMO66987.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1116	2	Putative uncharacterized protein npdX	SnoaL-like domain protein	58	KMO66986.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1117	4	XRE family transcriptional	GTP-binding protein LepA	81	KQW47527.1	<i>Nocardioides</i> sp. Root1257

		regulator with cupin sensor				
PD653_1118	1	Transcriptional regulator	XRE family transcriptional regulator with cupin sensor	71	CND52544.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PD653_1119	5	Transcriptional regulator, TetR family	TetR family transcriptional regulator	70	KQW53742.1	<i>Nocardioides</i> sp. Root1257
PD653_1120	3	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	73	KQV74634.1	<i>Aeromicrobium</i> sp. Root344
PD653_1121	6	NAD(P) transhydrogenase beta subunit	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	79	SFD02090.1	<i>Nocardioides terrae</i>
PD653_1122	4	Serine/threonine protein kinase	hypothetical protein ASD11_15130	34	KQY55832.1	<i>Aeromicrobium</i> sp. Root495
PD653_1123	35	Dehydrogenases with different specificities (related to short-	Gluconate 5-dehydrogenase	78	KMO83627.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>

		chain alcohol dehydrogenases)				
PD653_1124	15	Mannose-6- phosphate isomerase				
PD653_1125	5	Hypothetical protein	MULTISPECIES: LysR family transcriptional regulator	58	WP_08587050 7.1	<i>Nocardioides</i>
PD653_1131	4	Peptidase M24				
PD653_1132	2	Uncharacterized protein	Glyoxalase-like domain protein	84	KMO83754.1	<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>
PD653_1133	4	Enoyl-CoA hydratase (Fragment)	Putative enoyl-CoA hydratase echA8	69	KMO83648.1	<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>
PD653_1134	5	Mitomycin radical oxidase	Mitomycin radical oxidase	62	KMO83755.1	<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>
PD653_1135	36	FAD synthetase	Hypothetical protein	55	WP_08216862 5.1	<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>
PD653_1136	77	Uncharaterized protein	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	77	KMO66993.1	<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>

PD653_1137	36	Hypothetical protein				
		Phosphogluconate dehydrogenase (Decarboxylating), NAD binding domain protein	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	73	KMO66992.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1139	22	Alkylhydroperoxidase AhpD family core domain	Carboxymuconolactone decarboxylase family protein	71	KMO66991.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1140	8	Putative regulatory protein	HTH-type transcriptional regulator MalT	46	KMO66963.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1141	1	Esterase/lipase	Carboxylesterase NlhH	74	KMO67023.1	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
PD653_1142	1	ClcR	MULTISPECIES: LysR family transcriptional regulator	99	WP_085870507.1	<i>Nocardioides</i>
PD653_1143	1	UspA domain-containing protein	Nucleotide-binding universal stress protein, UspA family	56	SHG98930.1	<i>Jatrophihabitans endophyticus</i>
PD653_1144	3	Glutathion S-transferase	Glutathione S-transferase	85	KQW47837.1	<i>Nocardioides</i> sp. Root1257

PD653_1145	10	Oxidoreductase	Putative <i>N</i> ₅ , <i>N</i> ₁₀ - methylenetetrahydromethanopterin reductase	74	EGD43879.1	<i>Nocardioideae</i> bacterium Broad-1
------------	----	----------------	--	----	------------	--

Blastp 検索でヒットしなかったものは空欄、PCP 分解に関与する候補遺伝子を太字で示した。

(2) 候補遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

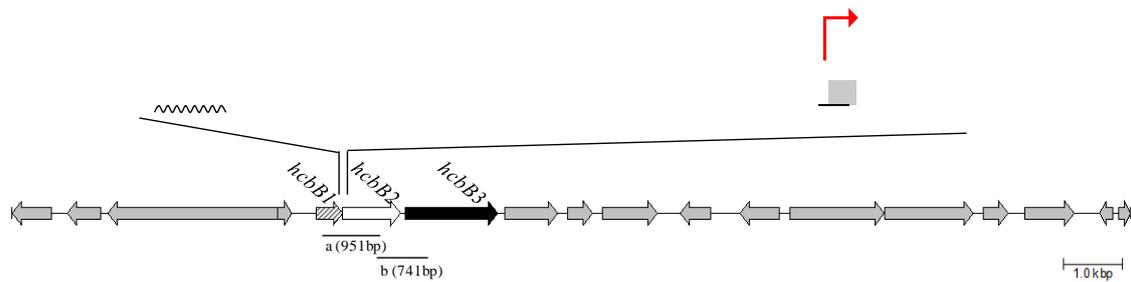
PD653_1112 は *Mycobacterium tuberculosis* 由来の protein Rv1155 (PDB number 1W9A_B) と 52% の相同性を示した (Query cover 89%, E value 1e-49)。また、PD653_1112 の closest relative protein は *Mycobacterium chlorophenicum* 由来の putative pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (accession number KMO83753) と 65% であった (Query cover 80%, E value 1e-58)。

PD653_1113 の closest related protein は *Mycobacterium chlorophenicum* 由来の Xylose isomerase-like TIM barrel (KMO83752, identity 100%, E-value 0.0) だった。

PD653_1114 は *Burkholderia cepacia* AC1100 株より同定された 2,4,6-trichlorophenol monooxygenase である TftD と 54% の相同性を示した (Query cover 97%, E value 0.0)。また、Blastp による検索では *Mycoacterium chlorophenicum* (KMO66988) 由来の TftD が最も近縁なタンパク質であることが示された (Query cover 100%, identity 84%, E- value 0.0)。

ポリ塩化フェノールの分解機構には TftD-TftC のような TC-FDM が関与する 경우가多く、また、PD653_1114 が TftD と相同性を示したことから、我々は PD653_1112 と PD653_1113 のどちらかが putative flavin reductase であると仮説を立て、gene_1112~1114 をそれぞれ ORF1~3 とし、候補遺伝子として選抜した。

(a)



(b)

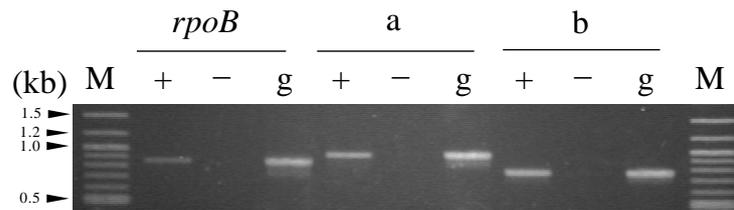


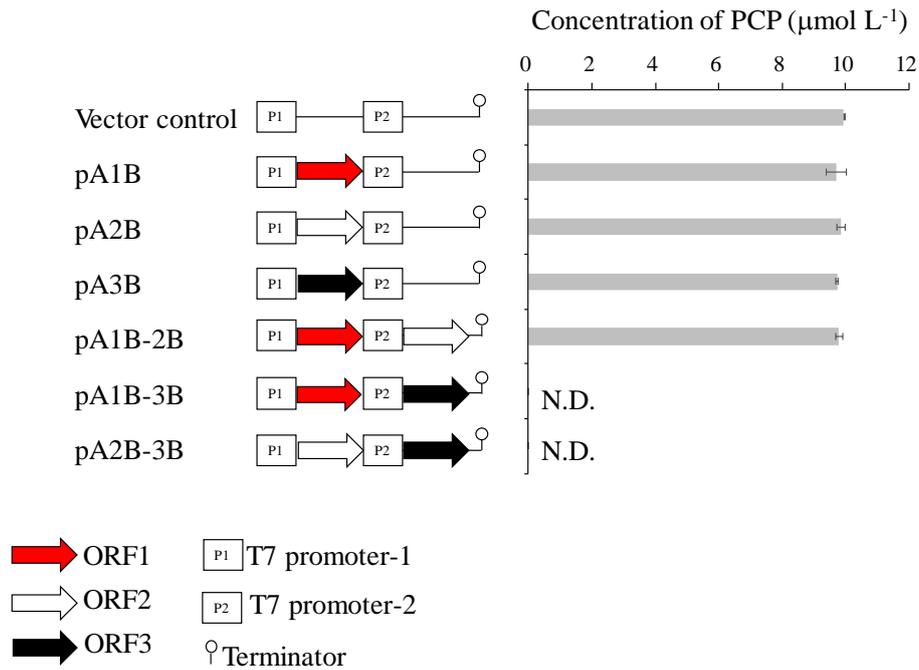
Fig. 2-4 (a) HCB の暴露によって発現量が増加した遺伝子クラスター

(PD653_1108~PD653_1125). 矢印は各 ORF のサイズ、転写の方向を示している。候補遺伝子 ORF1 (*hcbB1*)、ORF2 (*hcbB2*) および ORF3 (*hcbB3*) はそれぞれ網掛け、白、黒の矢印で示す。推定リボソーム結合部位は太字で示した。推定プロモーター配列は波線で示した。開始コドン (ATG) および終止コドン (TGA) はそれぞれ下線、網掛けで示した。(b) *hcbB* 遺伝子群のポリシストロニックな転写. Fig. 3-2 (A) で示した遺伝子間領域 'a' と 'b' に対し、cDNA (+)、no-RT control (-)、genomic DNA (g) をそれぞれ鋳型として増幅した。*rpoB* は mRNA control として用いた。M は 2Log DNA ラダーを示す。

(3) 組換え大腸菌による PCP 分解試験

候補遺伝子を挿入した発現ベクターを形質転換した組換え大腸菌 (whole cell) を用いて、PCP 分解活性を評価した。ORF1、ORF2、ORF3 をそれぞれ単独で発現する組換え体では PCP の分解活性が認められなかった。また、ORF1 と ORF2 を共発現させたコンストラクトを保有する大腸菌においても顕著な PCP 分解活性は確認されなかった。一方で ORF1 と ORF3 を共発現する *E. coli* BL21 (DE3)/pA1B-3B で顕著な PCP の減少が確認された (Fig. 2-5a)。また興味深いことに ORF2 と ORF3 を共発現させた *E. coli* BL21 (DE3)/pA1B-2B においても顕著な PCP の減少が示された。これらの結果より、PCP の分解反応を触媒する活性中心は ORF3 に存在し、ORF1 と ORF2 は ORF3 の遺伝子産物の活性を発揮するための補助的な役割を担っていることが示唆されたことから、ORF1、2、3 をそれぞれ *hcbB1*、*hcbB2*、*hcbB3* と命名した。しかしながら whole cell による PCP 初発濃度 $9.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ の試験のサンプルからは代謝産物と思われるピークを検出するに至らなかった (Fig. 2-5b)。

(a)



(b)

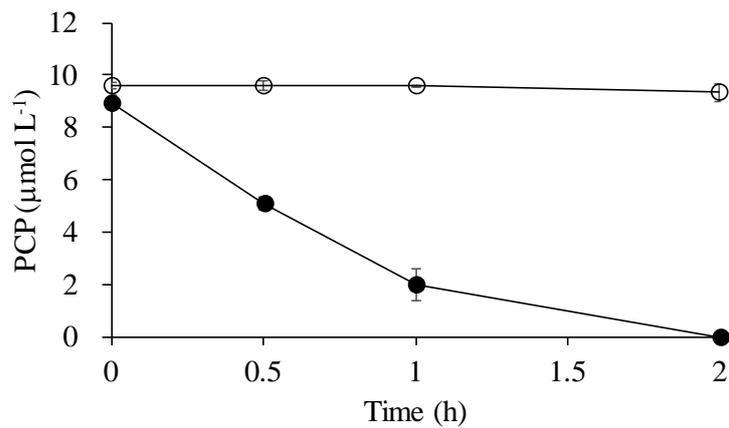


Fig. 2-5 組換え大腸菌による PCP 分解試験.

(a) *hcbB* 遺伝子群を発現させた大腸菌のコンストラクト別 PCP 分解活性の比較。横棒グラフは培地中に残存する PCP 濃度を示す。エラーバーはサンプル ($n=3$) の標準誤差を示す。(b) ベクターコントロール (○) または BL21 (DE3)/pA1B-3B (●) による PCP 分解のタイムコース。エラーバーは 3 連のサンプル間の誤差範囲を示す。

(4) PCP 分解代謝産物の同定

PD653 が TeCH を経由して PCP を代謝することから、*hcbB* 遺伝子群によって TeCH が生成することが予測された。そこで組換え大腸菌細胞を破碎し分画した可溶性画分を用いて TeCH の検出を試みた。18.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PCP、アスコルビン酸を molar ratio 1:1 となるよう添加し、培養後のサンプルをアセチル化し GC-MS 分析を行った。結果、実験区から TeCH を検出した (Fig. 2-6)。また、TeCH はベクターコントロールからは検出されなかった、(データは示さない)。しかしながら PCP の減少に伴う TeCH の生成はごく微量であったことから、*hcbB* 遺伝子群によって PCP がさらに下流へ代謝されていることが示唆された。

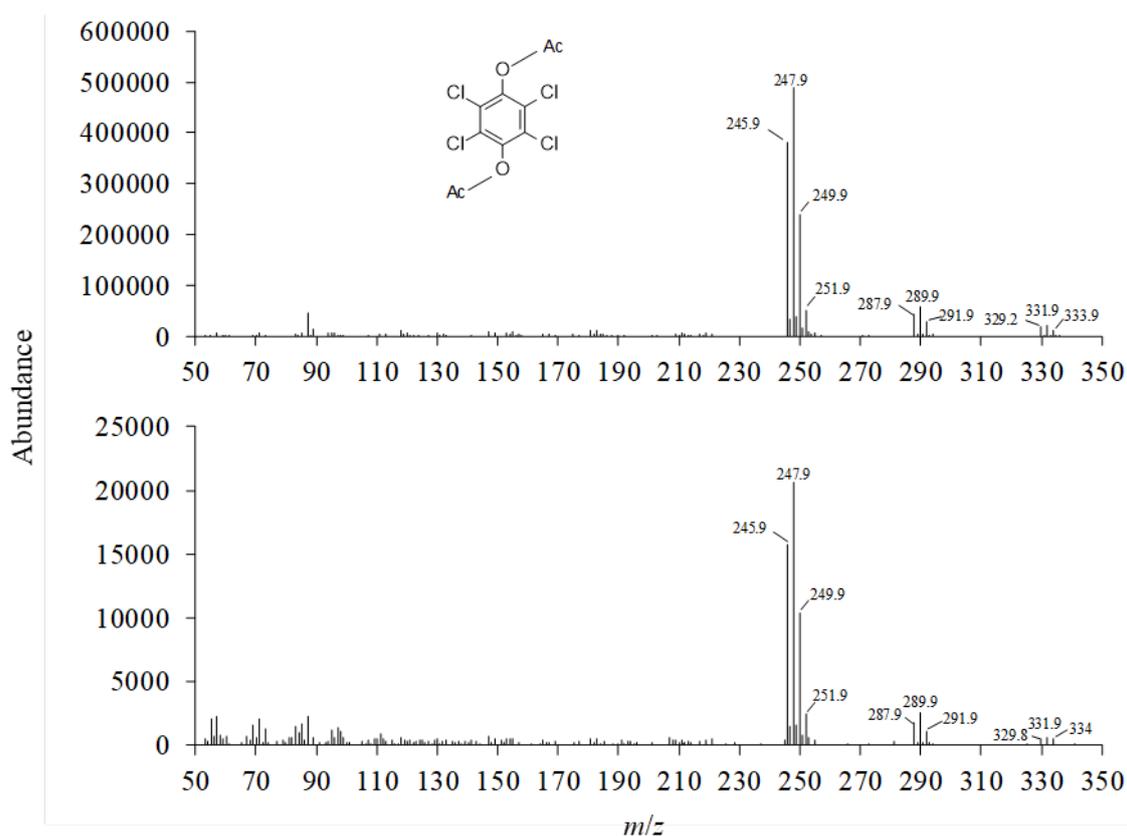


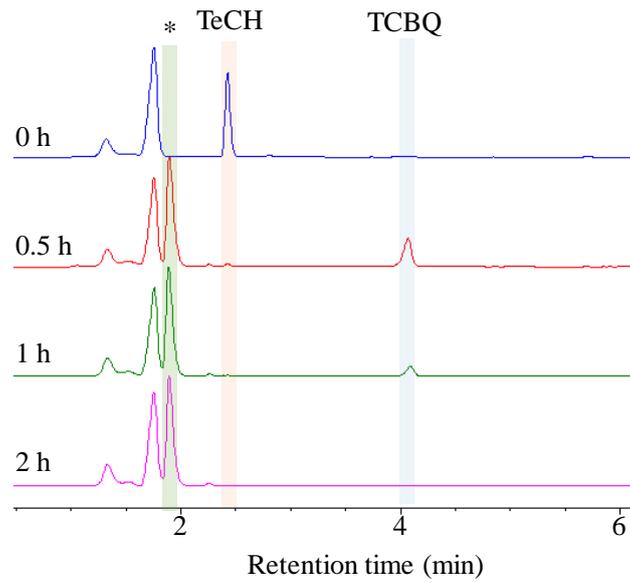
Fig. 2-6 TeCH の GC-MS スペクトラム.

上段; アセチル化した TeCH 標準品、下段; PCP 代謝物。

(5) 下流代謝産物 TeCH の同定

0.5 mmol L⁻¹ TeCH を初発とした分解試験を行った。その結果、まず培養開始後 0.5 h で TeCH はほぼ完全に消失し、TCBQ が検出された。また同時に処理区における Retention time 1.9 min のピークがベクターコントロールよりも増大していた (Fig. 2-7a)。また、培養開始 0.5 h 以降のサンプルは深い紫色を呈した。我々はこのピークについて UPLC-MS によるマススペクトルおよび UV-Vis スペクトルの取得を行った (Fig. 2-7b)。MS スペクトルは $m/z = 225$ にモノアイソトピック質量、 $m/z = 227$ に主イオン(principal ion) の 3 Cl 化合物の isotope pattern を示し、Zhu らによって報告されているものと一致した (Zhu *et al.*, 2012)。この化合物の UV-Vis スペクトルは 220, 295 nm に強い吸収、さらに 537 nm 付近にブロードの吸収が観測され、Tomashi *et al.*によって報告された *Burkholderia cepacia* AC1100 株による TeCH の代謝産物である TCHQ と非常に類似していた。そこで我々は Hancock らによる方法を基に TCHQ を合成し、UPLC-MS によってサンプル中の代謝産物と比較を行った。合成 TCHQ とサンプル由来の代謝産物のピークはリテンションタイム、マススペクトル共に一致したことから、*hcbB* 遺伝子群によって TeCH が TCHQ へ変換されていることが明らかとなった。

(a)



(b)

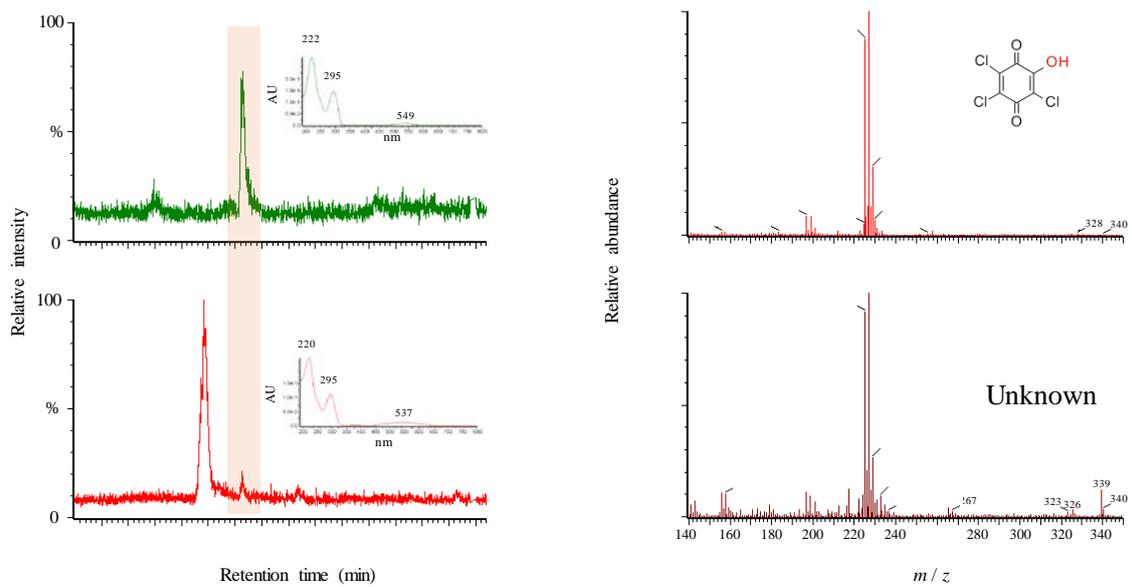


Fig. 2-7 (a) 2 時間で行った TeCH 分解試験における HPLC クロマトグラムの継時的変化。

TeCH、TCBQ、未知代謝物 (*) に該当するピークを示した。(b) 合成 TCHQ (上段) およびサンプル (下段) の UPLC-MS によるクロマトグラム (左) とマススペクトル (右)。

(6) *hcbB* オペロンの構造および転写誘導性

hcbB 遺伝子群がポリシストロニックに転写されているかを調べるため、HCB に暴露後 2 時間経過した PD653 から total RNA を精製・逆転写し、得られた cDNA を鋳型として、*hcbB1-hcbB2* (領域 I) および *hcbB2-hcbB3* (領域 II) の遺伝子間領域をそれぞれ標的とした RT-PCR を行った。その結果、どちらの領域も目的サイズのバンドが増幅し、シーケンス解析によって標的とした塩基配列を確認したため、*hcbB1B2B3* は一本の mRNA として転写されている、すなわち、オペロンを形成していることが明らかとなった (Fig. 2-4b)。

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、PD653 の分解代謝経路を経由する各種塩素化合物に対する *hcbB3* の発現変動を RT-qPCR で調べた。*hcbB* 遺伝子群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。よって、*hcbB* 遺伝子群の発現は HCB だけではなく、分解産物の TeCH によっても亢進することが分かった。一方で PCP 存在下では PCP 暴露後 2 時間で最大 6 倍まで増加した。DiCH 存在下では顕著な発現量の増加が見られなかった (Fig. 2-8)。

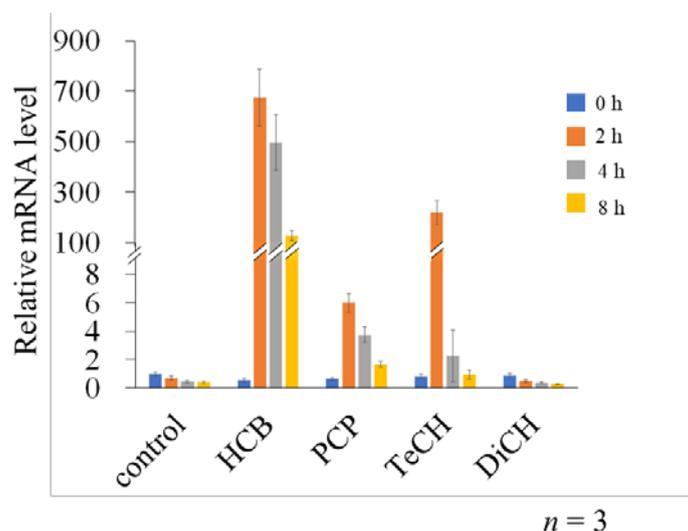


Fig. 2-8 *hcbB3* の転写誘導性.

遺伝子発現は *rpoB* をハウスキーピングとした相対定量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) によって算出した。

2□4. 考察

PCP 分解酵素遺伝子群として最初に報告された *pcp* 遺伝子群は主に Gram-negative 細菌の sphingomonad を中心として保存されている。また Beaulieu らの研究では PCP 汚染環境中から抽出した環境 DNA より、PCR によって *pcpB* とその variant を検出したことが報告されている (Beaulieu *et al.*, 2000)。しかしながら、Gram-positive 細菌における PCP 代謝遺伝子群は、分解細菌が単離されているにも関わらずこれまで発見されていなかった。

唯一、*Mycobacterium chlorophenolicus* PCP-I (以前は *Rhodococcus*) について、分子生物学的解析が行われており、膜局在性の cytochrome P-450 が関与している可能性が提唱されている (Uotila *et al.*, 1991)。また、いくつかの PCP 分解能をもつ放線菌を用いた研究では、*pcpB* をプローブとしたサザンブロット解析にて陽性を示さなかった結果が得られている (Orser *et al.*, 1993)。これらのことから、Gram-positive 細菌では *pcp* 遺伝子群非依存的な別のメカニズムが働いていると考えられていた (Crawford *et al.*, 2007)。

本研究では①PD653 における PCP 代謝遺伝子群は誘導的な発現である、②PCP 代謝遺伝子は HCB によって誘導される可能性がある (仮にそうでなく、中間産物によって誘導がかかる場合であっても、HCB を初発とすれば全ての中間産物を經由するため誘導がかかる可能性がある。しかしこの場合はどの中間産物で誘導されたのかを後に精査する必要が生じる)、という 2 つの仮説に基づき、HCB 暴露区および非暴露区のレストイングセルから調製したサンプルを用いて RNA-seq を行った。また、既往研究で PD653 のレストイングセルが培養後 20h まで HCB 分解活性を維持することが示されていたため (Takagi *et al.*, 2009)、本研究では HCB に暴露後、顕著に分解活性が示される 8h における PD653 レストイングセルから抽出した total RNA を用いた。その結果、HCB 暴露区で有意に発現量が増加している遺伝子群よりグラム陽性細菌由来では世界初となる PCP 代謝遺伝子群 *hcbB1B2B3* の同定に至ったことから、この手法は目的遺伝子を同定する際、inducer が存在し、発現が誘導される場合に有効であると考えられる。新規 PCP 分解酵素遺伝子群は同一の genomic region に配座しており *hcbB3* と *hcbB1* が *hcbB2* で隔てられ、*hcbB1* の終止コドンと *hcbB2* の開始コドンが 3 塩基ほど重複した構造遺伝子であることから (Fig. 2-4a)、translational coupling による翻訳制御が行われていることが示唆された (Spanjaard and van Duin, 1989、Sprengel *et al.*, 1985、Adhin and van Duin, 1990、Yoo and RajBhandary, 2008)。さらに、この近接した 2 つの推定 flavin reductase をコードする ORF がオーバーラップしている構造遺伝子は、PD653 のゲノム上より単離された

HCB 脱塩素酵素遺伝子群 (*hcbA* genes) の putative flavin reductase である *hcbA2* と *hcbA3* と非常に類似していた (Fig. 1-3a)。

組換え大腸菌を用いた *hcbB* genes の共発現による PCP 分解試験にて、*hcbB1* または *hcbB2* との共発現により顕著な PCP 分解活性が示されたこと、また HcbB3 の推定アミノ酸配列が TC-FDM に属する TftD と高い相同性を示した点から、HcbB3 は TC-FDM に属する可能性が高いと考えられる。TftD と TftC はフラビンを介した電子伝達により、2,4,6-trichlorophenol に 2 回水酸基を導入し 2,5-dichloro-*p*-quinol を経て 5-chlorohydroxyquinol へ変換する反応を触媒するが (Gisi and Xun, 2003)、*hcbB1B3* または *hcbB2B3* 共発現系においても PCP が最終的に 2 回脱塩素・水酸基付加され TCHQ が生成することが本研究で示されたことから、TftD と HcbB3 が機能的にも類似したタンパク質であることが考えられる。PCP 代謝経路において、TCHQ が生成する報告は *Burkholderia cepacia* AC1100 の他に *Mycena avenacea* TA 8480 (Kremer *et al.*, 1992)、white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor* (Iimura *et al.*, 1996) がある。本章で得られた知見から、PD653 は Fig. 2-9 のような分解代謝経路によって PCP を弱毒化していると推察した。一方で本研究では PD653 から直接 TCHQ を検出することができなかった。この理由として、TCHQ が PD653 の分解代謝により即座に下流代謝産物へ変換されることが原因ではないかと推察した。TeCH と TCBQ は酸化還元電位による平衡状態にあり (Su *et al.*, 2008)、本研究に於いても TCBQ が析出している無機塩液体培地中にアスコルビン酸 Na を添加すると、TeCH へ変換されて可溶化する現象が確認された (data は示さない)。

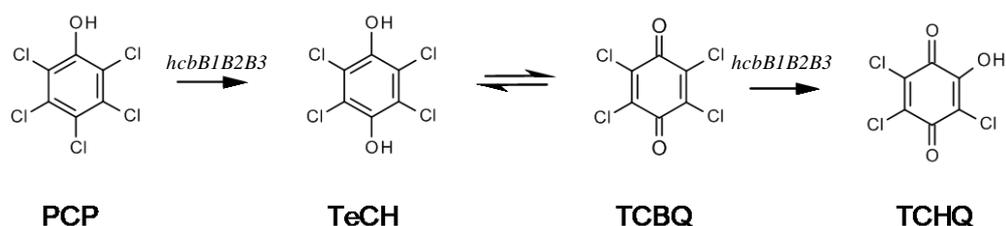


Fig. 2-9 PD653 における *hcbB* 遺伝子群による PCP 分解代謝経路

本研究ではこの HcbB1 の他、思いがけなく HcbB2 も HcbB3 による PCP 脱塩素活性を向上させるタンパク質として見出した。TC-FDM は細菌による芳香族化合物分解において重要な役割を担う知見が多いことから (Prieto and García, 1994, Perry and Zylstra, 2007, Min *et al.*, 2016, Louie *et al.*, 2002, Chu *et al.*, 2017, Cheng *et al.*, 2017)、*hcbB1* と *hcbB2* は共に flavin-dependent monooxygenase component (HcbB3) に還元型フラビンを供給する

flavin reductase をコードすることが推察された。二つの推定 flavin reductase (HcbB1、HcbB2)は TftD に対する flavin reductase TftC と相同性を有していない一方で、HcbB1-HcbB3 または HcbB2-HcbB3 共発現系において顕著な PCP 分解活性を示した。これは HcbB3 とその reductase component の分子間で特異性が低いことに起因するためではないかと考えられる。例えば、精製した TftD と TftC による *in vitro* での活性評価では、TftD が TftC だけではなく大腸菌由来 flavin reductase (Fre)から供給された還元型フラビンを利用できることが示されている (Prieto and García, 1994, Gisi and Xun, 2003)。他にも、thiobencarb 分解に関与する TmoAB (Chu *et al.*, 2017)や chloroacetanilide 分解に関与する MeaXY (Cheng *et al.*, 2017)といった TC-FDM においても、flavin reductase component と flavin-dependent monooxygenase component 間における特異性が低いことが報告されている。HcbB1-HcbB3 および HcbB2-HcbB3 における各コンポーネント間の特異性について明白にするためには、今後の展望として精製したタンパク質による生化学的な解析が求められるだろう。

本研究における発現解析では、HCB によって顕著に *hcbB3* が誘導されることが示された。この結果は HCB を初期基質とした RNA-seq によるスクリーニングで、*hcbB* 遺伝子群が強く誘導されていたことと一致する。多くの場合、人為起源物質代謝遺伝子群は親化合物ではなく、代謝経路の中間体によって誘導されることが多いが (Ohtsubo *et al.*, 2000、van der Meer *et al.*, 1992、Schell *et al.*, 1985)、本研究で同定された *hcbB* 遺伝子群が、初期基質である HCB によって強く誘導される点は大変興味深い点である。HCB は毒性を示すため、実際の応用を考えた場合使用は困難である。しかしながら、例えば植物の 2 次代謝産物のような天然物によって *bph* オペロンの転写量を増加させ、土壤中の PCB 汚染レベル低下を達成した知見があることから (Pham *et al.*, 2015、Gilbert and Crowley 1997, 1998、Singer *et al.*, 2000)、PCP のバイオレメディエーションを最適化する上でも、天然物を代謝活性の増進を図るアプローチもあり得る。

hcbB オペロンの上流には逆方向にコードされた二つの putative regulator HTH-type transcriptional regulator MalT (PD653_1110)および GntR family transcriptional regulator (PD653_1109)が存在している。これまで *E. coli* K12 株における phenyl acetic acid 代謝オペロンの PaaX (Ferrandez *et al.*, 1997)、*Pseudomonas* sp. KKS102 株由来の polychlorinated biphenyl 代謝オペロンにおける BphS (Ohtsubo *et al.*, 2001)、*Comamonas testosterone* R5 株または TA441 株由来の multi component phenol hydroxylase は transcriptional repressor である PhcS (Teramoto *et al.*, 2001)、AphS (Arai *et al.*, 1999)、が GntR-type regulator である

と提唱されており、何れも芳香族化合物の基質欠乏時に転写抑制因子として機能し、これらをコードする ORF は目的物質の代謝オペロンの上流に逆方向に配座するが多い (Tropel and van der Meer, 2004)。PCP 代謝に関与するレギュレーターが明らかとなれば、PCP 分解における転写制御機構においてより深い知見となるだろう。

本研究で見出された遺伝子群が PD653 における PCP 代謝に必要不可欠か否かを明らかとするためには、遺伝子欠損株および変異復帰株を用いた検証が将来的に必要である。

終章

総合考察

本研究は好気条件下における HCB 脱塩素分解能を保有する唯一の細菌である *Nocardioides* sp. PD653 を用いて、HCB 分解代謝系に関与する遺伝子群を単離・解析することより、好気性細菌の HCB 分解代謝メカニズム解明に向けた基盤的な知見を得ることを目的として遂行されたものである。本研究に先立ち、初発 HCB 脱塩素能に欠陥をもつ PD653-B2 が単離された。PD653-B2 は HCB の脱塩素能だけではなく、PCNB の脱ニトロ能を欠損しており、PCNB を初期基質とした場合は PCNB の減少に伴って pentachloroaniline が生成することから、代替の分解代謝経路が発現していることが示唆された (data は示さない)。この結果から PD653-B2 においては、HCB 脱塩素と PCNB 脱ニトロ化に関わる遺伝子が欠落している可能性が強く示された。

第一章では HCB から PCP への脱塩素・水酸基付加反応を触媒する酵素をコードする *hcbA* 遺伝子群の同定に成功した。PD653 と、初発 HCB 脱塩素能に欠陥を持つ PD653-B2 の比較ゲノム解析によって、PD653 特有の約 72-kb の対象領域が見出された。対象領域内では約半数の CDS (42/96) が他の *Nocardioides* 属で保存されている遺伝子と相同性を有していたことから (Table 1-7)、この領域が PD653 特異的なものではなく、近縁種で共通して保存される遺伝子が多く配座する領域であると考えられる。PD653-B2 における対象領域に該当する領域には、PD653 のゲノム上に存在する別の領域が配座していたことから、PD653 から PD653-B2 へ派生する過程でゲノム再編成が生じたことが考えられた一方で、ゲノム再編成に関わるトランスポゼース遺伝子、トランスポゼースに認識される挿入配列 (Siguier *et al.*, 2006) が近傍に検出されなかったため、対象領域に対してどのような機構でゲノム再編成が生じたのかは不明である。今後の展望としては Miseq で解読されなかった各コンティグ間の配列を取得し、ドラフトゲノム配列から全ゲノム配列を取得することで、挿入配列等の可動性遺伝因子が同定から、PD653 から PD653-B2 への派生の過程で生じたゲノム再編成の詳細の解明へ繋がるのではないかと考えている。また、全ゲノム配列が取得された場合、*hcbA* 遺伝子群が染色体またはプラスミドのどちらに配座しているのかも明らかとなり得る。

hcbA 遺伝子群の共発現系による解析では、HcbA1-HcbA3 共発現系で顕著な HCB 脱塩素活性の増加が見られた。更に、それぞれの推定アミノ酸配列を調べたところ、HcbA1

は luciferase-like domain、HcbA3 は flavin reductase domain が保存されていることが明らかとなった。いずれのドメインもフラビンと NAD(P)H を補因子とするタンパク質に見出されるものであること、HcbA1 の場合は分子酸素を基質に添加する monooxygenase に見出されるドメインであり、HcbA3 は NAD(P)H から電子を受け取り、還元型フラビンを生成する機能が推察されることから、HcbA1 と HcbA3 が協調して HCB を脱塩素・水酸基付加するメカニズムを考察する場合、TC-FDM のシステムが妥当であると考えられた。TC-FDM によって触媒される生体反応の一例を Fig. 3-1 に示す。TC-FDM は flavin reductase と flavin-dependent monooxygenase によって実に様々な反応を触媒するが、いくつかの共通点が挙げられる。一つ目は還元型フラビン依存的に反応を触媒し、monooxygenase コンポーネントが flavin reductase から還元型フラビンを得ることである。二つ目は反応の過程で C4a-(hydro)peroxyflavin が中間体として生成し、この中間体が基質の酸化反応に関わることである。

第二章では RNA-seq によって HCB 依存的に発現量が増加する遺伝子クラスターの中から、*hcbB1B2B3* を見出すことに成功した。*hcbB* 遺伝子群発現組換え大腸菌による PCP 分解活性評価では *hcbB1-hcbB3* または *hcbB2-hcbB3* 共発現系において顕著な活性が示された結果と、推定アミノ酸配列の解析を考慮した場合、PD653 における PCP 分解機構においても TC-FDM によるメカニズムが重要であることが示唆された。TCHQ 分解代謝に関与する下流の遺伝子を欠損させることが可能であれば、PD653 による HCB・PCP 分解代謝において TCHQ を経由することが明らかとなるだろう。

これまで論じられている好気性細菌による人為起源物質分解機構において、最初に特殊性の高い酵素を利用して人為起源物質をカテコールやプロトカテク酸といった基礎代謝産物に変換し (van deer Meer *et al.*, 1992)、それらを β -keto adipate pathway や TCA-cycle といった十分に確立された分解代謝系を利用することによって分解・資化している点から考えると、2000 年代から好気性細菌による芳香族化合物分解代謝系に関与するタンパク質として急激に報告数が増加している TC-FDM は、最初の特异性の高い反応を触媒する酵素として好気性細菌が広く利用しているのかもしれない。

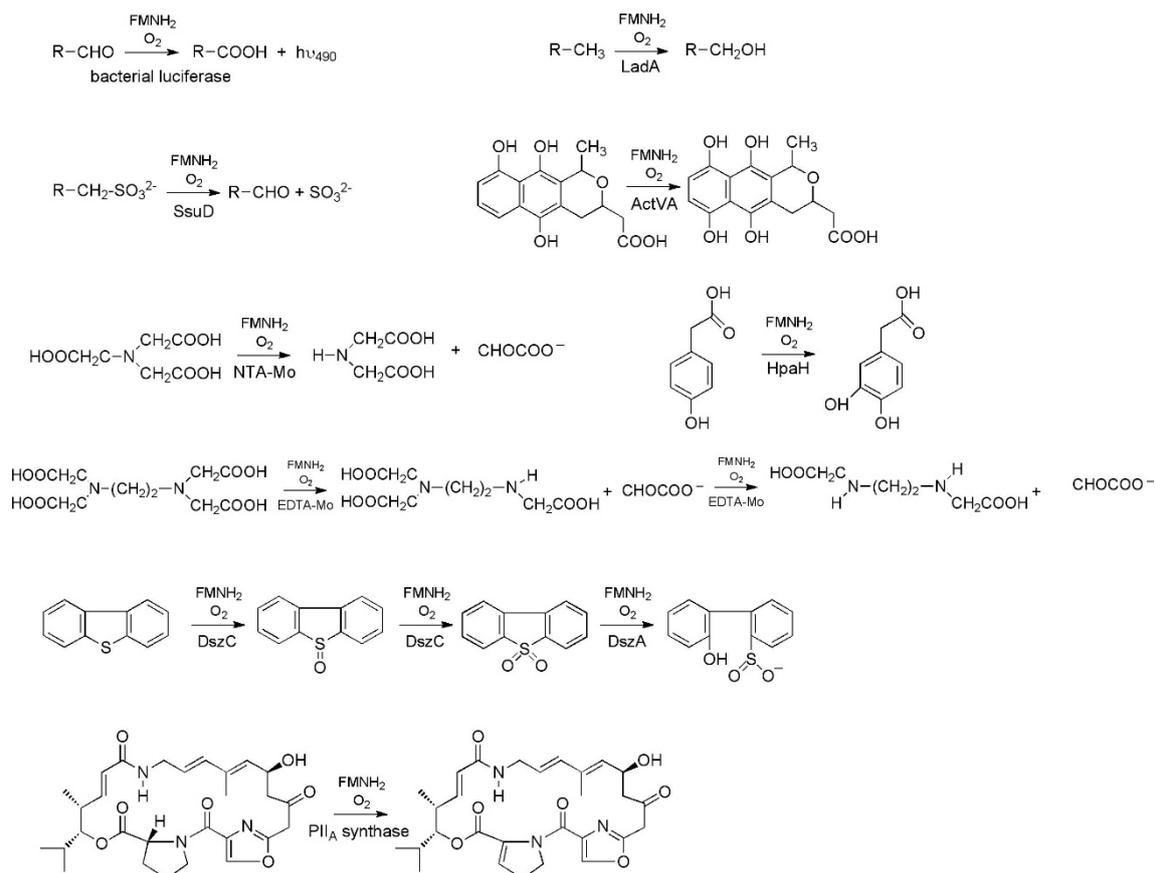


Fig. 3-1 FMN-dependent monooxygenase によって触媒される反応 (Ellis, 2010).

TC-FDM の flavin reductase component と flavin-dependent monooxygenase が flavin を介して行う反応機構について、C4a-(hydro)peroxyflavin 中間体の生成を経由する一連の反応式を、HPA を例として Fig. 3-2 に示す。最初に flavin reductase でフラビンが NAD(P)H から電子を受け取る反応が触媒される。還元型フラビンはタンパク質間相互作用または化合物の親和性の変化により、flavin reductase component から monooxygenase component へ輸送される。そして、monooxygenase component では還元型フラビンが分子酸素と結合し、C4a-hydroperoxyflavin が生成する。次に C4a 位に結合したヒドロペルオキシドが芳香族化合物へ求電子置換反応により、水酸基として導入される。化合物のヒドロキシル化に伴って生成する C4a-hydroxyflavin は脱ヒドロキシル化によって酸化型フラビンの形態に戻り、monooxygenase component から遊離する。(ヒドロペルオキシドが脱プロトン化し、負に荷電した形態、すなわち C4a-peroxyflavin は求核置換反応を触媒する) 本研究で見出した HcbA1-HcbA3 による HCB 脱塩素反応は、このような一連の反応が触媒されることによって触媒されているのではないかと推察した。興味深いことに、hcbA 遺伝子群を共発現させた組換え大腸菌では HCB だけではなく、PCNB の脱ニトロ反応

およびそれに伴う PCP の生成が確認されたことから、本研究で同定した TC-FDM が HCB の脱塩素反応だけではなく PCNB の脱ニトロ反応にも関わる可能性が示された (data は示さない)。Flavin-dependent monooxygenase は基質特性が広く、芳香族化合物の脱塩素反応だけではなく脱ニトロ反応も触媒するという知見は HcbA1 の他、PCP-4 hydroxylase (PcpB)でも報告されており (Xun *et al.*, 1992)、人為起源の高度に塩素置換された有機化合物に対して、好気性細菌がどのように分解代謝機構を発展させたのかを探る上で一つのヒントとなるかもしれない。HCB 分解代謝能の起源を探る上では、HcbA1 の基質特異性を調べると同時に、*hcbA1* をマーカーとして様々な細菌を単離し、HcbA1 (もしくはそのバリエーション)を利用する細菌がどのような環境下に存在するかを明らかにすることが重要な知見になると思われる。例えば haloalkane dehalogenase は従来ハロゲン化合物に汚染された土壌中の細菌にのみ保有されると考えられていたが、実は非汚染土壌中に生息する細菌もこのファミリーに属するタンパク質を保有することが分かってきており (Jasenska *et al.*, 2000, 2002, 2005)、さらに根圏微生物から新規の haloalkane dehalogenase が発見されている (Sato *et al.*, 2005)。特に *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の haloalkane dehalogenase DbjA は β -methylated haloalkane に対して高い基質特性を有し (Sato *et al.*, 2005)、永田らによる研究ではこれを haloalkane の資化のためではなく、高等生物が防虫やシグナル物質として生産する haloalkane を植物-細菌における生物間相互作用に利用するために保有しているのではないかと、という説が提唱されている (Nagata *et al.*, 2007)。HcbA1 に関しても、PCNB 連用圃場の他、根圏微生物におけるその存在の有無は興味深い。

現在、*Nocardioide*s 属細菌における染色体加工技術は十分に確立されておらず、失敗を報告する文献がいくつか見受けられるが (Rebić 2006, Jung *et al.*, 2011)、今後 *hcbA* 遺伝子群の欠損株及び発現ベクター構築による変異復帰株が取得できれば、この遺伝子群が実際に PD653 の分解代謝能(表現型)において鍵となる遺伝型であることが明らかとなるだろう。また、*Nocardioide*s 属細菌は有害化学物質に対して有用な分解代謝能を示すものが多く (Inoue *et al.*, 2006, Yamazaki *et al.*, 2008, Ebert *et al.*, 2001, Topp *et al.*, 2000)、本属における染色体加工技術の確立は重要な研究手法となり得る。

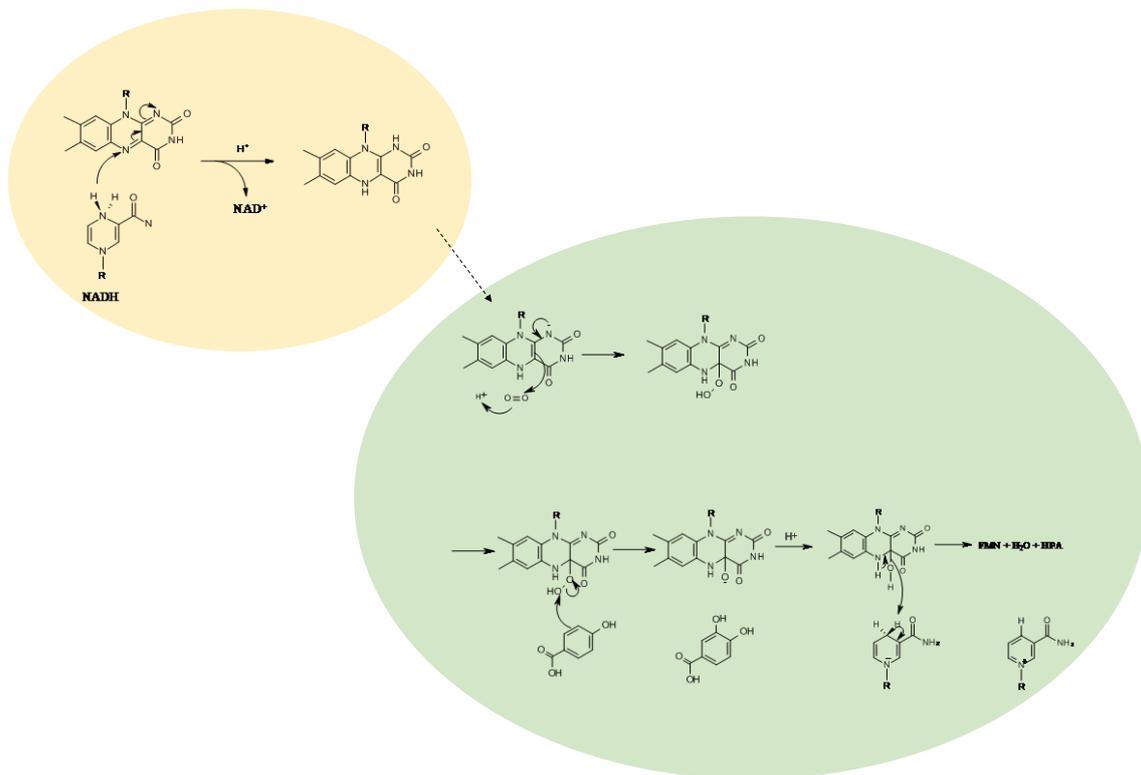


Fig. 3-2 TC-FDM による HPA の酸化反応.

引用文献

- Adhin MR, van Duin J.** (1990) Scanning model for translational reinitiation in eubacteria. *J. Mol. Biol.* 213:811– 818.
- Adrian L, Hansen SK, Fung JM, Görisch H, Zinder SH.** (2007a) Growth of *Dehalococcoides* strains with chlorophenols as electron acceptors. *Environ. Sci. Technol.* 41:2318–2323
- Adrian L, Rahnenführer J, Gobom J, Hölscher T.** (2007b) Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7717–7724.
- Adrian L, Szewzyk U, Wecke J, Görisch H.** (2000) Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408:580–583..
- Apajalahti JHA, Salkinoja-Salonen MS.** (1986) Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:62-67.
- Arai H, Akahira S, Ohishi T, Kudo T.** (1999) Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilization of phenol by spontaneous mutation of the gene for a trans-acting factor: *Mol. Microbiol.* 33:1132-1140.
- Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M.** (2009) ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* 25:1968 –1969.
- Asturias JA, Eltis LD, Prucha M, Timmis KN.** (1994) Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6. Identification of a new family of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* 269:7807-7815.
- Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, Shima S, Thauer RK, Ermler U.** (2004) Coenzyme binding in F420-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. *Structure* 12:361–370.
- Barber JL, Sweetman AJ, van Wijk D, Jones KC.** (2005) Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Sci. Total Environ.* 349:1-44.
- Beaulieu M, Bécaert V, Deschènes L, Villemur R.** (2000) Evolution of bacterial diversity during enrichment of PCP-degrading activated soils. *Microb. Ecol.* 40:345-355.
- Beck J, Hansen KE.** (1974) The degradation of quinterozone, hexachlorobenzene and pentachloroaniline in soil. *Pest Manag. Sci.* 5:41-48.
- Bielefeldt AR, Cort T.** (2005) Dual substrate biodegradation of a nonionic surfactant and pentachlorophenol by *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. *Biotechnol. Bioeng.* 89:680-689.

- Bohuslavek J, Payne JW, Liu Y, Bolton H, Xun L.** (2001) Cloning, sequencing, and characterization of a gene cluster involved in EDTA degradation from the bacterium BNC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:688–695.
- Broderick JB, and O'Halloran T.** (1991) Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance. *Biochemistry* 30:7349-7358.
- Cai M, Xun L.** (2002) Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *J. Bacteriol.* 184:4672-4680.
- Cam S.** (1958) Cases of skin porphyria related to hexachlorobenzene intoxication. *Saglik. Derg.* 32:215-216.
- Chandra R, Ghosh A, Jain RK, Singh S.** (2006) Isolation and characterization of two potential pentachlorophenol degrading aerobic bacteria from pulp paper effluent sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52:125-130.
- Chandra R, Singh S, Reddy MMK, Patel DK, Purohit HJ, Kapley A.** (2008) Isolation and characterization of bacterial strains *Paenibacillus* sp. and *Bacillus* sp. for kraft lignin decolorization from pulp paper mill waste. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54:399-407.
- Chang BV, Su CJ, Yuan SY.** (1988) Microbial hexachlorobenzene dechlorination under three reducing conditions. *Chemosphere* 36:2721-2730.
- Chen X, Christopher A, Jones JP, Bell SG, Guo Q, Xu F, Rao Z, Wong LL.** (2002) Crystal Structure of the F87W/Y96F/V247L mutant of cytochrome P-450cam with 1,3,5-trichlorobenzene bound and further protein engineering for the oxidation of pentachlorobenzene and hexachlorobenzene. *J. Biol. Chem.* 277:37519-37526.
- Cheng MG, Meng Q, Yang YJ, Chu CW, Chen Q, Li Y, Cheng D, Hong Q, Yan X, He J.** (2017) The two-component monooxygenase MeaXY Initiates the downstream pathway of chloroacetanilide herbicide catabolism in Sphingomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e03241–16.
- Chu CW, Liu B, Li N, Yao SG, Cheng D, Zhao JD, Qiu JG, Yan X, He Q, He J.** (2017) A novel aerobic degradation pathway of thiobencarb is initiated by a two-Component FMN-dependent monooxygenase system TmoAB in *Acidovorax* sp. T1 *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e01490-17.

- Coleman NV, Mattes TE, Gossett JM, Spain JC.** (2002) Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6162-6171.
- Colores GM, Radehaus PM, Schmidt SK.** (1995) Use of a pentachlorophenol degrading bacterium to bioremediate highly contaminated soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 54:271-275.
- Crawford RL, Jung CM, Strap JL.** (2007) The recent evolution of pentachlorophenol (PCP)-4-monooxygenase (PcpB) and associated pathways for bacterial degradation of PCP. *Biodegradation* 18:525-539.
- Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT.** (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14:1394–1403.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ.** (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 43:W389–W394.
- Duffner FM, Mueller R.** (1998) A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 161:37–45.
- Ebert S, Fischer P, Knackmuss HJ.** (2001) Converging catabolism of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) and 2,4-dinitrophenol by *Nocardioides simplex* FJ2-1A. *Biodegradation* 12:367-376.
- Ebert S, Fischer P, Knackmuss HJ.** (2001) Converging catabolism of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) and 2,4-dinitrophenol by *Nocardioides simplex* FJ2-1A. *Biodegradation* 12:367-376.
- Ederer MM, Crawford RL, Herwig RP, Orser CS.** (1997) PCP degradation is mediated by closely related strains of the genus *Sphingomonas*. *Mol. Ecol.* 6:39-49.
- Eichhorn E, Davey CA, Sargent DF, Leisinger T, Richmond TJ.** (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD. *J. Mol. Biol.* 324:457–468.
- Ellis LBM, Wackett LP.** (2012) Use of the University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database for study of microbial degradation. *Microb. Inform. Exp.* 2:1.
- Fathepure BZ, Tiedje JM, Boyd SA.** (1988) Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:327-330.
- Feidieker D, Kämpfer P., Dott W.** (1994) Microbiological and chemical evaluation of a site contaminated with chlorinated aromatic compounds and hexachlorocyclohexanes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15:265-278.

- Feng L, Wang W, Cheng J, Ren Y, Zhao G, Gao C, Tang Y, Liu X, Han W, Peng X, Liu R, Wang L.** (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus* thermodenitrificans NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104:5602–5607.
- Ferrandez A, Garcia JL, Diaz E.** (1997) Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179:2573-2581.
- Fetzner S, Lingens F.** (1994) Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* 58:641-685.
- Field JA, Sierra-Alvarez R.** (2008) Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7: 211-241.
- Fisher AJ, Thompson TB, Thoden JB, Baldwin TO, Rayment I.** (1996) The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *J. Biol. Chem.* 271:21956–21968.
- Fukuda M, Yasukochi Y, Kikuchi Y, Nagata Y, Kimbara K, Horiuchi H, Takagi M, Yano K.** (1994). Identification of the *bphA* and *bphB* Genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:850-856.
- Furukawa K, Hayase N, Taira K, Tomizuka N.** (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
- Furusawa Y, Nagarajan V, Tanokura M, Masai E, Fukuda M, Senda T.** (2008) Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J. Mol. Biol.* 342:1041-1052.
- Galán B, Díaz E, Prieto MA, García JL.** (2000) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.* 182:627– 636.
- Ghisla S, Massey V.** (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 181:1–17
- Gilbert ES, Crowley DE.** (1997) Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1933-1938.

- Gilbert ES, Crowley DE.** (1998) Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:489-494
- Gisi MR, Xun L.** (2003) Characterization of chlorophenol 4-monoxygenase (TftD) and NADH:flavin adenine dinucleotide oxidoreductase (TftC) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* 185:2786–2792.
- Haigler BE, Nishino SF, Spain JC.** (1988) Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:294-301.
- Hancock JW, Morrell CE, Rhum D.** (1962) Trichlorohydroxyquinone. *Tetrahedron Lett.* 22:987-988.
- Hölscher T, Görisch H, Adrian L.** (2003) Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2999–3001.
- Hubner A, Danganan CE, Xun L, Chakrabarty AM, Hendrickson W.** (1998) Genes for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: Characterization of the *tftC* and *tftD* genes and locations of the *tft* Operons on Multiple Replicons. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2086-2093.
- Huijbersa MME, Montersinoa S, Westphala AH, Tischlera D, van Berkela WJH.** (2014) Flavin dependent monooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 544:2–17.
- Iimura Y, Hartikainen P, Tatsumi K.** (1996) Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 45:434-439.
- Inoue K, Habe H, Yamane H, Omori T, Nojiri H.** (2005) Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel Gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 245:145-153.
- Jayachandran G, Görisch H, Adrian L.** (2003) Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Arch. Microbiol.* 180:411–416.
- Jesenska A, Bartos M, Czernekova V, Rychlik I, Pavlik I, Damborsky J.** (2002) Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene *dhmA* from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3724–3730.
- Jesenska A, Pavlova M, Strouhal M, Chaloupkova R, Tesinska I, Monincova M, Prokop Z, Bartos M, Pavlik I, Rychlik I.** (2005) Cloning, biochemical properties, and distribution of mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6736–6745.

- Jesenska A, Sedlacek I, Damborsky J.** (2000) Dehalogenation of haloalkanes by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and other mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:219–222.
- Jones JP, O'Hare EJ, Wong LL.** (2001) Oxidation of polychlorinated benzenes by genetically engineered CYP101 (cytochrome P450cam). *FEBS J.* 268:1460–1467.
- Jorens PG and Schepens PJC.** (1993) Human pentachlorophenol poisoning. *Human Exp. Toxicol.* 12:479-495.
- Jung CM, Crocker FH, Eberly JO, Indest KJ.** (2011) Horizontal gene transfer (HGT) as a mechanism of disseminating RDX-degrading activity among Actinomycete bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 110:1149-1459.
- Karn SK, Chakrabarti SK, Reddy MS.** (2011) Degradation of pentachlorophenol by *Kocuria* sp. CL2 isolated from secondary sludge of pulp and paper mill. *Biodegradation.* 22:63-69.
- Karn SK, Chakrabarty SK, Reddy MS.** (2010) Characterization of pentachlorophenol degrading *Bacillus* strains from secondary pulp-and-paper-industry sludge. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 64:609-613.
- Kikuchi Y, Nagata Y, Hinata M, Kimbara K, Fukuda M, Yano K, Takagi M.** (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.
- Kim S-H, Hisano T, Takeda K, Iwasaki W, Ebihara A, Miki K.** (2007) Crystal structure of the oxygenase component (HpaB) of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.* 282:33107-33117.
- Kirchner U, Westphal AH, Müller R, van Berkel WJH.** (2003) Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J. Biol. Chem.* 278:47545–47553.
- Kitagawa W, Takami S, Miyauchi K, Masai E, Kamagata Y, Tiedje JM, Fukuda M.** (2002) Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *J. Bacteriol.* 184:509-518.
- Kremer S, Sterner O, Anke H.** (1992) Degradation of pentachlorophenol by *Mycena avenacea* TA 8480 - identification of initial dechlorinated metabolites. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* 47c:561-566.

- Kube M, Beck A, Zinder SH, Kuhl H, Reinhardt R, Adrian L.** (2005) Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat. Biotechnol.* 23:1269–1273.
- Lawrence AD, Taylor SL, Scott A, Rowe ML, Johnson CM, Rigby SEJ, Geeves MA, Pickersgill RW, Howard MJ, Warren MJ.** (2014) FAD binding, cobinamide binding and active site communication in the corrin reductase (CobR). *Biosci. Rep.* 34:345-355.
- Lee SG, Yoon BD, Park YH, Oh HM.** (1998) Isolation of a novel pentachlorophenol-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. Bu34. *J. Appl. Microbiol.* 85:1–8.
- Leung KT, Cassidy MB, Shaw KW, Lee H, Trevors JT, Vogel EML, Vogel HJ.** (1997) Pentachlorophenol biodegradation by *Pseudomonas* sp. UG25 and UG30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13:305–313.
- Leys D, Adrian L, Smidt H.** (2013) Organohalide respiration: microbes breathing chlorinated molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368:20120316.
- Li L, Liu X, Yang W, Xu F, Wang W, Feng L, Bartlam M, Wang L, Rao Z.** (2008) Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *J. Mol. Biol.* 376:453– 465.
- Liu T, Chen ZL, Shen YF.** (2009) Aerobic biodegradation of hexachlorobenzene by an acclimated microbial community. *Int. J. Environ. Pollut.* 37:235–244.
- Louie TM, Webster CM, Xun L.** (2002) Genetic and biochemical characterization of a 2,4,6-trichlorophenol degradation pathway in *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.* 184:3492-3500.
- Maeda M, Chung SY, Song E, Kudo T.** (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.
- Mattes TE, Coleman NV, Spain JC, Gossett JM.** (2005) Physiological and molecular genetic analyses of vinyl chloride and ethene biodegradation in *Nocardioides* sp. strain JS614. *Arch. Microbiol.* 183:95-106.
- Min J, Zhang JJ, Zhou NY.** (2015) A two-component *para*-nitrophenol monooxygenase initiates a novel 2-chloro-4-nitrophenol catabolism pathway in *Rhodococcus imtechensis* RKJ300. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:714-723.

- Nguyen AT, Sato Y, Iwasaki T, Miyauchi K, Tokuda M, Kasai D, Masai E, Fukuda M.** (2011) Characterization of the 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE) degradation system in *Janibacter* sp. TYM3221. *Enzyme Microb. Technol.* 49:532-9.
- Nguyen AT, Trinh THT, Fukumitsu Y, Shimodaira J, Miyauchi K, Tokuda M, Kasai D, Masai E, Fukuda M.** (2013) Gene cluster and regulation system for 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE) degradation in *Janibacter* sp. TYM3221. *J. Biosci. Bioeng.* 116:91-100.
- Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, Takagi M, Ohta A, Nagata Y.** (2001) BphS, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 *J. Biol. Chem.* 276:36146-36154.
- Ohtsubo Y, Nagata Y, Kimbara K, Takagi M, Ohta:A.** (2000) Expression of the *bph* genes involved in biphenyl/PCB degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 induced by the biphenyl degradation intermediate, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid. *Gene* 256:223-228.
- Okai M, Kudo N, Lee WC, Kamo M, Nagata K, Tanokura M.** (2006) Crystal structures of the short-chain flavin reductase HpaC from *Sulfolobus tokodaii* strain 7 in its three states: NAD(P)+-free, NAD+-bound, and NADP+-bound. *Biochemistry* 45:5103-5110.
- Orser CS, Lange CC, Xun L, Zahrt TC, Schneider BJ.** (1993) Cloning, sequence analysis, and expression of the Flavobacterium pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:411–416.
- Orser CS, Lange CC.** (1994) Molecular analysis of pentachlorophenol degradation. *Biodegradation* 5:277–288.
- Perkins EJ, Gordon MP, Caceres O, Lurquin PF.** (1990) Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172:2351–2359.
- Perry LL, Zylstra GJ.** (2007) Cloning of a gene cluster involved in the catabolism of *p*-nitrophenol by *Arthrobacter* sp. strain JS443 and characterization of the *p*-nitrophenol monooxygenase. *J. Bacteriol.* 189:7563-7572.
- Pham TTM, Rodriguez NJP, Hijri M, Sylvestre M.** (2015) Optimizing polychlorinated biphenyl degradation by flavonoid-induced cells of the rhizobacterium *Rhodococcus erythropolis* U23A *PLoS ONE* 10:e0126033.

- Prieto MA, García JL.** (1994) Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme. *J. Biol. Chem.* 269:22823–22829.
- Prieto MA, Perez-Aranda A, Garcia JL.** (1993) Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *J. Bacteriol* 175:2162–2167
- Radehaus PM, Schmidt SK.** (1992) Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2879–2885.
- Rebić A.** (2006) Biodegradation of 2,4,6-Trinitrophenol in *Rhodococcus opacus* and *Nocardioides simplex*: Developing a mutagenesis system and cloning of the nitrite eliminating enzyme. Ph.D thesis, the Faculty of Science, University of the Witwatersrand
- Resnick SM, Chapman PJ.** (1995) Physiological properties and substrate specificity of a pentachlorophenol-degrading *Pseudomonas* species. *Biodegradation.* 5:47-54.
- Saito A, Iwabuchi T, Harayama S.** (1999) Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere* 38:1331-1337.
- Sato Y, Monincova M, Chaloupkova R, Prokop Z, Ohtsubo Y, Minamisawa K, Tsuda M, Damborsky J, Nagata Y.** (2005) Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4372–4379.
- Schel MA.** (1985) Transcriptional control of the nah and sal hydrocarbon-degradation operons by the nahR gene product. *Gene* 36:301–309.
- Seibert V, Stadler-Fritzsche K, Schlömann M.** (1993) Purification and characterization of maleylacetate reductase from *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 175:6745– 6754.
- Shima S, Warkentin E, Grabarse W, Sordel M, Wicke M, Thauer RK, Ermler U.** (2000) Structure of coenzyme F420 dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea. *J. Mol. Biol.* 300:935–950.
- Siguiier P, Filée J, Chandler M.** (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:526 –531.
- Singer AC, Gilbert ES, Luepromchai E, Crowley DE.** (2000) Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:838-843.

- Spanjaard RA, van Duin J.** (1989) Translational reinitiation in the presence and absence of a Shine and Dalgarno sequence. *Nucleic Acids Res.* 17:5501–5507.
- Sprengel R, Reiss B, Schaller H.** (1985) Translationally coupled initiation of protein synthesis in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 13:893–909.
- Stanlake GJ, Finn RK.** (1982) Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1421-1427.
- Strohl WR.** (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20:961–974.
- Su Y, Chen L, Bandy B, Yang J.** (2008) The catalytic product of pentachlorophenol 4-monooxygenase is tetra-chlorohydroquinone rather than tetrachlorobenzoquinone. *Open Microbiol. J.* 2:100–106.
- Sugawara H, Ohyama A, Mori H, Kurokawa K.** (2009) The 20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009) Poster and Software Demonstrations (Yokohama), S001-1-2.
- Taira K, Hirose J, Hayashida S, Furukawa K.** (1992) Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267:4844-4853.
- Takagi K, Iwasaki A, Kamei I, Satsuma K, Yoshioka Y, Harada N.** (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4452-4458.
- Takagi K, Yoshioka Y, Iwasaki A, Kamei I, Harada N.** (2007) Metabolic pathways of hexachlorobenzene (HCB), quintozene (PCNB) and pentachlorophenol (PCP) by a newly isolated strain *Nocardioides* sp. PD653 under aerobic conditions. *Organohalogen Compd.* 69:2576 –2579.
- Takizawa N, Yokoyama H, Yanagihara K, Hatta T, Kiyohara H.** (1995) A locus of *Pseudomonas pickettii* DTP0602, had, that encodes 2,4,6-trichlorophenol-4-dechlorinase with hydroxylase activity, and hydroxylation of various chlorophenols by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80:318-326.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Teramoto M, Harayama S, Watanabe K.** (2001) PhcS represses gratuitous expression of phenol metabolizing enzymes in *Comamonas testosteroni* R5 *J. Bacteriol.* 183:4427-4234.

- Tirola MA, Männistö MK, Puhakka JA, Kulomaa MS.** (2002b) Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a groundwater bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:173-180.
- Tirola MA, Wang H, Paullin L, Kulomaa MS.** (2002a) Evidence for natural horizontal transfer of the *pcpB* gene in the evolution of polychlorophenol-degrading Sphingomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4495-4501.
- Tomasi I, Artaud I, Bertheau Y, Mansuy D.** (1995) Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100: determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole. *J. Bacteriol.* 177:307-311.
- Topp E, Mulbry WM, Zhu H, Nour SM, Cuppels D.** (2000) Characterization of *s*-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3134-3141.
- Topp E, Mulbry WM, Zhu H, Nour SM, Cuppels D.** (2000) Characterization of *s*-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3134-3141.
- Topp E, Mulbry WM, Zhu H, Nour SM, Cuppels D.** (2000) Characterization of *s*-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3134-3141.
- Tropel D, van der Meer JR.** (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:474-500.
- UNEP** (2012b) Risk profile on chlorinated naphthalenes, UNEP/POPS/POPRC.8/16/Add.1. <http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/POPRCMeetings/POPRC8/POPRC7WorkingDocuments/tabid/2801/Default.aspx>
- Uotila JS, Salkinoja-Salonen MS, Apajalahti JHA.** (1991) Dechlorination of pentachlorophenol by membrane bound enzymes of *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-I. *Biodegradation* 2:25-31.
- van den Heuvel RHH, Westphal AH, Heck AJR, Walsh MA, Rovida S, van Berkel WJH, Mattevi A.** (2003) Structural studies on flavin reductase PheA2 reveal binding of NAD in an unusual folded conformation and support novel mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 279:12860-12867.
- van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zehnder AJ.** (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 56:677-694.

- Vögli M, Hütter R.** (1987) Characterization of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (*sph*) of *Streptomyces glaucescens*: nucleotide sequence and promoter analysis. *Mol. Gen. Genet.* 208:195–203.
- Webb BN, Ballinger JW, Kim E, Belchik SM, Lam K-S, Youn B, Nissen MS, Xun L, Kang C.** (2009) Characterization of chlorophenol 4-monooxygenase (TftD) and NADH:FAD oxidoreductase (TftC) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Biol. Chem.* 285:2014–2027.
- Weinbach EC.** (1954) The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 210:545–550.
- Weir KM, Sutherland TD, Horne I, Russell RJ, Oakeshott JG.** (2006) A single monooxygenase, *ese*, is involved in the metabolism of the organochlorides endosulfan and endosulfate in an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3524–3530.
- Wohlfarth G, Diekert G.** (1997) Anaerobic dehalogenases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:290–295.
- Xun L, Topp E, Orser CS.** (1992) Diverse substrate range of a Flavobacterium pentachlorophenol hydroxylase and reaction stoichiometries. *J. Bacteriol.* 174:2898–2902.
- Xun L.** (1996) Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* 178:2645–2649.
- Yamazaki K, Fujii K, Iwasaki A, Takagi K, Satsuma K, Harada N, Uchimura T.** (2008) Different substrate specificities of two triazine hydrolases (TrzNs) from *Nocardioide*s species. *FEMS Microbiol. Lett.* 286:171–177.
- Yan DZ, Liu H, Zhou NY.** (2006) Conversion of *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 to a hexachlorobenzene degrader by metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2283–2286.
- Yanze-Kontchou C, Gschwind N.** (1994) Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4297–4302.
- Yoo JH, RajBhandary UR.** (2008) Requirements for translation re-initiation in *Escherichia coli*: roles of initiator tRNA and initiation factors IF2 and IF3. *Mol. Microbiol.* 67:1012–1026.
- Zhu BZ, Mao L, Huang CH, Qin H, Fan RM, Kalyanaraman B, Zhu JG.** (2012) Unprecedented hydroxyl radical-dependent two-step chemiluminescence production by polyhalogenated quinoid carcinogens and H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:16046–16051.
- 関谷 和人(2009) 東京農業大学農学研究科農芸化学専攻 修士論文

高木和広 (1993) 茨城県下の畑圃場における土壌の PCNB 分解活性の分布とその特性. 第 18 回日本農薬学会大会

高木和広 (1994) 茨城県下の畑圃場における PCNB 分解土壌の分布とその特性. 第 19 回日本農薬学会大会

謝辞

本研究の創始者であり、研究テーマを頂き、日頃よりご指導、御教示を賜り支えてくださった農研機構農業環境変動研究センター・主席研究員兼東京農業大学連携大学院高木和広教授に深く感謝いたします。本研究を遂行する中で、多くの御助言を頂きました東京農業大学大学院微生物学研究室・五十君静信教授、横田健治准教授、梶川揚申准教授に深く感謝いたします。また、TCHQの合成に関して御指導を賜りました同大学大学院生物制御化学研究室・松島芳隆教授、並びに¹³C-NMR測定を手伝って頂いた同研究室・今野寛之氏、原利樹氏に感謝の意を表します。本研究における発見の基盤となったバイオインフォマティクスによる研究戦略に関して、幾多に及ぶ御助言、ご指導を承りました同大学生命科学部分子微生物学科・田中尚人教授、および静岡大学グリーン科学研究所・兼崎友博士に心から感謝いたします。組換え大腸菌によるHCB・PCP分解酵素遺伝子の発現系構築において、多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました順天堂大学・岩崎昭夫特任准教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行する上で、折に触れて有機化学的見識をご教授して頂いた岡山大学・清田洋正教授に心から感謝いたします。本研究の前任者であり、*hcbA* 遺伝子群および*hcbB* 遺伝子群の解析に関するディスカッションを通じて研究に深みを与えてくださいましたフランス国立農学研究所・Fabrice Martin-Laurent 博士に心より感謝いたします。本研究における重要な仮説を設定してくださいました、農研機構農業環境変動研究センター・倉俣正人博士に心より感謝の意を表します。また、PD653の核酸を取り扱う実験に必要な研究機器の使用を快諾していただきました同研究センター・石川覚博士に深く感謝いたします。学部3年までは全くの門外漢であった小生に対し、微生物学の門扉を開いてくださいました東京農業大学・岡田早苗名誉教授（現：木曾町地域資源研究所所長）への感謝の意は筆舌に尽くしがたいものがございます。農研機構西日本農業研究センター・池田達哉博士は研究者の生態学について折に触れて熱く伝えていただき、心から感謝いたします。

最後に高木研でお世話になりましたスタッフの皆様、先輩方、そして私事ですが、学生生活を支援して下さった両親、伊藤家の皆様はこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

文献リスト

1. Ito K, Kawashima F, Takagi K, Kataoka R, Kotake M, Kiyota H, Yamazaki K, Sakakibara F, Okada S. (2016) Isolation of endosulfan sulfate-degrading *Rhodococcus koreensis* strain S1-1 from endosulfan contaminated soil and identification of a novel metabolite, endosulfan diol monosulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473:1094-1099. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.021
2. Ito K, Takagi K, Iwasaki A, Tanaka N, Kanasaki Y, Martin-Laurent F, Igimi S. (2017) Identification of the *hcb* gene operon involved in catalyzing aerobic hexachlorobenzene dechlorination in *Nocardioides* sp. strain PD653. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e00824-17. DOI: 10.1128/AEM.00824-17
3. Ito K, Takagi K, Y. Matsushima, Iwasaki A, Tanaka N, Kanasaki Y, Martin-Laurent F, Igimi S. (2018) Identification of the novel *hcbB* operon catalyzing dechlorination of pentachlorophenol in the Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain PD653. *J. Pestic. Sci. In press*

SUMMARY

The organochlorine fungicide hexachlorobenzene (HCB) is widely distributed in the environment. Bioremediation can effectively remove HCB from contaminated sites, but HCB-degrading microorganisms have been isolated in few studies and the genes involved in HCB degradation have not been identified. In this study, possible genes involved in the initial step of the mineralization of HCB by *Nocardioides* sp. strain PD653, which was the first identified aerobic bacterium capable of mineralizing HCB. In this study, strain PD653-B2, which was unexpectedly isolated from a subculture of strain PD653, was found to lack the ability to transform HCB into pentachlorophenol (PCP). Comparative genome analysis of the two strains revealed that genetic rearrangement had occurred in strain PD653-B2, with a genomic region present in strain PD653 being deleted. *In silico* analysis allowed three open reading frames within this region to be identified as HCB-dechlorinating gene candidates. Assays using recombinant *Escherichia coli* cells revealed that an operon is responsible for oxidative HCB dechlorination. The metabolite PCP was detected in the cultures produced in the *E. coli* assays. Significantly less HCB-degrading activity occurred in assays under oxygen limited conditions ($[O_2] < 0.5 \text{ mg liter}^{-1}$) than under aerobic assays, suggesting that monooxygenase is involved in the reaction. In this operon, *hcbA1* was found to encode a monooxygenase involved in HCB dechlorination.

While the *pcp* genes are well known in Gram-negative bacteria to code for the enzymes responsible for PCP degradation, little is known about PCP degrading-genes in Gram-positive bacteria. Transcriptome analysis based on RNA-Seq revealed overexpressed genes in strain PD653 following exposure to HCB. Based on *in silico* annotation, three open reading frames (ORFs) were selected as biodegrading-enzyme candidates. Cloning and expression of the candidate genes by recombinant *E. coli* cells, it was demonstrated that approximately $9.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ of PCP was degraded in 2 h. Therefore, we designated these genes as *hcbB1B2B3*. Interestingly, PCP-degrading activity was recorded when *hcbB3* was co-expressed with *hcbB1* or *hcbB2*, and the function of HcbB3 was expected to be similar to chlorophenol 4-monooxygenase (TftD).

These results improve our understanding of the protein families involved in the dechlorination of HCB and PCP.