

第2章 新規 **carbazole** 資化菌の取得と遺伝学的解析

2-1. 緒言

他の ROS と比較し、CARDO は幾つかの興味深い特徴を有している。現在までに数例しか報告がなされていない **angular dioxygenation** を触媒することがその特徴の1つである。また、CARDO は基質特異性が広く、基質の化学構造によって **lateral dioxygenation (cis-dihydroxylation)**、**monooxygenation**、**angular dioxygenation** を触媒できることも注目すべき特徴の1つである。一般に、分子系統学的に近縁な **terminal oxygenase** コンポーネントを持つものの殆どは ROS の分類 (Table 1-4)において同じ **class** に分類される。しかし、CARDO においては、CA10 株、J3 株の CARDO と KA1 株の CARDO はその電子伝達コンポーネントの違いから、それぞれ **class III** と **classIIA** に分類されるが[Inoue et al., 2004、Urata et al., 2006]、このような二つの **class** に渡る多様性が存在することも CARDO の珍しい特徴といえる。

このように、**carbazole** 分解系遺伝子・酵素の研究は、環境修復や物質生産を目指した応用面だけでなく、学術面においても有意義である。それにもかかわらず、**carbazole** 代謝系遺伝子・酵素の分子生物学的な解析例は、当研究室で行われてきた CA10 株の先駆的な研究例を除いてほとんどないのが現状である。そこで、本章では、新規 **carbazole** 代謝系遺伝子・酵素の取得を目的として、日本全国各地より採取したサンプルから新規 **carbazole** 資化菌を単離した。また、新たに得られた **carbazole** 資化菌について属種の同定を行い、さらにそれらが持つ **car** 遺伝子群についても解析を行った。得られた新規 **carbazole** 資化菌のうち、グラム陽性 **carbazole** 資化菌としては、当時、遺伝学的な解析を行った唯一の例となった *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株の **carbazole** 以外の芳香族化合物資化能力についても解析を行った(2006 年には、Santos らにより他のグラム陽性細菌 **carbazole** 資化菌[*Gordonia* 属]が報告された)。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 試薬

基質として用いた carbazole や他の芳香族化合物は SIGMA-ALDRICH, Inc. (MO, USA)、Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)、及び Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) の製品を用いた。*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)の製品を用いた。本研究で使用した制限酵素及びその他の酵素類は、Taka-Bio Co., Ltd. (Kyoto, Japan)、Toyobo Co., Ltd. (Osaka, Japan)、New England Biolabs, Inc. (MA, USA)社のいずれかのものを購入し、説明書に従って用いた。その他、用いた試薬・キット類については、各実験の方法と同時に記述した。次章以降においても、「試薬」については本項と同様のため、記述を省略した。

2-2-2. 菌株、プラスミド、及び培養液

本章で使用した菌株及びプラスミドを Table M2-1 に示した。*Escherichia coli* DH5α 株は遺伝子操作の宿主として用いた。プラスミド pBKA104、pBKA105 は本章 2-2-6、2-2-8~11 に従って、pBKA102 (Inoue et al., 2004) から構築した。pBKA104、pBKA105 は、それぞれ、pBKA102 のインサート 5.7-kb *Hind*III-*Eco*RI 断片(ORF10~7、*carR*、*carAa* の一部を含む)、pBKA102 のインサート 4.5-kb *Xho*I-*Hind*III 断片(*carRAaBaBbCAc* を含む)を pBluescript II SK(-)のマルチクローニングサイトに挿入することで作成した。*E. coli* 用の培地として LB broth [Sambrook and Russel, 2001]を用いた(Table M1)。培地には、必要に応じて ampicillin (Ap)、X-Gal、及び、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)をそれぞれ終濃度 50 µg/ml、20 µg/ml、1 mM、となるように添加した。プレート作製時には細菌培地用の寒天を終濃度 1.6% (wt/vol)になるように添加した。また、carbazole 資化菌を培養、選択する培地としては、炭素源となる化合物を含まない培地である NMM2 (nitrogen plus mineral medium 2)、及び、炭素源と窒素源となる化合物を含まない培地である MM2(mineral medium 2) に、carbazole を dimethylsulfoxide (DMSO)に 0.04 mg/ml となるように溶解させ、疎水性フィルターで濾過滅菌したものを終濃度(1 mg/ml)となるように培地に添加したものを、NMM2 の寒天培地の上に重層したプレート培地を用いた。NMM2 及び MM2 培地の組成を以下に記す。IC177 株の生育基質の解析では、培地として NMM2 を使い、基質は carbazole と同様の操作で終濃度 100 µg/ml に調整した。ただし、DMSO の代わりに、anthranilic acid では dH₂O、dibenzo-*p*-dioxin、pyrene、phenanthrene では *N,N*-dimethylformamide を用いた。

・ NMM2

Na ₂ HPO ₄	2.2 g/L
KH ₂ PO ₄	0.8 g/L
NH ₄ NO ₃	3.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/L
CaCl ₂	0.01 g/L

・ MM2

Na ₂ HPO ₄	2.2 g/L
KH ₂ PO ₄	0.8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/L
CaCl ₂	0.01 g/L

Table M2-1. 本章で用いた菌株およびプラスミド。

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> ($\phi 80$, <i>lacZ</i> $\Delta M15$), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Toyobo
<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	Car ⁺ ^a	Ouchiyaama et al. (1993)
<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	Car ⁺ ^a	Habe et al. (2002)
<i>Sphingomonas</i> sp. CB3	Car ⁺ ^a	Kilbane et al. (2002)
<i>Acinetobacter johnsonii</i> IC001	Car ⁺ ^a	This study
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> IC017	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC033	Car ⁺ ^a	This study
<i>Burkholderia</i> sp. IC049	Car ⁺ ^a	This study
<i>Acromobacter xylosoxidans</i> sp. IC074	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC075	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC081	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC097	Car ⁺ ^a	This study
<i>Erythrobacter</i> -like sp. IC114	Car ⁺ ^a	This study
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> IC129	Car ⁺ ^a	This study
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> IC138	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas wittichii</i> IC145	Car ⁺ ^a	This study
<i>Janthinobacterium</i> sp. IC161	Car ⁺ ^a	This study
<i>Nocardioides aromaticivorans</i> IC177	Car ⁺ ^a	This study
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> IC193	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC209	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC258	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC268	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC273	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC290	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC291	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC300	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC306	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC315	Car ⁺ ^a	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. IC321	Car ⁺ ^a	This study
<i>Marinobacterium</i> sp. IC961	Car ⁺ ^a	This study
<i>Marinobacterium</i> sp. IC977	Car ⁺ ^a	This study
Plasmids		
pBluescript II SK(-)	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	Stratagene
pT7Blue(R)	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Novagen
pUCA1	Ap ^r , pUC119 with 6.9-kb <i>EcoRI</i> insert of CA10 DNA	Sato et al. (1997b)
pBKA102	Ap ^r , pBluescript II SK(-) with 8.7-kb <i>HindIII</i> insert of KA1 DNA	Inoue et al. (2004)
pBKA104	Ap ^r , pBluescript II SK(-) with 4.5-kb <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> insert of KA1 DNA	This study
pBKA105	Ap ^r , pBluescript II SK(-) with 4.5-kb <i>XhoI</i> - <i>HindIII</i> insert of KA1 DNA	This study
pTCB001	Ap ^r , pT7Blue(R) with 0.9-kb PCR-amplified DNA fragment containing partial <i>carAa</i> gene of CB3	This study
pT177001	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.1-kb PCR-amplified DNA fragment containing partial <i>carAaC</i> genes of IC177	This study

^a Car⁺ は carbazole を唯一の炭素源、窒素源、エネルギー源として生育可能であることを示す。

2-2-3. Carbazole 資化菌の単離

全国各地から活性汚泥、土壌、海洋土壌など 71 サンプルを MM2 + carbazole 液体培地に 1 g もしくは 1 ml づつ加え、細菌の生育がみられた培養液は以下に示す方法で資化菌の単離を行った。

操作

- ①培養液中の carbazole 資化菌の population をあげるため、最低 3 回の植継ぎ(1/100 量)を行った。その後、菌の生育が観察された培養液を 10^{-1} ~ 10^{-8} まで希釈したサンプルを調製し、MM2 + carbazole 重層プレートに 100μ ずつ spread し、 30°C で incubate した。ただし、海洋サンプルについてはろ過滅菌した海水 + carbazole 重層プレートを用い、培養は 25°C で行った。
- ②Carbazole 重層プレートは白濁しているので、プレートに carbazole 資化菌が生えたと、クリアゾーンを形成する。クリアゾーンを形成したシングルコロニーをランダムに 16 個選び出し、MM2 + carbazole 重層プレートに線引きした。
- ③コロニーを顕微鏡で観察し、形状が同じもの同士で分類し、分類群の代表 1 つを carbazole 重層プレートに streak した。
- ④クリアゾーンを形成したシングルコロニーを今度はブイヨンプレートに streak し、生えてきたコロニーが単一の種であるかどうかを確認するため、コロニーを顕微鏡で観察した。
- ⑤ブイヨンプレートに生えたシングルコロニーを carbazole 重層プレートに streak した。
- ⑥④と⑤の行程をもう一度繰り返し行い、carbazole 重層プレートにクリアゾーンを形成したシングルコロニーだけを単菌とした。単離が不可能だったサンプルは carbazole 分解菌群として後の解析に用いた。

2-2-4. Carbazole 資化菌からの total DNA の調製

Current Protocols in Molecular Biology [Ausubel *et al.*, 1990]に従って行った。

試薬

- Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl solution

4.1% (w/v)	NaCl
10% (w/v)	CTAB
- 5 M NaCl
- TE buffer
- フェノール/クロロホルム
- 10%(w/v) SDS
- 2-Propanol
- $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteinase K solution
- クロロホルム
- 70% ethanol

操作

- ①各 carbazole 分解菌を 5 ml の LB 培地に、分解菌群は MM2 + carbazole 培地に植菌して、 30°C で振盪培養した (300 stroke/min、20 h)。
- ②2 ml の培養液を 2 ml 容チューブに移し、13,000 rpm、RT で 2 min 遠心して集菌し、567 μl の TE buffer に懸濁した。

- ③10% SDS を 30 μ l、proteinase K solution を 3 μ l 加えて、小型回転培養器 (TAITEC RT-5) で 30 min 穏やかに (強度の目盛りは 3~4) 攪拌して、37°C で 1 時間 incubate した。以後攪拌はすべてこの小型回転培養器を用いて同様に行った。
- ④5 M NaCl を 100 μ l 加えて 15 min 攪拌する。さらにあらかじめ 65°C に温めた CTAB/NaCl solution を 80 μ l 加えて 15 min 攪拌し、65°C で 10 min incubate した。
- ⑤クロロホルムを 800 μ l 加えて、15 min 攪拌し、13,000 rpm、RT で 5 min 遠心する。その後上層 400 μ l を新しい 2 ml チューブに取った。
- ⑥フェノール/クロロホルムを 400 μ l 加え、15 min 攪拌し、13,000 rpm、RT で 5 min 遠心して上層 300 μ l を新しい 1.5 ml チューブに取った。
- ⑦2-Propanol を 300 μ l 加え、30 min 攪拌した後、13,000 rpm、RT で 10 min 遠心して、70% ethanol でリンス、dry up した。
- ⑧沈殿を終濃度 1 μ g/ml の RNaseA を含む TE buffer 100 μ l に溶解し、37°C で 1 h 反応させる。使用時まで -20°C で保存した。

2-2-5. Polymerase chain reaction (PCR)

<反応系>

PCR は ExTaq Hot Start Version (Takara-Bio) を DNA polymerase として用い添付のプロトコールに従って行った。

DNA template	適当量
Primer (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l each
10 x ExTaq buffer	10 μ l
2.5 mM dNTP	8 μ l
DNA polymerase	0.5 μ l

dH₂O を加え、total 100 μ l にした。

<PCR 反応>

PCR には Thermal Cycler Dice mini (Takara-Bio) を用い、次の条件で行った。

96°C	1 min	} 30 cycles
96°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	(増幅断片の長さによる。約 1 kb で 1 min)	
72°C	6 min	
4°C	Hold	

ただし、16S rDNA の増幅と degenerate PCR (*carAa* 増幅)では以下の条件で行った。

16S rDNA 増幅

95°C	3 min	} 30 cycles
95°C	1 min	
50°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	7 min	
4°C	Hold	

Degenerate PCR

96 °C	5 min	} 30 cycles
96 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	8 min	
4 °C	Hold	

また、16S rDNA の増幅には Polz et al. (1998) に、degenerate PCR には Habe et al. (2002) に記されているプライマーを用いた。サザン解析のプローブ作成に用いた KA1 株の *carR*、*carAa*、*carAc* 遺伝子増幅用のプライマーの配列と併せて以下に配列を記した。

16S rDNA 用プライマー (大腸菌では 16S rDNA の 5' 末端側から 27~1492 番目の塩基が増幅する)

Forward: 5'-AGAGTTTGATC[A/C]TGGCTCAG-3'

Reverse: 5'-TACGG[T/C]TACCTTGTTACGACTT-3'

carAa 縮重プライマー

Forward: 5'-TA[C/T]CACG[G/C]GTGGACCTAT-3'

Reverse: 5'-CTC[A/G][G/C][A/C]AGCT[G/T]G[A/C]GCCAT-3'

KA1 株 *carR* 用プライマー

Forward: 5'-ATCCGGAAGGTCAGCAAAAA-3'

Reverse: 5'-TTTCAACGACCATGACTTCG-3'

KA1 株 *carAa* 用プライマー

Forward: 5'-TAACCAACCATCAATCGCC-3'

Reverse: 5'-TCAACGTGCTTCCTGAATGC-3'

KA1 株 *carAc* 用プライマー

Forward: 5'-CAAAGGTCCGCGTGATCTT-3'

Reverse: 5'-TCATGACTGTGCCTTCGGCA-3'

2-2-6. 電気泳動、及び、アガロースゲルからの DNA の回収

アガロース電気泳動用のゲルの作成には、Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer と 1% アガロース ME (Nacalai Tesque) を用いた。泳動には、ミュービッド小型電気泳動層 (ADVANCE Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、50 もしくは 100 V で行った。マーカーとしては Marker 5、Marker 6 (ニッポンジーン) を用いた。アガロースゲルからの DNA の回収には ConcertTM Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL, U. K.) もしくは QIAEX II DNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、操作手順は添付のプロトコールに従った。

2-2-7. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

本章 2-2-5. の方法に従って調製した各カルバゾール資化菌由来 rDNA PCR 増幅断片を制限酵素 *Hae*III、*Hha*I、*Sau*3AI でそれぞれ処理し、各 DNA 断片を 3% アガロースゲル (アガロース ME; Nacalai Tesque 製) にて電気泳動を行った。

2-2-8. Ligation

シーケンス解析を行うため、PCR にて増幅させた DNA 断片は pT7Blue T-vector (Novagen、Madison、Wisconsin、USA) に組み込んだ。Ligation には Ligation High (Toyobo Co., Ltd. Osaka、Japan) を用い、操作は添付のプロトコールに従って行った。

2-2-9. コンピテントセルの調製

基本的に細胞工学実験プロトコール (p. 111-113) [東京大学医科学研究所制癌研究部編、1993]に従い、培養時間・温度などを一部変更したプロトコールで行った。

試薬

・ Φa plate

Yeast extract	5.0 g/L
Tryptone peptone	20 g/L
MgSO ₄ /7H ₂ O	5.0 g/L
精製寒天末	1.6 g/L

・ Φb plate

Φa に精製寒天末を入れないもの

・ Tfb I

30 mM	KOAc
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15% (v/v)	Glycerol

氷酢酸を用いて pH 5.8 に調整。

・ Tfb II

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15% (v/v)	Glycerol

KOH を用いて pH 6.5 に調整。

操作

- ① Φa plate で over night(O/N)培養した *E. coli* DH5α株の single colony を Φb 培地 5 ml に植菌し、37°C で O/N、300 strokes/min で振盪培養した。
- ② 前培養液を 100 ml の Φb 培地に移し、18°C、120 rpm/min で約 24 時間振盪培養した(OD = 約 0.5)。
- ③ 培養液を 5 min 氷冷し、遠心 (3,000 rpm、5 min、4°C) して集菌した。
- ④ 菌体に Tfb I を 40 ml 加えて懸濁し、5 min 氷冷後、遠心して集菌した。
- ⑤ 菌体に Tfb II を 4 ml 加えて懸濁し、15 min 氷冷後、50 μl ずつ分注し、その直後に液体窒素で急凍結させ、使用時まで -80°C で保存した。

2-2-10. 大腸菌の transformation

Hanahan の方法[Hanahan, 1983]に基づき、細胞工学実験プロトコール (p. 131-133) に従って行った。

試薬

- ・ SOC 培地

2.0% (w/v) Tryptone peptone

0.5% (w/v) Yeast extract

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

操作

- ①氷上で融解させたコンピテントセル 50 µl にプラスミド溶液を 1~5 µl 加え、氷上で 30 min 静置した。
- ②42°C、90 sec の heat shock を与えて、氷上に 2 min 静置した。
- ③SOC を 1 ml 加えて、37°C で 20~60 min 振盪培養 (300 strokes/min) した。
- ④適当な抗生物質、X-Gal、IPTG を含む平板培地に培養液を塗り広げ、37°C で O/N 培養した。

2-2-11. 大腸菌からのプラスミド抽出

<遺伝子操作用のプラスミドの抽出>

試薬

- ・ TEG (solution I)

1 M Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 ml

0.5 M EDTA (pH 8.0) 2.0 ml

0.6 g のグルコースを加えて蒸留水で 100 ml に fill up し、オートクレーブ後、冷蔵保存した。

- ・ 0.2 N NaOH 1% SDS (solution II)

10% SDS 100 µl

10 N NaOH 200 µl

蒸留水で 1 ml に fill up して、vortex で攪拌した。(用事調製)

- ・ 5 M Potassium acetate (KOAc) (solution III)

KOAc 24.9 g と氷酢酸 11.5 ml を蒸留水で 100 ml に fill up 後、オートクレーブして冷蔵保存した。

- ・ TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1.0 ml

1 mM EDTA (pH 8.0) 0.2 ml

蒸留水で 100 ml に fill up し、オートクレーブ後常温保存した。

- ・ 10 µg/ml RNase solution (ニッポンジーン)

- ・ フェノール/クロロホルム

フェノール 500 g

8-Quinolinol 0.5 g

TE buffer 適量

クロロホルム 適量

68°Cの水浴で融解したフェノールに、8-quinolinol を加えて、フェノールと等量の TE buffer を加えて約 1 h 攪拌した。その後 TE buffer を取り除いて、新しい TE buffer を加えて同様の操作をした。この下層と等量

のクロロホルムを混合し、常温保存した。

- ・ 70% Ethanol

-20℃保存した。

操作

- ①5 ml の LB (Ap 50 µg/ml) に大腸菌を植菌し、37℃、300 stroke/min で 6-12 h 振盪培養した。
- ②2 ml の培養液を 2 ml 容チューブに移し、遠心して (4℃、13,000 rpm、2 min) 集菌した。
- ③上清の培地成分をできる限り除いた後、200 µl の solution I に vortex でよく懸濁した。
- ④Solution II を 300 µl 加えて、軽く混合し、氷上で 5 min 静置した。
- ⑤Solution III を 300 µl 加えて混合し、氷上で 5 min 以上静置した。
- ⑥フェノール/クロロホルムを 600 µl 加えて vortex で 1 min 混合した。
- ⑦15,000 rpm 室温、5 min 遠心して、上清 700 µl を新しい 1.5 ml 容チューブに取った。
- ⑧2-propanol を 700µl 加えて vortex で良く混合した後、13,000 rpm、RT、3 min 遠心し、上清を捨てた。
- ⑨70% Ethanol でリンスし、dry up 後、100 µl の終濃度 100 µg/ml の RNase を含む TE buffer に溶解させて 37℃ で 1 時間 incubate した。
- ⑩DNA solution は-20℃保存した。

<シーケンスに用いるプラスミドの抽出>

プラスミド抽出用キット Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD)を用いて行った。

試薬

- ・ Resuspension solution
- ・ Lysis solution
- ・ Neutralization solution
- ・ Quantum prep Matrix
- ・ Wash buffer

※全て Kit 付属のものを用いた。

※Wash buffer には開封時に 63 ml の 99% ethanol を加えた。

- ・ TE buffer

操作

- ①LB 培地で *E. coli* を培養し (300 rpm、37℃、overnight)、培養液を 2 ml 容マイクロチューブに入れ、遠心 (13,000 rpm、1 min、RT) で集菌した。
- ②Resuspension solution を 200 µl 加え、vortex で完全に懸濁した。
- ③Lysis solution を 250 µl 加え、5~6 回 invert によって穏やかに混合した。
- ④Neutralization solution を 250 µl 加え、5~6 回 invert によって穏やかに混合した。
- ⑤遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) し、上清を Wash tube に乗せたスピンドフィルターに移した。
- ⑥⑤に vortex で懸濁した、Quantum prep Matrix を 200 µl 加え、pipeting によって良く混合した。その後、遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) し、Wash tube 内の液体を捨てた。
- ⑦再び Wash tube に乗せたスピンドフィルターに、500 µl の Wash buffer を加え、遠心 (13,000 rpm、1 min、RT) した。
- ⑧スピンドフィルターをプラスミド回収チューブにのせ、あらかじめ 70℃ に温めておいた TE buffer を 100 µl

加えた後、遠心（13,000 rpm、2 min、RT）して溶出液を回収した。

⑨Ethanol 沈殿し、400 μ l の 70% ethanol でリンスしたのち、10 μ l の蒸留水に溶解させ使用時まで-20°C で保存した。

2-2-12. シークエンス解析

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を用いた。操作手順は添付の操作ガイド（2000 年 8 月版 Rev. 4.0）に従った。

試薬

- ・ BigDye Primer Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（PE Biosystems Japan）
- ・ 10 x EDTA buffer（PE Biosystems Japan）
- ・ Performance Optimized Polymer 6 (POP6)（PE Biosystems Japan）
- ・ Template Suppression Reagent (TSR)（PE Biosystems Japan）

<反応系>

DNA template	500 ng
Primer (3.3 pmol)	1 μ l
Premix buffer	4 μ l
5x sequencing buffer	2 μ l

蒸留水で total 20 μ l とした。

<シークエンス反応>

シークエンス反応を行う Thermal Cycler には 2-2-5 と同じものを用い、次のようなプログラムで行った。

96°C	10 sec	} 25 cycles
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	Hold	

PCR 終了後、dH₂O を 16 μ l、99.5% ethanol を 64 μ l 加えて室温で 15 min 静置した後、室温、15,000 rpm、15 min 遠心し、上清を取り除いた。その後、70% ethanol 250 μ l でリンスし、dry up して、15 μ l の TSR に溶解させた。シークエンサーにセットする直前に 95°C で 3 min 加温し、氷上で急冷して変性させた。

<シークエンスデータの解析>

シークエンス解析により得られた塩基配列の解析には DNASIS-Mac software (version 3.7、Hitachi Software Engineering, Co. Ltd.、Yokohama、Japan) を用いて行った。

<相同性検索>

相同性検索は DDBJ/EMBL/GenBank DNA database の BLASTn、及び BLASTp を利用した。

<alignment 解析>

本研究で見いだされた ORF の推定アミノ酸配列の alignment 解析は DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)の ClustalW を用いて行った。

<系統樹作成>

DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)の ClustalW のプログラムを用いて解析し、TreeView のプログラム[Page et al. 1996]を用いて作成した。

2-2-13. サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションには non-Radioactive Digoxigenen (DIG) DNA 標識及び検出キット (Roche Diagnostics, Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、そのプロトコールに従って操作を行った。メンブレンには PALL BYODYN® B MENBLANE を用いた。*car*_{CA10} probe、*car*_{KA1} probe はそれぞれ pUCA1 のインサート 6.9-kb *Eco*RI 断片(*carAaAaBaBbCAc* を含む)、pBKA105 (本論文 2-2-2)のインサート 4.5-kb *Xho*I-*Hind*III 断片(*carRAaBaBbCAc* を含む)を各プラスミドの制限酵素処理断片をゲル抽出(2-2-6)により精製したものを用いた。KA1 株の *carR*、*carAa*、及び *carAc* のプローブを作成する際は、それぞれの DNA 断片を PCR により、2-2-5 に示したプライマーと PCR の方法を用いて増幅させた DNA 断片を用いた。CB3 株の *carAa* のプローブは、CB3 株の total DNA から *carAa* 縮重プライマーを用いて増幅させた断片を pT7Blue(R)ベクターに組み込んだプラスミド pTCB001 のインサート(2-2-12 の方法によりデータベース[accession no. AF060489]と配列が一致することを確認)の DNA 断片を用いた。

<プローブの作成>

試薬

- 10 x Hexanucleotide solution
- 10 x DIG DNA labeling mixture (dNTP)
- Klenow fragment
- 0.5 M EDTA
- 5 M NaCl
- Ethachinmate (ニッポンジーン)
- TE buffer

操作

- ①DNA fragment solution 5 µl を 10 min、98℃で incubate し、氷上で 5 min 急冷した。
- ②2 µl の 10 x Hexanucleotide solution、2 µl の 10 x DIG DNA labeling mixture、10 µl の滅菌水、1 µl の Klenow fragment を加えて 37℃で 20 h incubate した。
- ③8 µl の 0.5 M EDTA、2 µl の 5 M NaCl、1 µl の Ethachinmate、100 µl の 99% ethanol を加えて-80℃で 0.5 h 冷却した。
- ④15,000 rpm、4℃、15 min 遠心して、70% ethanol でリンス、dry up 後、0.1% SDS とした TE buffer 50 µl に溶かした。
- ⑤68℃で 30 min 加温した。
- ⑥ハイブリダイゼーションの使用前に 98℃で 10 min、incubate して使用した。

<ハイブリダイゼーション>

試薬

- Denaturation buffer
 - 0.5 M NaOH
 - 1.5 M NaCl

常温保存した。

- Neutralization buffer

0.5 M	Tris
3 M	NaCl

HCl で pH 7.0 に調整して、常温保存した。

- Buffer 1

0.1 M	Maleic acid	11.6 g
0.15 M	NaCl	8.77 g

NaOH で pH 7.5 に調整し、オートクレーブ、常温保存した。

- Blocking stock solution

Blocking reagent を Buffer 1 で 10% (w/v) となるように、熱を加えながら攪拌して溶解させた後、オートクレーブした。その後冷蔵保存した。

- Buffer 2

Blocking stock solution を Buffer 1 で 10 倍希釈したものを用事調製した。

- 20 x SSC

3 M	NaCl	350.6 g
0.3 M	Na ₃ · citrate · 2 H ₂ O	176.4 g

1.5 L の蒸留水に溶解後、2 L に fill up した。常温保存した。

- Hybridization buffer

5 x SSC	
1% (w/v)	Blocking stock solution
0.1% (w/v)	N-Laurorylsarcosine
0.2% (w/v)	SDS

-20℃で保存した。

- Buffer 3

0.1 M	Tris
0.1 M	NaCl

1 M の Tris-HCl 50 ml を 400 ml の蒸留水で希釈し、NaCl 2.93 g を溶かした後、1 N の NaOH を用いて pH 9.5 に調整した。500 ml に fill up し、filtration をした後、室温保存した。

- EDTA

- 抗体 (Anti-digoxigenin fragment)

- 発色溶液

NBT/ solution	X-Phosphate	200 µl
------------------	-------------	--------

10 ml の Buffer 3 に溶解して用いた。暗所にて用事調製した。

操作

ゲルからメンブレンへの transfer については、VacuGene XL Vacuum Blotting System (Amersham Biosciences、LTD.、Buckinghamshire、UK)を用いて行い、操作手順はそのプロトコールに従った。

①Hybridization に供する DNA を各種制限酵素で切断して、TAE を buffer として、アガロースゲル電気泳動を行った。その後エジチウムブロマイドで染色して、UV を照射下で写真を撮った。

②ゲルを VacuGene XL Vacuum Blotting System にセットし、0.2 N の HCl をゲルの表面を覆う様に加え、15 min、50 HPa の圧力で静置した。

③ゲル表面より HCl 液を除いた後、Denaturation buffer を加えて、同様に 15 min 静置した。

④同様にして Neutralization buffer を加えて 15 min 静置した後、ゲル高の 2 倍程度の位置まで 20 x SSC buffer で浸るように加えて 60 min 静置した。

- ⑤メンブレンを取り出して、UV を 5 min 当てた。
- ⑥シールドパック中で 100 cm²あたり 20 ml の hybridization buffer を用いて 68℃で 1h prehybridization を行った。
(以後、反応液に加える液量はメンブレン 100 cm²あたりの量で示す。また、hybridization の条件は、特に明記しない限り 68℃で行った。)
- ⑦1 ml あたり 1 μl のプローブを加えた hybridization buffer 15 ml と prehybridization buffer を交換し、68℃で 6 h 以上 incubate した。
- ⑧Hybridization 終了後、メンブレンを RT で終濃度 0.1% (w/v) の SDS を加えた 2 x SSC で 5 min 洗浄した (2 回)。
- ⑨同様に 0.1% (w/v) SDS を加えた 0.1 x SSC で 68℃、15 min 洗浄した (2 回)。
- ⑩Buffer 1 でメンブレンを 1 min 洗浄した。
- ⑪約 100 ml の Buffer 2 で 30 min、RT で incubate した。
- ⑫抗体溶液を Buffer 2 で 150 mU/ml となるように希釈した希釈抗体溶液で、RT で 30 min、incubate した。
- ⑬未結合抗体を Buffer 1、100 ml で激しく攪拌しながら 15 min 洗浄した (2 回)。
- ⑭メンブレンを Buffer 3、20 ml で 2 min 平衡化させて (pH 7.5→9.0)、hybridization pack に入れて暗冷化で発色溶液 10 ml と共に平らな場所に静置した。
- ⑮望ましいシグナルが得られたら、メンブレンを取り出して、TE buffer 50 ml で洗浄した (3 回)。
- ⑯メンブレンを乾燥させて保存した。

2-2-14. 唯一の炭素源として利用可能な化合物の探索

IC177 株と CA10 株が唯一の炭素源、エネルギー源として生育に利用できる芳香族化合物の探索には NMM2 培地を用いた。基質には xylene、toluene、phenol、benzoic acid、salicylic acid、gentisic acid、phthalic acid、protocatechuic acid、anthranilic acid、naphthalene、biphenyl、dibenzofuran、dibenzo-*p*-dioxin、dibenzothiophene、dibenzothiophene sulfone、fluorene、9-fluorenone、indole、及び、carbazole を用いた。これらの化合物の化学構造を Fig. M2-1 に示した。菌体を炭素が含まれない NMM2 にて 1 週間培養し飢餓状態になった菌体を調整した。その菌体約 10³ 個を 5 ml の NMM2 に各基質を加えた培地に植菌し、1 及び 3 週間 30℃で培養した。培養液を 10~10⁴ に希釈し、LB プレート培地に 50 μl 塗布して 30℃で培養した後、形成されたコロニーの数を数えることで生育の有無を確認した。

2-2-15. GC-MS を用いた IC177 株による carbazole 分解の解析

IC177 株の carbazole を唯一の炭素源・エネルギー源とする培地で生育した株数、及び、carbazole の経時的分解には 200 ml の NMM2 に、終濃度 0.1% (w/v) となるように carbazole を添加したもの(NMM2 + carbazole)を用いた。IC177 株は 5 ml の NMM2 + carbazole にて 3 日間培養した菌体約 10³ 個を、上記 200 ml の培地に植菌した時点から測定を開始した。

<生育曲線の作成>

操作

- ①植菌から 12 時間おきに採取した培地を 10⁵~10⁸ に希釈して LB プレート培地に塗布し、30℃で静置培養した。
- ②プレートに生育したコロニーの数を数え、1 ml あたりの生菌数を colony forming unit (cfu)として算出した。

< carbazole 分解の経時的なモニタリング>

- ①<生育曲線の作成>で記したものと同一サンプル、すなわち植菌から 12 時間おきに採取した培地 1 ml に内部標準物質として用いた **dibenzo-*p*-dioxin** を終濃度 0.01% (w/v) となるように加え、1 ml の酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムでサンプル中の水を除いた。
- ②酢酸エチル抽出液 10 μ l をアスピレーターを用いて蒸発乾固させ、そこに 10 μ l の MSTFA を加えて vortex mix した後、70°C で 20 分間 incubate した。
- ③調製したサンプル 1 μ l を CG-MS (model JMS-Automass 150; JEOL, Tokyo, Japan) に供した。キャピラリーカラムは J&W Scientific 社 (California, USA) 製 DB-5 (内径 0.25 \times 15 m、フィルム厚 0.25 μ m) を用いた。各サンプルは 80°C で splitless mode にて inject し、80°C で 2 分 \rightarrow 280°C まで 16°C/min の昇温プログラムで行い、ヘリウムガスの head pressure は 65 kPa とした。培地中に残存する carbazole 量を評価するために、carbazole の total ion current におけるピーク面積と内部標準物質 **dibenzo-*p*-dioxin** のピーク面積とを比較した。購入した carbazole を標準物質として用いて保持時間とマススペクトル情報を求め、サンプルのそれと比較した。休止菌体反応の基質変換効率は、「反応生成物の 2'-aminobiphenyl-2,3-diol のピークエリア値/(carbazole のピークエリア値 + 2'-aminobiphenyl-2,3-diol のピークエリア値) \times 100 (単位は%)」として算出した。

2-2-16. Carbazole 代謝中間体の同定

IC177 株の carbazole 分解時に生成される中間代謝物を同定するため、GC-MS による解析を行った。

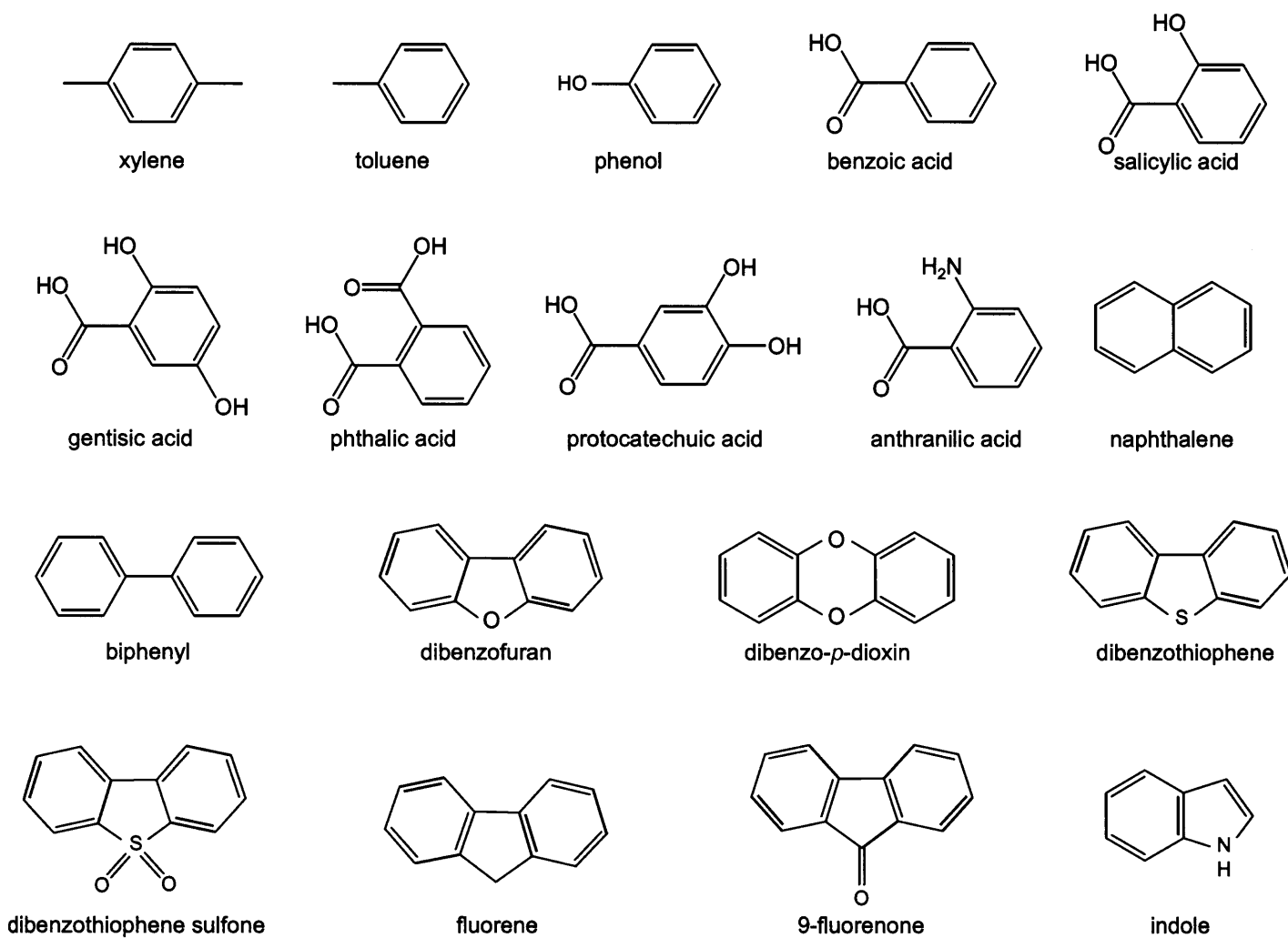


Figure M2-1. IC177株、CA10株が唯一の炭素源として利用可能な化合物の解析に用いた基質の化学構造。

操作

- ① **Carbazole** を終濃度 0.1% 含む **MM2** 培地 5 ml にて **IC177** 株を 30℃ で 4 日間培養した。
- ② 培地を 1 N の **HCl** を用いて pH 3 になるまで酸性にし、5 ml の酢酸エチルで抽出した後、無水硫酸ナトリウムで水を除いた。
- ③ ②のサンプルを 2-2-15 に示した方法で **GC-MS** に供した。

2-2-17. 塩基配列の accession numbers

本研究で得られた塩基配列情報のうち **Table M2-2** に示したものは **DDBJ**、**EMBL**、**GenBank nucleotide sequence databases** に登録した。

Table M2-2. 本章の研究で登録された塩基配列の accession no.。

由来株名	accession no.
16S rRNA	
IC001	AB196244
IC017	AB196245
IC033	AB196246
IC049	AB196247
IC074	AB196248
IC075	AB196249
IC081	AB196250
IC114	AB196251
IC138	AB196252
IC145	AB196253
IC161	AB196254
IC177	AB196255
IC193	AB196256
IC961	AB196257
Partial <i>car</i> gene homolog	
IC177	AB196258

2-3. 結果と考察

2-3-1. 新規 carbazole 分解菌及び分解菌群のスクリーニング

Carbazole を資化できる菌株を得るため、全国各地から採取したサンプル 71 種について、carbazole が唯一の炭素源、窒素源、エネルギー源となるような培地である MM2 + carbazole (0.1 %, w/v) 液体培地にて、30℃で培養を行った。また、海洋土壌サンプルについては、濾過滅菌した海水に 0.1 % (w/v)となるように carbazole を加えたものを培地とし、25℃で培養を行った。本実験により、27 株の carbazole 資化菌の単離に成功した。carbazole 分解は観察できたものの、単離には至らなかったサンプルは carbazole 分解菌群とし、16 種類得られた(それぞれ英文字と数字などの組み合わせ、G6、IT、TSH などと命名)。取得した carbazole 分解菌、菌群の取得に至ったサンプルの種類と大まかな採取地を Table 2-1 に示した。

2-3-2. 新規 carbazole 資化菌の属種の同定

新たに単離した carbazole 資化菌の属種を同定するため、Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)を行い、同属と考えられる菌株をグループ分けしたところ、単離した 27 株 (Table 2-2)は、14 種のグループ(A~N)に分けることができた(Fig. 2-1)。14 の各グループからそれぞれ代表を一株選び、その 16S rDNA 断片を pT7Blue T vector に組み込み、その塩基配列を決定し、相同性検索を行うことにより、属種を同定した(Table 2-2)。今回得られた carbazole 資化菌の 16S rDNA の塩基配列うち、C、F、G、J のグループの菌株は *Sphingomonas* 属細菌、B、N のグループの菌株は *Pseudomonas* 属細菌であること明らかとなったが、既知の carbazole 資化菌においてもこれらの属に分類される報告例が殆どである[Ouchiya et al., 1993; Hisatsuka and Sato, 1994; Gieg et al., 1996; Shepherd and Lloyd-Jones, 1998; Kirimura et al., 1999; Habe et al., 2002; Yoon et al., 2002; Kilbane et al., 2002]。一方、その他の A、E、H、L、M、N のグループの菌株(IC001 株、IC074 株、IC114 株、IC177 株、IC193 株、IC961 株)のものはそれぞれ *Acinetobacter*、*Acromobacter*、*Erythrobacter*、*Nocardioide*s、*Stenotrophomonas*、*Marinobacterium* 属細菌と高い相同性を示したが、これらの属に分類される carbazole 資化菌は現在までに得られていなかった。つまり、本研究により得られた菌株が分類される 6 属は carbazole 資化菌として得られたもののうち報告例が無いものであった。その中でも特に、IC177 株が属する *Nocardioide*s 属細菌は高 GC 含量の特徴を有する放線菌であり(Fig. 2-2)、グラム陽性の carbazole 資化菌についての遺伝学的な研究例がないことから、IC177 株の carbazole 分解に関わる遺伝子・酵素に興味を持たれた。*Nocardioide*s 属細菌の中には、2,4,6-trinitrophenol、2,4,5-trichlorophenylacetic acid、*p*-nitrophenol、phenanthrene、及び dibenzofuran などの芳香族化合物分解細菌として報告されているものが多数存在する [Golovleva et al., 1990; Rajan et al., 1996; Cho et al., 1998; Iwabuchi et al., 1998; Futamata et al., 2004]。

2-3-3. 新規 carbazole 資化菌が保持する car 遺伝子群の解析

2-3-3-1. サザン解析

新たに取得した carbazole 資化菌がどのような car 遺伝子群を保持するのかを明らかにするために、まずは、既知の car 遺伝子を保持するのかどうか調べた。各菌株から抽出した total DNA を *Eco*RI 処理したサンプルに対し、CA10 株と KA1 株の car 遺伝子群をプローブ(それぞれ *car*_{CA10} probe、*car*_{KA1} probe と命名; Fig. 2-3)としたサザン解析を行った。得られた carbazole 分解菌群に

Table 2-1. carbazole 分解細菌の取得に用いたサンプルの種類、採取場所 MM2 + carbazole 培地での生育、及び、単離した菌株名。

サンプルの種類	採取場所	生育の有無	菌株・菌群名
活性汚泥	北海道	+	G6
	福島	+	G5
	新潟	+	IT
	秋田 1	+	IC074、IC075
	秋田 2	+	IC209
	茨城	+	G8
	神奈川	-	
	名古屋 1	+	NA
	名古屋 2	+	G9
	富山 1	+	TM
	石川	+	IC258、IC268
	京都 1	+	KY
	大阪 1	+	IC081
	大阪 2	+	EB2
	大阪 3	+	IC290、IC291、IC300
	大阪 4	+	IC306、IC315
	大阪 5	+	IC017
	大阪 6	-	
	兵庫 1	+	IC097
	徳島	-	
土壌	愛媛	-	
	福岡 1	-	
	福岡 2	-	
	秋田 3	-	
	秋田 4	-	
	岩手	-	
	宮城	-	
	東京 1	+	IC001
	東京 2	+	AR
	東京 3	+	IC033
	富山 2	-	
	富山 3	-	
	富山 4	+	TH2
	京都 2	+	IC273
	京都 3	+	IC193
	京都 4	-	
	京都 5	+	IC049
	大阪 7	-	
	大阪 9	+	IC129、IC138
	兵庫 2	-	
	兵庫 3	+	IC145
	兵庫 4	+	IC161
	徳島 2	+	YS
	徳島 3	+	TSH
	佐賀	+	SG
	長崎 1	-	
	長崎 2	+	
	長崎 3	+	IC177
	長崎 4	+	
	熊本 1	+	KU1
	熊本 2	+	
	熊本 3	+	
marine soil	秋田 5	-	
	東京 4	-	
	広島 1	+	IC114、IC977
	広島 2	+	IC321、IC961
	広島 3	+	
	広島 4	-	
	広島 5	-	
	広島 6	-	
	広島 7	-	
	広島 8	+	
	広島 9	+	
	広島 10	-	
	広島 11	-	
	広島 12	-	
	広島 13	-	
	長崎 5	-	
	長崎 6	-	
	熊本 4	-	

Table 2-2. 新規 carbazole 資化菌の 16S rDNA の配列と最も相同性の高かった菌株と遺伝学的解析結果。

Strain	Closest phylogenetic relative			ARDRA	Hybridization
	%		accession no.		
IC001	99	<i>Acinetobacter johnsonii</i> S35	AB099655	A	-
IC017	99%	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> LMG 1225T	PPZ76666	B	CA10
IC033	99%	<i>Sphingomonas xenophaga</i>	AY611716	C	KA1 and CB3
IC049	92%	<i>Burkholderia</i> sp. NE-7	AY568508	D	CA10
IC074	99%	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ATCC 9220	AF411021	E	KA1
IC075	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. Y2	AB084247	F	KA1
IC081	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	AB064271	G	KA1 and CB3
IC097	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC114	99%	<i>Erythrobacter</i> -like sp. V4.BO.03	AJ244716	H	-
IC129	-	<i>Burkholderia</i> sp. ^a	-	I	-
IC138	93%	<i>Burkholderia</i> sp. NW-1	AY568509	I	-
IC145	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. J40	AB097175	J	KA1
IC161	96%	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3	AB097172	K	CA10
IC177	99%	<i>Nocardioide aromaticivorans</i> H-1	AB087721	L	-
IC193	99%	<i>Stenotrophomonas</i> sp. LMG 19833	AJ300772	M	KA1
IC209	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC258	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC268	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC273	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC290	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC291	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC300	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC306	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC315	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC321	-	<i>Sphingomonas</i> sp. ^a	-	F	KA1
IC961	99%	<i>Marinobacterium georgiense</i> IAM 1419T	AB021408	N	-
IC977	-	<i>Marinobacterium georgiense</i> ^a	-	N	-

^a 属の決定は ARDRA によるもので、シーケンス解析は行わなかった。

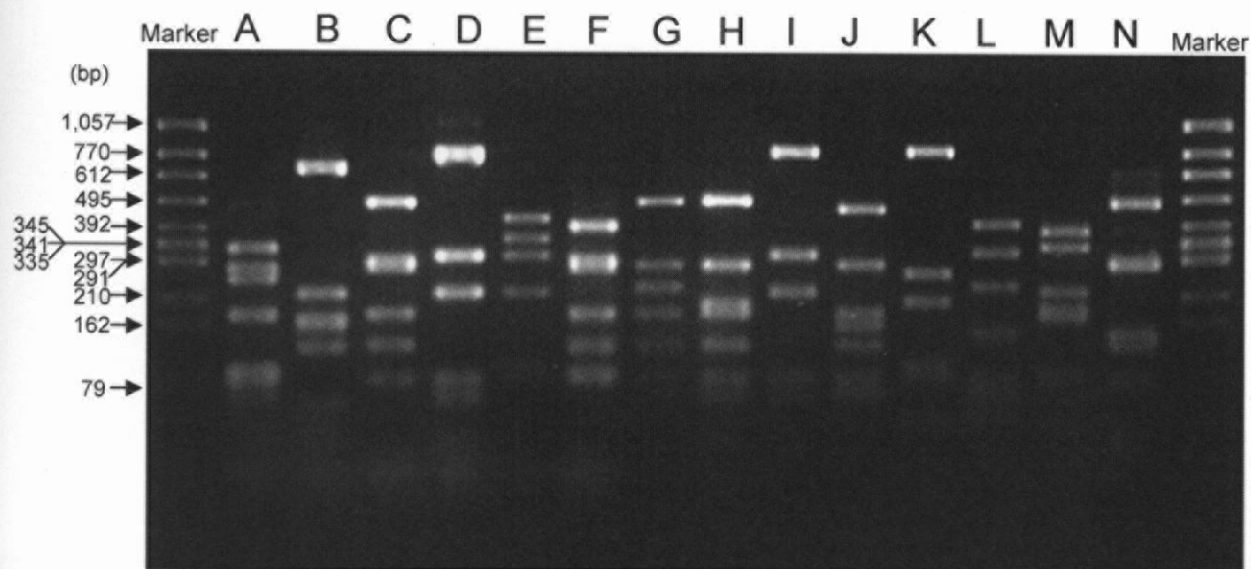


Figure 2-1. carbazole産生菌のARDRAパターン。各carbazole産生菌から抽出したtotal DNAを鋳型とし、PCRにより増幅させた16S rRNAのDNA断片をHaeIIIで処理し、電気泳動した。ここではHaeIIIで処理したもののみを示したが、それ以外にHhaIとSau3AIでもARDRAパターンを解析した。本研究で取得されたcarbazole産生菌は合計27株であったが、ARDRAのパターンから14種類に分類できた(A-N)。レーン: Marker、size marker ϕ X174 DNA digested with HincII; A、*Acinetobacter johnsonii* IC001; B、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* IC017; C、*Sphingomonas* sp. IC033; D、*Burkholderia* sp. IC049; E、*Achromobacter xylosoxidans* subsp. IC074; F、*Sphingomonas* sp. IC075; G、*Sphingomonas* sp. IC081; H、*Erythrobacter*-like sp. IC114; I、*Burkholderia vietnamiensis* IC129; J、*Sphingomonas wittichii* IC145; K、*Janthinobacterium* sp. IC161; L、*Nocardioides aromaticivorans* IC177; M、*Stenotrophomonas acidaminiphila* IC193; N、*Marinobacterium* sp. IC961.

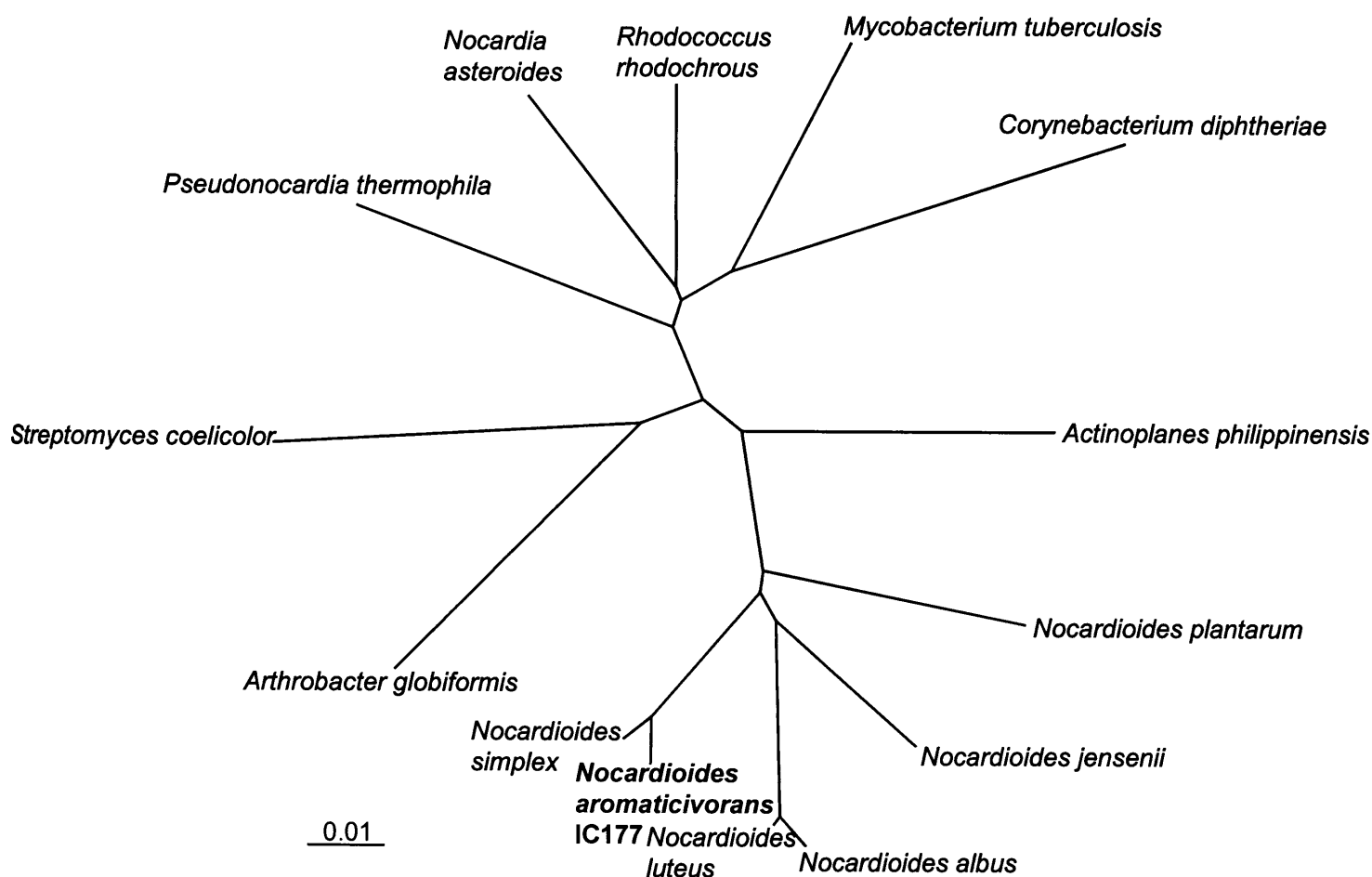


Figure 2-2. IC177株、*Nocardioides*属細菌の代表、及び他のアクチノマイセス群の細菌の分子系統学的分類の位置を示す無根系統樹。系統樹に用いたGenBankに登録されている16S rDNA 配列のaccession numberを以下に示す。*Actinoplanes philippinensis* (D85474)、*Arthrobacter globiformis* (M23411)、*Corynebacterium diphtheriae* (X84248)、*Mycobacterium tuberculosis* (X52917)、*Nocardia asteroides* (X84850)、*Nocardioides albus* (AF005001)、*Nocardioides jensenii* (AF005006)、*Nocardioides luteus* (AF005007)、*Nocardioides simplex* (AF005013)、*Nocardioides plantarum* (X69973)、*Pseudonocardia thermophila* (AJ252830)、*Rhodococcus rhodochrous* (X79288)、*Streptomyces coelicolor* (Z76678)。

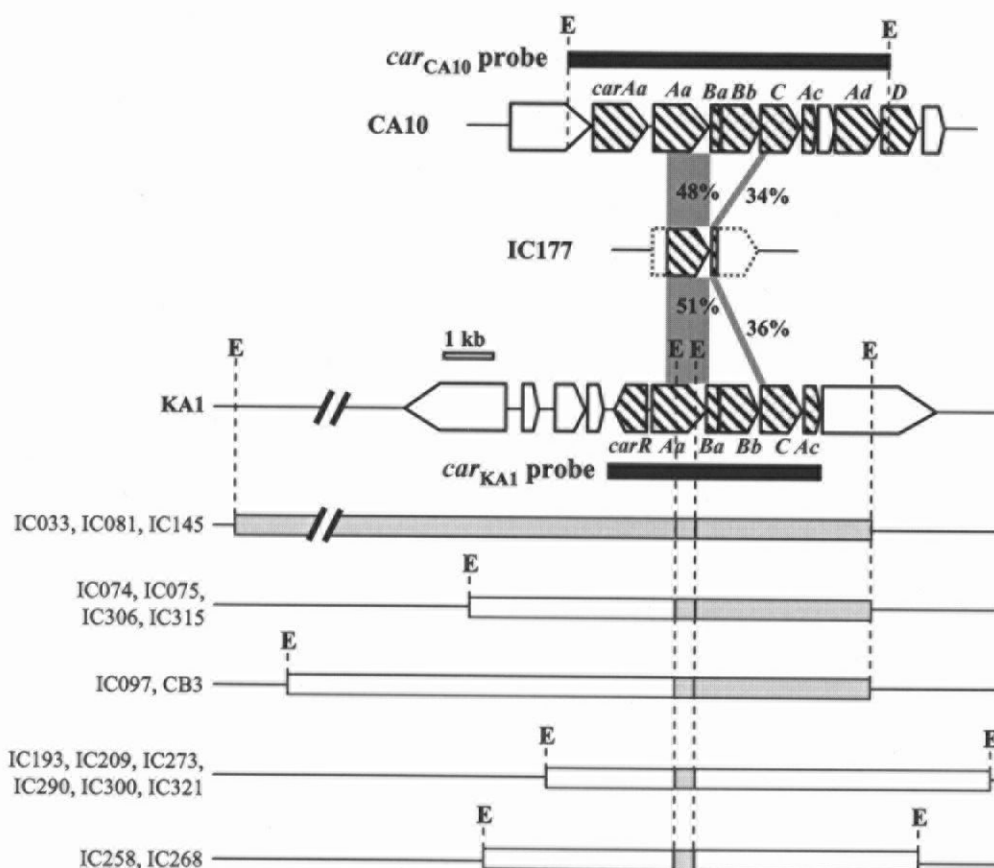


Fig. 2-3. *Pseudomonas resinovorans* CA10株と*Spingomonas* sp. KA1株の*car*遺伝子群と*Nocardioidees aromaticivorans* IC177株の*car*遺伝子ホモログの一部。五角形は遺伝子・ORFの大きさ、位置、転写の方向を示した。*car*遺伝子は斜線模様の五角形で示した。黒色の太線は*car*_{CA10}、*car*_{KA1} probeのDNA領域を示した。IC177株の*car*遺伝子断片はCA10株、KA1株のそれと相同性を有するDNA領域を灰色で示し、アミノ酸レベルのidentityを数字で示した。*car*_{KA1} probeでハイブリダイズが確認された新規 carbazole 産生菌17株と*Spingomonas* sp. CB3株については、*car*_{KA1} probeでハイブリダイズした*Eco*RI 切断断片の位置と長さを示した概略図を示した。灰色に色付けされた断片はKA1株と同じ長さの*Eco*RI切断断片を示す。*Eco*RIサイトはEで示した。

についても同時に解析を行った。さらに、単離した菌株においては、ニュージーランド、Waikato 大学の研究グループにより単離された CB3 株の *car* 遺伝子[Shepherd et al., 1998]を持つかどうかにも興味をもたれたので、CB3 株の total DNA から *carAa* 縮重プライマーを用いた縮重 PCR から増幅させた *carAa* 遺伝子断片(シーケンス解析により配列を確かめた[accession no. AF060489] ; pTCB001 の insert)をプローブ(*car*_{CB3} probe)としたサザン解析も行った。CB3 株は Waikato 大学 Lloyd-Jones 博士から分与していただいた。

単離した carbazole 資化菌のうち *car*_{CA10} probe と強くハイブリダイズしたのは *Pseudomonas pseudoalcaligenes* IC017 株のみであり、ハイブリダイズしたバンドの長さは CA10 株同様 6.9 kb であった(Fig. 2-4A)。ハイブリダイズが確認できなかったサンプルに対し、電気泳動に供する DNA 量を増やして再度同様のサザン解析を行ったところ、IC049 株、IC161 株にも非常に弱いハイブリダイズが確認できたが、そのハイブリダイズしたバンドの長さは CA10 株とは異なり、IC049 株では 8.0 kb、IC161 株では 5.6 kb であった(Fig. 2-4B)。Carbazole 資化菌群は全て *car*_{CA10} probe とハイブリダイズしなかった(Fig. 2-4A)。

*car*_{KA1} probe を用いたサザン解析では、単離した carbazole 資化菌 27 株のうち *car*_{KA1} probe とハイブリダイズしたのは 17 株であった(Fig. 2-5、Table 2-2)。サザン解析に用いた template は *Eco*RI 処理されており、ハイブリダイズバンドの長さによって分類が可能であった(Fig. 2-3)。Fig. 2-3 の分類は、KA1 株の *carR*、*carAa*、*carAc*、をプローブとしたサザン解析の結果と照合しても同様の分類が可能であった。KA1 株と全く同じハイブリダイズパターンを示したのは、IC033 株、IC081 株、IC145 株であった。KA1 株の *car* 遺伝子群上流側の遺伝子構造が異なると考えられたのは、IC074 株、IC075 株、IC306 株、IC315 株、および IC097 株であった。さらに、KA1 株の *car* 遺伝子群と上流下流ともに異なる遺伝子構造を持つと考えられたのが、IC193 株、IC209 株、IC273 株、IC290 株、IC291 株、IC300 株、IC321 株、IC258 株、および IC268 株であった。carbazole 資化菌群については 16 種類中 13 種において *car*_{KA1} probe とのハイブリダイズが認められた。これら carbazole 資化菌群のハイブリダイズパターンについては単離された菌株と共通するハイブリダイズパターンが観察されたものが多かったものの、Fig. 2-5B に示したように詳細な比較が困難なほど様々な長さのハイブリダイズバンドが確認された。本実験結果から、自然界には KA1 株が持つ *car* 遺伝子群とよく似た *car* 遺伝子群を持つ菌株が広く分布しており、また、それらの細菌が保持している *car*_{KA1} 様遺伝子周辺の遺伝子構造には多様性が存在することも明らかになった。KA1 株の *car* 遺伝子群は約 255 kb の巨大プラスミド pCAR3 上に存在していることが明らかになっており[Habe et al., 2002]、これら carbazole 資化細菌は pCAR3 もしくは pCAR3 様の何らかの可動性遺伝因子により自然界に伝播したものである可能性が考えられた。KA1 株は α -Proteobacteria に分類される *Sphingomonas* 属細菌で、その KA1 株の *car* 遺伝子と高い相同性を有する遺伝子を保持することが明らかになった IC074 株、IC193 株はそれぞれ β -、 γ -Proteobacteria に分類される *Acromobacter*、*Stenotrophomonas* 属細菌であった。これは pCAR3 様の可動性遺伝因子が α -Proteobacteria のみならず、 β -、 γ -Proteobacteria の細菌にまで伝播した可能性を示唆している。

CB3 株の *carAa* 遺伝子をプローブとしたサザン解析では、IC033 株、及び、IC081 株においてハイブリダイズが確認された(Fig. 2-3、Table 2-2)。これら 2 株のハイブリダイズした DNA 断片の長さは 7.4 kb で、CB3 株の 8.0 kb とは異なっていた。また、逆に CB3 株の total DNA に対し

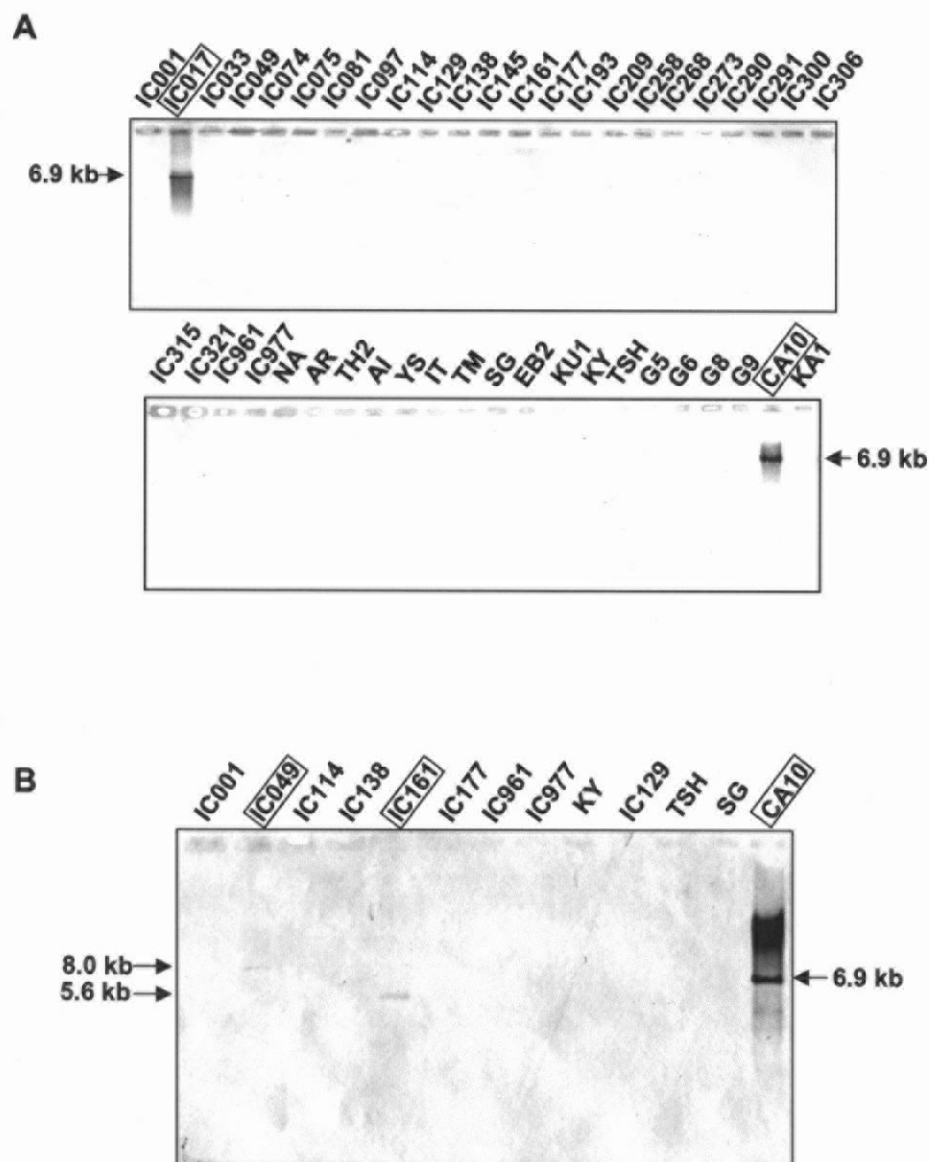


Figure 2-4. 新規carbazole産生菌のtotal DNA *Eco*RI切断DNA断片のサザン解析。プローブは*car*_{CA10} probe (Fig. 2-3)を用いた。

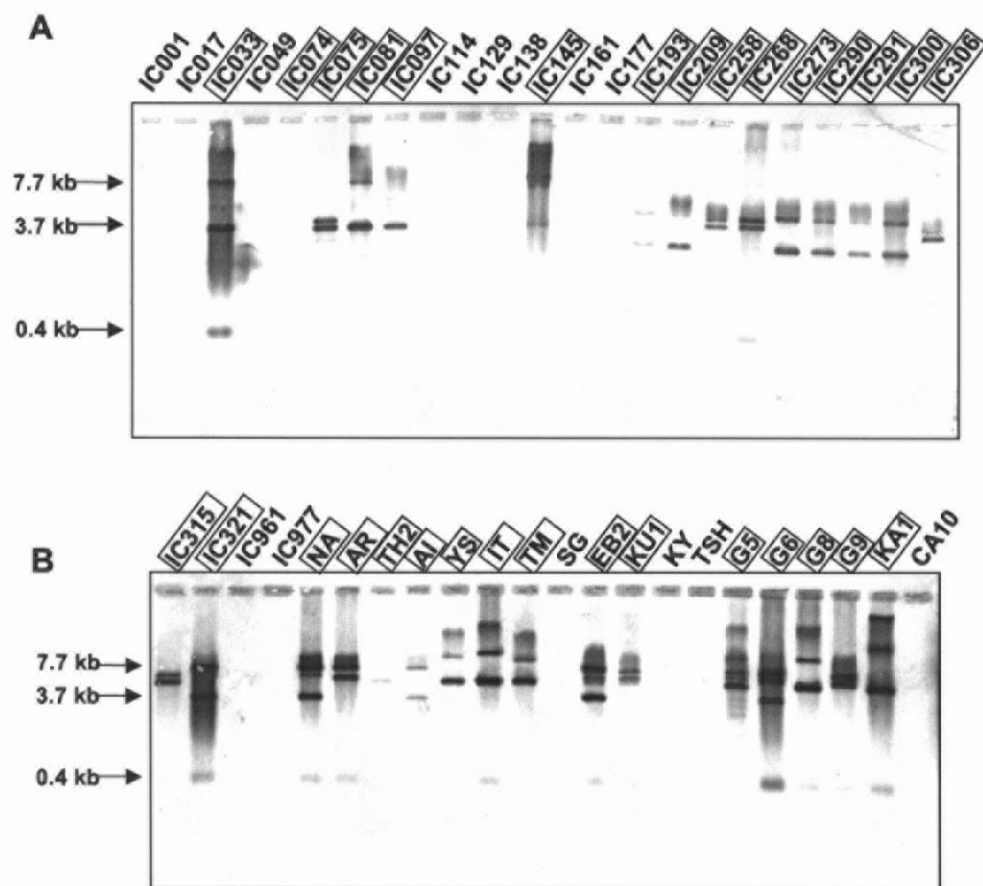


Figure 2-5. 新規carbazole産化菌のtotal DNA *Eco*RI切断DNA断片の サザン解析。プローブは car_{KA1} probe (Fig. 2-3)を用いた。

て *car*_{KA1} probe を用いてサザン解析を行ったところ、ハイブリダイズが確認され(Fig. 2-3、Table2-2)、CB3 株は KA1 株の *car* 遺伝子と高い相同性を有する遺伝子を保持することが明らかとなった。本実験により、IC033、IC081、CB3 株は KA1 株の *car* 遺伝子群と CB3 株の *car* 遺伝子と高い相同性を有する遺伝子を両方持つことが明らかになり、これら 3 株は KA1 株、CB3 株の *car* 遺伝子双方の遺伝子産物を生産することで、協調的に carbazole を分解しているのかもしれない。

*car*_{CA10} probe、*car*_{KA1} probe とともにハイブリダイズが確認できなかったサンプルについて、後述の IC177 株由来新規 *car* 遺伝子群の一部をプローブとしたサザン解析を行ったが、ハイブリダイズは確認できなかった。

2-3-3-2. Degenerate PCR

*car*_{CA10} probe 及び *car*_{KA1} probe を用いたサザン解析でハイブリダイズが確認できなかった carbazole 資化菌 7 株(IC001 株、IC114 株、IC129 株、IC138 株、IC177 株、IC961 株、IC977 株)に関しては、既知の *car* 遺伝子群とは相同性が低い *car* 遺伝子を保持する可能性が考えられたため、既知の CarAa のアミノ酸配列をもとに設計した縮重プライマーを用いた degenerate PCR を行った。また、ハイブリダイズバンドが薄かった IC049 株、IC161 株についても同様に degenerate PCR を行った。各サンプルにおいて増幅した断片をクローニングし、塩基配列を決定したところ、IC001 株、IC049 株、IC114 株、IC129 株、IC138 株、IC961 株、IC977 株では、その塩基配列から carbazole 代謝に関与する遺伝子と考えられるものは得られなかった。IC177 株については、増幅断片 991 bp (pT177001 インサート)のうち 876 bp の塩基配列の推定アミノ酸配列は KA1 株、CA10 株、J3 株の CarAa の相当するアミノ酸配列と 51、48、48 %の identity を示した。さらに、その直下流の 121 bp の塩基配列は既知の CarC の 5'末端側一部と相同性を示した(Fig. 2-3)、この *carC* ホモログの一部は KA1 株、J3 株、CA10 株の CarC 中の相当する領域のアミノ酸配列と 36、36、34 %の identity を示した。既知の carbazole 分解系遺伝子群では、*carAa* の直下流には *carBa* もしくは、*carAb* が位置しているにもかかわらず、これらの結果は IC177 株が保持する *car* 遺伝子群ホモログが既知の *car* 遺伝子群(Fig. 2-3)と遺伝子の並びが異なることを示していた[Sato et al., 1997a, Ouchiya et al., 1998, Shepherd et al., 1998, Habe et al., 2002, Kilbane et al., 2002, Inoue et al., 2004]。この 991 bp の DNA 断片の GC 含量は 65.4%であり、高 GC 含量を特徴とするアクチノマイセス群に属する *Nocardioide*s 属細菌としての性質をよく表していた。これまで報告されてきた carbazole 分解系遺伝子群はプラスミドやトランスポゾンなどの移動性遺伝因子上に位置している例が多かった[Maeda et al., 2003, Shintani et al., 2003, 2004, Nojiri et al., 2004]。しかし、この遺伝子断片は進化的に最近グラム陰性細菌などから転移してきたものではない可能性が高く、IC177 株が保持する *car* 遺伝子は古くからグラム陽性細菌が保持してきた新規な carbazole 代謝系遺伝子であることを示唆している。

2-3-4. グラム陽性 carbazole 資化菌 IC177 株の carbazole 分解

前述のように、これまでの細菌による carbazole 分解の遺伝学・酵素学的研究例はグラム陰性細菌のもののみであり、グラム陽性 carbazole 資化菌についての報告例はなかった。そこで、まずは、グラム陽性 carbazole 資化菌についての今後の詳細な研究のための基礎的な情報を得るため、IC177 株の carbazole 分解とそれに伴う生育の変化を経時的にモニタリングした。carbazole が唯一の炭素源、窒素源となる培地、MM2 + carbazole 0.1% (w/v) 200 ml に IC177 株を植菌し、

①IC177 株の colony forming unit (cfu)の測定、及び、②GC-MS を用いた残存 carbazole の半定量を行った。①、②の結果を併せて Fig. 2-6 に示した。IC177 株を培地に植菌すると、約 1 日の遅滞期後、IC177 株の増殖が始まり 3 日間の指数期を経て、約 4 日で静止期に達した。静止期まででおよそ 18%の carbazole が分解された。また、このとき培地中には茶褐色の物質の蓄積が観察され、何らかの carbazole 代謝物が蓄積していることが予想された(Fig. 2-7C)。その後 30 日間の培養で 80%の carbazole が分解された。IC177 株は栄養培地で生育した場合には、培養温度によっては菌体の凝集が観察された(Fig. 2-7A)。栄養培地と MM2 + carbazole 培地とでは、平板培地においても IC177 株のコロニーの形状は異なり(Fig. 2-7B)、富栄養と貧栄養状態とでは明確な形態の違いが観察された。

IC177 株の carbazole 分解時の中間代謝物を調べるため、MM2 + carbazole (0.1%w/v)に IC177 株を植菌して 4 日間 incubate した培地を酢酸エチル抽出したサンプルを TMS 化し、GC-MS に供した。保持時間 7 分 40 秒付近と 8 分 40 秒付近に現れたピークのマススペクトルと(Fig. 2-8A)、TMS 化した標品の anthranilic acid の保持時間、マススペクトル(Fig. 2-8B)を比較したところ、一致したため、IC177 株による carbazole 分解において、中間代謝物として anthranilic acid が蓄積することが明らかとなった。グラム陰性細菌の carbazole 資化菌である CA10 株の研究においても、carbazole 分解時の中間代謝物として anthranilic acid を蓄積することが明らかとなっており [Ouchiyama et al., 1993]、グラム陽性細菌である IC177 株は anthranilic acid までは CA10 株と同様の carbazole 代謝系を持つ可能性が考えられた。

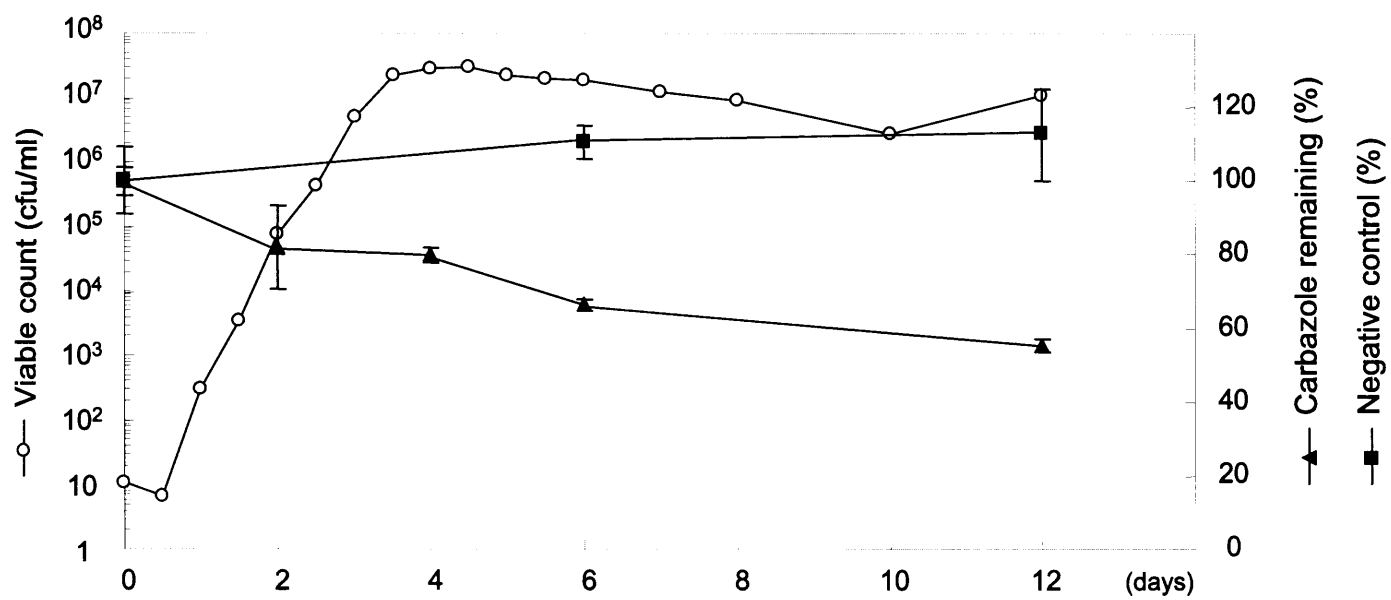


Figure 2-6. IC177株のMM2 + carbazole培地での生育とそれに伴うcarbazoleの減少。

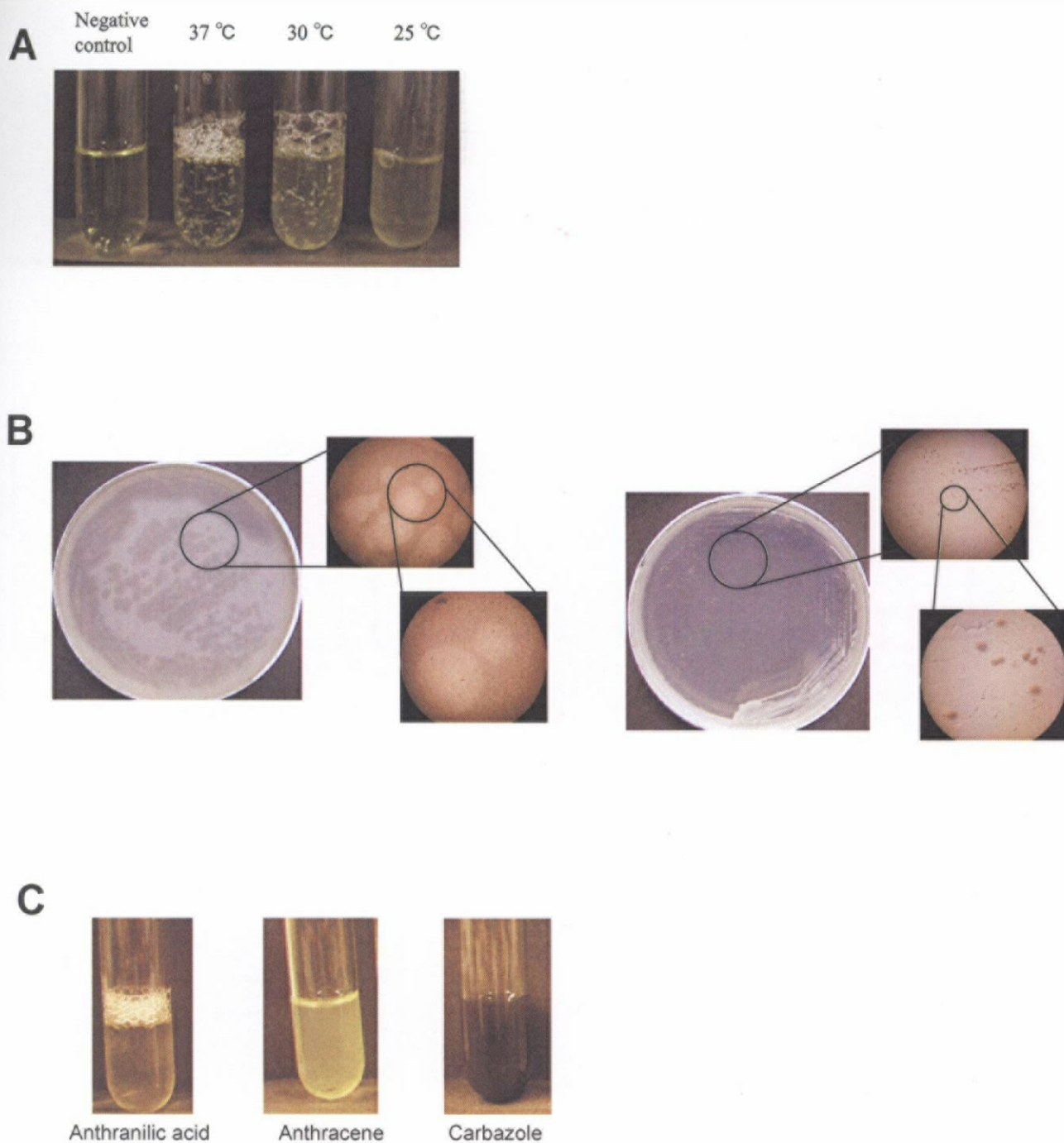
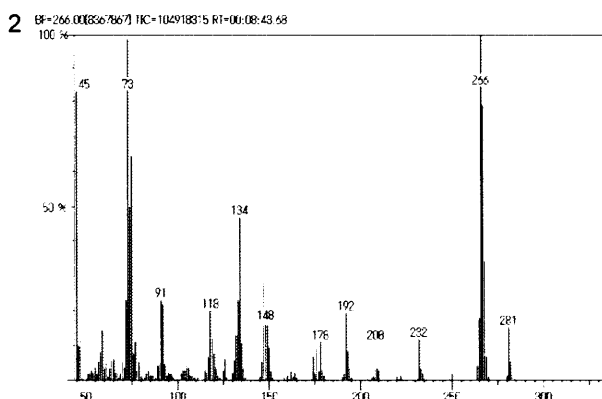
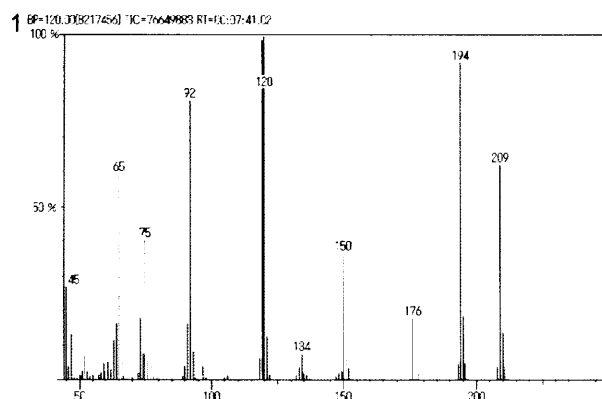
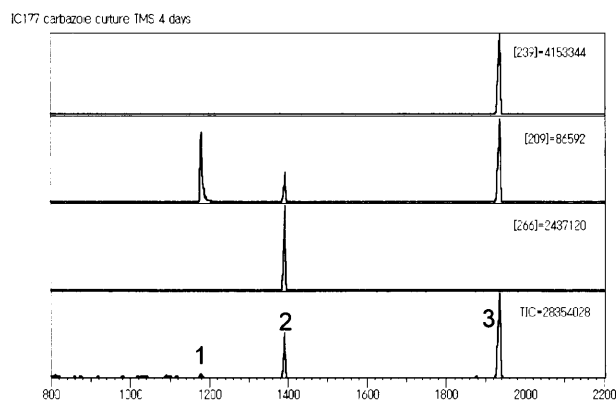


Figure 2-7. *Nocardiodides aromaticivorans* IC177株の培養の様子。(A)LB培地において37、30℃で培養した場合25℃で培養した場合と比べて菌体の凝集が確認できる。Negative controlは培地のみのサンプル。(B) carbazoleを唯一の炭素源としたプレート上でのコロニー(左)は明らかに富栄養のブイヨンプレート(右)とは形態が異なっていた。(c) Anthranilic acid、anthracene、carbazoleを唯一の炭素源とした培地で培養した場合、それぞれ茶褐色、黄色、焦げ茶色の物質が培地中に蓄積した。

A



B

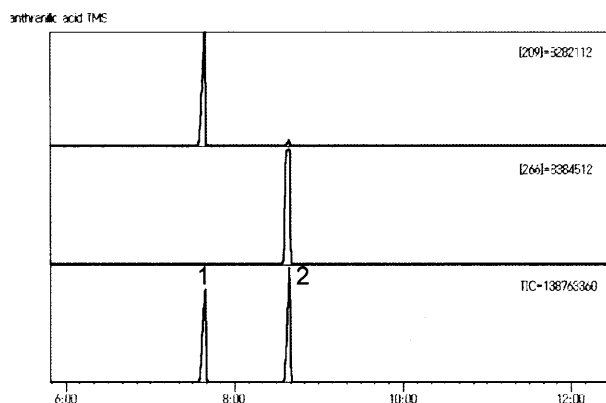
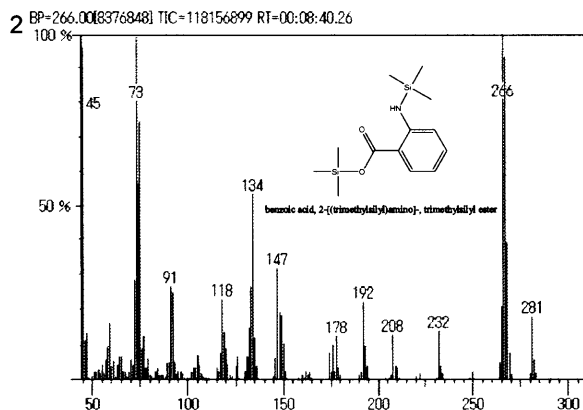
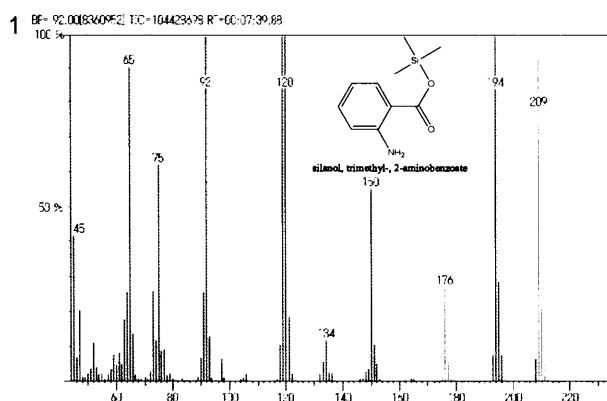


Figure 2-8. IC177株のcarbazole分解時の中間代謝物の解析。(A) MM2 + carbazoleで4日間培養した培養液の酢酸エチル抽出サンプルをTMS化し、GC-MSに供した。1、2、はanthranilic acid、3はcarbazole由来のピーク。1、2のピークのMSスペクトルも示した。(B) 標品のanthranilic acidをTMS化し、GC-MSに供した。TMS化により1、2の2種の化合物がピークとして検出された。

2-3-5. IC177 株の芳香族化合物資化能

carbazole を唯一の炭素源・エネルギー源として生育が可能な IC177 株は、他にもどのような芳香族化合物を唯一の炭素源として生育できるのか興味を持たれた。そこで、様々な芳香族化合物(Fig. M2-1 に示した化合物)が唯一の炭素源となるような培地(NMM2 + 様々な芳香族化合物)を用い、IC177 株の資化生育能を解析した。同時に、CA10 株についても同様の解析を行った。培養 1 週間毎にサンプリングし、本実験では、培養液中の cfu が 10^7 以上に達した場合に生育可能であるとした。本実験に用いた化合物と結果を Table 2-3 に示した。IC177 株、CA10 株共に、protocatechuic acid 及び anthranilic acid を資化することができた。IC177 株は dibenzothiophene-sulfone と anthracene の資化も可能であった。IC177 株は anthranilic acid、anthracene、carbazole で生育した培地中にはそれぞれ、茶褐色、黄色、焦げ茶色の物質の蓄積が観察された(Fig. 2-7C)。CA10 株は IC177 株とは異なり、phenol と benzoic acid での生育が可能であった。このような生育基質の違いはそれぞれが持つ代謝経路、代謝系遺伝子・酵素、代謝系オペロンの制御機構などの違いに由来するものと考えられる。

(本章の内容は 2005 年 4 月に、学術雑誌 FEMS Microbiology Letters にて発表した[Inoue et al., 2005])

Table 2-3. IC177 株と CA10 株の生育基質の解析。基質は NMM2 に終濃度 0.1% (wt/vol) となるように添加し、菌の生育は 1, 3 週間後の培養液中の生菌数をプレートカウントにて cfu を算出した。++ は 1 週間の培養で $>10^7$ cfu/ml に達したもの、+ は 3 週間で $>10^7$ cfu/ml に達したものを示し、- は 3 週間経っても $<10^7$ cfu/ml であったサンプル。基質の化学構造は Fig. M2-1 に示した。

Substrate	IC177	CA10
Xylene	-	-
Toluene	-	-
Phenol	-	++
Benzoic acid	-	++
Salicylic acid	-	-
Gentisic acid	-	-
Phthalic acid	-	-
Protocatechuic acid	++	++
Anthranilic acid	++	++
Naphthalene	-	-
Biphenyl	-	-
Anthracene	+	-
Fluoranthene	-	-
Phenanthrene	-	-
Pyrene	-	-
Dibenzofuran	-	-
Dibenzo- <i>p</i> -dioxin	-	-
Dibenzothiophene	-	-
Dibenzothiophene sulfone	++	-
Fluorene	-	-
9-Fluorenone	-	-
Indole	-	-
Carbazole	++	++