

細菌におけるダイオキシン類分解系遺伝子群と
その周辺領域の解析

羽 部 浩

目次

目次

略語表

第 1 章 序論	1
第 2 章 Dibenzofuran 資化菌 <i>Terrabacter</i> sp. DBF63 株の dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (DFDO) component をコードする遺伝子の単離と機能解析	14
2-1 緒言	14
2-2 材料及び方法	15
2-2-1 菌株、プラスミド、試薬、培地、及び培養条件	15
2-2-2 DNA の取り扱い	15
2-2-3 DBF63 株、DBF63W 株の total DNA の調製	16
2-2-4 Polymerase chain reaction (PCR)	18
2-2-5 アガロースゲルからの DNA の回収	19
2-2-6 サザンハイブリダイゼーション解析	20
2-2-7 ベクターの脱リン酸化	22
2-2-8 コンピテントセルの作製	22
2-2-9 大腸菌の形質転換	23
2-2-10 大腸菌からのプラスミド及びコスミド回収	24
2-2-11 コスミドライブラリーの構築	25
2-2-12 コロニーハイブリダイゼーション	27
2-2-13 休止菌体反応と反応液からの代謝物の抽出	28
2-2-14 Gas chromatography- mass spectrometry (GC- MS)分析	30
2-2-15 DNA 塩基配列決定法	31
2-2-16 DNA 塩基配列の accession number	32
2-3 結果	33
2-3-1 PCR 法による oxygenase component をコードする遺伝子の増幅と検出	33
2-3-2 DFDO の oxygenase component (<i>dbfA1A2</i> 遺伝子)のクローニング	33
2-3-3 DFDO の基質特異性の解析	38
2-3-4 <i>dbfA1A2</i> 遺伝子周辺領域の塩基配列の決定	42
2-3-5 サザンハイブリダイゼーション解析	46
2-4 考察	48

第3章 Carbazole 資化菌 <i>Pseudomonas</i> sp. CA10 株の carbazole 代謝に関する 酵素遺伝子群及びその周辺領域の解析	53
3-1 緒言	53
3-2 材料及び方法	54
3-2-1 菌株、プラスミド、試薬、培地、及び培養条件	54
3-2-2 CA10 株の total DNA の調製	54
3-2-3 アガロースゲルからの DNA の回収	58
3-2-4 DNA 塩基配列決定法	58
3-2-5 粗酵素抽出液の調製	61
3-2-6 タンパク質の定量	61
3-2-7 SDS- PAGE	62
3-2-8 2-Hydroxypenta- 2,4- dienoate (HPD) の調製法	63
3-2-9 HPD hydratase の酵素活性測定法	63
3-2-10 Acetaldehyde dehydrogenase (acylating) の酵素活性測定法	64
3-2-11 CA10 株の total RNA の調製	64
3-2-12 RNA の DNaseI 処理	65
3-2-13 ノーザンハイブリダイゼーション	66
3-2-14 CA10 株由来のプラスミド pCAR1 の抽出法	66
3-2-15 DNA 塩基配列の accession number	67
3-3 結果	68
3-3-1 <i>carAaAaBaBbCAc(ORF7)Ad</i> 遺伝子周辺領域の塩基配列の決定	68
3-3-2 HPD から acetyl- CoA の代謝に関する遺伝子群 (<i>carDFE</i> 遺伝子) の解析	68
3-3-3 Anthranilic acid から catechol の代謝に関する遺伝子群 (<i>antABC</i> 遺伝子) の解析	74
3-3-4 <i>car</i> 遺伝子群周辺領域に見いだされた挿入配列 (IS) の解析	79
3-3-5 その他 ORF の解析	86
3-3-6 Catechol 代謝に関する遺伝子群 (<i>cat</i> 遺伝子群) の単離と解析	87
3-3-7 <i>car</i> 遺伝子群、 <i>cat</i> 遺伝子群及び IS の局在性	90
3-4 考察	93
 第4章 Cumene 資化菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01 株の cumene 代謝酵素遺伝子 の単離と機能解析	100
4-1 緒言	100
4-2 材料及び方法	101
4-2-1 菌株、プラスミド、試薬、培地、及び培養条件	101
4-2-2 Cumene 資化菌のスクリーニング法	101

4-2-3	IP01 株の同定	101
4-2-4	IP01 株の生育基質特異性の検討	101
4-2-5	IP01 株の total DNA の調製	103
4-2-6	アガロースゲルからの DNA の回収	103
4-2-7	初発酸化酵素遺伝子のショットガンクローニング	103
4-2-8	休止菌体反応	103
4-2-9	High-performance liquid chromatography (HPLC)分析	103
4-2-10	DNA 塩基配列決定法	105
4-2-11	DNA 塩基配列の accession number	105
4-3	結果	106
4-3-1	IP01 株の同定及び諸性質	106
4-3-2	Cumene 酸化酵素遺伝子の取得	106
4-3-3	pIP103 にコードされる分解系酵素群の基質特異性	106
4-3-4	初発酸化酵素活性、脱水素酵素活性、メタ開裂酵素活性を示す領域の限定	110
4-3-5	Cumene 代謝系酵素遺伝子群 (<i>cum</i> 遺伝子) の塩基配列の決定	110
4-3-6	各 ORF 推定アミノ酸配列の相同性検索	113
4-4	考察	117
	総括と展望	122
	参考文献	125
	付図 1	136
	付図 2	142
	付図 3	171
	付図 4	178
	付図 5	179
	謝辞	

略語表

ADP	adenosine 5'- diphosphate
APS	ammonium persulfate
BSA	bovine serum albumin
CAR	carbazole
CARDO	carbazole 1,9a- dioxygenase
CAT	catechol
CBB	Coomassie brilliant blue R- 250
CDDs	chlorinated dibenzo- <i>p</i> - dioxins
CDFs	chlorinated dibenzofurans
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
C23O	catechol 2,3- dioxygenase
Co- PCB	coplanar polychlorinated biphenyl
CTAB	hexadecyltrimethyl ammonium bromide
2,4- D	2,4- dichlorophenoxyacetate
DD	dibenzo- <i>p</i> - dioxin
DEP	diethylpirocarbonate
DF	dibenzofuran
DFDO	dibenzofuran 4,4a- dioxygenase
DHB	dihydroxybiphenyl
DMF	dimethyl formamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
Dnase	deoxyribonuclease
DRs	direct repeats
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	flavin adenine dinucleotide
FN	fluorene
GA	gentisic acid
GC- MS	gas chromatography- mass spectrometry
HOMODA	2- hydroxy- 6- oxo- 7- methylocta- 2,4- dienoic acid
HOPDA	2- hydroxy- 6- oxo- 6- phenylhexa- 2,4- dienoic acid
HPD	2- hydroxypenta- 2,4- dienoic acid

HPLC	High- performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- β - D- thiogalactopyranoside
IRs	inverted repeats
ISs	insertion sequences
MOPS	3- (<i>N</i> - morpholino)propanesulfonic acid
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
ORFs	open reading frames
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PCBs	polychlorinated biphenyls
PCDDs	polychlorinated dibenzo- <i>p</i> - dioxins
PCDFs	polychlorinated dibenzofurans
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
RNA	ribonucleic acid
RNaseA	ribonuclease A
SA	salicylic acid
SD	Shine- Dalgano
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS- PAGE	SDS- polyacrylamide gel electrophoresis
TAE	Tris- acetate- EDTA
TBE	Tris- borate- EDTA
TCE	trichloroethylene
TE	Tris- EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetramethylethylenediamine
THB	trihydroxybiphenyl
THDE	trihydroxydiphenyl ether
Tn	transposon
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
X- Gal	5- bromo- 4- chloro- 3- indolyl- β - galactoside

第1章

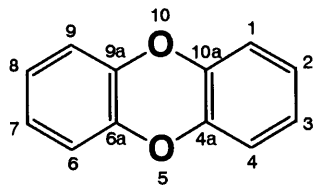
序論

近代における急速な産業活動の発展に伴い、それまで地球環境中には見出されなかった人為起源の難分解性化学物質が大量に環境中へと放出されてきた。その結果、水圏、大気圏、土壌圏といった地球上のあらゆる環境において汚染状況は深刻化しており、自然界の生物はもとより人類にもその影響が現れている。このような化合物のひとつにダイオキシン類と呼ばれる化合物群がある。ダイオキシン類は毒性が強い上、発癌性、変異原性を有するものが多く、特にベトナム戦争で使用された枯れ葉剤に含まれていた 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo- *p*- dioxin (Fig.1- 1) は、人類史上最強の毒性・変異原性を有すると言われている。

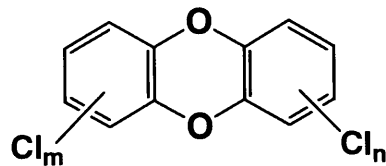
ダイオキシンは polychlorinated dibenzo- *p*- dioxins (PCDDs) の総称であるが、類似した化学構造を有する polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) も同様の毒性を持つことが明らかにされており、これらはダイオキシン類と呼ばれている (Fig. 1- 1)。PCDDs と PCDFs は最大 8 個までの塩素をベンゼン環に置換基として有することができるため、PCDDs には 75 種、PCDFs には 135 種の異性体が存在する。また、polychlorinated biphenyls (PCBs) も塩素の置換位置により 209 種類の異性体が存在するが、*ortho* 位 (2,2',6,6'位) に塩素置換基を持たない異性体は 2 つのベンゼン環が共平面性の構造を示し、coplanar PCBs (Co- PCBs) と呼ばれている。Co- PCBs も PCDDs と立体的に類似の構造をとるため、ダイオキシンのような強い毒性を示す。このような理由から、Co- PCBs の 12 種類もダイオキシン類に含めることが、世界保健機関 (WHO) の会議において提案されている。

近年、ダイオキシンに関しては多くの物理化学的な処理方法が開発されつつあるが、これまでのところダイオキシンをほぼ完全に破壊する唯一の、もしくは唯一低コストな方法は、焼却処理のみであった。しかしながら、この処理法も高濃度で局所的に汚染された場合には有効だが、実際には低濃度広範囲の汚染形態が多いため、大量の汚染土壌を焼却処理することは現実的ではなく、それに代わりうる生物学的な修復法 (bioremediation) が有望な浄化技術として期待されている。汚染土壌中に土着のダイオキシン分解菌が存在しない場合は、他で単離された強力な分解菌を汚染現場に添加するのが最適な手法 (bioaugmentation) であると考えられており、この 20 年間に多くの研究者が細菌や真菌類といったダイオキシン分解菌の単離・解析を行ってきた [Harden and Dwyer 1997; Wittch 1998]。

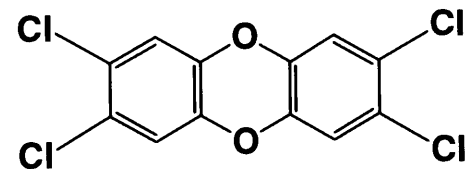
その結果、細菌によるダイオキシンの分解に関しては、PCDDs や PCDFs の基本骨格をなす dibenzo- *p*- dioxin (DD) を dibenzofuran (DF) を資化する細菌が集積・単離され、DD や DF の代謝経路の解明とともに [Engesser et al., 1989, 1990; Strubel et al.,



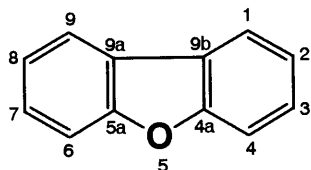
Dibenzop-*p*-dioxin (DD)



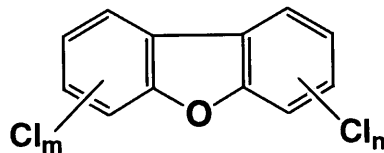
Polychlorinated dibenzop-*p*-dioxin (PCDD)



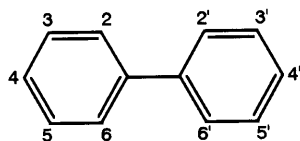
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin



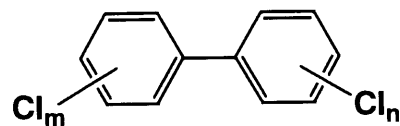
Dibenzofuran (DF)



Polychlorinated dibenzofuran (PCDF)



Biphenyl



Polychlorinated biphenyl (PCB)

Fig. 1-1. Chemical structure of dioxin-related compounds.

1991; Fortnagel et al., 1989a,b, 1990; Harms et al., 1990; Strubel et al., 1991; Wittich et al., 1992; Monna et al., 1993]、これらの細菌が1～4塩素化ダイオキシンを分解可能であることも明らかとなった [Harms et al., 1991; Wilkes et al., 1996; Schreiner et al., 1997; Parsons et al., 1998; Halden et al., 1999; Keim et al., 1999; Wittich et al., 1999]。現在までに解明されている主要な DD/DF 分解代謝経路 (Fig. 1-2) は初発酸化反応に特徴があり、ダイオキシン分子内の酸素原子と結合している炭素原子 (核間炭素原子) とそれに隣接する炭素原子に分子状酸素の酸素原子を1個ずつ水酸基として導入する反応で、angular dioxygenation (核間への酸素添加反応) と呼ばれる。この反応により DD 及び DF は分子内に不安定なヘミアセタール構造を持つ中間体へと変換され、自発的な環開裂と再芳香環化によりそれぞれ 2,2',3-trihydroxydiphenyl ether (2,2',3-THDE) と 2,2',3-trihydroxybiphenyl (2,2',3-THB) へ変換される。その後、メタ開裂により片側の芳香環が開裂し、さらに加水分解されてそれぞれ catechol (CAT) と salicylic acid (SA) に代謝される。

しかしながら、DD/DF 分解系酵素及びその遺伝子など分子レベルでの知見は非常に限られており、最も解析の進んでいる菌株はグラム陰性細菌の *Sphingomonas wittichii* RW1 株 [Wittich et al., 1992; Yabuuchi et al., 2001] である。RW1 株からは、dioxin dioxygenase (DD/DF の初発酸化を触媒する angular dioxygenase) の各コンポーネントが精製され、本酵素が $\alpha_2\beta_2$ の構造の terminal oxygenase (DxnA1A2)、ferredoxin (Fdx1、Fdx3)、及び ferredoxin reductase (RedA2) からなる 3 component dioxygenase system であることが明らかとなった [Bünz and Cook 1993; Armengaud and Timmis 1997, 1998; Armengaud et al., 2000]。Dioxin dioxygenase の各コンポーネントをコードする遺伝子はそれぞれ chromosome 上の異なる遺伝子座に確認されるなど、各々がある程度離れた位置に散在していることも示された [Armengaud et al., 1998]。続く反応を触媒するメタ開裂酵素 (DbfB) についても、遺伝子のクローニングが報告されており [Happe et al., 1993]、反応に必須な Fe^{2+} が His (H) 残基に配位することも明らかとなっている [Bertini et al., 1995]。さらにメタ開裂物質を加水分解する2種類の酵素についても精製及び諸性質が研究され [Bünz et al., 1993]、一方の加水分解酵素 (DxnB) が DD/DF の分解に、もう一方が biphenyl の分解に関与していると推測されている。また、DD/DF 上流代謝系遺伝子群と隣接した位置に、4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol の分解に関与すると推測される一連の下流分解系遺伝子群 (dxnDEFGHI) が存在することも報告されている [Armengaud et al., 1999]。

また、グラム陽性細菌については、*Terrabacter* sp. DPO360 株から DF 生育時に発現する3種類のメタ開裂酵素 [BphC1、BphC2、catechol 2,3-dioxygenase (C23O)] が精製され、2,2',3-THB に対して活性が高かった BphC1 をコードする遺伝子については塩基配列も決定されている [Schmid et al., 1997]。しかしながら、その周辺領域に

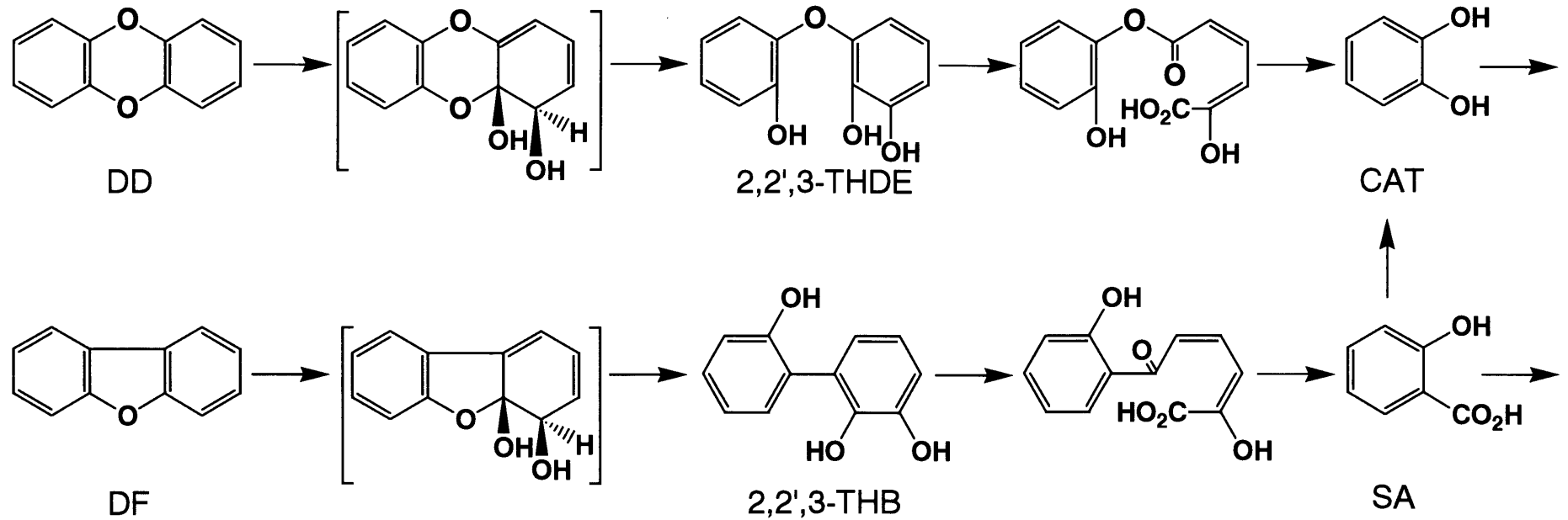


Fig. 1-2. Degradative pathways for the mineralization of DD (A) and DF (B) [Wittich 1998].

dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (DFDO; DF の初発酸化を触媒する angular dioxygenase) をコードする遺伝子は存在しないことが報告されており、現在までにグラム陽性細菌の DF 分解系遺伝子に関する知見は不十分であると言わざるをえない。

当研究室においても、DF を唯一炭素源・エネルギー源として生育可能な DBF63 株が土壌サンプルから単離された [Monna et al., 1993]。本菌株は fluorene (FN)、SA、gentisic acid (GA) も同様に資化し、DD を共酸化することが示され、Fig. 1-3 に示すような分解代謝経路が推定された。その後、DBF63 株はグラム陽性細菌の *Terrabacter* 属細菌であると同定され、メタ開裂物質の黄色を指標としたショットガンクローニングにより 2,2',3- THB から SA への変換に関与すると推測されるメタ開裂酵素及び加水分解酵素遺伝子 (*dbfBC*) の取得にも成功した (Fig. 1-4) [Kasuga et al., 1997]。しかしながら、DD/DF 骨格の中でも強固なエーテル結合を特異的に開裂するのに重要な初発酸化酵素 DFDO をコードする遺伝子は *dbfBC* 遺伝子の周辺領域には存在しなかったため、DF 寒天プレート上の clear zone 形成を指標としたショットガンクローニングや、ハイブリダイゼーションによる目的酵素遺伝子の取得を試みてきたが成功には至っていなかった。

一方、当研究室においては、ダイオキシンと構造類似のヘテロ環式芳香族化合物である carbazole (CAR) を唯一炭素源・窒素源・エネルギー源として生育可能な *Pseudomonas* sp. CA10 株を活性汚泥中より単離し、CAR 代謝経路を Fig. 1-5 に示すように明らかにした [Ouchiyama et al., 1993]。CA10 株に transposon (Tn) 挿入変異を行い、得られた CAR 資化能欠損変異株である TD2 株と catechol (CAT) 資化能欠損変異株 TE1 株を用いて、CA10 株の CAR 分解に関与する遺伝子の単離と解析を行った [Kimura et al., 1996]。その結果、TD2 株の Tn 挿入周辺領域に multicomponent dioxygenase の ferredoxin と ferredoxin reductase 遺伝子の存在が示されたため、その intact な遺伝子をメタ開裂物質の黄色を指標としたショットガンクローニングにより取得した。塩基配列の決定を行い、CAR 代謝に関与している angular dioxygenase 遺伝子 (*carAaAcAd*)、メタ開裂酵素遺伝子 (*carBaBb*)、加水分解酵素遺伝子 (*carC*) の構造を明らかにするとともに、それらの機能・諸性質を明らかにした (Fig. 1-6) [Sato et al., 1997a,b]。これら酵素群により、CAR は AN と 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid (HPD) へと代謝されるが (Fig. 1-6)、そのうち、初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO; *CarAaAcAd*) は、その基質特異性を解析した結果、DD や DF に対して angular dioxygenation を触媒するだけでなく、例えば Fig. 1-7 に示したような他の数多くの芳香族化合物に対し、angular dioxygenation、*cis*-dihydroxylation 及び monooxygenation を触媒しうることが明らかとなった [Nojiri et al., 1999]。このように、当研究室において初めて、CAR 資化菌が DD 及び DF も分解できることを示し、*car* 遺伝子群がダイオキシン類分解系遺伝子群であることを明らかにした。

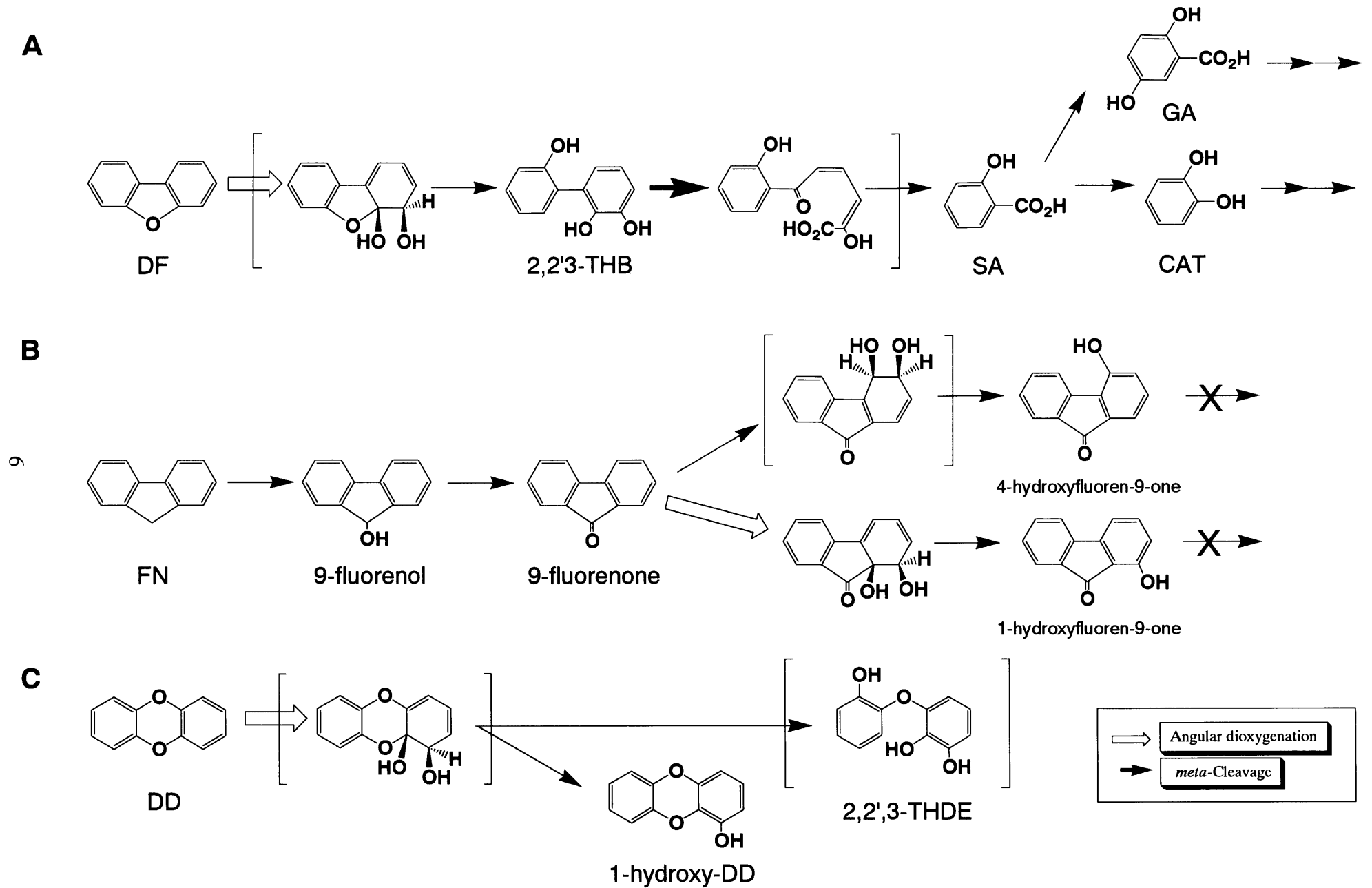


Fig. 1-3. Degradation of DF (A) and FN (B) and co-metabolism of DD (C) by *Terrabacter* sp. strain DBF63.

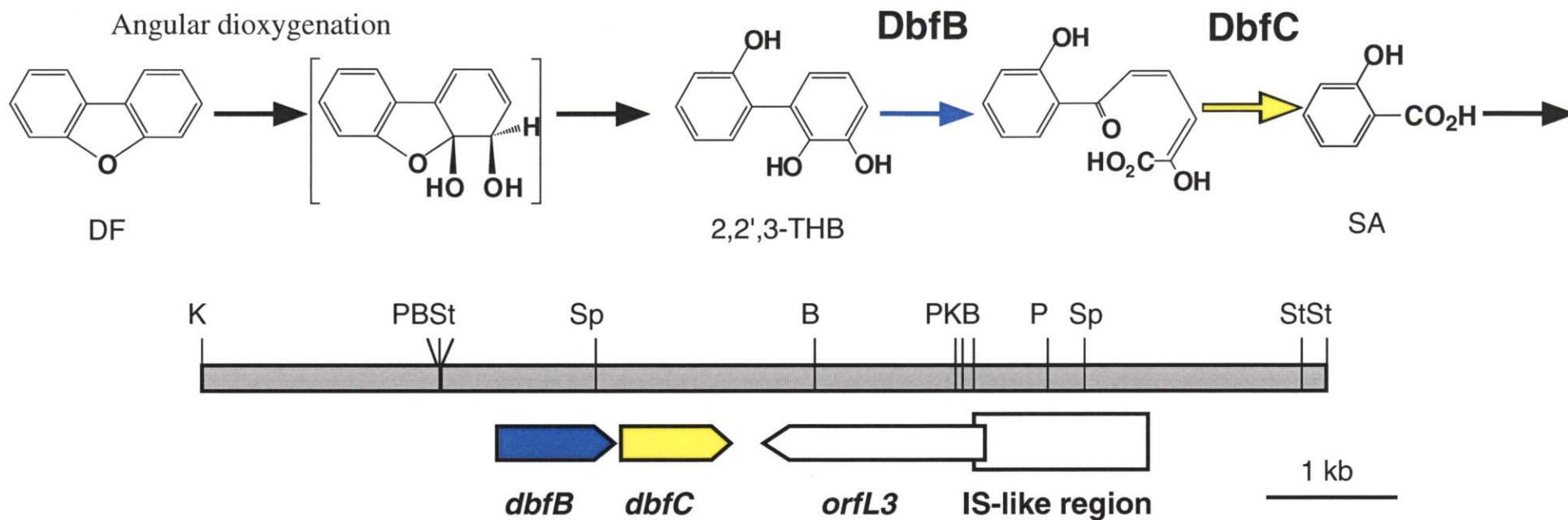


Fig. 1-4. Physical map of the DNA region containing the *dbfBC* gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. Restriction site designations: B, *Bam*HI; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Sp, *Sph*I; St, *Stu*I.

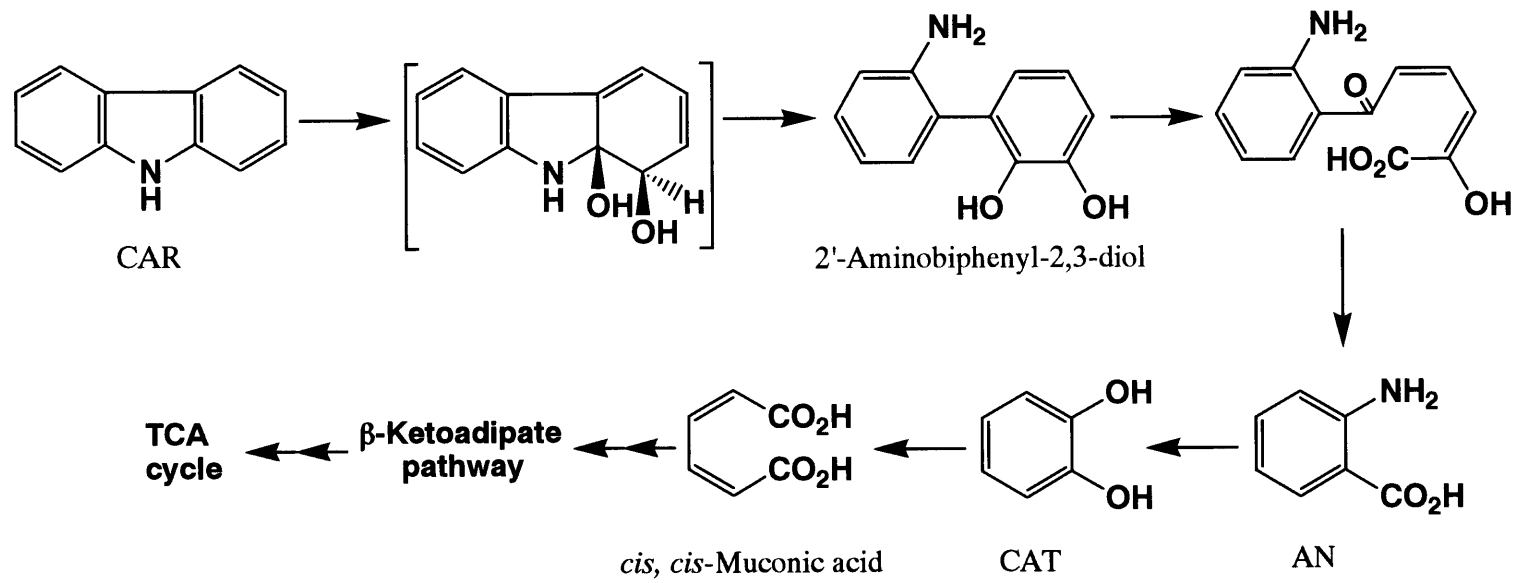


Fig.1-5. Proposed pathway for the degradation of carbazole by *Pseudomonas* sp. CA10 [Ouchiyama et al., 1993].

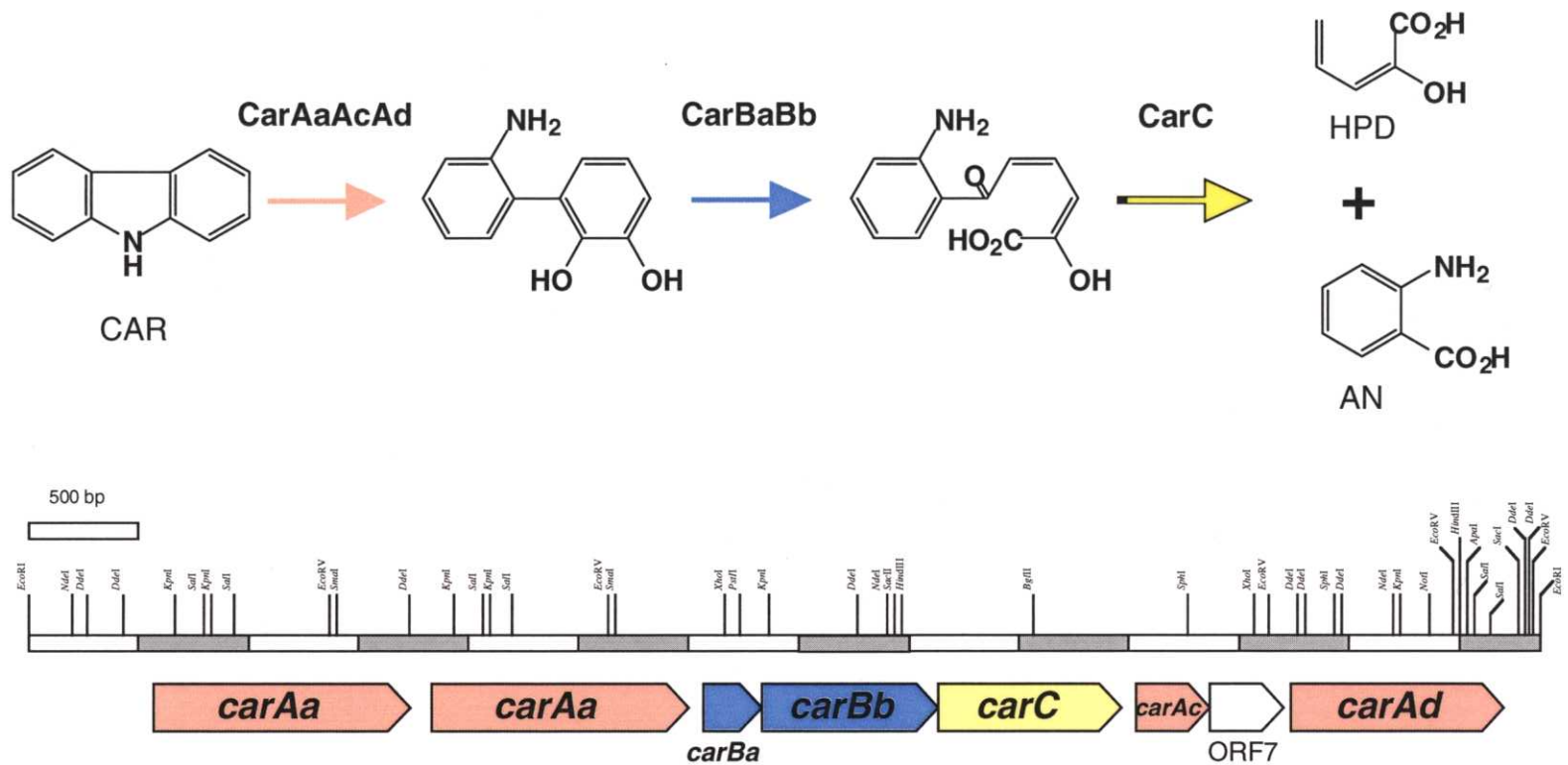


Fig. 1-6. Physical map of the 6.9-kb *EcoRI* insert of pUCA1 [Sato et al., 1997a,b].

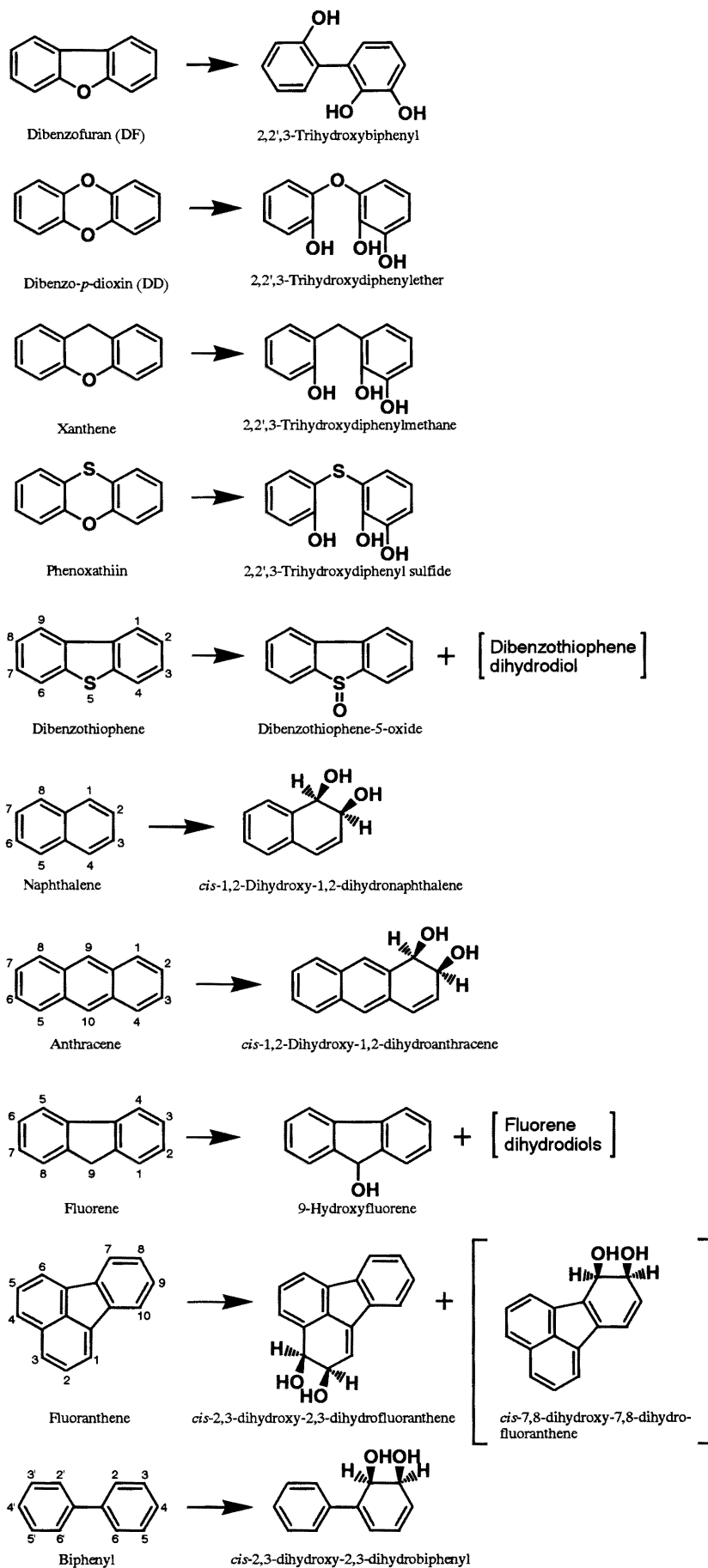


Fig. 1-7. Oxidation reaction by CARD0 which was identified by GC-MS or NMR analyses in dibenzofuran, dibenzo-*p*-dioxin, xanthene, phenoxathiin, dibenzothiophene, naphthalene, anthracene, fluorene, fluoranthene, and biphenyl. The compounds in brackets are the hypothetical products by CARD0. Monohydroxylated compounds were also identified in the biotransformation experiments of dibenzothiophene, naphthalene, anthracene, fluorene, fluoranthene, and biphenyl. The presences of *cis*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrofluoranthene and fluorene dihydrodiols were presumed by the identification of 7-hydroxyfluoranthene and monohydroxyfluorenes. Absolute stereochemistry is not intended.

解析がなされた 6.9-kb *EcoRI* 断片上にコードされる *car* 遺伝子群においては、CARDO の各 component (*carAa*、*carAc*、*carAd*) がクラスター内に散在していたり、CARDO の terminal oxygenase component をコードする *carAa* 遺伝子がタンデムに重複して存在するなどユニークな特徴をもっていたことから (Fig. 1-6)、その周辺の遺伝子構造についても興味を持たれていた。また、*carAd* 遺伝子の下流域には、HPD 代謝に関与すると推測される遺伝子の存在が示唆されていたが解析されておらず [Sato et al., 1997a]、さらに、TE1 株の Tn 挿入周辺領域からは CAT 代謝に関わる酵素遺伝子群 *catBC*、及びその発現制御タンパクをコードすると推測される *catR* 遺伝子の存在が示されていたが、これらの intact な遺伝子領域についてもまだ解析されていなかった [Kimura et al., 1996]。

一方、PCBs についても微生物処理を目的として、その基本骨格を成す biphenyl 資化性細菌の解析が盛んに行われてきた。グラム陽性細菌からグラム陰性細菌に渡って数多くの属種に分類される分解菌が単離され、中でも *Burkholderia* sp. LB400 株、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株、*Pseudomonas* sp. KKS102 株、*Rhodococcus* sp. RHA1 株などについては分子レベルで詳細な研究が行われてきた。実際に問題となる PCBs の分解に関しても、塩素の置換位置と酵素の基質特異性の関係が明らかになりつつあるなど、PCDDs/ PCDFs と比較しても細部に渡ってかなり研究が進んでいる [Haddock et al., 1995; Seeger et al., 1995, 1999; Kimura et al., 1997; McKay et al., 1997; Kumamaru et al., 1998; Arnett et al., 2000; Stephen et al., 2000, 2001]。Biphenyl 分解系遺伝子は *bph* 遺伝子群と呼ばれ、本遺伝子群がコードする biphenyl 代謝系では、biphenyl dioxygenase (BphA1A2A3A4) が biphenyl の 2,3 位を直接二水酸化して *cis*-dihydrodiol とした後に dihydrodiol dehydrogenase (BphB) が作用して 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHB) を生成し、メタ開裂酵素 (BphC) が芳香環をメタ開裂する。さらに加水分解酵素 (BphD) が働いて加水分解を受けた後、アセチル CoA まで代謝される (Fig. 1-8)。

以前当研究室においても、biphenyl 資化菌 *Pseudomonas cruciviae* S93B1 株について解析を行っており、S93B1 株から部分精製されたメタ開裂酵素が biphenyl の代謝中間体である 2,3-DHB よりも、単環芳香族化合物である cumene (isopropylbenzene) の代謝中間体である 3-isopropylcatechol に対して高い活性を示すことを報告している [Ishigooka et al., 1986]。また、メタ開裂物質加水分解酵素の精製酵素が、biphenyl のメタ開裂物質である 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) と cumene のメタ開裂物質である 2-hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid (HOMODA) の両基質に対して加水分解反応を触媒することが明らかとなった [Omori et al., 1986]。これらの結果から、biphenyl 代謝系酵素群と cumene 代謝系酵素群は類似の酵素群であることが推測され、各々の代謝系酵素遺伝子群の分子進化上の関連性

や、cumene 資化菌も PCBs 分解能を有しているのかなどについて興味を持たれた。

以上の様な背景から本研究では、ダイオキシン類分解系酵素の機能と、それらをコードする遺伝子群及び周辺領域の遺伝子構造について知見を得ることを目的とした。第一の研究課題として、DBF63 株から DFDO の terminal oxygenase component をコードする遺伝子を取得し、その遺伝子構造を解析するとともに、DFDO の基質特異性を検討し、chlorinated DDs (CDDs) や chlorinated DFs (CDFs) に対しても分解活性を持つか調べた (第 2 章)。第二の課題として、CA10 株の既知の DD/ CAR 分解系酵素遺伝子群 (*carAaAaBaBbCAcORF7Ad*) の周辺領域について遺伝子構造を詳細に解析することで、HPD と AN 以降の CAR 分解に関与する全代謝系酵素遺伝子群を明らかにし、それらの機能解析も試みた (第 3 章)。また、第三の課題として、biphenyl と代謝系酵素の類縁性が示唆されていた cumene の資化菌を単離し、cumene 代謝系酵素を取得・解析することで、*bph* 遺伝子群との進化上の関連性について調べた (第 4 章)。

第 2 章

Dibenzofuran 資化菌 *Terrabacter* sp. DBF63 株の dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (DFDO) component をコードする遺伝子の単離と機能解析

2-1. 緒言

これまでに DBF63 株の DF 分解に関与する酵素遺伝子群のうち、2,2',3- THB から SA への反応を触媒可能なメタ開裂酵素遺伝子 (*dbfB*)と加水分解酵素遺伝子 (*dbfC*)が取得・解析されてきた [Kasuga et al., 1997]。既知の芳香族化合物分解系酵素遺伝子の多くがオペロン構造を成しているが、*dbfBC* 遺伝子の周辺領域に初発酸化酵素をコードすると思われる ORF は存在しなかった。

そこで本章では、PCR 法を用いて初発酸化酵素である angular dioxygenase の oxygenase component をコードする *dbfA1A2* 遺伝子を単離し、これが DF のみならず CDDs 及び CDFs も分解可能であることを示すとともに、既知の angular dioxygenase component の large subunit である DxnA1 や CarAa とは分子系統樹上の離れた場所に位置する新規な酵素であることも明らかにした。

2-2. 材料及び方法

2-2-1. 菌株、プラスミド、試薬、培地、及び培養条件

本章で使用した菌株及びプラスミドを Table 2-1 に示した。*E. coli* JM109 株 [Yanish-Perron et al., 1985] は遺伝子ライブラリー及びサブクローニングを行ったプラスミドの宿主として用いた。遺伝子ライブラリーの作成には、ベクターとして pUC118/119 [Vieira and Messing, 1987] を使用した。通常の *E. coli* 用の培地として 2×YT 培地 (Table 2-2) あるいは LB 培地 (Table 2-3) [Sambrook et al., 1989] を用いた。DBF63 株用の培地としては CFMM 培地を用いた (Table 2-4)。DF はエーテルに溶解し (0.1g/ml)、0.2 mm PTFE 膜 (Advantec) を用いて濾過滅菌したものを培地および休止菌体反応液に終濃度 0.1% (vol/vol) となるよう添加した。DBF63W 株用の培地としては NB 培地 (栄研化学) を用いた (Table 2-5)。*E. coli* の選択培地には Ap を終濃度 50 µg/ml となるよう添加した。試薬は市販のもので最も純度の高いものを購入し使用した。本研究で使用した試薬の調整法は細胞工学実験プロトコル [東京大学医科学研究所制癌研究部編, 1993]、クローニングとシーケンス [杉浦昌弘 編, 1989]、もしくは Sambrook らの成書 [Sambrook et al., 1989] に従った。培養は DBF63 株、DBF63W 株については 30°C、*E. coli* については特に明記しないかぎり 37°C で行った。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) になるよう添加した。

2-2-2. DNA の取り扱い

本研究で使用した制限酵素及びその他の酵素類は、宝酒造、東洋紡、ニッポンジーン、ベーリンガー・マンハイム社のいずれかのもので購入し、説明書の指示に従って用いた。DNA の連結は DNA Ligation Kit ver.1 もしくは ver.2 (宝酒造) を利用し、添付の説明書の指示に従って用いた。DNA の平滑末端化には DNA Blunting Kit (宝酒造) を利用し、添付の説明書の指示に従って用いた。特に明記しないその他の DNA 操作は、細胞工学実験プロトコル [東京大学医科学研究所制癌研究部編, 1993]、クローニングとシーケンス [杉浦昌弘 編, 1989]、もしくは Sambrook らの成書 [Sambrook et al., 1989] に従った。

2-2-3. DBF63 株、DBF63W 株の total DNA の調製

Current Protocols in Molecular Biology [Ausubel et al., 1990] を基に若干の変更を加えた方法に従って行った。

【試薬】

① TE buffer

10 mM	tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris)- HCl (pH8.0)
1 mM	ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

② lysozyme solution

60 mg の lysozyme (Sigma) を 1 ml の H₂O に溶解する。

③ achromopeptidase solution

20 mg の achromopeptidase (和光純薬) を 1 ml の H₂O に溶解する。

Table 2-1. Bacterial strains and plasmids.

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Terrabacter</i> sp. DBF63	DF ⁺ <i>a</i>	This study
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gryA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F⁺[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ ΔM15]</i>	Yanish-Perron et al., 1985
Plasmids		
pUC119	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon, M13IG	Yanish-Perron et al., 1985
SuperCos1	ColE1-replicon, SV40 <i>ori</i> , Apr, NEO, dual <i>cos</i> site	Wahl et al., 1987
pT7Blue T-vector	Ap ^r , T-end at the <i>EcoRV</i> site	Stratagene
pCC01 - 20	Ap ^r , SuperCos1 with a ca. 40-kb <i>Bam</i> HI insert of strain DBF63	This study
pDF01	Ap ^r , pUC119 with 8.1-kb <i>Bam</i> HI fragment of pCC12 insert	This study
pDF02	Ap ^r , pUC119 with 7.6-kb <i>Kpn</i> I fragment of pCC12 insert	This study
pDF03	Ap ^r , pUC119 with 6.3-kb <i>Pst</i> I fragment of pCC12 insert	This study
pDF04	Ap ^r , pUC119 with 5.0-kb <i>Sph</i> I fragment of pCC12 insert	This study
pDF05	Ap ^r , pUC119 with 11.0-kb <i>Bam</i> HI fragment of pCC12 insert	This study
pDF06	Ap ^r , pUC119 with 6.3-kb <i>Sph</i> I fragment of pCC12 insert	This study
pDF07	Ap ^r , pUC119 with 2.6-kb <i>Pst</i> I fragment of pCC12 insert	This study
pDF20	Ap ^r , pUC119 with 2.3-kb <i>Sal</i> I fragment of pCC12 insert	This study
pDF32	Ap ^r , pUC119 with a blunted 2.5-kb <i>Bgl</i> II- <i>Sph</i> I fragment of pDF01	This study

^aDF⁺ indicates the ability to grow on dibenzofuran as a sole source of carbon and energy.

Table 2-2. Composition of 2 x YT medium.

2 x YT medium	
Bacto-trypton	16 g
Bacto-yeast extract	10 g
NaCl	5 g
pH 7.0 (NaOH)	
	per liter

Table 2-3. Composition of LB medium.

LB medium	
Bacto-trypton	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g
pH 7.0 (NaOH)	
	per liter

Table 2-4. Composition of CFMM medium.

CFMM medium	
K ₂ HPO ₄	2.2 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g
NH ₄ NO ₃	3.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg
Bacto-yeast extract	50 mg
pH 7.0	
	per liter

Table 2-5. Composition of NB medium.

NB medium	
Nutrient broth	18 g
pH 7.0	
	per liter

④ CTAB/ NaCl solution

4.1% (wt/ vol)	NaCl
10% (wt/ vol)	hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

⑤ 5 M NaCl

⑥ フェノール/クロロホルム

TE 飽和フェノールとクロロホルムを等量混合する。

⑦ 10% sodium dodecylsulfate (SDS)

⑧ ribonuclease A (RNaseA) solution

100 mg の RNaseA (Sigma) を 10 ml の H₂O に溶解する。

【操作】

- ① DBF63 株を 5 ml の CFMM+DF 培地に植菌し、30°C で振とう培養する (300 strokes/ min、20 hour)。(DBF63W 株は 5 ml の NB 培地に植菌する。)
- ② 2 ml の培養液を 2 ml チューブに移し、遠心 (15,000 rpm、5 min、RT) により集菌した後、467 μl の TE buffer に懸濁させる。
- ③ 60 mg/ ml lysozyme solution を 50 μl、20 mg/ ml achromopeptidase を 50 μl 加え、小型回転培養器 (ローテーター RT-5, TAITEC) を用いて室温で 30 分間穏やかに攪拌 (強度の目盛りは slow から 3) した後、37°C で 1 時間インキュベートする。
- ④ 5 M NaCl を 100 μl 加え、30 分攪拌する。
- ⑤ CTAB/ NaCl solution を 80 μl 加え、30 分攪拌した後、65°C で 10 分間インキュベートする。
- ⑥ 800 μl のクロロホルムを加え、30 分攪拌した後、遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) し、上清を新しいチューブに分取する。上清は粘性が高いため、一本のチューブあたり 400 μl もとれば十分である。
- ⑦ 400 μl のフェノール/クロロホルムを加え、30 分攪拌、遠心 (13,000 rpm、10 min、RT) し、上清を新しいチューブに分取する。
- ⑧ 300 μl の 2-プロパノールを加え、5 分攪拌した後、DNA を遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) により回収する。
- ⑨ 1.5 ml チューブあたり 500 μl の 70% エタノールでリンスし、残った CTAB を除去する。
- ⑩ ペレットを 100 μl の終濃度 1 μg/ ml の RNaseA を含む TE buffer に溶解し、37°C で 15 時間反応させた後、-20°C で使用時まで保存した。

2- 2- 4 . Polymerase chain reaction (PCR)

芳香族化合物初発酸化酵素の terminal oxygenase component、large subunit には、Rieske-type 鉄硫黄クラスターの形成に関与するアミノ酸残基が保存されている [Rieske et al., 1964]。そこでこのモチーフをターゲットとして縮重プライマー primer Rieske forward (5'- TGYCGBCAYCGBGGS AWG- 3')、primer Rieske reverse (5'- CCAGCCGTGRTARSTGCA- 3') を合成した(クシアケム)。

PCR反応は、AmpliTaq Gold (PE Biosystems)と GeneAmp PCR System 9700 (PE Biosystems)を使用し、以下の条件で行った。

反応液組成：	template DNA	1 μ l
	Primer	1 μ l each
	10 x PCR buffer (1.5 mM MgCl ₂)	10 μ l
	dNTPs mix (10 mM each)	10 μ l
	Taq DNA polymerase	0.5 μ l
	H ₂ O	76.5 μ l

温度プログラム：	1 cycle	96°C	10 min
	40 cycles	95°C	1 min
		55°C	1 min
		72°C	2 min
	1 cycle	72°C	10 min
	1 cycle	4°C	∞

2- 2- 5 . アガロースゲルからの DNA の回収

本章で DNA のアガロースゲル電気泳動には、Tris- acetate- EDTA (TAE) buffer と 0.9%アガロース ME (岩井化学) を用い、ミュールピッド小型電気泳動槽内で 50- 100 V で行った。以後、特に明記しない場合はこの DNA アガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルからの DNA の回収は GENE CLEAN II KIT (Bio 101) を用い、NaI 法により行った。操作手順は細胞工学実験プロトコールに従った。

【試薬】

① 50xTAE buffer

2 M	Tris- acetate (pH 8.0)
0.05 M	EDTA

② NaI solution

③ NEW wash solution

7 ml	NEW concentrate
140 ml	H ₂ O

100%エタノールで 300 ml までメスアップ。- 20°Cで保存。

【操作】

- ① DNA アガロースゲル電気泳動を行い、UV 照射下で目的のバンドを含むゲルを切り出し、2 ml のマイクロチューブに入れる。
- ② ゲル 0.4 g あたり 1 ml の NaI 溶液を加え、50°Cで加温し、ゲルを完全に溶解させる。
- ③ 5 μ l の GLASS MILK を加えて vortex ミキサーで 2- 3 秒の攪拌を行い、DNA を GLASSMILK の

表面に吸着させる。

- ④ 遠心 (15,000 rpm、5 sec、4°C) により、上清を除去する。
- ⑤ 800 μ l の NEW wash solution に沈殿した GLASSMILK を懸濁させ、再び遠心 (15,000 rpm、5 sec、4°C) を行い、上清を除去する。
- ⑥ ⑤の操作を 2 回繰り返した後、沈殿した GLASSMILK を 10 μ l の TE buffer にピペティングにより懸濁する。
- ⑦ 55°C、10 分間の熱処理を行い、GLASSMILK に吸着している DNA を溶出させる。
- ⑧ 遠心 (13,000 rpm、5 sec、RT) を行い、GLASSMILK を沈殿させ、上清を新しいチューブに分取する。

2-2-6. サザンハイブリダイゼーション解析

本研究ではメンブレンには Hybond- N⁺ (Amersham) を使用した。プローブの作成とハイブリダイゼーションは non-radio system DNA labeling and detection kit (ペーリンガー・マンハイム) を用いて以下の方法で行った [Southern, 1975]。

2-2-6-1. プローブの作成

【操作】

- ① プローブとして用いる DNA 断片を 2-2-5 の方法により精製する。
- ② 精製した DNA 1 μ g を 96°C で 10 分間熱変性し、水中で急冷することにより一本鎖 DNA に解離させる。
- ③ ヘキサヌクレオチド混合液を 2 μ l、dNTP ラベリング混合液 (digoxigenin で標識された dUTP を含む) を 2 μ l、滅菌水を 5 μ l、Klenow fragment (2 U/ μ l) を 2 μ l 加えて、37°C で一晩反応させる。
- ④ 反応液に 0.2 M EDTA (pH 8.0) 溶液を 2 μ l 加えてラベリング反応を停止させる。
- ⑤ エタノール沈殿によりラベル化された DNA を回収し、70%エタノールでリンスする。
- ⑥ 50 μ l の 0.1% SDS を含む TE buffer に溶解させる。

2-2-6-2. ハイブリダイゼーション及び検出

【試薬】

- ① Denaturation buffer

0.5 M	NaOH
1.5 M	NaCl
- ② Neutralization buffer

0.5 M	Tris- HCl (pH 7.0)
3 M	NaCl
- ③ 20 x SSC (pH 7.0)

	3 M	NaCl
	0.3 M	Trisodium citrate dihydrate
④ Hybridization buffer	5 x SSC	
	0.5% (wt/ vol)	blocking reagent
	0.1% (wt/ vol)	<i>N</i> - lauroylsarcosine sodium salt
	0.02% (wt/ vol)	SDS
⑤ Buffer 1	0.1 M	Tris- HCl (pH 7.0)
	0.15 M	NaCl
⑥ Buffer 2	0.5% (wt/ vol)	blocking reagent in Buffer 1
⑦ Buffer 3	0.1 M	Tris- HCl (pH 9.5)
	0.1 M	NaCl
	0.05 M	MgCl ₂
⑧ 発色試薬	45 μl	NBT in dimethylformamide
	35 μl	X- phosphate in dimethylformamide
	10 ml	Buffer 3
⑨ TE buffer		

【操作】

- ① 電気泳動をしたゲルを 0.25 M HCl 中で 30 分間処理し、DNA の断片化を行う。
- ② Denaturation buffer で 15 分間処理を 2 回行う。
- ③ Neutoralization buffer で 15 分間処理を 2 回行う。
- ④ ナイロンメンブレン Hybond- N⁺に DNA 断片をキャピラリーブロッティング法によりトランスファーする（一晚）。
- ⑤ トランスファー後のフィルターを 2 x SSC で軽く洗浄し、風乾する。
- ⑥ UV を 3 分間照射し、DNA をフィルターに固定する。
- ⑦ メンブレンフィルター100 cm²あたり 10 ml の Hybridization buffer を加え、ハイブリダイゼーションバック内で 68°C、4 時間以上プレハイブリダイゼーションを行う。
- ⑧ メンブレンフィルター100 cm²あたり 10 μl の digoxigenin ラベルしたプローブ溶液を加え、68°C で 12 時間以上ハイブリダイゼーションさせる。
- ⑨ メンブレンフィルターを 2 x SSC+0.1% SDS で 15 分間、室温で 2 回洗浄し、未反応のプローブを除去する。

- ⑩ メンブレンフィルターを 0.1 x SSC+ 0.1% SDS で 15 分間、68°C で 2 回の洗浄を行う。
- ⑪ Non- radio system DNA labeling and detection kit DIG- ELISA に添付の説明書に従って発色反応を行う。

2- 2- 7. ベクターの脱リン酸化

本研究でベクターの脱リン酸化には calf intestine alkaline phosphatase (CIAP, ベーリンガー・マンハイム) 使用し、細胞工学実験プロトコールに従って行った。

【試薬】

- ① 3 M sodium acetate (pH 5.2)
- ② 10 x CIAP buffer

0.5 mM	Tris- HCl (pH 9.0)
10 mM	MgCl ₂
- ③ CIAP (1U/ μ l)
- ④ proteinase K solution

1 mg を 266 μ l の H₂O に溶解させる。
- ⑤ 250 mM EDTA (pH 8.0)
- ⑥ 10% SDS

【操作】

- ① ベクターを各種制限酵素で切断する。
- ② フェノール/クロロフォルム抽出した後、3 M sodium acetate を終濃度 0.1 mM 以上になるよう添加し、水溶液の 2.5 倍量のエタノールを加えて vortex ミキサーにより攪拌する。攪拌後、遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) により DNA を回収し、エタノールリンスにより、残留しているフェノール/クロロフォルムや塩を除去する。
- ③ 43 μ l の TE buffer に溶解させる。
- ④ CIAP buffer 5 μ l と CIAP 1 μ l を加え、37°C で 20 分間反応させる。
- ⑤ 再び CIAP 1 μ l を加え、さらに 37°C で 20 分間反応させる。
- ⑥ 250 mM EDTA 2 μ l、10 % SDS 3 μ l、proteinase K solution 4 μ l を加え、37°C で 1 時間以上反応させ、CIAP を失活させる。
- ⑦ フェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿により DNA を回収し、エタノールリンスを行う。
- ⑧ TE buffer 10 μ l に溶解させる。

2- 2- 8. コンピテントセルの作製

本研究でコンピテントセルの作製は、細胞工学実験プロトコールに従って行った。

【試薬】

① Ψ a plate

5 g	Bacto- triptone
20 g	Bacto- yeast extract
5 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O
16 g	agar

蒸留水で 1 liter に fill up して、オートクレーブ後シャーレに分注。

② Ψ b 培地

Ψ a に agar を加えないもの

③ Tfb I

30 mM	potassium acetate
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15% (vol/ vol)	glycerol

0.2 M CH₃COOH で pH 5.8 に調整。

④ Tfb II

10 mM	3- (N- morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15% (vol/ vol)	glycerol

KOH で pH 6.5 に調整。

【操作】

以下の操作は全て 4°C で行う。

- ① Ψ a プレートで前培養した *E. coli* のシングルコロニーを 5 ml の Ψ b 培地に植菌し、37°C で 3 時間振とう培養する (300 strokes/ min)。
- ② 前培養液を 100 ml の Ψ b 培地が入った坂口フラスコに移し、optical density at 550 nm (OD₅₅₀)=0.48 になるまで 37°C で振とう培養する (120 rpm)。
- ③ 培養液を 5 分間氷冷し、遠心 (3,500 rpm、10 min、4°C) により集菌する。
- ④ 菌体を 40 ml の Tfb I に懸濁し、氷上で 5 分間静置した後、遠心 (3,500 rpm、10 min、4°C) により集菌する。
- ⑤ 菌体を 4 ml の Tfb II に懸濁し、氷上で 15 分間静置した後、100 ml ずつ分注し、使用時まで - 80°C で保存する。

2- 2- 9 . 大腸菌の形質転換

本研究では、Hanahan の方法 [Hanahan, 1983] に基づき、細胞工学実験プロトコールに従って行っ

た。

【試薬】

① SOC 培地

2% (wt/ vol)	Bacto- tryptone
0.5% (wt/ vol)	Bacto- yeast extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄

【操作】

- ① 氷上で融解させたコンピテントセル 100 μ l にプラスミド溶液を 2- 10 μ l 加え、氷上で 45- 60 分間静置する。
- ② 42°C で 90 秒間の heat shock を与え、氷上で 2 分間静置する。
- ③ SOC 培地を 500 μ l 加えて、37°C で 30- 45 分間培養する。
- ④ Ap 50 μ g/ ml、isopropyl- β - D- thiogalactopyranoside (IPTG) 0.1 mM、5- bromo- 4- chloro- 3- indolyl- β - galactoside (X- gal) 20 μ g/ ml を含むプレートに培養液を塗布し、37°C で一晩静置培養する。

2- 2- 10 . 大腸菌からのプラスミド及びコスミド回収

本研究では、アルカリ SDS 法 [Birnboim and Doly, 1979] により行った。

【試薬】

① TEG solution

25 mM	Tris- HCl (pH 8.0)
10 mM	EDTA
50 mM	glucose

② NaOH- SDS solution

0.2 N	NaOH
1% (wt/ vol)	SDS

③ 5 M KOAc

29.4 g	potassium acetate
11.5 ml	AcOH

蒸留水で 100 ml にメスアップ。

④ TE buffer

⑤ 12.5 M LiCl

⑥ RNaseA solution

【操作】

- ① 5 ml の 2×YT 培地あるいは LB 培地に *E. coli* を植菌し、37°C で 6-12 時間振とう培養する。
- ② 2 ml の培養液を 2 ml チューブに移し、遠心 (13,000 rpm、1 min、RT) により集菌する。
- ③ ②の遠心を再度繰り返して培地を可能な限り除く。
- ④ 100 μl の TEG に菌体を vortex ミキサーで懸濁させる。
- ⑤ 200 μl の NaOH- SDS を加え invert により穏やかに攪拌し、氷上で 5 分間静置する。
- ⑥ 150 μl の 5 M KOAc を加え invert により穏やかに攪拌し、氷上で 5 分間以上静置する。
- ⑦ 遠心 (15,000 rpm、10 min、4°C) を行い、上清 350 μl を新しいチューブに回収する。
- ⑧ 350 μl のフェノール/クロロフォルムを加え、ローテーターで 10 分間混合する。
- ⑨ 遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) した後、水相 350 μl を分取し、新しい 1.5 ml チューブに移す。
- ⑩ 350 μl の 2-プロパノールを加え、ローテーターで 10 分間混合する。
- ⑪ 遠心 (13,000 rpm、2.5 min、RT) を行い、上清を捨てる。
- ⑫ 沈殿を 400 μl の 70%エタノールでリンスする。
- ⑬ 沈殿を 100 μl の TE buffer に溶解する。
- ⑭ 25 μl の 12.5 M LiCl を加えローテーターで 10 分間混合し、氷上で 15 分間静置する。
- ⑮ 遠心 (15,000 rpm、15 min、4°C) により RNA 等を沈殿させ、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。
- ⑯ 300 μl の TE buffer に溶解後、1 ml のエタノールを加え、室温でエタノール沈殿を行う。
- ⑰ 400 μl の 70%エタノールでリンスする。
- ⑱ 100 μl の終濃度 100 μg/ml の RNaseA を含む TE buffer に溶解させ、37°C で 1 時間放置する。
フェノール/クロロフォルム処理の後、エタノール沈殿でプラスミドを回収し、使用時まで -20°C で保存する。

2- 2- 1 1 . コスミドライブラリーの構築

本研究では SuperCos1 Cosmid Vector Kit (STRATAGENE) を用いて、添付の説明書に従って行った。コスミドのパッケージングには Gigapack II XL packaging extract (STRATAGENE) を使用した。

2- 2- 1 1- 1 . インサート DNA の調製

コスミドベクターに挿入するための約 30- 40 kb 程度の長さの DNA 断片を得るために、DBF63 株の total DNA の *Bam*HI による partial digestion を、細胞工学実験プロトコールに従って行った。

【操作】

- ① Total DNA 溶液 810 μl と制限酵素用 10 x K buffer (宝酒造) 90 μl をピペティングにより混合する。
- ② ①の溶液を 300 μl ずつ分注し、2⁴, 2⁵, 2⁶ 倍に希釈した *Bam*HI を 20 μl 加え、37°C で 1 時間反応させる。

- ③ 65°Cで 15 分間反応させ、酵素を失活させる。
- ④ フェノール/クロロホルム抽出を 2 回行い、エタノール沈殿で DNA を回収し、使用時まで- 20°C で保存する。

2- 2- 1 1- 2. コスミドベクターの調製とライゲーション

【操作】

- ① SuperCos1 plasmid solution を制限酵素 *Xba*I で切断し、2-2-7 に従って DNA 末端の脱リン酸化を行う。
- ② *Bam*HI により切断し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、20 μ l の TE buffer に溶解する。
- ③ DNA ligation kit ver.2 (宝酒造) を用いて、4 μ l の SuperCos1 溶液 (0.23 μ l/ μ g) と 1 μ l のインサート用 DNA 断片を反応させた。

2- 2- 1 1- 3. パッケージング

【試薬】

① SM buffer

100 mM	NaCl
8 mM	MgSO ₄ · 7H ₂ O
50 mM	Tris- HCl (pH 7.5)
0.01% (wt/ vol)	gelatin

【操作】

- ① Packaging extract の入ったマイクロチューブを指先で温めて溶解させ、溶けたらすぐに ligation 溶液を 0.1- 0.4 mg DNA/ 1- 4 μ l solution となるように加える。
- ② ピペッティングにより穏やかに攪拌した後、spin down する。
- ③ 22°Cで 2 時間反応させる。
- ④ SM buffer を 500 μ l、クロロホルムを 20 μ l 加え、穏やかに攪拌する。
- ⑤ 遠心して spin down し、上清をファージ液とした。

2- 2- 1 1- 4. 大腸菌への感染

【試薬】

- ① SM buffer
- ② 20% maltose
- ③ 10 mM MgSO₄

【操作】

- ① 50 μ l の 20% maltose と 50 μ l の 1 M MgSO₄ を加えた LB 培地に *E. coli* XLI- Blue MR のシングル

コロニーを植菌し、30°Cで一晩振とう培養する（300 rpm）。

- ② 遠心（2,000 rpm、10 min、4°C）して集菌する。
- ③ OD₆₀₀=1.0 程度になるよう 10 mM MgSO₄ に懸濁する。
- ④ ファージ液を SM buffer に対して 1 : 10、1 : 50 の割合で希釈する。
- ⑤ 25 μl のファージ液に対して 25 μl の大腸菌懸濁液を加え、室温で 30 分間反応させる。
- ⑥ 200 μl の LB 培地を加え、37°C で 1 時間反応させる。
- ⑦ 遠心（5,000 rpm、5 min、RT）して集菌する。
- ⑧ 500 μl の LB 培地に懸濁し、Ap を加えた 2 x YT プレートに塗布して培養する。

2- 2- 1 2 . コロニーハイブリダイゼーション

2- 2- 1 2- 1 . プロープの作成

本研究で、プロープの標識には Megaprime™ DNA labeling system（アマシャム・ファルマシア）を使用した。

【操作】

- ① プロープとして用いる DNA 断片を 2-2-5 の方法により精製する。
- ② 精製した DNA 1 μg、滅菌水を 9 μl、Primer solution を 2 μl 加えて、96°C で 5 分間熱変性し、氷中で急冷することにより一本鎖 DNA に解離させる。
- ③ Labeling buffer を 4 μl、[α-³²P]dCTP を 2 μl、Klenow fragment (2 U/ μl) を 1 μl 加えて、37°C で 30 分間反応させる。
- ④ 使用時まで氷上で保持する。

2- 2- 1 2- 2 . メンブレンフィルターの作成

【試薬】

- ① Denaturation buffer
- ② Neutralization buffer
- ③ washing solution

50 mM	NaOH
0.1% (wt/ vol)	SDS

【操作】

- ① 2 x YT プレートにメンブレンフィルターをのせ 1 分間放置し、コロニーをうつしとる。
- ② Denaturation buffer をしみこませた濾紙の上に置き、室温で 5 分間放置する。
- ③ Neutralization buffer をしみこませた濾紙の上に置き、室温で 5 分間放置する。
- ④ 2 x SSC をしみこませた濾紙の上に置き、室温で 5 分間放置する。
- ⑤ 風乾させた後、100°C、15 分間 baking して、メンブレンフィルターと DNA を架橋させる。

- ⑥ Washing buffer で 15 分間振とうしながら洗浄する。
- ⑦ フィルター 1 枚あたり 100 ml の 2 x SSC でメンブレンフィルターを 15 分間振とうしながら洗浄する。
- ⑧ UV を 3 分間照射し、DNA をメンブレンフィルターに固定する。

2- 2- 1 2- 3 . ハイブリダイゼーション及び検出

ハイブリダイゼーションに用いるバッファーとして Rapid hybridization buffer (アマシャム・ファルマシア) を用いた。以下の操作で、12 cm x 9 cm のメンブレンフィルター 1-5 枚の処理が可能である。

【試薬】

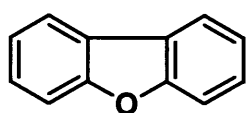
- ① ニシン精子 DNA
- ② 20 x SSC
- ③ 10% (wt/ vol) SDS

【操作】

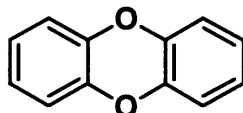
- ① メンブレンフィルター 1 枚あたり 20 μ l のニシン精子 DNA を 0.5 ml 容マイクロチューブに入れ、95°C で 5 分間熱変性した後、氷中で急冷することにより一本鎖 DNA に解離させる。
- ② ①の DNA 溶液と Rapid hybridization buffer をフィルター 1 枚あたり 1 ml 加え、ハイブリダイゼーションバック内で 65°C で 2 時間以上プレハイブリダイゼーションを行う。
- ③ メンブレンフィルター 1 枚あたり 4 μ l のニシン精子 DNA を 0.5 ml 容マイクロチューブに入れ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - labeled probe を加えて 95°C で 5 分間熱変性した後、氷中で急冷することにより一本鎖 DNA に解離させる。
- ④ ③の DNA 溶液と Rapid hybridization buffer をフィルター 1 枚あたり 1 ml 加え、65°C で 16 時間以上ハイブリダイゼーションさせる。
- ⑤ メンブレンフィルターを 1 x SSC+0.1% SDS で 30 分間、65°C で洗浄し、未反応のプローブを除去する。
- ⑥ メンブレンフィルターを 0.1 x SSC+0.1% SDS で 30 分間、65°C で 2 回の洗浄を行う。
- ⑦ メンブレンフィルターの水分を除いてラップで包み、イメージングプレート (富士フィルム) を用いて露光した後、バイオイメージングアナライザ BAS- 2000II (富士フィルム) で検出した。

2- 2- 1 3 . 休止菌体反応と反応液からの代謝物の抽出

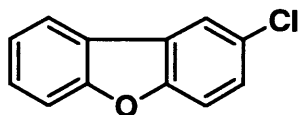
本章においては CFMM 培地 (Table. 2- 4) を菌体の洗浄と反応 buffer として使用した。DFDO による変換産物の同定を行った基質としては、DF と類似の構造を有するヘテロ環式芳香族化合物として DD、CAR、xanthene、phenoxathiin、2- CDF、2,8- DCDF、2- CDD、2,3- DCDD、2,7- DCDD、1,2,3- TCDD、PAHs として FN、9- fluorenone、naphthalene、phenanthrene、anthracene を用いた。基質の構造は Fig. 2- 1 に示した。反応基質は dimethyl formamide (DMF) もしくは dimethyl sulfide (DMSO) に濃度が 1 mg/ ml となるよう溶解させた。



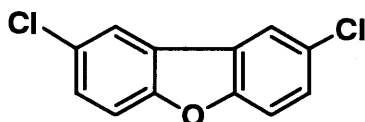
DF



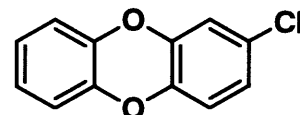
DD



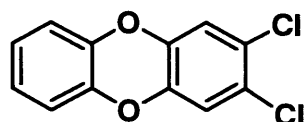
2-CDF



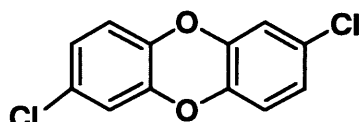
2,8-DCDF



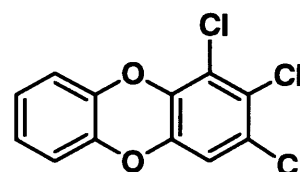
2-CDD



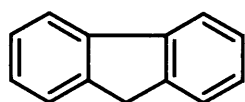
2,3-DCDD



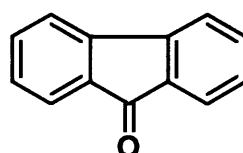
2,7-DCDD



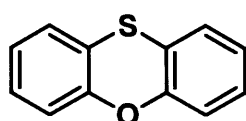
1,2,3-DCDD



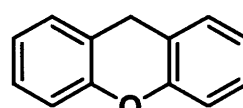
FN



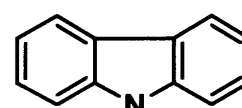
9-Fluorenone



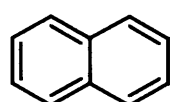
Phenoxathiin



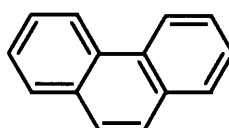
Xanthene



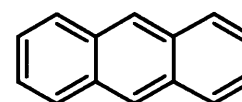
CAR



Naphthalene



Phenanthrene



Anthracene

Fig. 2-1. Chemical structure of the substrates used for resting cell reactions.

【試薬】

- ① 1N HCl
- ② 酢酸エチル
- ③ 無水硫酸ナトリウム

【操作】

- ① 目的のタンパク質を発現する組換え大腸菌を5 mlの2 x YT培地で37°C、一晩振とう培養する(300 strokes/ min)。
- ② 100 mlの2 x YT培地に植え継ぎ、OD₅₅₀=1.0になるまで37°Cで振とう培養する(120 rpm)。
- ③ IPTGを終濃度0.1 mMになるよう添加し、さらに数時間同じ条件で培養しタンパク質の発現を誘導する。
- ④ 培養液を遠心(3,500 rpm、10 min、4°C)により集菌する。
- ⑤ 4°Cに冷やしたCFMM培地を30 ml加え、菌体を懸濁することにより洗浄し、再び遠心(3,500 rpm、10 min、4°C)により集菌する。
- ⑥ ⑤の操作を再度繰り返し、計2回の洗浄を行う。
- ⑦ 回収した菌体をCFMM培地5 mlに懸濁し、反応基質を加えて30°Cで18時間振とう(300 strokes/ min)することにより反応させる。
- ⑧ 反応液を遠心(3,500 rpm、10 min、4°C)し、上清4 mlをガラスチューブに取る。
- ⑨ 1N HClで酸性(pH 2-3)にするか、もしくは中性のまま、4 mlの酢酸エチルを加え、vortexミキサーによる攪拌を1分間行う。
- ⑩ 遠心(3,500 rpm、30 min、RT)により水相と酢酸エチル相を分離する。
- ⑪ 酢酸エチル相をガラスピペットで新しいガラスチューブに移す。
- ⑫ 無水硫酸ナトリウムにより脱水する。
- ⑬ 脱水した酢酸エチル相をカラムを通すことにより、硫酸ナトリウムを濾過する。
- ⑭ 遠心エバポレーターを用いて、40°C以下の条件で濃縮する。

2- 2- 1 4 . Gas chromatography- mass spectrometry (GC- MS)分析

本研究ではJMS- Automass 150 GC- MS system (JOEL, Ltd.)を用い、以下に示す条件でGC- MS分析を行った。休止菌体反応後の抽出物については、*N*- methyl- *N*- trimethylsilylfluoroacetamide (MSTFA)によるtrimethylsilyl (TMS)化を行い、分析に供した。

カラム	Fused- silica chemically bonded capillary column DB- 5 (0.25 mm [inside diameter] by 15 m, 0.25- μm film thickness; J&W Scientific Inc.)
Injection mode	splitless mode
Injection 温度	230°C
イオン化電圧	70 eV

head pressure	65 kPa (He gas)	
昇温プログラム	initial temp.	60°C
	rate A	4°C/ min
	final temp. A	72°C
	rate B	16°C/ min
	final temp. B	280°C

2- 2- 1 5 . DNA 塩基配列決定法

2- 2- 1 5- 1 . Deletion mutant の作製

本章でプラスミド上にクローン化した断片の deletion には、Kilo- sequence 用 Deletion Kit (宝酒造) を用い、exonuclease III による unidirectional deletion 法 [Henikoff, 1984]で行った。実際の操作は添付の説明書に従った。

2- 2- 1 5- 2 . シークエンス用プラスミド DNA の精製

【試薬】

- ① 13% (wt/ vol) polyethylene glycol (PEG) 8000 水溶液
- ② 5M NaCl

【操作】

- ① 2-2-10 の方法でプラスミドを回収し、RNase 処理後、はじめの大腸菌培養液 4 ml 分を 1 本のチューブにまとめ全量 200 μ l とする。
- ② 200 μ l のフェノール/クロロホルムを用いて抽出した後、20 μ l の 3 M sodium acetate、500 μ l のエタノールを加えて DNA を回収した後、沈殿を 70%エタノールでリンスする。
- ③ 沈殿を 33.6 μ l の滅菌水に溶解し、6.4 μ l の 5 M NaCl を加える。
- ④ PEG 溶液を 40 μ l 加えて氷中で 25 分間放置し、プラスミドを沈殿させる。
- ⑤ 遠心 (15,000 rpm、15 min、4°C) により沈殿を回収する。
- ⑥ 70%エタノールでリンスする。
- ⑦ 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解し、260 nm の吸光度 (A_{260})の測定により DNA 量を定量する。

2- 2- 1 5- 3 . シークエンス反応

反応試薬は PRISM Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.)を使用し、添付の説明書に従って反応液を調製した。1 μ l (3.2 pmol) のプライマー溶液 (-21 M13 primer [5'-TGTAACGACGGCCAGT-3']、もしくは M13 RP1 primer [5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'])、8 μ l の PRISM 溶液、0.3- 0.5 μ g 分の DNA 溶液を混合し、滅菌蒸留水で全量が 20 μ l となるように調製した。

シークエンス反応は PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC- 700 (ASTECC)を用い、以下に示す温度プログラムで行った。反応液からの反応産物の精製は、添付の説明書に従い、エタノール沈殿により

行った。

25 cycles	96°C	30 sec
	50°C	15 sec
	60°C	4 min
1 cycle	4°C	∞

2-2-15-4. 電気泳動及びデータ解析

オートシーケンサー Applied Biosystems 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc.) を用い、dideoxy 法 [Sanger et al., 1977] で行った。電気泳動は 6% アクリルアミド (アクリルアミド:ビス=19:1)、8 M 尿素含有ゲルを用い、泳動 buffer として Tris-borate-EDTA (TBE) buffer を使用した。電気泳動のデータ解析は、373A ソフトウェア (ver.1.2.1) で自動解析した。シーケンスデータの解析は、DNASIS Mac (ver 3.7, Hitachi Software Engineering Co. Ltd.) を用いた。決定した塩基配列のホモロジー検索は、GenBank DNA database または SWISS PROT protein database を用いて行った。アミノ酸のアラインメントには、Clustal W software [Thompson et al., 1994] を用いた。また、PHYLP package (ver.3.5c) [Felsenstein, 1985] を用いて、Neighbor-joining 法 [Saitou and Nei, 1987] により分子系統樹の作製を行った。

2-2-16. DNA 塩基配列の accession number

本章で決定した塩基配列は、DDBJ、EMBL、GenBank nucleotide sequence database に登録しており、accession number は AB054975 である。

2-3. 結果

2-3-1. PCR法による oxygenase component をコードする遺伝子の増幅と検出

一般に芳香族化合物初発酸化酵素の oxygenase component large subunit のアミノ酸配列においては、電子伝達に参与する Rieske-type の鉄硫黄クラスター [2Fe-2S] の形成に参与するアミノ酸残基が保存されている。そこで、これら残基とその周辺領域の配列を基に PCR の縮重プライマーを設計した (Fig. 2-2A)。

このプライマーを用いた PCR によって DBF63 株の total DNA から 78 bp の DNA 断片が増幅されたため (Fig. 2-2B)、この断片を pT7Blue T-vector に組み込み塩基配列を決定した。PCR 増幅 DNA 断片の推定アミノ酸配列(26 残基)について、SWISS-PROT amino acid sequence databank から相同配列の検索を行ったところ、最も高いもので BphA1 (*Pseudomonas* sp. KKS102) [Fukuda et al., 1994] の相当する部分と 69.2% の identity を示した。

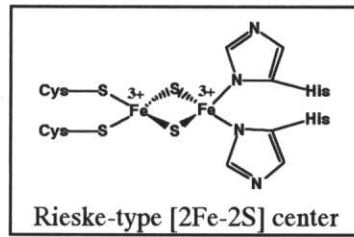
増幅された 78 bp の DNA 断片をプローブとし、DBF63 の total DNA に対してザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、この遺伝子は約 8 kb の *Bam*HI 断片にコードされていることが示された (Fig. 2-3)。また約 8 kb の *Bam*HI 断片の他にも、約 11 kb と約 2.7 kb の *Bam*HI 断片が弱い陽性バンドとして検出され、他の制限酵素で処理した場合でも、複数の陽性バンドが検出されたことから、DBF63 株には少なくとも 3 種類の芳香族化合物初発酸化酵素の oxygenase component large subunit が存在する可能性が示唆された。

2-3-2. DFDO の oxygenase component (*dbfA1A2* 遺伝子)のクローニング

DBF63 株 total DNA のコスミドライブラリーを作製し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した 78 bp の PCR 産物をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果、30 個以上もの陽性クローンが得られたため、20 クロンの選択し、制限酵素地図の作製及びハイブリダイゼーション解析を行った (Fig. 2-4)。19 クローン (pCC1-3、pCC5-20) において 8 kb *Bam*HI 断片に強いシグナルが、また 20 クローン (pCC1-20) 全てで 11 kb *Bam*HI 断片に弱いシグナルが検出された。さらに Fig. 2-4 に示したように、これら 8 kb と 11 kb の *Bam*HI 断片は互いに隣接していることも明らかとなった。しかしながら、他のクローンについても同様な実験を行ったところ、2.7 kb *Bam*HI 断片を含むクローンは得られなかった。

PCR 産物とハイブリダイズする DNA 領域をコスミドクローンからサブクローニングし、制限酵素地図を作製した (Fig 2-5)。続いて oxygenase の活性を検出する目的で、pDF01-07、pDF20、pDF32 を保持する *E. coli* JM109 について休止菌体反応による DF の変換を試みたところ、pDF04 と pDF32 を保持する *E. coli* において 2,2',3-THB への変換が確認された (Fig 2-5)。この結果より、pDF32 の約 2.5 kb *Bgl*II-*Sph*I 断片上に

(A)



(B)

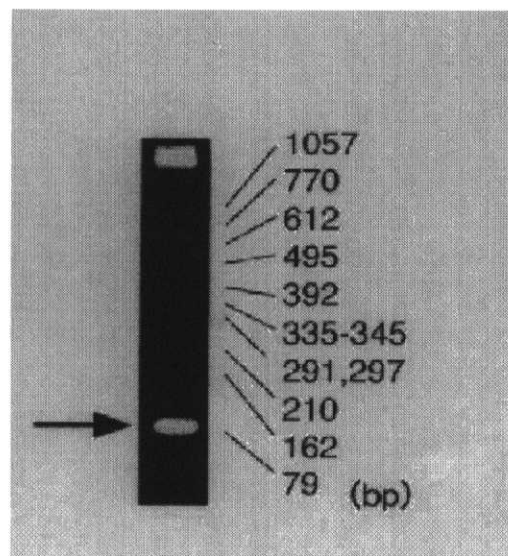


Fig. 2-2. A set of the designed PCR primer (A), and the size of the PCR product (B).

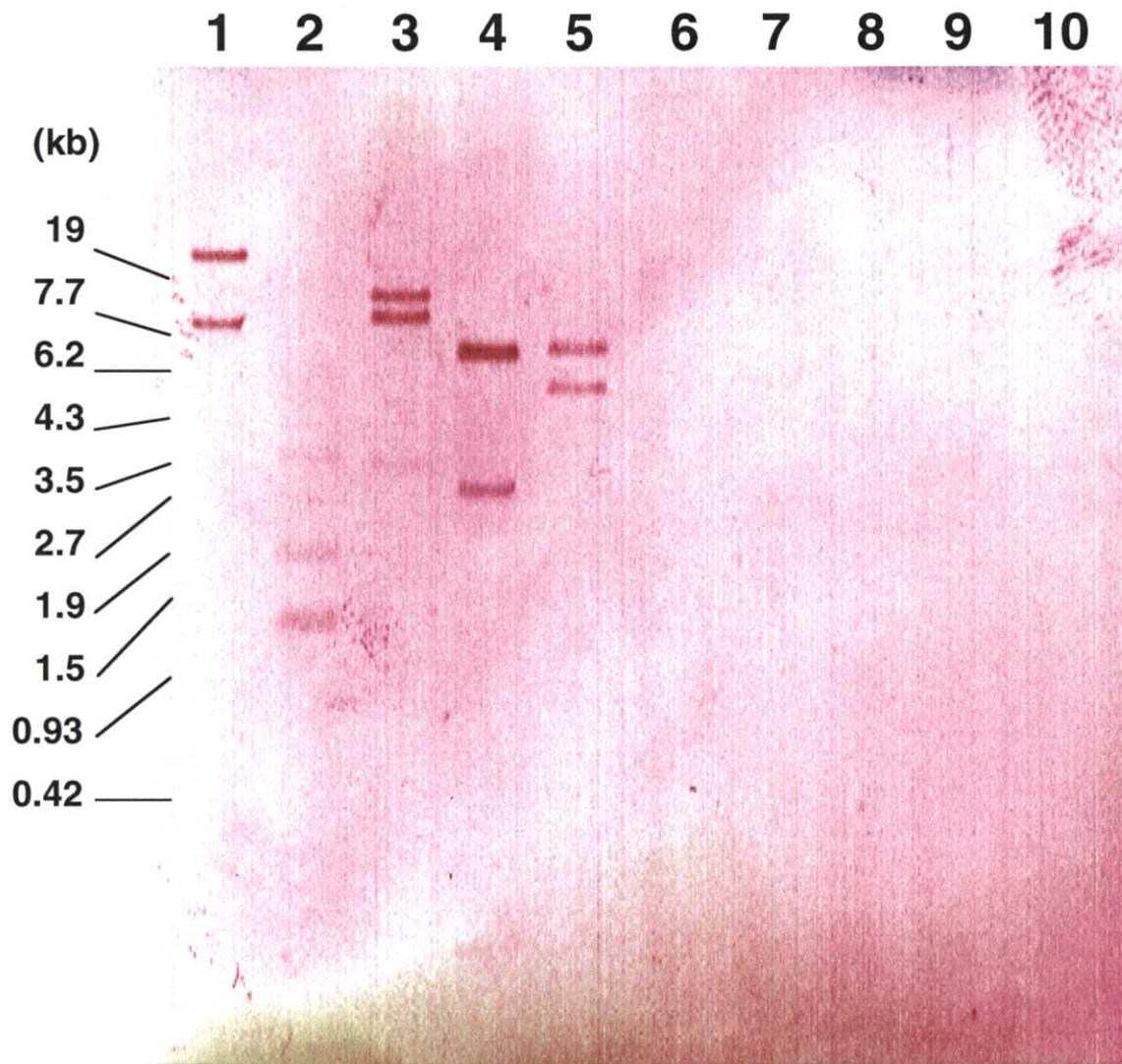


Fig. 2-3. Southern blot analysis using the PCR product as a probe. Total DNA of strain DBF63 were digested with *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *PstI*, and *SphI*, and the resultant digests were loaded onto lanes 1, 2, 3, 4, and 5, respectively. Also, total DNA of strain DBF63W [Kasuga et al., 1997] were digested with *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *PstI*, and *SphI*, and the resultant digests were loaded onto lanes 6, 7, 8, 9, and 10, respectively.

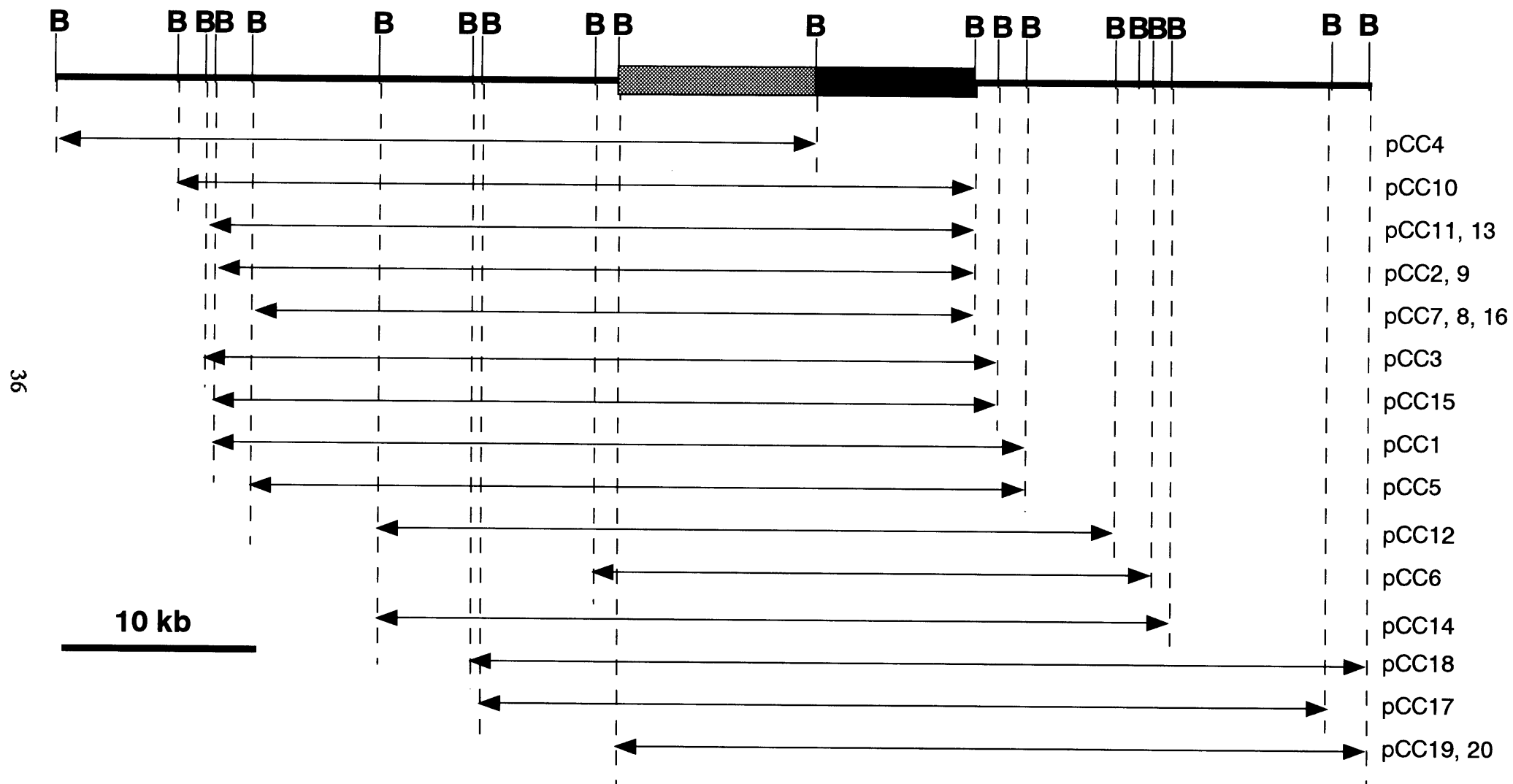


Fig. 2-4. The *Bam*HI-restriction mapping of the isolated cosmid clones. Gray and black boxes indicate 11-kb and 8-kb *Bam*HI fragments, respectively, which were hybridized with the 78-bp PCR product used as the probe.

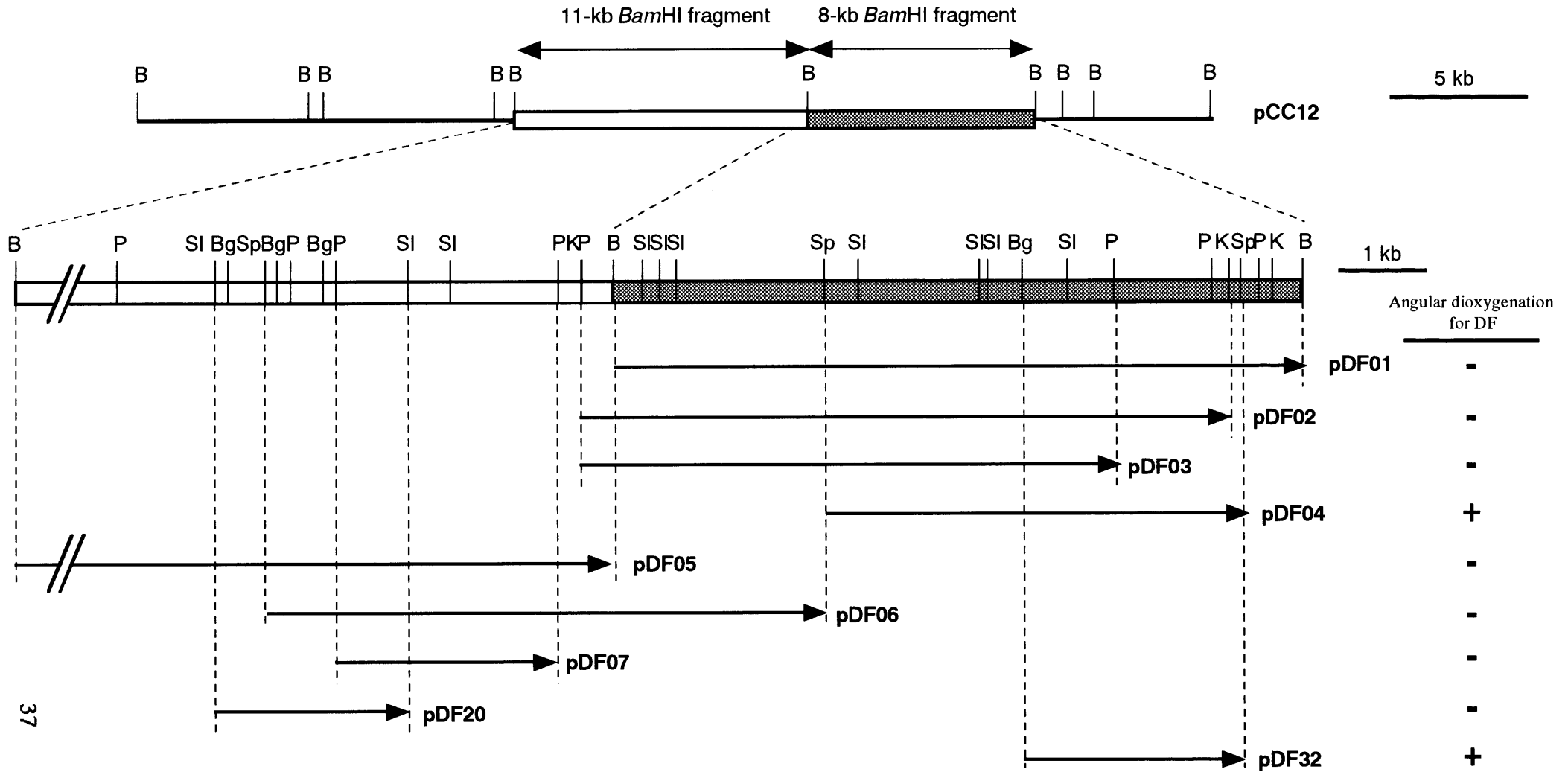


Fig. 2-5. Physical map of the 19-kb DNA region containing two ring-hydroxylating dioxygenases from *Terrabacter* sp. strain DBF63. The solid arrows indicate the direction of transcription from the *lac* promoter of the cloning vector pUC119. pCC12 is one of cosmid clones shown in Fig. 2-4. The presence (+) or absence (-) of angular dioxygenase activity for dibenzofuran is shown at the right. Restriction designations are B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; K, *Kpn*I; SI, *Sal*I; Sp, *Sph*I; P, *Pst*I.

angular dioxygenase の terminal oxygenase component がコードされている可能性が示唆された。しかしながら、活性の確認された pDF04 の全領域を含む pDF01 と pDF02 を保持する *E. coli* の休止菌体反応では DF に対する angular dioxygenase 活性は確認されず、また、もう一つの oxygenase component の全領域がコードされていると考えられる pDF05 と pDF06 についても活性は検出されなかった。

そこで pDF32 の約 2.5 kb *Bgl*III-*Sph*I 領域について塩基配列を決定し、コンピュータ解析を行ったところ、2 個の open reading frames (ORF; 上流から ORF1、ORF2 と命名) が認められた。ORF1 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したところ、他の芳香族化合物分解系 multicomponent dioxygenase system の large subunit である NidA (*Rhodococcus* sp. I24) [Treadway et al., 1999]、PhdA (*Nocardioides* sp. KP7) [Saito et al., 2000]、NarAa (*Rhodococcus* sp. NCIMB12038) [accession number AF082663] とアミノ酸レベルでそれぞれ 38、37、37% の identity を示した。また、Rieske-type の [2Fe-2S] クラスターとの結合に参与するアミノ酸残基である CXHX₁₆₋₁₇CXXH という配列 [Rieske et al., 1964] や、反応に直接関与すると考えられる 2 価の鉄イオンの結合領域と考えられる部位 [Jiang et al., 1996] も存在していた (Fig. 2-6)。一方 ORF2 は、multicomponent dioxygenase system の small subunit である BphA2 (*R. erythropolis* TA421) [accession number D88020]、BnzB (*P. putida*) [accession number P08085] TodC2 (*P. putida* F1) [Zylstra and Gibson, 1989] とアミノ酸レベルでそれぞれ 40、37、37% の identity を示した。DF を基質とした休止菌体反応抽出液の GC-MS 分析の結果 (Table 2-6, Fig 2-5) を合わせて考えると、ORF1 と ORF2 はそれぞれ angular dioxygenase の large 及び small subunit をコードしていることが明らかであることから、ORF1、ORF2 をそれぞれ *dbfA1*、*dbfA2* と命名した。

2-3-3. DFDO の基質特異性の解析

pDF32 を保持する *E. coli* の休止菌体を用いて、PCDFs や PCDDs を含む Fig 2-1 に示した各種芳香族化合物の変換を行った (Table 2-6)。以下、各基質の結果について述べる。

(1) Dibenzo-*p*-dioxin (DD)

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC-MS 分析の結果、分子イオンピーク $m/z = 434 (M^+)$ の他に、fragment ion peaks として Table 2-6 に示すようなイオンが認められた。この結果は、Kasuga らにより報告されている 2,2',3'-THDE の TMS 誘導体の分析データ [Kasuga et al., 1997] と完全に一致した。従って、DD は DFDO により酸素原子に隣接する核間炭素原子が酸化された後、不安定なヘミアセタール環が spontaneous に開裂し、2,2',3'-THDE へと変換されていることが明らかとなった。

DbfA1 (DBF63)	92	CAHRGMAV-CSTDAGSSKFFRC	117--207	NWKLAENFAGDDYHV-LYTH	226
PhdA (KP7)	91	CRHRGTLT-CRTEAGNTSHFRC	116--205	NWKLGADNFVGDYHT-LMTH	224
NidA (I24)	88	CRHRGMQV-CRAEMGNASHFRC	113--202	NWKLGADNFVGDYHT-MMTH	221
NagAc (U2)	79	CRHRGKTL-VHAEAGNAKGFVCS	104--192	NWKAPAENFVGDYHVG-WTH	211
BphA1 (RHA1)	98	CRHRGMRI-CRADGGNAKSFTCS	123--210	NWKFAAEQFCSDMYHAGTTSH	230
TodC1 (F1)	96	CRHRGMRI-CRADAGNAKAFTCS	121--208	NWKFAAEQFCSDMYHAGTTSH	228
AntA (ADP1)	93	CEHRGATL-TRVAKGNQSVFTCP	118--207	NWKLQENGL-DGYHV-STVH	225
TftA (AC100)	98	CRHRGALL-CPFSKGNQKFHVCR	123--213	NWKLQFENGL-DFYHFG-STH	231
DxnA1 (RW1)	85	CRHRGNRL-CLADRGNAKSFRCS	110--195	NWKWQAEQHATDHLHV-AVSH	214
CarAa (CA10)	69	CLHRGVQLSVKVECKTKSTITC	94--169	NWRLAVENG-FDPSHIY--IH	186
		* ***	* ** *	** * *	*

Fig. 2-6. Alignment of well conserved sequence regions in the large subunits of ring-hydroxylating dioxygenases. Highlighted characters represent the residue involved in the Rieske-type [2Fe-2S] cluster binding and the potential mononuclear iron binding. The sequence abbreviations, substrate enzyme, species, and accession numbers of these sequences are as follows: DbfA1(DBF63), dibenzofuran, *Terrabacter* sp. strain DBF63, AB054975; PhdA(KP7), phenanthrene, *Nocardioides* sp. strain KP7, AB017794; NidA(I24), indene, *Rhodococcus* sp. strain I24, AF121905; NagAc(U2), naphthalene, *Pseudomonas* sp. strain U2, AF036940; BphA1(RHA1), biphenyl, *Rhodococcus* sp. strain RHA1, D32142; TodC1(F1), toluene, *P. putida* strain F1, J04996; AntA(ADP1), anthranilic acid, *Acinetobacter* sp. strain ADP1, AF071556; TftA(AC100), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, *Burkholderia cepacia* strain AC100, U11420, DxnA1(RW1), dibenzo-*p*-dioxin, *Sphingomonas* sp. strain RW1, X72850, CarAa(CA10), carbazole, *Pseudomonas* sp. strain CA10, D89064.

Table 2-6. GC retention times and MS spectral properties of major compounds formed from dibenzofuran and its analogs by resting cell reactions of *E. coli* carrying DFDO

Substrate	RT ^a (min)	Principle fragment ions ^b	Identified or possible product ^c
Dibenzofuran	10.1	418 (M ⁺ , 34), 315 (67), 73 (100)	2,2',3-Trihydroxybiphenyl
Dibenzo- <i>p</i> -dioxin	10.7	434 (M ⁺ , 23), 331 (49), 166 (15), 73 (100)	2,2',3-Trihydroxydiphenyl ether
Fluorene	8.9	254 (M ⁺ , 88), 239 (73), 165 (100), 74 (52)	9-Fluorenol
9-Fluorenone	10.3	358 (M ⁺ , 34), 343 (6), 270 (17), 253 (47), 223 (5), 180 (9), 147 (51), 73 (100)	1-Hydro-1,1a-dihydroxy-9-fluorenone or 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxy-9-fluorenone
2-Chlorodibenzofuran	10.9	454 (M ⁺ , ³⁷ Cl, 34), 452 (M ⁺ , ³⁵ Cl, 62), 349 (100), 314 (6)	5'-Chloro-2,2',3-trihydroxybiphenyl
2,8-Dichlorodibenzofuran	11.7	486 (M ⁺ , ³⁵ Cl, 71), 383 (100), 253 (21), 173 (20)	5,5'-Dichloro-2,2',3-trihydroxybiphenyl
2-Chlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	11.3	470 (M ⁺ , ³⁷ Cl, 60), 468 (M ⁺ , ³⁵ Cl, 95), 365 (100), 330 (74), 166 (46)	5'-Chloro-2,2',3-trihydroxydiphenyl ether or 4'-Chloro-2,2',3-trihydroxydiphenyl ether
2,3-Dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	12.4	502 (M ⁺ , ³⁵ Cl, 60), 399 (100), 364 (37), 165 (19), 137 (18)	4',5'-Dichloro-2,2',3-trihydroxydiphenyl ether
1,2,3-Trichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	13.0	538 (M ⁺ , ³⁵ Cl, 100), 435 (63), 398 (24), 179 (51), 137 (26)	3',4',5'-Trichloro-2,2',3-trihydroxydiphenyl ether or 4',5',6'-Trichloro-2,2',3-trihydroxydiphenyl ether

^aAll products were analyzed by GC-MS after derivatization of MSTFA.

^bFragment ions are expressed as *m/z* values; Relative intensities expressed as percentages are given in parentheses.

^cPossible products of 9-fluorenone were suggested based on the results reported by Monna et al. (1993), and possible products of PCDFs and PCDDs were suggested based on our unpublished result.

(2) Fluorene (FN)

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC- MS 分析の結果、分子イオンピーク $m/z = 254$ (M^+)の他に、fragment ion peaksとして Table 2- 6 に示すようなイオンが認められた。この結果は、Nojiri らにより報告されている 9- fluorenol の TMS 誘導体の分析データ [Nojiri et al., 1999]と一致している。従って、DFDO が FN のメチレン基に対して、選択的に monooxygenation を触媒しうることが明らかとなった。

(3) Fluorenone

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC- MS 分析の結果、分子イオンピーク $m/z = 358$ (M^+)の他に、fragment ion peaksとして Table 2- 6 に示すようなイオンが認められた。この結果は、門奈らにより報告されている、FN の代謝産物として単離された化合物 FN- P5 の TMS 誘導体の分析データ [門奈, 1993]と一致した。FN- P5 については既に、1- hydro- 1,1a- dihydroxy- 9- fluorenone もしくは 1,2- dihydro- 1,2- dihydroxy- 9- fluorenone のいずれかであることが明らかとなっているが [Monna et al., 1993]、DbfA1A2 が明らかに angular dioxygenase 活性を持っていることを考えると、本分解産物は 9- fluorenone に対しても核間の位置を酸化し、1- hydro- 1,1a- dihydroxy- 9- fluorenone へと変換した可能性が高いと考えられる。

(4) 2- Chlorodibenzofuran (2- CDF)

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC- MS 分析の結果、 $m/z = 454$ (^{37}Cl)と 452 (^{35}Cl)に分子イオンと考えられるイオンが検出され、水酸基が3個存在していることが示唆された (Table 2- 6)。このことは、DF や DD と同様に 2- CDF においてもヘテロ環の開裂が起き、相当する trihydroxy 体が生成していることを示唆していた。

(5) 2,8- Dichlorodibenzofuran (2,8- DCDD)

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC- MS 分析の結果、 $m/z = 486$ (^{35}Cl)に分子イオンと考えられるイオンが検出され、水酸基が3個存在していることが示唆された (Table 2- 6)。このことは、DF や DD と同様に 2,8- DCDF においてもヘテロ環の開裂が起こっていることを示唆しており、酸素原子に隣接する核間炭素原子に酸化が起こり環開裂した 5,5'- dichloro- 2,2',3- THB が生成しているものと考えられた。

(6) 2- Chlorodibenzo- *p*- dioxin (2- CDD)

休止菌体反応によって生成した2つの分解産物の GC- MS 分析の結果、両者とも $m/z = 470$ (^{37}Cl)と 468 (^{35}Cl)に分子イオンと考えられるイオンが検出され、水酸基が3個存在していることが示唆された (Table 2- 6)。このことは、DF や DD と同様に 2- CDD

においてもヘテロ環の開裂が起き、相当する trihydroxy 体が生成していることを示唆していた。

(7) 2,3- Dichlorodibenzo- *p*- dioxin (2,3- DCDD)

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC- MS 分析の結果、 $m/z = 502$ (^{35}Cl)に分子イオンと考えられるイオンが検出され、水酸基が3個存在していることが示唆された (Table 2-6)。このことは、DF や DD と同様に 2- CDF においてもヘテロ環の開裂が起き、相当する trihydroxy 体が生成していることを示唆していた。

(8) 2,7- Dichlorodibenzo- *p*- dioxin (2,7- DCDD)

2,7- DCDD を基質として休止菌体反応を行ったが、GC- MS 分析の結果、相当する trihydroxy 体の生成は検出されなかった。

(9) 1,2,3- Trichlorodibenzo- *p*- dioxin (1,2,3- TCDD)

休止菌体反応によって生成した分解産物の GC- MS 分析の結果、 $m/z = 538$ (^{35}Cl)に分子イオンと考えられるイオンが検出され、水酸基が3個存在していることが示唆された (Table 2-6)。このことは、DF や DD と同様に 2- CDF においてもヘテロ環の開裂が起き、相当する trihydroxy 体が生成していることを示唆していた。

(10) その他ヘテロ環式芳香族化合物

CAR、xanthene、phenoxathiin を基質として休止菌体反応を行ったが、GC- MS 分析の結果、各々の angular dioxygenation 産物である 2'-aminobiphenyl- 2,3- diol、2,2',3- trihydroxydiphenylmethane、2,2',3- trihydroxydiphenyl sulfide の TMS 誘導体は検出されなかった。従って、DFDO は窒素原子に隣接する核間炭素原子や、xanthene、phenoxathiin のような化学構造を持つ化合物の酸素原子に隣接する核間炭素原子を酸化できないことが明らかとなった。

(11) 多環芳香族炭化水素 (PAHs)

多環芳香族炭化水素である naphthalene、phenanthrene、anthracene を基質として休止菌体反応を行ったが、GC- MS 分析の結果、分解産物と思われる化合物は検出されなかった。

2- 3- 4 . *dbfA1A2* 遺伝子周辺領域の塩基配列の決定

DFDO 活性が認められた pDF32 の約 2.5 kb *Bgl*III- *Sph*I 領域について塩基配列を決定したところ、angular dioxygenase の large 及び small subunit をコードする *dbfA1*、*dbfA2*

遺伝子が確認されたが、電子伝達コンポーネントである ferredoxin や ferredoxin reductase をコードする遺伝子は検出されなかった。芳香族化合物の分解系遺伝子において、dioxygenase の各コンポーネントをコードする遺伝子はクラスターをなしている例も多いため、*dbfA1A2* 遺伝子周辺領域 (8,179- bp *Bam*HI 断片)の塩基配列の決定を行った (Table 2- 7, Fig. 2- 7) (決定した塩基配列と 8 個の ORF の推定アミノ酸配列及び推定 SD 配列 [Shine and Dalgano 1975]を付図 1 [論文の末尾に添付]に示した)。以下、各 ORF の結果について述べる。

(1) ORF3 及び ORF4

dbfA2 遺伝子 (ORF2)の直下流に存在する ORF3 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したところ、3'末端の塩基配列が一部未決定であるものの、他の単環芳香族化合物分解系に見られるメタ開裂物質の加水分解酵素 OhpC (*Rhodococcus* sp. V49 の 3-(2-hydroxybiphenyl)propionic acid 分解系) [Powell and Archer, 1998]、CmtE (*P. putida* F1 の *p*-cumate 分解系) [Eaton, 1996]、EtbD1 (*Rhodococcus* sp. RHA1 の ethylbenzene 分解系) [Yamada et al., 1998]、NahN (*P. stutzeri* AN10 の catechol 分解系) [Bosch et al., 2000]とアミノ酸レベルでそれぞれ 38、35、33、32%の identity を示した。これらの結果は ORF3 が加水分解酵素をコードしていることを強く示唆しており、さらに、serine hydrolase に共通して見いだされる活性中心の 5 アミノ酸残基のモチーフ (GX SXG) も保存されていた (付図 1)。

一方、*dbfA1* 遺伝子 (ORF1)の直上流に存在する ORF4 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したところ、PhbB (*Pseudomonas* sp. 61- 3 の acetoacetyl- CoA reductase) [accession number AB014757]、CymB (*P. putida* F1 の *p*-cymene 分解系 alcohol dehydrogenase) [Eaton, 1997] とアミノ酸レベルでそれぞれ 33、32%の identity を示した。これらの結果から、ORF4 が dehydrogenase をコードしていることが示唆されたが、他の芳香族化合物分解系に見られる *cis*- dihydroxydiol dehydrogenase とは相同性を示さなかった。

(2) ORF5 及び ORF6

それぞれ隣接して逆向きに存在する ORF5、ORF6 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したところ、転写制御タンパクと相同性を示すことが明らかとなった。そのうち ORF5 については、TdfT (*R. eutropha* JMP134 の 2,4- D 分解系) [Leveau and van der Meer 1996]、ClcR (*P. putida* の chlorocatechol 分解系) [Coco et al., 1993]、AphT (*C. teststeroni* TA441 の phenol 分解系) [Arai et al., 2000]といった LysR ファミリーと呼ばれる一群の転写制御タンパク質とそれぞれ、32、27、26%の identity を示した。これら転写制御タンパクの N 末端

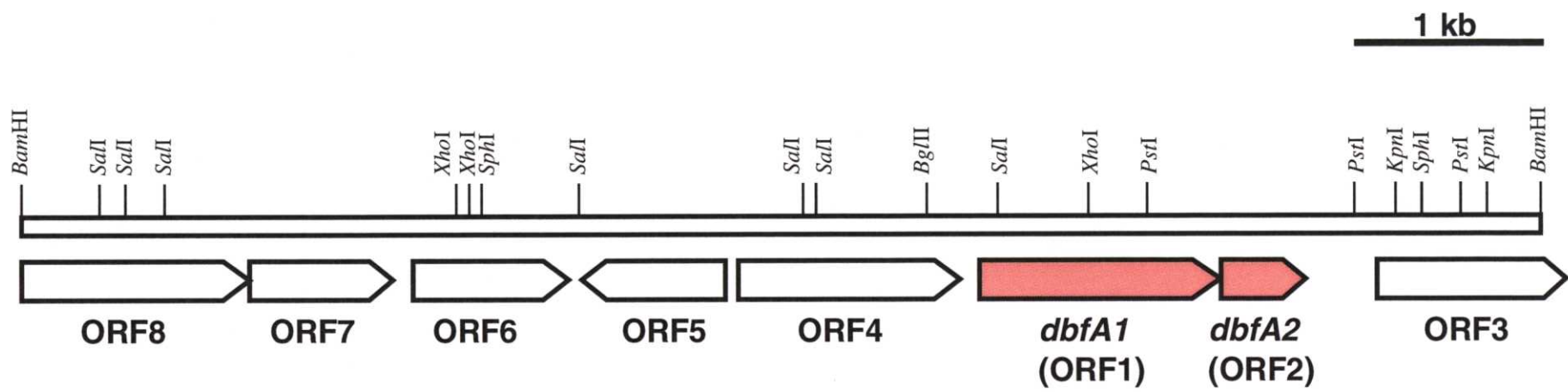


Fig. 2-7. Restriction maps of the 8,179-kb *Bam*HI fragment containing *dbfA1A2* genes. ORFs are indicated by pentagons.

Table 2-7. Homology analysis of the neighboring region of *dbfA 1A 2* genes

Gene ^a	Probable function or product	Molecular mass	Homologous Sequence	Source	Identity (%) ^b	Accession number ^c
<i>dbfA1</i> (ORF1)	Large subunit of angular dioxygenase	49,518	NidA	<i>Rhodococcus</i> sp. strain I24	38	AF121905
			PhdA	<i>Nocardioides</i> sp. strain KP7	37	AB017794
			NarAa	<i>Rhodococcus</i> sp. strain NCIMB12038	37	AF082663
<i>dbfA2</i> (ORF2)	Small subunit of angular dioxygenase	19,761	BphA2	<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain TA421	40	D88020
			BnzB	<i>Pseudomonas putida</i>	37	P08085
			TodC2	<i>Pseudomonas putida</i> strain F1	37	Y18245
ORF3 ^d	Hydrolase	>34,396	OhpC	<i>Rhodococcus</i> sp. strain V49	38	AF274045
			CmtE	<i>Pseudomonas putida</i> strain F1	35	U24215
			EtbD1	<i>Rhodococcus</i> sp. strain RHA1	33	AB004320
ORF4	Dehydrogenase	38,510	PhbB	<i>Pseudomonas</i> sp. strain 61-3	33	AB014757
			CymB	<i>Pseudomonas putida</i> strain F1	32	U24215
			PhbB	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	31	U17226
ORF5 ^e	Regulatory protein	32,473	TfdT	<i>Rhodococcus eutropha</i> strain JMP134	32	U16782
			ClcR	<i>Pseudomonas putida</i>	27	L06464
			ClcR	<i>Ralstonia</i> sp. strain JS705	27	AJ006307
ORF6	Regulatory protein	28,947	KdgR	<i>Bacillus halodurans</i>	31	AP001519
			PcaR	<i>Rhodococcus opacus</i> strain 1CP	28	AF003947
			KdgR	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	28	S17713
ORF7	Unknown	24,665	Aldolase	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	31	AE000903
			CmtD	<i>Pseudomonas putida</i> strain F1	25	U24215
ORF8 ^d	Ferredoxin reductase	>42,650	MocF	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	39	AF076471
			BphA4	<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain TA421	38	D88021
			PhdD	<i>Nocardioides</i> sp. strain KP7	37	AB017795

^a Accession number AB054975.

^b Multiple sequence alignment was carried out using Clustal W [Thompson et al., 1994], and the construction of a phylogenetic tree, using PHYLIP ver. 3.5c [Felsenstein, 1985], by the neighbor-joining method [Saitou and Nei, 1987].

^c Accession number in the SwissProt and EMBL/DDBJ/GenBank formats.

^d The 5'- and 3'-terminal regions, respectively, of the nucleotide sequences of ORF8 and ORF4 have not been determined completely.

^e The ORF is encoded in the complementary sequence.

に存在する推定 DNA 結合部位である helix-turn-helix モチーフ [Schell, 1993] において特に高い相同性を示した (付図 1)。

一方、ORF6 については、PcaR (*R. opacus* 1CP 及び *P. putida* の protocatechuate 分解系) [Eulberg et al., 1998; Romero-Steiner et al., 1994]、KdgR (*Erwinia chrysanthemi* の pectin 代謝系) [Reverchon et al., 1991]、IclR (*E. coli* の acetate 代謝系) [Sunnarborg et al., 1990] といった IclR ファミリーと呼ばれる一群の転写制御タンパク質とそれぞれ、27-28、28、26%の identity を示した。ORF6 の推定アミノ酸配列においても、転写制御タンパクの N 末端に存在する推定 DNA 結合部位である helix-turn-helix モチーフが存在し、C 末端には IclR ファミリーに特有の共通配列 [G/A]X₃[D/S]X₂EX₆[C/S/A][L/I/V/M][G/S/A]X₂[L/I/V/M][F/Y/H][D/N] [Thomson et al., 1999]が、222 番目の alanine、223 番目の serine を除いて保存されていた。N 末端の推定 helix-turn-helix モチーフと C 末端の IclR ファミリーに特有の共通配列部分を付図 1 に示した。

(3) ORF7 及び ORF8

ORF7 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したところ、fuculose-1-phosphate aldolase (*Methanobacterium thermoautotrophicum* Delta H) [accession number AE000903]、CmtD (*P. putida* F1 の *p*-cumate 分解系 decarboxylase) [Eaton, 1996] とアミノ酸レベルでそれぞれ 31、25% の identity を示した。

一方、ORF8 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したところ、5'末端の塩基配列が一部未決定であるものの、他の芳香族化合物分解系 multicomponent dioxygenase system の電子伝達コンポーネントである ferredoxin reductase、BphA4 (*R. erythropolis* TA421) [accession number D88020]、PhdD (*Nocardioides* sp. KP7) [Saito et al., 2000] とアミノ酸レベルでそれぞれ 39、37% の identity を示した。芳香族化合物分解系の ferredoxin reductase においては、補因子である FAD や NAD の ADP 結合部位が、他の oxydoreductase とのアミノ酸配列の比較により推測されている [Mason and Cammack, 1992]。ORF8 の推定アミノ酸配列においても、その共通モチーフである GXGX₂GX₃A [Niedle et al., 1991]が完全に保存されていた (付図 1)。

2-3-5. サザンハイブリダイゼーション解析

2-3-1 において増幅された 78 bp の DNA 断片をプローブとし、DBF63 の total DNA に対してサザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、約 8 kb の *Bam*HI 断片に強くハイブリダイズしたが、その他に、約 11 kb と約 2.7 kb の *Bam*HI 断片にも弱い

バンドが検出された (Fig. 2-3)。

一方、DF 資化能が欠損した変異株である DBF63W 株 [Kasuga et al., 1997] の total DNA に対してもサザンハイブリダイゼーション解析を同時に行ったところ、これら 3 種の *Bam*HI 断片が存在しないことが明らかとなった (Fig. 2-3)。

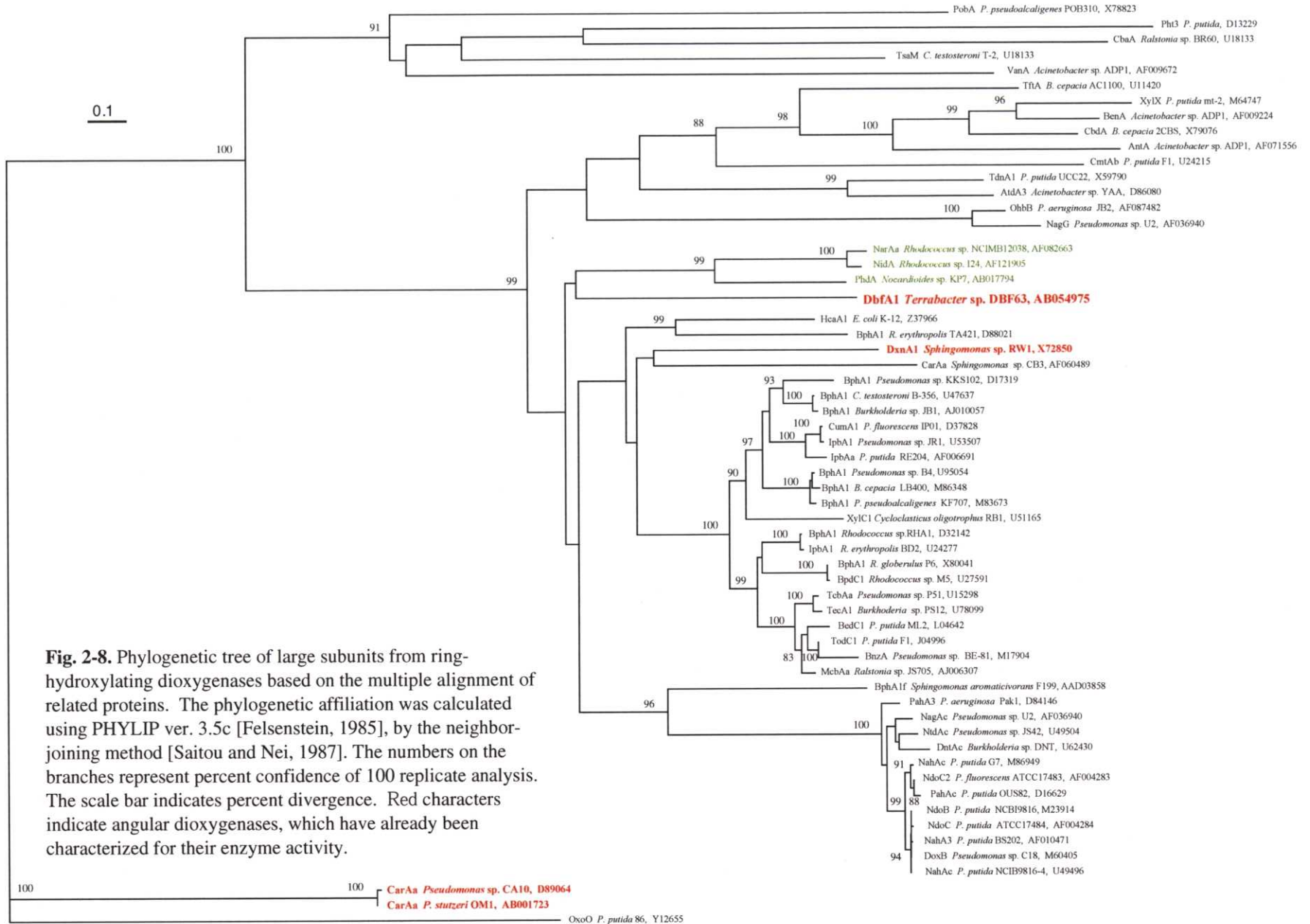
2-4. 考察

本章では、DF から 2,2',3- THB への反応を触媒する dibenzofuran 4,4a- dioxygenase (DFDO) の terminal oxygenase component (DbfA1 及び DbfA2) の単離と機能解析を行った。今回クローニングに成功した DbfA1A2 は、DF の酸素原子に隣接する核間炭素原子に酸素を添加する angular dioxygenase であるが、グラム陽性細菌から angular dioxygenase component をコードする遺伝子を単離したのは本研究が世界初である。

シーケンス解析により、pDF32 のインサート部分 (2.5- kb *Bgl*II- *Sph*I 断片) には、電子伝達コンポーネントである ferredoxin と ferredoxin reductase をコードする遺伝子は存在しなかったものの、pDF32 を保持した大腸菌において幸運にも angular dioxygenase 活性を確認することができた。これまでに、ferredoxin と ferredoxin reductase の片方あるいは両方が欠損した dioxygenase をコードした組み換えプラスミドが、宿主である大腸菌由来の電子伝達コンポーネントに相補されて oxygenase 活性を示す例が naphthalene dioxygenase [Kurkela et al., 1991] や isopropylbenzene dioxygenase [Eaton et al., 1998] など報告されている。DbfA1A2 においても同様に、大腸菌由来の特異性の低い電子伝達コンポーネントが相補することで活性を示したものと推測される。DBF63 株の DFDO も他の multicomponent dioxygenase system と同様に terminal oxygenase、ferredoxin、ferredoxin reductase の 3 コンポーネントで構成されると考えられるが、現在のところ、DbfA1A2 と相補する ferredoxin (DbfA3) と ferredoxin reductase (DbfA4) については未同定である。

本章で単離された DbfA1 と、他の multicomponent dioxygenase の terminal oxygenase large subunit のアミノ酸配列との比較から分子系統樹を作製した結果を Fig. 2-8 に示す。その結果、DbfA1 は既知の多くの large subunit とはグループを構成しない新規な酵素であることが示され、強いて挙げるならば NidA [Treadway et al., 1999]、PhdA [Saito et al., 2000]、NarAa [accession number AF082663] といった近年報告されたグラム陽性細菌の PAH dioxygenase system の large subunit (Fig. 2-8 中、緑色で示す) と若干近いところに位置している。また、類似の反応を触媒する他の angular dioxygenase と分子系統樹上の位置を比較すると、DD 及び DF に angular dioxygenation を行う dioxin dioxygenase の DxnA1 (Fig. 2-8 中、赤色で示す) が biphenyl dioxygenase と近い場所に位置しているのに対し、DbfA1 はそれとは離れた場所に位置している。さらに、CAR に angular dioxygenation を行う CARDO の CarAa (Fig. 2-8 中、赤色で示す) は、DbfA1 や DxnA1 とは極めて離れた場所に位置していた。これらの事実から、CarAa は、DbfA1 や DxnA1 とは異なる進化的な経過を経て現在の形に至ったものと推定される。

一方、DbfA2 について相同性検索を行った結果、NidB [Treadway et al., 1999]、PhdB [Saito et al., 2000] といった large subunit において相同性の高かった PAH dioxygenase



の small subunit とは identity がなく、biphenyl 分解系の small subunit である *Rhodococcus* sp. TA421 株や RHA1 株の BphA2 [accession number D88020; Masai et al., 1995] や、toluene 分解系 *P. putida* F1 株の TodC2 [Zylstra and Gibson, 1989] と比較的高い相同性を有するという興味深い結果が得られた。しかしながら、これら DbfA1 と DbfA2 の分子系統樹上構成されるグループの違いが、分子進化上においてなんらかの重要性を持っているのかどうかについては現在のところ不明である。

休止菌体反応を用いた DFDO の基質特異性の解析から、DF の他に DD や数種類の塩素化ダイオキシン類に対しても angular dioxygenation を触媒しうることが明らかとなった。精製酵素あるいはクローン化された遺伝子を用いて、angular dioxygenase が塩素化ダイオキシン類も分解できることを示したのは、本研究が初めてである。次に、DFDO の基質特異性を既に報告されている RW1 株の dioxin dioxygenase や CA10 株の CARDO といった angular dioxygenase の基質特異性と比較した。DD 分解菌 *Sphingomonas wittchii* RW1 株の dioxin dioxygenase は、DD 及び DF の angular dioxygenation を触媒するが、CAR は基質にできないことが知られている。加えて、naphthalene といった PAHs も酸化できないことが報告されている [Bünz and Cook, 1993]。DBF63 株の DFDO も dioxin dioxygenase と類似の基質特異性を示しており、DD 及び DF の angular dioxygenation は触媒するが CAR は基質にできず、さらに naphthalene、phenanthrene、anthracene といった PAHs も酸化できないことが明らかとなった。

また、9-fluorenone に対しては、RW1 株の dioxin dioxygenase も DBF63 株の DFDO も cis-diol 体の化合物を生成する点で類似しているが、FN に対しては明らかに反応性が異なっている。Dioxin dioxygenase が FN を酸化しないのに対し、DFDO は FN を 9-fluorenol へと変換したことから、本酵素は FN のメチレン基に monooxygenation 反応を触媒することが明らかとなった。

一方、CAR 分解菌 *Pseudomonas* sp. CA10 株の CARDO と DFDO では、基質特異性が非常に異なっていた。両酵素とも、DD 及び DF の angular dioxygenation と FN の monooxygenation を触媒可能な点は類似しているものの、CARDO は DFDO と異なり、CAR、xanthene、phenoxathiin に対して angular dioxygenation を触媒し、naphthalene、anthracene、fluoranthene といった PAHs に対しても cis-dihydroxylation を触媒可能であることが明らかとなっている [Nojiri et al., 1999]。これら angular dioxygenase の基質特異性の違いは、おそらく各酵素の基質結合ポケットの構造や基質結合部位に存在するアミノ酸残基の違いによるものと推測されるが、今後 DFDO や CARDO の X線結晶構造解析により、基質認識部位や活性中心の構造が明らかにされるものと期待される。

本研究で DFDO の terminal oxygenase component をコードする *dbfA1A2* 遺伝子の

クローニングに成功したことで、既に単離されている *dbfBC* 遺伝子と合わせ、DF から SA までの上流代謝系を触媒する各酵素遺伝子が取得されたことになる。DF 資化能欠損変異株である DBF63W 株の total DNA に対して *dbfBC* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行うと、陽性バンドが全く確認されないことから、DbfBC が DF の代謝に関与している可能性が示唆されていた [Kasuga et al., 1997]。本章においても同様に、*dbfA1* 遺伝子と強くハイブリダイズする 78- bp の PCR 産物をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行ったが、DBF63W 株においては陽性バンドが全く確認されなかったことから、DbfA1A2 も DF の代謝に関与していることが推測された。これらの結果から、*dbfA1A2* 及び *dbfBC* 遺伝子はプラスミドのような欠落しやすい因子上にコードされている可能性が示唆されたが、今後、*dbfA1A2* 及び *dbfBC* 遺伝子が局在する遺伝子座をパルスフィールドゲル電気泳動などを用いて解析すること、さらにノーザンハイブリダイゼーション解析や RT-PCR 法により遺伝子の発現様式を確認していくことで、これら遺伝子群の DF 分解における役割がさらに明らかとなるであろう。

DBF63 株を含め、これまで DF 分解系遺伝子群の解析が行われている DF 資化菌 *Sphingomonas wittichii* RW1 株と *Terrabacter* sp. DPO136 株においては、DF 分解に関する各遺伝子がクラスターを成しておらず、ゲノム上の様々な遺伝子座に局在していることが明らかとなっている。例えば、RW1 株においては、angular dioxygenase の terminal oxygenase component をコードする *dxnA1A2* 遺伝子と電子伝達コンポーネントをコードする遺伝子はゲノム上の異なる位置に局在していることが明らかとなっている。さらに、*dxnA1A2* 遺伝子が生育基質に応じて誘導的に発現するのに対し、DF 分解のメタ開裂酵素をコードする *dbfB* 遺伝子は、*dxnA1A2* の近傍に存在しているがそれとは転写方向が逆向きにコードされており、構成的に発現していることが明らかとなっている [Armengaud et al., 1998]。また、DPO360 株においては、4 種類の異なるメタ開裂酵素が検出され、うち 3 種類 (BphC1、BphC2、C23O) が DF 分解に関与していることが明らかとなっている。このうち *bphC1* と *bphC2* 遺伝子は、それぞれゲノム上の異なる位置にコードされており、各近傍領域から angular dioxygenase をコードする遺伝子は検出されていない [Schmid et al., 1997]。これらの結果は、現段階で DF 分解系遺伝子が、成熟したオペロン構造を獲得する以前の進化途上の分解系遺伝子であることを想起させる。DF が存在するような環境中でこれら細菌を長期間馴養させると、異種微生物間での遺伝子転移や遺伝子構造の再編成を繰り返すことにより、biphenyl や PAHs、単環芳香族化合物の分解系遺伝子群のように、発現調節機構やオペロン構造の整った分解系遺伝子へと進化していくのか非常に興味深い。

DBF63 株の *dbfA1A2* 遺伝子の周辺領域には、5'末端の塩基配列が一部未決定であるが、他の芳香族化合物初発酸化酵素の ferredoxin reductase と相同性の高い ORF8 が

存在していた。ORF8 にコードされるタンパク質が *DbfA1A2* と相補する ferredoxin reductase である可能性も考えられるが、*dbfA1A2* と ORF8 との間には転写方向が逆向きで、転写制御遺伝子と相同性の高い ORF5 と ORF6 が並んで存在していたことから、少なくとも *dbfA1A2* と ORF8 の転写単位は異なっていることは明らかである (Fig. 2-7)。また、ORF8 の上流領域に *DbfA1* とは異なるもう一つの large subunit が存在することから、ORF8 はこちらの dioxygenase system で機能する電子伝達コンポーネントの可能性もある。今後は、この ORF8 をはじめ、*dbfC* とは異なるが加水分解酵素と相同性の高い ORF3、制御遺伝子と推定される ORF5 や ORF6 などの機能解析や発現様式についても詳細な解析が必要であろう。

第3章

Carbazole 資化菌 *Pseudomonas* sp. CA10 株の carbazole 代謝に関する 酵素遺伝子群及びその周辺領域の解析

3-1. 緒言

これまでに CA10 株の CAR 分解に関する酵素遺伝子群のうち、CAR から AN 及び HPD への代謝に関する *carAaAaBaBbCAcORF7Ad* 遺伝子群が取得・解析されてきた [Sato et al., 1997a,b]。また、このうち初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO; CarAaAcAd) は、DD や DF に対して angular dioxygenation を触媒し、他の基質に対しては *cis*-dihydroxylation や monooxygenation も触媒可能であるなど、基質特異性の低い酵素であることも明らかとなった [Nojiri et al., 1999]。一方、序論でも述べたように、HPD 以降の代謝系酵素遺伝子に関しては、*carAd* 遺伝子の下流域に存在している可能性が示唆されていたものの [Sato et al., 1997a]、詳細な解析は行われていなかった。また AN の代謝に関しては、Tn5 挿入変異により AN 及び CAT 資化能欠損変異株 TE1 株を取得して Tn5 挿入周辺領域を解析した結果、CAT 代謝に関する酵素遺伝子群 (*cat*) の存在が示唆されていたが [Kimura et al., 1996]、こちらも詳細な解析は行われていなかった。

そこで本章では、*car* 遺伝子及び *cat* 遺伝子の周辺領域を大規模にクローニングして遺伝子解析を行い、CA10 株の CAR 分解に関する全酵素遺伝子を明らかにした。また詳細な遺伝子構造解析の過程で、*car* 遺伝子群が現在のユニークな遺伝子構造を形成するに至った遺伝子再構成の痕跡をいくつか見出すこともできた。

3-2. 材料及び方法

3-2-1. 菌株、プラスミド、試薬、培地、及び培養条件

本章で新たに使用した菌株及びプラスミドを Table 3-1 及び Table 3-2 に示した。*E. coli* JM109 株 [Yanish-Perron et al., 1985] は遺伝子ライブラリー及びサブクローニングを行ったプラスミドの宿主として用いた。遺伝子ライブラリーの作成には、ベクターとして pUC118/119 [Vieira and Messing, 1987] を使用した。CA10 株用の培地としては CNFMM 培地を用いた (Table 3-3)。CAR はエーテルに溶解し (0.1g/ml)、0.2 µm PTFE 膜 (Advantec) を用いて濾過滅菌したものを培地および休止菌体反応液に終濃度 0.1% (vol/vol) となるよう添加した。*E. coli* の選択培地には Ap や Km を終濃度 50 µg/ml となるよう添加した。試薬は市販のもので最も純度の高いものを購入し使用した。本研究で使用した試薬の調整法は細胞工学実験プロトコル [東京大学医科学研究所制癌研究部編, 1993]、クローニングとシーケンス [杉浦昌弘 編, 1989]、もしくは Sambrook らの成書 [Sambrook et al., 1989] に従った。培養は CA10 株については 30°C、*E. coli* については特に明記しないかぎり 37°C で行った。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) になるよう添加した。

3-2-2. CA10 株の total DNA の調製

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

【試薬】

- ① TE buffer
- ② CTAB/ NaCl solution
- ③ 5 M NaCl
- ④ フェノール/クロロホルム
- ⑤ 10% SDS
- ⑥ 20 mg/ml proteinase K solution

200 mg の proteinase K (Sigma) を 10 ml の H₂O に溶解する。

- ⑦ RNaseA solution

【操作】

- ① CA10 株を 5 ml の 2x YT 培地に植菌し、30°C で振とう培養する (300 strokes/min、20 hour)。
- ② 2 ml の培養液を 2 ml チューブに移し、遠心 (15,000 rpm、5 min、RT) により集菌した後、545 µl の TE buffer に懸濁させる。
- ③ 10% SDS を 50 µl、20 mg/ml proteinase K solution を 5 µl 加え、ローテーターを用いて室温で 30 分間穏やかに攪拌した後、37°C で 2 時間インキュベートする。
- ④ 5 M NaCl を 100 µl 加え、30 分攪拌する。
- ⑤ CTAB/ NaCl solution を 80 µl 加え、30 分攪拌した後、65°C で 10 分間インキュベートする。
- ⑥ 800 µl のクロロホルムを加え、30 分攪拌した後、遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) し、上清を新しいチューブに分取する。上清は粘性が高いため、一本のチューブあたり 400 µl もとれば十

Table 3-1. Bacterial strains, plasmids, and cosmids used in this study I (for analysis of *car* and *ant* genes).

Strains, plasmids, or cosmids	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10	Car ⁺ ^a	Ouchiyama et al., 1993
<i>Pseudomonas</i> sp. strain TE1	Car ^{-a} , AN(C, N ⁺) ^b	Kimura et al. 1996
<i>Escherichia coli</i>		
strain JM109	<i>recA1</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , [F ⁺ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac</i> ^F ZΔM15]	Yanisch-Perron et al., 1985
strain DH5α	F ⁺ , φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , λ, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TOYOBO
strain XL1-Blue MR	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	STRATAGENE
Plasmids		
pUC18/19	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	Yanisch-Perron et al., 1985.
pBluescript II KS+/-	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	STRATAGENE
pBluescript II SK-	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	STRATAGENE
SuperCos 1	Ap ^r , Km ^r	STRATAGENE
pT7Blue(R)	Ap ^r , <i>lacZ</i> ,	Novagen
pUCA1	Ap ^r , pUC119 with 6.9-kb <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	Sato et al., 1997a
pUCA601	Ap ^r , pUC19 with 5.8-kb <i>HindIII</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pUCA610	Ap ^r , pUC19 with 4.0-kb <i>SalI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA616	Ap ^r , pBluescript II SK- with 1.0-kb <i>SalI-XbaI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pUCA617	Ap ^r , pUC18 with 1.3-kb <i>HincII-SphI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pUCA618	Ap ^r , pUC19 with 1.7-kb <i>EcoRV</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA620	Ap ^r , pBluescript II SK- with 9.5-kb <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA711	Ap ^r , pBluescript II SK- with 4.4-kb <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA721	Ap ^r , pBluescript II SK- with 11.3-kb <i>XhoI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA722	Ap ^r , pBluescript II SK- with 7.2-kb <i>XhoI-SalI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA731	Ap ^r , pBluescript II SK- with 7.5-kb <i>EcoRV-ClaI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pUCA741	Ap ^r , pUC19 with 8.9-kb <i>SalI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA751	Ap ^r , pBluescript II SK- with 5.3-kb <i>PstI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pTE11	Ap ^r , pUC19 with 10.7-kb <i>EcoRI</i> insert of strain TE1 DNA containing the 7.7-kb Tn5-Mob region	Kimura et al. 1996
pTCA16S	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.5-kb PCR-amplified DNA fragment containing partial 16S rRNA gene of strain CA10	This study
Cosmids		
pSCos701	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos702	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos703	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos704	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos705	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos706	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos707	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos708	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos709	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study

^a Car⁺ indicates the ability to grow on CAR as a sole carbon source of carbon, nitrogen, and energy.

^b AN(C, N⁺) indicates that strain TE1 can grow on anthranilate as a sole nitrogen source but not as a sole carbon source.

Table 3-2. Bacterial strains, plasmids, and cosmids used in this study II (for analysis of *cat* genes).

Strains, plasmids, or cosmids	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10	Car ⁺ ^a	Ouchiyama et al., 1993
<i>Pseudomonas</i> sp. strain TE1	Car ⁻ ^a , AN(C ⁻ , N ⁺) ^b	Kimura et al., 1996
<i>Escherichia coli</i>		
strain JM109	<i>recA1</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , [F ['] , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacF'Z</i> Δ M15]	Yanisch-Perron et al., 1985
strain DH5 α	F ['] , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (τ_K^- , m_K^+), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TOYOBO
XL1-Blue MR	$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	STRATAGENE
Plasmids		
pUC18/19	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	Yanisch-Perron et al., 1985
pBluescript II SK-	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	STRATAGENE
SuperCos 1	Ap ^r , Km ^r	STRATAGENE
pT7Blue(R) T-Vector	Ap ^r , <i>lacZ</i> ,	Novagen
pTE11	Ap ^r , pUC19 with 10.7-kb <i>EcoRI</i> insert of strain TE1 DNA containing the 7.7-kb Tn5-Mob region	Kimura et al., 1996
pUCA811	Ap ^r , pUC19 with 3.2-kb <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pBCA821	Ap ^r , pBluescript II SK- with 6.9-kb <i>NotI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
Cosmids		
pSCos801	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos802	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos803	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos804	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study
pSCos805	Ap ^r , Km ^r , SuperCos1 with <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	This study

^a Car⁺ or Car⁻ indicates the ability or inability to grow on CAR as a sole carbon source of carbon, nitrogen and energy.

^b AN(C⁻, N⁺) indicates that strain TE1 can grow on anthranilate as a sole nitrogen source but not as a sole carbon source.

Table 3-3. Composition of CNFMM medium.

CNFMM medium	
K_2HPO_4	2.2 g
KH_2PO_4	0.8 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10 mg
Bacto-yeast extract	50 mg
pH 7.0	
	per liter

分である。

- ⑦ 400 μ l のフェノール/クロロホルムを加え、30 分攪拌、遠心 (13,000 rpm、10 min、RT) し、上清を新しいチューブに分取する。
- ⑧ 300 μ l の 2-プロパノールを加え、5 分攪拌した後、DNA を遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) により回収する。
- ⑨ 1.5 ml チューブあたり 500 μ l の 70%エタノールでリンスし、残った CTAB を除去する。
- ⑩ ペレットを 100 μ l の終濃度 1 μ g/ml の RNaseA を含む TE buffer に溶解し、37°C で 15 時間反応させた後、-20°C で使用時まで保存した。

3- 2- 3 . アガロースゲルからの DNA の回収

本章でアガロースゲルからの DNA の回収には Concert™ Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL) を用い、実際の操作は添付のプロトコールに従って行った。

【試薬】

- ① Gel Solubilization Buffer (L1)
- ② Wash buffer (L2)
- ③ TE buffer
- ④ 50 x TAE buffer

【操作】

- ① DNA アガロースゲル電気泳動を行い、Dark Reader (ビーエム機器) で目的のバンドを含むゲルを切り出し、2 ml のマイクロチューブに入れる。
- ② ゲル 10 mg あたり 30 μ l の L1 を加え、50°C で 15 分以上加熱し、ゲルを完全に溶解させる。
- ③ 室温で 5 分間静置する。
- ④ スピンカートリッジを 2 ml のポリプロピレンチューブにのせ、ゲル溶解液をのせる。
- ⑤ 遠心 (12,000 rpm、1 min、RT) を行い、チューブ内の液を捨てる。
- ⑥ スピンカートリッジに 500 μ l の L1 を加え、室温で 1 分間静置した後、遠心 (12,000 rpm、1 min、RT) を行う。
- ⑦ チューブ内の液を捨て、スピンカートリッジに 700 μ l の L2 を加え、室温で 5 分間静置する。
- ⑧ 遠心 (12,000 rpm、1 min、RT) を行い、チューブ内の液を捨てた後、再度同じ条件で遠心して完全に L2 を取り除く。
- ⑨ 1.5 ml のチューブにスピンカートリッジをのせ、65- 70°C に加熱した TE buffer を 50 μ l 加える。
- ⑩ 室温で 1 分間静置し、遠心 (12,000 rpm、2 min、RT) を行う。
- ⑪ チューブ内の DNA 溶液を回収し、必要に応じてエタノール沈殿を行う。

3- 2- 4 . DNA 塩基配列決定法

3- 2- 4- 1 . シークエンス用 mutant の作製

本章で、シーケンス用 mutant の作製は、GPS- 1 genome priming system (New England Biolabs Inc.) を用いて行った。実際の操作は添付の説明書に従った。

【操作】

- ① 10 x GPS buffer を 2 μ l、pGPS1.1 を 1 μ l、DNA solution 0.08 μ g を dH₂O で 20 μ l に fill up し、ピペッティングにより混合する。
- ② 1 μ l の TnsABC Transposase を加えて混合する。
- ③ 37°C で 10 分間反応させる。
- ④ 1 μ l の Start Solution を加え、ピペッティングにより混合する。
- ⑤ 37°C で 1 時間反応させる。
- ⑥ 75°C で 10 分間加温する。
- ⑦ ⑥の溶液で形質転換を行い、Ap と Ap/ Km を加えた 2 x YT プレートに塗布する。

3- 2- 4- 2 . シーケンス用プラスミドの抽出

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】

- ① Cell Resuspension Solution
- ② Cell Lysis Solution
- ③ Neutralization Solution
- ④ Wash buffer

【操作】

- ① 5 ml の 2 x YT 培地あるいは LB 培地に *E. coli* を植菌し、37°C で 6- 12 時間振とう培養する。
- ② 2 ml の培養液を 2 ml のチューブに移し、遠心 (8,000 rpm、2 min、4°C) により集菌する。
- ③ ②の遠心を再度繰り返して培地を可能な限り除く。
- ④ 200 μ l の Cell Resuspension Solution に菌体を vortex ミキサーで懸濁させる。
- ⑤ 250 μ l の Cell Lysis Solution を加え、10 回のピペッティングにより溶解する。
- ⑥ 250 μ l の Neutralization Solution を加え、10 回のピペッティングにより混合する。
- ⑦ 遠心 (13,000 rpm、5 min、RT) を行い、上清の半分を 2 ml の Wash tube に入れた Spin Filter にのせる。
- ⑧ 200 μ l のマトリクスを加えてピペッティングにより混合した後、遠心 (13,000 rpm、30 sec、RT) を行う。
- ⑨ Wash tube の液を捨て、残り半分の上清を Spin Filter にのせ、ピペッティングにより混合した後、遠心 (13,000 rpm、30 sec、RT) を行う。
- ⑩ Wash tube の液を捨てて 500 μ l の Wash buffer を加え、遠心 (13,000 rpm、2 min、RT) する。
- ⑪ Spin Filter を 1.5 ml の Collection tube に移し、100 μ l の 70°C に加温した滅菌蒸留水に溶解する。使用時まで - 20°C で保存する。

3-2-4-3. シークエンス反応

《プライマーラベル反応》

試薬は Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit (アマシャム・ファルマシア) を使用した。ただし、dNTP は 2.5 mM dNTP mixture with 7- deaza- dGTP Kit (アマシャム・ファルマシア) を、Stop buffer には IR2 用 Stop Solution (ALOKA) を使用した。プライマーラベルのシークエンス反応液は DNA シークエンサー LIC- 4200L(S)- 2 (LI- COR) の取扱説明書に従って調製した。1 pmol のプライマー溶液、200- 300 fmol 分の DNA 溶液、試薬を混合し、滅菌蒸留水で全量が 17 μ l になるよう調製し、termination mixture を入れたチューブに 4 μ l ずつ分注した。PCR 反応は GenAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER) を用い、以下に示す温度プログラムで行った。反応後、Stop Solution を 4 ml 加え、- 20°C で使用時まで保存する。

1 cycle	95°C	5 min
30 cycles	95°C	30 sec
	50°C	30 sec
	70°C	60 sec
1 cycle	4°C	∞

《インターナルラベル反応》

試薬は SequiTherm EXCEL™ II Long- Read™ DNA Sequencing Kit- LC と IRD40- dATP (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて行った。インターナルラベルのシークエンス反応は DNA シークエンサー LIC- 4200L(S)- 2 の説明書に従って調製した。2 pmol のプライマー溶液、300- 800 fmol の DNA 溶液、試薬を混合し、滅菌蒸留水で全量が 17 μ l になるよう調製した。PCR 反応は GenAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER) を用い、以下に示す温度プログラムで行った。反応後、6 μ l のフェノール/クロロフォルムと 1 μ l の 1% (wt/vol) Blue Dextran を加えて遠心 (15,000 rpm、2 min、RT) し、上清を新しいチューブに移す。Stop Solution を 1.5 μ l 加え、- 20°C で使用時まで保存する。

ラベリング反応：	1 cycle	92°C	2 min
	40 cycles	92°C	30 sec
		50°C	20 sec
		70°C	5 sec
	1 cycle	4°C	∞
サイクルシークエンス反応：	1 cycle	92°C	2 min
	30 cycles	92°C	30 sec
		50°C	15 sec
		70°C	15 sec
	1 cycle	4°C	∞

3- 2- 4- 4 . 電気泳動及びデータ解析

オートシーケンサー-LIC- 4200L(S)- 2 (LI- COR)を用い、dideoxy 法 [Sanger et al., 1977]で行った。電気泳動は 3.75%アクリルアミド、7 M 尿素含有ゲルを用い、泳動 buffer として TBE buffer を使用した。電気泳動のデータ解析は、BaselImageIR™ (ver.4.1)で自動解析した。シーケンスデータの解析は、DNASIS Mac (ver 3.7、Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)を用いた。決定した塩基配列のホモロジー検索は、GenBank DNA database または SWISS PROT protein database を用いて BLAST ver.2.0.10 [Altschul et al., 1997] で行った。アミノ酸のアラインメントには、Clustal X software [Thompson et al., 1997]を用いた。

3- 2- 5 . 粗酵素抽出液の調製

本章で用いた粗酵素抽出液は以下の方法で調整した。

【試薬】

- ① 50 mM sodium- phosphate buffer (pH 7.5)

KH_2PO_4 6.8g を 870 ml の蒸留水に溶解させた後、10N NaOH で pH7.5 に調整し、1000 ml に fill up する。

【操作】

- ① 目的のタンパク質を発現するプラスミドを保持した *E. coli* を 5 ml の 2 x YT 培地 (Ap を含む) に植菌し、37°Cで一晩前培養 (300 strokes/ min) を行う。
- ② 100 ml の 2 x YT 培地に植菌し、 $\text{OD}_{550}=1.0$ になるまで 37°Cで培養 (300 strokes/ min) する。
- ③ $\text{OD}_{550}=1.0$ になったところで IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加し、同じ条件でさらに 5 時間振とう培養を行う。
- ④ 遠心 (3,000 rpm、10 min、4°C) により集菌し、培地を除去する。
- ⑤ 4°Cに冷やした 50 mM sodium- phosphate buffer (pH 7.5) で菌体を 2 回洗浄する。
- ⑥ 菌体を 5 ml の同 buffer に懸濁させる。
- ⑦ 超音波により菌体を破碎する。破碎の条件は氷上で破碎液の温度が 4°C以上にならないように行った。破碎の強度は装置の目盛りを 4.0 に合わせ、プログラムは M1 を用いた。
- ⑧ 遠心 (15,000 rpm、30 min、4°C) を行い、上清を粗酵素抽出液とした。

3- 2- 6 . タンパク質の定量

タンパク質の定量は、プロテインアッセイキット (BIO- RAD) を用いて、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質としてマイクロアッセイ法により行った [Bradford, 1976]。

【操作】

- ① 標準試料として、BSA を 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製する。
- ② サンプルを適宜滅菌水で希釈した溶液を調製する。

- ③ 標準試料もしくはサンプル 800 μ l に対して dye reagent を 200 μ l 加えて vortex ミキサーで 2-3 秒程度攪拌する。
- ④ 室温で 5 分間放置した後、 A_{595} を測定し、標準タンパク質を用いた検量線との比較を行い、サンプル中のタンパク質の定量を行った。

3-2-7. SDS- PAGE

Laemmli の方法 [Laemmli, 1970] に従い、ミニスラブ電気泳動槽 AE- 6400 (ATTO) を用いて行った。

【試薬】

- ① 30% アクリルアミド・ビス (19:1) 溶液
- ② 電気泳動用 buffer

3 g	Tris base
14.4 g	glycine
1 g	SDS

 蒸留水で 1000 ml に fill up する。
- ③ 濃縮ゲル用緩衝液

1.5 M	Tris- HCl (pH 8.8)
0.4% (wt/ vol)	SDS
- ④ 分離ゲル用緩衝液

0.5 M	Tris- HCl (pH 6.8)
0.4% (wt/ vol)	SDS
- ⑤ 10% 過硫酸アンモニウム (APS) 溶液
- ⑥ *N,N,N',N'*- tetramethylethylenediamine (TEMED)
- ⑦ 染色液

0.25% (wt/ vol)	Coomassie brilliant blue R- 250 (CBB)
30% (vol/ vol)	methanol
10% (vol/ vol)	acetic acid
- ⑧ 脱染色液

30% (vol/ vol)	methanol
10% (vol/ vol)	acetic acid

【操作】

- ① 分離ゲルを作製する。特に明記しない限り 13%アクリルアミドゲルを使用した。6.5 ml の 30% アクリルアミド・ビス溶液、3.75 ml の分離ゲル緩衝液、4.75 ml の蒸留水を混合し、30 分間脱気する。
- ② ①の溶液に 50 μ l の 10% APS 水溶液と 10 μ l の TEMED を加え、予め組み立てておいたゲル板に流し込む。

- ③ 上部に蒸留水を重層して空気中の酸素との接触を断ち、30- 60 分間室温でゲルを重合させる。ゲルが固まったら、上部を濃縮ゲル緩衝液でリンスする。
- ④ 濃縮ゲルを作製する。0.65 ml の 30%アクリルアミド・ビス水溶液、1.25 ml の濃縮ゲル緩衝液、3.05 ml の蒸留水を混合し、30 分間脱気する。
- ⑤ ④の溶液に 25 μ l の 10% APS 水溶液と 5 ml の TEMED を加え、分離ゲルの上に重層する。コームを差し込み、試料穴を作製する。
- ⑥ 試料穴に試料をのせ、dye front がゲルの下端に達するまで電気泳動（定電流; 20 mA）を行う。
- ⑦ ゲル板を剥がし、濃縮ゲルを切り取ってから、染色液に 30 分間浸す。
- ⑧ ゲルを脱染色液に浸し、振とうしながら CBB を脱色する。
- ⑨ ゲルドライヤーを用いてゲルを乾燥させる。

3- 2- 8 . 2- Hydroxypenta- 2,4- dienoate (HPD) の調製法

Collintheworth らの方法を基に、DL- allylglycine より調製した [Collintheworth et al., 1973]。

【操作】

- ① 200 μ mol の KCl、5 mg の D- amino acid oxydase (Sigma)、140 μ l の Tris- HCl (pH 7.2)、1 μ l の catalase (Sigma)、5 ml の dH₂O を混合した。
- ② ①の溶液に DL- allylglycine 60 μ mol を加えて、37°C で 1 時間反応させる。
- ③ 6% 過塩素酸 1 ml を加えて反応を停止させ、遠心（15,000 rpm、15 min、4°C）して上清を回収する。
- ④ 上清の 3 倍量のエーテルで抽出し、ガラスピペットで新しいガラスチューブに移す。
- ⑤ 無水硫酸ナトリウムにより脱水する。
- ⑥ 脱水した酢酸エチル相をカラムを通すことにより、硫酸ナトリウムを濾過する。
- ⑦ 遠心エバポレーターを用いて、40°C 以下の条件で乾固させる。
- ⑧ 1 ml の dH₂O に溶解し、A₂₆₅ を測定する。また FeCl₃ 水溶液中で青色を呈することを確認した。

3- 2- 9 . HPD hydratase の酵素活性測定法

HPD hydratase の活性は、Harayama らの方法を基に、*carD* をコードする pBCA616 を保持した *E. coli* の粗酵素抽出液を用いて測定した [Harayama et al., 1989]。吸光度の測定は、分光光度計 DU- 7400 (BECKMAN) を用いて、恒温槽（TAITEC）からの循環水を用いた温度制御下で、セル内をスターラーで攪拌しながら行った。酵素反応の温度は 25°C で行い、反応スケールは 1 ml とした。HPD の添加により反応を開始した。HPD の吸収波長は 265 nm、モル吸光計数は 19200 cm⁻¹M⁻¹ を用い [Pollard and Bugg 1998]、A₂₆₅ の減少を測定した。1 酵素ユニット (U) は 25°C で 1 分間に 1 mM の HPD を分解するのに必要な酵素量とした。なお、反応液の組成は以下の通りである。コントロールとして pBluescript SK- を保持する *E. coli* の粗酵素抽出液を用いて同様の実験を行った。

10 mM Tris- Hcl (pH7.0)

3.3 mM MgSO₄

50 μM HPD

タンパク質濃度が 50 ng/ ml になるように粗酵素抽出液を加える。

3- 2- 1 0 . Acetaldehyde dehydrogenase (acylating) の酵素活性測定法

Acetaldehyde dehydrogenase の活性は、Singler らの方法を基に、*carF* をコードする pUCA617 を保持した *E. coli* の粗酵素抽出液を用いて測定した [Shingler et al., 1992]。酵素反応の温度は 19°C で行い、反応スケールは 1 ml とした。Acetaldehyde の添加により反応を開始した。β- NADH のモル吸光計数は 6300 cm⁻¹M⁻¹ を用い、acetaldehyde のアシル化で消費される β- NAD⁺ の減少を β- NADH の最大吸収波長である A₃₄₀ の増加を測定した。1 酵素ユニットは 19°C で 1 分間に 1 mM の β- NAD⁺ を消費するのに必要な酵素量とした。なお、反応液の組成は以下の通りである。コントロールとして pUC18 を保持する *E. coli* の粗酵素抽出液を用いて同様の実験を行った。

50 mM phosphate buffer (pH7.5)

100 μM Coenzyme A

285 μM β- NAD⁺

10 mM Acetaldehyde

タンパク質濃度が 0.4- 0.5 mg/ ml になるように粗酵素抽出液を加える。

3- 2- 1 1 . CA10 株の total RNA の調製

本章において CA10 株からの total RNA の抽出は、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて行った。

【試薬】

① lys- TE buffer

20 μg/ ml の lysozyme 溶液 2ml を 100 μl の TE buffer に溶解する。

② Buffer RLT

β- Mercaptoethanol 10 μl を 1 ml の Buffer RLT に加える。

③ Buffer RPE

100%エタノール 44 ml を 11 ml の Buffer RPE に加える。

④ QIA shredder

⑤ RNase free water

【操作】

① CA10 株の CAR 培養液 2 ml を 2 ml チューブに移し、遠心 (9,500 rpm、5 min、4°C) により集菌する。

② ①の遠心を再度繰り返して培地を可能な限り除く。

③ 菌体を 100 μl の lys- TE buffer に懸濁し、室温で 5 分間静置する。

④ 350 μl の Buffer RLT を加え、vortex ミキサーで穏やかに攪拌し、遠心 (13,000 rpm、5 min、4°C)

する。

- ⑤ 上清 450 μ l を QIA schreder に移し、遠心 (13,000 rpm、2 min、RT) する。
- ⑥ 下に落ちた溶液に 250 μ l の 100%エタノールを加え、ピペッティングにより穏やかに攪拌する。
- ⑦ ⑥の溶液を 2 ml チューブの上にセットした RNeasy mini spin column に移し、遠心 (13,000 rpm、15 sec、RT) する。
- ⑧ 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy mini spin column に加え、遠心 (13,000 rpm、15 sec、RT) する。
- ⑨ RNeasy mini spin column を新しい 2 ml チューブの上にセットする。
- ⑩ 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy mini spin column に加え、遠心 (13,000 rpm、15 sec、RT) する。
- ⑪ ⑩の操作を再度繰り返す。
- ⑫ RNeasy mini spin column を新しい 1.5 ml チューブの上にセットする。
- ⑬ 30 μ l の RNase free water を RNeasy mini spin column に加え、遠心 (13,000 rpm、15 sec、RT) し、total RNA を溶出させる。使用時まで -80°C で保存する。

3- 2- 1 2 . RNA の DNaseI 処理

試薬を調整する際には、全て diethylpyrocarbonate (DEP) 処理水を使用した。

【試薬】

① DEP 処理水

50 ml の H₂O に DEP を 100 μ l 加えて攪拌後、30 分以上静置しオートクレーブ。

② 10×DNaseI buffer

400 mM	Tris- HCl (pH 8.0)
100 mM	NaCl
60 mM	MgCl ₂

③ 50 mM Dithiothreitol (DTT)

DTT 3.1 g を 20 ml の 0.01 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) に溶解する。

④ フェノール/クロロホルム

⑤ 7M Ammonium acetate (NH₄OAc)

NH₄OAc 53.9 g を H₂O に溶解し、100 ml に fill up する。濾過滅菌する。

【操作】

- ① 1.5 ml チューブに以下に示す反応液 100 μ l を調整し (DNaseI は最後に加える)、混合した後 37°C で 30 分間 DNaseI 処理を行う。

反応液組成 :	RNA solution	60 μ l
	10×DNaseI buffer	10 μ l
	50 mM DTT	2 μ l

RNase inhibitor	2 μ l
RNase free water	24 μ l
DNaseI	2 μ l

- ② 100 μ l のフェノールを加え、vortex ミキサーで攪拌する。
- ③ 遠心 (13,000 rpm、15 min、RT) した後、水相 100 μ l を分取し、新しい 1.5 ml チューブに移す。
- ④ 100 μ l のフェノール/クロロホルムを加え、vortex ミキサーで攪拌する。
- ⑤ 遠心 (13,000 rpm、15 min、RT) した後、水相 100 μ l を分取し、新しい 1.5 ml チューブに移す。
- ⑥ ④、⑤の操作を再度繰り返す。
- ⑦ 40 μ l の 7M NH_4OAc を加え、vortex ミキサーで攪拌する。
- ⑧ 280 μ l の 100%エタノールを加え、- 80°Cで一晩エタノール沈殿を行う。
- ⑨ 200 μ l の 70%エタノール (- 20°C) でリンスする。
- ⑩ 40 μ l の RNase free water に溶解させ、- 80°Cで保存する。

3- 2- 1 3 . ノーザンハイブリダイゼーション

【試薬】

① 20 x MOPS

41.9 g MOPS、6.8 g sodium acetate、3.72 g EDTA · 2Na を H_2O に溶解し、KOH で pH 7.0 に調整した後、500 ml に fill up する。オートクレーブによる滅菌。

② 20 x SSC

【操作】

- ① 3- 2- 11 の方法により取得した CA10 株の total RNA を、3- 2- 12 の方法により DNaseI 処理する。
- ② RNA 溶液 1.5- 2.0 μ g 分を、2.2 M formaldehyde を含むアガロースゲル電気泳動に供した。泳動 buffer には 1 x MOPS buffer を使用した。
- ③ ナイロンメンブレン Biodyne B に RNA をキャピラリーブロッティング法によりトランスファーする (一晩)。
- ④ 2- 2- 12- 1 の方法によりプローブを作製する。
- ⑤ 2- 2- 12- 2 の方法によりメンブレンフィルターを作製する。
- ⑥ 2- 2- 12- 3 の方法によりハイブリダイゼーション及び検出を行う。

3- 2- 1 4 . CA10 株由来のプラスミド pCAR1 の抽出法

本章においてメガプラスミド pCAR1 の抽出は、Ka and Tiedje (1994) の方法に若干の変法を加えて行った。メガプラスミドの電気泳動には、TAE buffer と 0.7%アガロース H (ニッポンジーン) を用いて行った。

【試薬】

① Lysing solution (pH 12.6)

50 mM	Tris
3%	SDS

② フェノール/クロロホルム

③ 50×TAE

【操作】

- ① CA10 株を 5 ml の 2 x YT 培地に植菌し、30°C で振とう培養する (300 strokes/ min、16 hour)。
- ② 5 ml の培養液をチューブに移し、遠心 (13,000 rpm、2 min、RT) により集菌した後、1 ml の滅菌水で洗浄してから再度遠心 (13,000 rpm、2 min、RT) により集菌する。
- ③ 滅菌水 50 μ l に懸濁させた後、lysing solution を 200 μ l 加え、穏やかに攪拌した後、室温で 15 分間インキュベートする。
- ④ 80°C で 1 分間インキュベートする。
- ⑤ 250 μ l のクロロホルムを加え、穏やかに攪拌した後、室温で 3 時間インキュベートする。
- ⑥ 遠心 (13,000 rpm、15 min、RT) し、上清を電気泳動に供した。

3- 2- 1 5 . DNA 塩基配列の accession number

本章で決定した塩基配列は、DDBJ、EMBL、GenBank nucleotide sequence database に登録しており、*car* 遺伝子群及び *ant* 遺伝子群は accession number AB047548、*cat* 遺伝子群は accession number AB047272、CA10 株の 16S- rDNA の塩基配列は accession number AB047273 である。

3-3. 結果

3-3-1. *carAaAaBaBbCAc(ORF7)Ad* 遺伝子周辺領域の塩基配列の決定

CA10 株 total DNA のコスミドライブラリーを作製し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した *carAaAaBaBbCAc(ORF7)Ad* 遺伝子を含む 6.9- kb *EcoRI* 断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果、9 個の陽性クローン (pSCos701-709) が得られたため、ハイブリダイゼーション解析とともに制限酵素地図の作製を行った (Fig. 3-1)。各種サブクローンを作製して既知の *car* 遺伝子群の上流 27,937- bp と下流 9,448- bp の領域に関して塩基配列を決定し、コンピュータ解析を行ったところ、上流域に 23 個の ORF (ORF9- ORF31 と命名)、下流域に 9 個の ORF (ORF32- ORF40 と命名) が認められた (Fig. 3-2) (決定した塩基配列と 32 個の ORF の推定アミノ酸配列及び推定 SD 配列 [Shine and Dalgarno 1975] を付図 2 [論文の末尾に添付] に示した)。各 ORF の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果を Table 3-4 に要約した。

3-3-2. HPD から acetyl- CoA の代謝に関与する遺伝子群 (*carDFE* 遺伝子) の解析

ORF32、ORF35、ORF36 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、それぞれ HPD hydratase である CumE (*P. fluorescens* IP01) [Habe et al., 1996]、acetaldehyde dehydrogenase (acylating) である DmpF (*P. putida* CF600) [Shingler et al., 1992]、4- hydroxy- 2- oxoalate aldorase である MhpE (*C. testosteroni* TAA411) [Arai et al., 1999] と 74、71、82% の最も高い identity を示した。ORF32 の推定アミノ酸配列には、既知の HPD hydratase の活性や構造の保持において重要な役割を果たしていると考えられる 5 アミノ酸残基 ADNAS [Lau et al., 1994] が保存されていた (付図 2)。これらの結果より、ORF32、ORF35、ORF36 はそれぞれメタ開裂経路の酵素群である HPD hydratase、acetaldehyde dehydrogenase (acylating)、4- hydroxy- 2- oxoalate aldorase をコードしていると考えられたため、*carD*、*carF*、*carE* と命名した。一方、*carD* と *carF* の間に存在した ORF33 と ORF34 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索したが、有意な相同性を示すタンパク質は存在しなかった。

また、ORF32、ORF35、ORF36 の遺伝子産物を同定するため、それぞれの発現用プラスミド pBCA616 (*CarD* をコード)、pUCA617 (*CarF* をコード)、pUCA618 (*CarE* をコード) を保持する大腸菌に対して IPTG で誘導をかけ、粗酵素抽出液を SDS- PAGE に供した。各々のコントロールとして pBluescript SK-、pUC18、pUC19 を保持する大腸菌から同様に調製した粗酵素抽出液を用いた。その結果を Fig. 3-3 に示す。pBCA616 を保持する大腸菌からは分子量約 27,000 の発現産物、pUCA617 を保持する大腸菌からは分子量約 35,000 の発現産物、pUCA618 を保持する大腸菌からは分子量

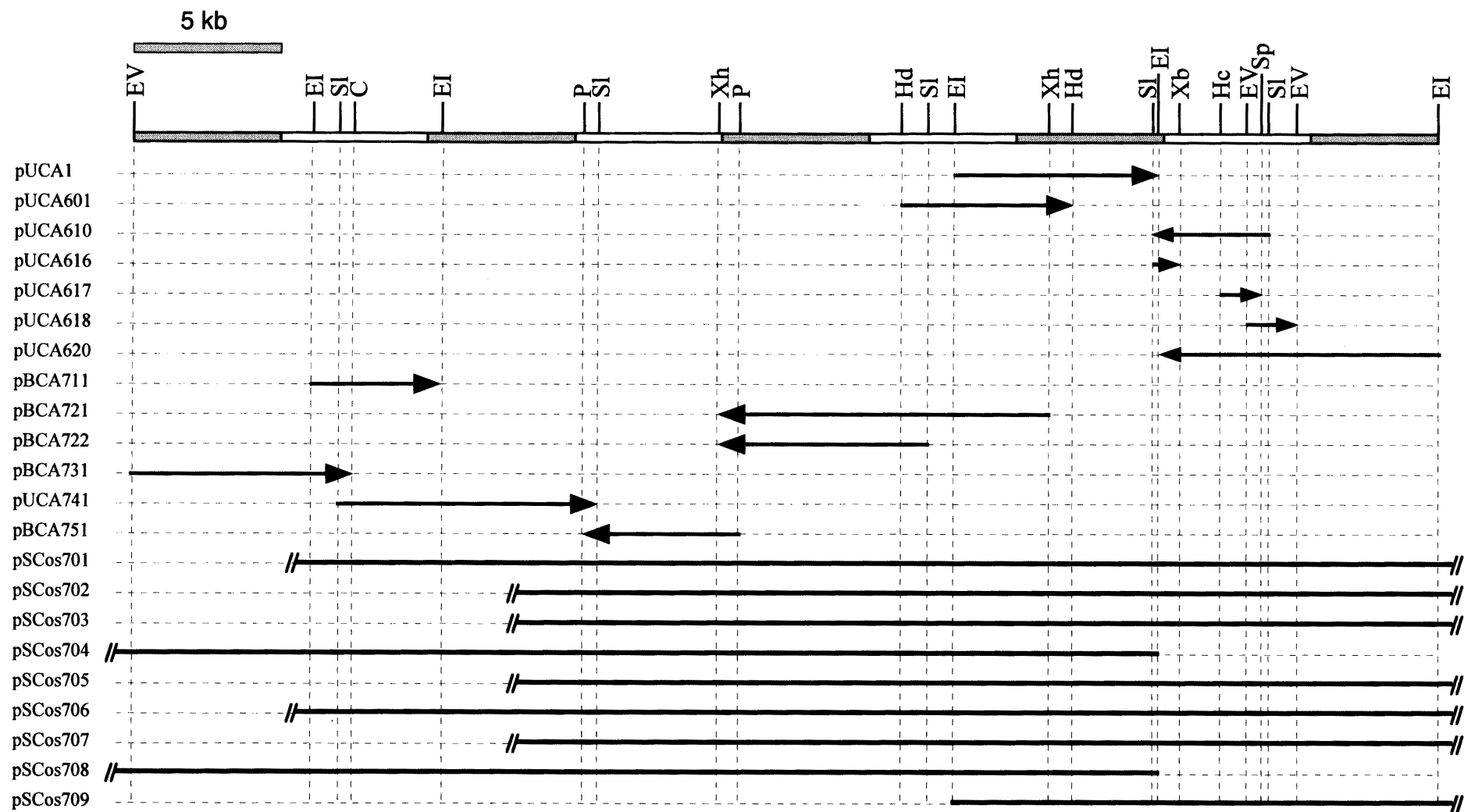


Fig. 3-1. Physical map of the 44.3-kb DNA region containing 6.9-kb *EcoRI* insert of pUCA1 and its flanking region. The location of the subcloned DNA fragments and orientation of the *lac* promoter of cloning vector are indicated by the length and the direction of arrow, respectively. As for the cosmid clones, the DNA region which was revealed to be contained in respective cosmid by Southern hybridization analysis was shown by the solid line. The double slash attached to the end of the solid line indicates that DNA region outside of *EcoRI* site was contained in respective cosmid insert. Only the restriction enzyme sites used for the construction of the plasmids are shown. Restriction enzyme site designations are: C, *Clal*; EI, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; Hc, *HincII*; Hd, *HindIII*; P, *PstI*; SI, *Sall*; Sp, *SphI*; Xb, *XbaI*; and Xh, *XhoI*.

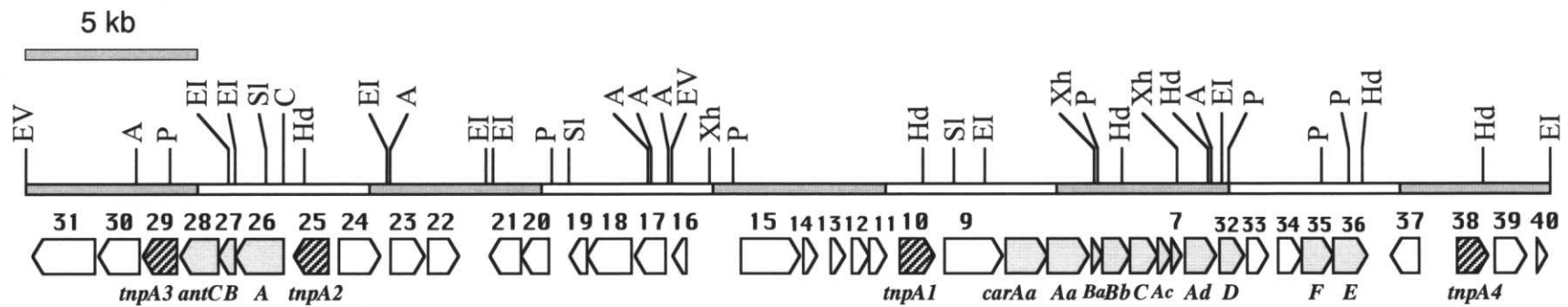


Fig. 3-2. Physical map of the 44.3-kb DNA region containing 6.9-kb *EcoRI* insert of pUCA1 and of the different cloned DNA fragments described in this study. The pentagons and triangles in the physical map indicate the size, location, and the direction of transcription of the ORFs derived from the DNA sequence analysis. The shaded pentagons and triangles represent the *car* and *ant* gene clusters. The cross-hatching pentagons represent the transposase genes. Only restriction sites of relevant enzymes are shown. Restriction site designations are: A, *ApaI*; C, *ClaI*; EI, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; H, *HindIII*; P, *PstI*; SI, *Sall*; Xh, *XhoI*.

Table 3-4. Genes located in *car* gene cluster and its flanking region and their functions

ORFs (Gene name)	Position in accession no. AB047548	Probable function	Calculated G+C		Identity (%)	Homology		Accession no.
			molecular mass (Da)	content (%)		Name of protein	Source	
ORF9	26,723-28,426	Unknown (fusion gene)	63,238	55.5	40	AntA	<i>Acinetobacter</i> sp. strain ADP1	AF071556
					27	XylX	pDK1 (<i>P. putida</i> strain PaW630)	AF134348
ORF10 (<i>tnpA1</i>)	25,375-26,355	Transposase	36,828	58.9	100	TnpA2, TnpA4	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10	AB047548
					96	TnpA3	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10	AB047548
					96	TnpA1	<i>P. stutzeri</i> . strain AN10	AF039533
					96	transposase	IS1384 (<i>P. putida</i> . strain H)	AF052751
					94	TnpA2	<i>P. stutzeri</i> . strain AN10	AF039534
ORF11	24,489-25,001	Unknown	18,850	49.3				
ORF12	23,972-24,463	Unknown	18,038	49.2				
ORF13	23,447-23,779	Unknown	12,384	55.0				
ORF14	22,567-22,971	Unknown	14,672	65.2				
ORF15	20,851-22,485	Unknown	57,008	68.7	13 ^a	VgrG	<i>E. coli</i> strain ECOR-50	AF044506
					13 ^a	VgrG	<i>E. coli</i> strain ec-11	AF044503
ORF16	19,244-18,846	Unknown	14,101	62.6				
ORF17	18,644-17,697	Reductase component	33,670	67.9	40	VanB	<i>Pseudomonas</i> sp. strain ATCC19151	M22077
					34	PobB	<i>P. pseudoalcaligenes</i> strain POB310	X78823
ORF18	17,646 -16,315	Large (α) subunit of terminal oxygenase component	49,399	63.4	24	TdnA1	pTDN1 (<i>P. putida</i> strain UCC22)	D85415
					25	AtdA3	pYA1 (<i>Acinetobacter</i> sp. strain YAA)	D86080
ORF19	16,325-15,792	Small (β) subunit of terminal oxygenase component	20,934	64.8	29	PhnY	<i>Burkholderia</i> sp. strain RP007	AF112137
					26	BnzB	<i>P. putida</i> strain BE-81	P08085
ORF20	15,203-14,394	Short-chain alcohol dehydrogenase	27,878	69.1	33	Short-chain alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus thermoleovorans</i> strain B23	AB040809
					33	Hypothetical protein X	<i>P. aeruginosa</i>	S39654
ORF21	14,347-13,526	Dienelactone hydrolase	29,901	65.4	36	ORF2	<i>Azospirillum brasilense</i> strain Sp7	Q43914
					33	ClcD	<i>P. aeruginosa</i> strain JB2	AF087482
ORF22	11,659-12,645	Putative regulatory protein	36,411	67.6	30	ORF3	<i>P. aeruginosa</i> strain JB2	AF087482
					17	BphS	<i>Pseudomonas</i> sp. strain IC	AF077670
ORF23	10,639-11,655	Putative regulatory protein	38,853	60.9	27	OxoS	<i>P. putida</i> strain 86	Y12655
					19	ThcR	<i>Rhodococcus</i> sp. strain NI86/21	P43462
ORF24	9,062-10,318	Channel-forming protein	47,299	61.7	39	PhaK	<i>P. putida</i> strain U	AF029714
					35	PhaK-like protein	<i>P. putida</i> strain DOT-T1E	AF031417
ORF25 (<i>tnpA2</i>)	8,809 -7,829	Transposase	36,828	58.8	100	TnpA1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10	AB047548

ORF26 (<i>antA</i>)	7,487-6,084	Large (α) subunit of terminal oxygenase component of anthranilate 1,2-dioxygenase	53,154	61.1	72 43	AntA XylX	<i>Acinetobacter</i> sp. strain ADP1 pDK1 (<i>P. putida</i> strain PaW630)	AF071556 AF134348
ORF27 (<i>antB</i>)	6,081-5,590	Small (β) subunit of terminal oxygenase component of anthranilate 1,2-dioxygenase	19,394	62.8	53 43	AntB BenB	<i>Acinetobacter</i> sp. strain ADP1 <i>P. putida</i>	AF071556 AF218267
ORF28 (<i>antC</i>)	5,571-4,543	Reductase component of anthranilate 1,2-dioxygenase	37,984	65.6	54 33	AntC XylZ	<i>Acinetobacter</i> sp. strain ADP1 pWW0 (<i>P. putida</i> strain mt-2)	AF071556 P23101
ORF29 (<i>tnpA3</i>)	4,385-3,405	Transposase	36,916	58.8	99 99 96 94	TnpA1 transposase TnpA1 TnpA2	<i>P. stutzeri</i> . strain AN10 IS1384 (<i>P. putida</i> . strain H) <i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10 <i>P. stutzeri</i> . strain AN10	AF039533 AF052751 AB047548 AF039534
ORF30	3,245-2,085	Putative ABC transporter substrate binding protein	41,687	63.3	24 15	HbaE BraC	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> strain GCA009 <i>P. aeruginosa</i> strain PAO	U75364 P21175
ORF31	1,929-214	Putative membrane spanning protein	60,651	65.6	30 18	OhbE HbaG	<i>P. aeruginosa</i> strain JB2 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> strain GCA009	AF087482 U75364
ORF32 (<i>carD</i>)	34,668-35,450	2-Hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase	27,459	51.6	74 73	CumE IpbE	<i>P. fluorescens</i> strain IP01 pRE4 (<i>P. putida</i> strain RE204)	D63377 AF006691
ORF33	35,562-36,059	Unknown	18,625	48.0				
ORF34	36,389-37,132	Unknown	27,415	44.4				
ORF35 (<i>carF</i>)	37,086-38,033	Acetaldehyde dehydrogenase (acylating)	33,265	48.2	71 68 68 67	DmpF XylQ MhpF MhpF	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CF600 pWW0 (<i>P. putida</i> strain mt-2) <i>E. coli</i> strain K12 <i>Comamonas testosteroni</i> strain TA441	S24419 S35222 P77580 AB024335
ORF36 (<i>carE</i>)	38,030-39,052	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase	36,651	50.6	82 83	MhpE MhpE	<i>Comamonas testosteroni</i> strain TA441 <i>E. coli</i> strain K12	AB024335 P51020
ORF37	40,520-39,723	Unknown	29,534	52.3				
ORF38 (<i>tnpA4</i>)	41,554-42,534	Transposase	36,828	58.9	100	TnpA1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CA10	AB047548
ORF39	42,747-43,577	C-terminus of YkoW-like protein (truncated ORF)	31,201	44.6	38 ^b 36 ^b	protein slr1305 YkoW	<i>Synechocystis</i> sp. strain PCC 6803 <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	S76238 AJ243712
ORF40	43,934-44,203	Unknown	10,057	38.5				

^a Homology was observed only in about the 100-amino acid region in N-terminus of the deduced amino acid sequence of ORF15.

^b Homology was observed only in about 300 amino acids in C-terminus of YkoW or slr1305.

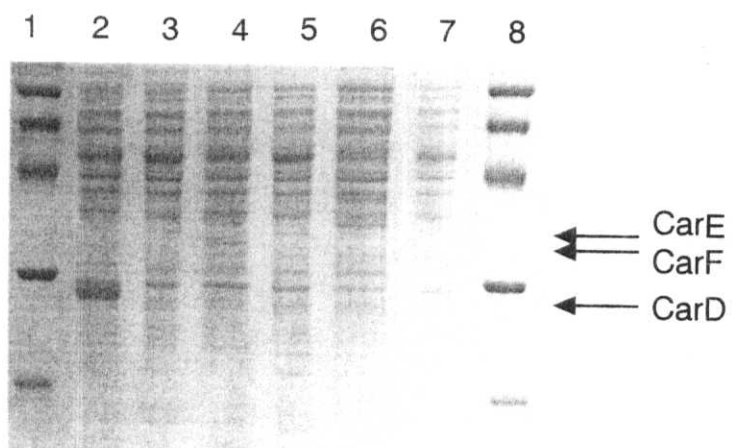


Fig. 3-3. Detection of the CarD, CarF, and CarE produced by *E. coli* cells. Total cellular proteins of *E. coli* cells were analyzed by SDS-PAGE. Lanes: 1 and 8, molecular mass standards of 94, 67, 43, 30, 20.1, and 14.4 kDa (top to bottom); 2, JM109(pBCA616); 3, JM109 (pBluescript II SK-); 4, JM109(pUCA617); 5, JM109(pUC18); 6, JM109(pUCA618); 7, JM109(pUC19).

約36,000の発現産物が確認され、推定アミノ酸配列から予想される各々の分子量27,458、33,232、36,619 とほぼ一致した。

さらに *carD* 及び *carF* については活性測定も行った。pBCA616 (*CarD* をコード)を保持する大腸菌から調製した粗酵素抽出液を用いて、合成した HPD に対する酵素活性を測定した。その結果、*CarD* は HPD に対して活性を示し、その値はコントロール (0.076 U/mg protein) に対し 3.05 U/mg protein と 33.7 倍であった (Table 3-5A)。一方、pUCA617 (*CarF* をコード)を保持する大腸菌から調製した粗酵素抽出液を用いて acetaldehyde に対する活性を測定したところ、コントロールに比べ約 9.2 倍の活性 (0.119 U/mg protein)を示した (Table 3-5B)。

3-3-3. AN から CAT の代謝に関与する遺伝子群 (*antABC* 遺伝子) の解析

ORF26、ORF27、ORF28 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、Class IB [Batie et al., 1991]に属する multicomponent dioxygenase の各コンポーネント terminal oxygenase large subunit、small subunit、reductase component と identity を示した。中でも、anthranilic acid 代謝系の AntABC (*Acinetobacter* sp. ADP1) [Bundy et al., 1998]とアミノ酸レベルでそれぞれ 72、53、54%の最も高い identity を示した。ORF26 推定アミノ酸配列の N 末端には、Rieske-type の [2Fe-2S]クラスターとの結合に関与するアミノ酸配列である CXHX₁₆₋₁₇CXXH [Rieske et al., 1964]が存在していた。また、反応に直接関与すると考えられる二価鉄イオンの結合領域と考えられる配列 [Jiang et al., 1996]が存在するなど、multicomponent dioxygenasesystem の terminal oxygenase large subunit の特徴を有していた (Fig. 3-4)。ORF28 推定アミノ酸配列には、plant-type の [2Fe-2S]クラスターとの結合に関与する共通アミノ酸配列 CX₄CX₂CX₃C [Otaka and Ooi 1989]が存在していた (付図 2)。これらの結果より、ORF26、ORF27、ORF28 はそれぞれ anthranilate 1,2-dioxygenase の terminal oxygenase component large subunit、small subunit、reductase component をコードしていると考えられたため、*antA*、*antB*、*antC* と命名した。

CAR で生育した CA10 株において、*ant* 遺伝子群が発現しているか確認する目的で、*antA* 遺伝子のみの特異的な 200-bp の *Sma*I 断片をプローブとし、CA10 株の total RNA に対してノーザンハイブリダイゼーション解析を行った (Fig. 3-5)。その結果、CA10 株を CAR で生育させた場合、バンドが smearing を起こしているものの、*antABC* 遺伝子群の全領域の長さに相当する 3-kb の転写物が確認された (Fig. 3-5, lane3)。一方、CA10 株をブイオン培地で生育させた場合には、陽性バンドは得られなかった (Fig. 3-5, lane2)。これらの結果から、CA10 株を CAR で生育させた場合に、*ant* 遺伝子群が明らかに誘導されること、また *antABC* 遺伝子が 1 つのオペロンとして転写されてい

Table 3-5.

(A) Activity of 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase, CarD, involved in CAR metabolism by *Pseudomonas* sp. strain CA10

Substrate	Activities (U/ μ g protein) ^a	
	JM109 (pBCA616) [CarD]	JM109 (pBluescript SK-) [Control]
2-hydroxypenta-2,4-dienoate	3.05	0.076

^a Activities of CarD were measured in cell extracts of *E. coli* recombinant strains carrying the plasmids pBCA616.

(B) Activity of acetaldehyde dehydrogenase (acylating), CarF, involved in CAR metabolism by *Pseudomonas* sp. strain CA10

Substrate	Activities (U/ μ g protein) ^a	
	JM109 (pUCA617) [CarF]	JM109 (pUC18) [Control]
acetaldehyde	0.119	0.013

^a Activities of CarF were measured in cell extracts of *E. coli* recombinant strains carrying the plasmids pUCA617.

```

ORF18 (CA10)      AB047548  -----MIPTNEQIAALVRDSDSVHKSIVYTDPPQLFALEMQRIVGQAWIYVGHESQ
TdnA1 (UCC2)     D85415   MTTTAKISVLPRTPAAQGDWDDLQVEDRVHRRLYTDEAIFSRMNNIFAATWVYLAHESE
AtdA3 (YAA)      D86080   -----MKTINQLIQSGRVHRKVYTEASIFQAEMDKIFQANWVFLHASQ
AntA (ORF26, CA10) AB047548  MSSARSVEQWKNFIEGCLDFRPADGVFRIARDIFTEPDLFDLEMELIFEKNWIYACHESE
AntA (ADP1)      AF071556  -MTARNLAEQNFVQGCIDFRPNDGVYRIARDMFTEPELFELEMELIFEKVIYACHESE
XylX (pDK1)     AF134348  -----MNLGLDYIDSLVEEDENEGYRCKREMFTDPRFLDLEMKHFEGNWIYLAHESQ
                . . . * . * * * . * . . * * .

ORF18 (CA10)      VKNPGDYHTTRIGDQDVLVLRGADKRVNVLYNRCPHKGAKLVAEGDGNVGKFFRCYPYHAW
TdnA1 (UCC2)     IPEPNDFKQAWIGVREIVARDEEGVIRVFSNRCSHRGASVCREHRGNA-AGFTCPYHGW
AtdA3 (YAA)      IPKLDDYQTVRMGGRPLIVVRKGDDEFQALLNRCPHRGAKVCRNDSGNS-KTFTCPYHGW
AntA (ORF26, CA10) IANKHDFMTMRAGRQPMIITRDGEGQLNALINACQHRGTTLTRVGKGNQ-STFTCPFHAW
AntA (ADP1)      IPNNNDFTVQIGRQPMIVSRDGKGGELHAMVNACEHRGATLTRVAKGNQ-SVFTCPFHAW
XylX (pDK1)     IPEKNDYTTQMGRRQPIFITRNKDGELNAFINACS HRGATLCRFRSGNK-ATHTCSFHGW
                . * . * . . . * * * * . * * * * . * * *

ORF18 (CA10)      TFKLDGQHLSAPLKN-AFEGTCFNPSHPDFSMVGLARVDSYRGVVFASQSPHGPD-LKGF
TdnA1 (UCC2)     RFDNRGQLFGIPGK--NAYGPTFKSR--DMHLARPAQVASYKGFVFATLNPDAPS-LAEH
AtdA3 (YAA)      KFRNSGKAFVIPGA--NAYGEGFDK--NFSMTAIPRVESYRGVVFATSNENAVS-LEEH
AntA (ORF26, CA10) CYKSDGRLVVKVAP--GEYPEGFDKA--TRGLKK-ARIESYKGFVVISLVDVGDQDSLQEF
AntA (ADP1)      CYKSDGRLVVKVAP--GEYCEDFDKS--SRGLKQ-GRIASYRGVVFVSLDTQATDSLEDF
XylX (pDK1)     TFSNSGKLLKVKDPKGAGYPPDSFDCDG-SHDLKVARFASYRGFLFGSLREDVAP-LEEF
                . * . * . * . * * * * . *

ORF18 (CA10)      LGGVITSIDNLCDRSPVGEVEVAGGIFRVVQSRNWKVYENLHDTMVARVTESSVDAAR
TdnA1 (UCC2)     LGNAAPYLDAWIDHNGGPENLRLAGAQRFLACNWKLVWDNAGDGYVVPFSQSLLVMTN
AtdA3 (YAA)      LGSARQYIDEWLAHQGG-EIKVSKSVQRYEIKCNWKLVDNAGDGYVVPFSQSLLMQTT
AntA (ORF26, CA10) LGDAKVFFDMMVAQSPTEGELEVLPGKSAYTYDGNWKLQENGLDGYVSTVYNYVATVQ
AntA (ADP1)      LGDAKVFLDLMVDQSPTEGELEVLQGKSAYTFAGNWKLQENGLDGYVSTVYNYVSTVQ
XylX (pDK1)     LGESRKVIDMVVDQSPTEGELEVLQGKSAYTFAGNWKLQENGLDGYVSTVYNYAATQQ
                ** * . * * * * * *

ORF18 (CA10)      SEAQSLGEMPFELLIMD--GNGEPYDFWEKLELRAYHNGHGYMEAIFDPAAAERDEVSKA
TdnA1 (UCC2)     ERYGGGDMAVFADADRSKMTNSALDNGHTVIDQRPEMHGE-SAWRLQRQP-GR-EPYED
AtdA3 (YAA)      LRYGGGDIQYFGNADETGMGLYALGNHGSVIDQRPEMHKE-SGWDQQRQP-GR-ESYET
AntA (ORF26, CA10) HRQQVNSEKGLTSADTLDYSKLGAGDKETDDGWFAFHNGH-SVLFSDMPNPSVR-PGYAT
AntA (ADP1)      HRQQVNAAKGDE-LDTLDYSKLGAGDSETDDGWFSFKNGH-SVLFSDMPNPTVR-PGYNT
XylX (pDK1)     QRKLREAGDDIRAMSASSWGKGG-----GFYSFENGH-QMIWARWPPADR-PLFAD
                . * *

ORF18 (CA10)      HFECLSAAYGEERARAILGMNRHNTVIYSGSGSP-HTVFMQFRIIRPMAVDQTLVEIQTFR
TdnA1 (UCC2)     HVASIYGDQAQQVLDTTVGAGM-NLNIFPNLAL---IGNQVQVIQPLAVASTGVHWHYATQ
AtdA3 (YAA)      HVRNNS-SQPARDLERAVGAGM-NLNIFPNLLL---IGNQIQVIDPISVNETVLHWHATL
AntA (ORF26, CA10) IMPRLLEQYEGGKAQWMMHRLR-NLNIYPSMFFLDQISSQLRIIRPIAWNKTEINSFCLG
AntA (ADP1)      VMPYLVEKFGKRAEWAMHRLR-NLNLYPSLFFMDQISSQLRIIRPVAWNKTEVISQCIG
XylX (pDK1)     RD-RLASEVGEARADWMIGISR-NLCLYPNLYLMDQFGSQLRITRPLSVDRTEITIYCIA
                . * . . * . . * . .

```

Fig. 3-4. Alignments of the large (α) subunits of Class I terminal oxygenase components with the postulated ORF18 and *antA* gene products. The identical and similar amino acid residues in all proteins are indicated by asterisks and dots, respectively. The gaps introduced into the alignment are indicated by hyphen. The amino acids conserved for Rieske-type [2Fe-2S] cluster binding site (Rieske et al. 1964) and mononuclear iron coordination site (Jiang et al. 1996) are indicated by reverse type and shaded boxes, respectively. The DDBJ, EMBL, and GenBank nucleotide sequence accession numbers are indicated after the names of enzymes and the name of plasmid, or bacterial strain (in parentheses).

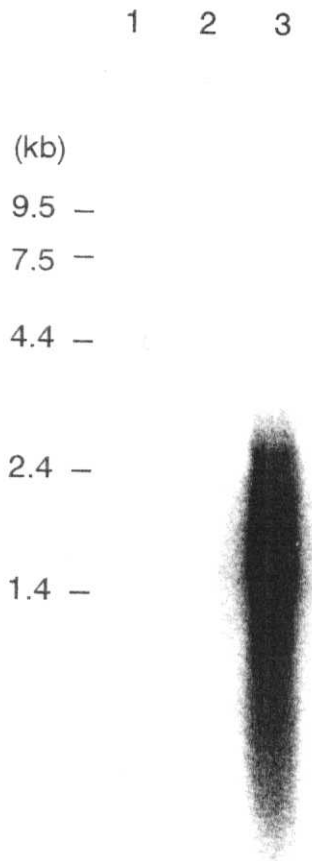


Fig. 3-5. Northern hybridization analysis using *antA* gene as probe. Total RNA was extracted from the CA10 cells grown on nutrient medium (Lane 2) and CAR (Lane 3) to late log phase. As the negative control, total RNA was similarly extracted from strain CA10 cells just after the starvation culture (Lane 1).

ることが明らかとなった。

3-3-4. *car* 遺伝子群周辺領域に見いだされた挿入配列 (IS) の解析

Table 3-4 に示したように、CA10 株の *car* 遺伝子群近傍領域に transposase と相同性を示す 4 つの ORF が見いだされた (ORF10、ORF25、ORF29、ORF38)。ORF10 の推定アミノ酸配列は、TnpA1 (*P. stutzeri* AN10) [Bosch et al., 1999a]、IS1384 の transposase (*P. putida* H) [accession number AF052751]、TnpA2 (*P. stutzeri* AN10) [Bosch et al., 1999b] とアミノ酸レベルでそれぞれ 96、96、94% の高い identity を示した。IS5 ファミリーに分類される transposase のアミノ酸配列を alignment したところ、N2、N3 及び C1 ドメインに存在する DDE 共通モチーフ [T(I/L)VDAT(I/L)X₇₆VXADAGYXTGX₅₂(K/R)X₄IEXXKAX(L/V)(R/K)] と、その Glu (E) 残基から 7 アミノ酸下流に存在する Arg (R) [あるいは Lys (K)] 残基 [Mahillon and Chandler 1998] がよく保存されていた (Fig. 3-6)。これらの結果より、ORF10 は IS5 ファミリーの IS5 サブグループに分類される transposase をコードしていると考えられ、*tnpA1* と命名した。ORF25 の推定アミノ酸配列は、CA10 株の TnpA1 (ORF10 にコード) と、塩基配列が 1 bp 異なっていることを除いては同一であることが明らかとなった。そこで ORF25 を *tnpA2* と命名した。一方、ORF29 の推定アミノ酸配列は、CA10 株の TnpA1 (ORF10 にコード) や TnpA2 (ORF25 にコード) とアミノ酸レベルでそれぞれ 96% の identity を示した。ORF29 の推定アミノ酸配列にも DDE 共通モチーフと、その E 残基から 7 アミノ酸下流に存在する Arg (R) [あるいは Lys (K)] 残基 [Mahillon and Chandler 1998] がよく保存されていたため (Fig. 3-6)、*tnpA3* と命名した。加えて、ORF38 の推定アミノ酸配列も CA10 株の TnpA1 (ORF10 にコード) や TnpA2 (ORF25 にコード) と同一であったため、*tnpA4* と命名した。

本研究で見いだされた transposase はどれも IS5 類縁の transposase と高い相同性を持っていた。IS はその塩基の長さ、transposase のアミノ酸配列の相同性、inverted repeats の類似性、insertion の標的部位の 4 点を考慮して各ファミリーに分類されるため [Mahillon et al., 1998]、これら 4 つの transposase をコードする遺伝子および周辺領域について alignment を行った。その結果、これら 4 つの transposase (TnpA1-TnpA4) は互いに非常に高い相同性を有しており (Table 3-6)、IS5 ファミリーに分類される transposase に見いだされる DDE 共通モチーフ [Mahillon and Chandler 1998] がよく保存されていた (Fig. 3-6)。ただし TnpA3 だけは、他の transposase と相同性が若干低いことも明らかとなった (Table 3-6)。また完全には一致していないものの、16 bp の inverted repeats (IRs) が確認され、それら IRs の外側には、IS5 ファミリーの挿入の target サイトと推定されている direct repeats (DRs)、“CTAG”あるいは“(C/T)TA(A/G)”が存在した (Fig 3-7)。ただし *tnpA1* の場合は上流と下流で direct

Table 3-6. Homologies among the ISs identified in the flanking region of *car* gene cluster.

	Length (bp)	Number of mismatch nucleotide with (% Identity with)			
		<i>IS5car1</i>	<i>IS5car2</i>	<i>IS5car3</i>	<i>IS5car4</i>
<i>IS5car1</i>	1,192	0 (100)	1 (99.9)	219 (81.6)	0 (100)
<i>IS5car2</i>	1,192		0 (100)	220 (81.5)	1 (99.9)
<i>IS5car3</i>	1,190			0 (100)	219 (81.6)

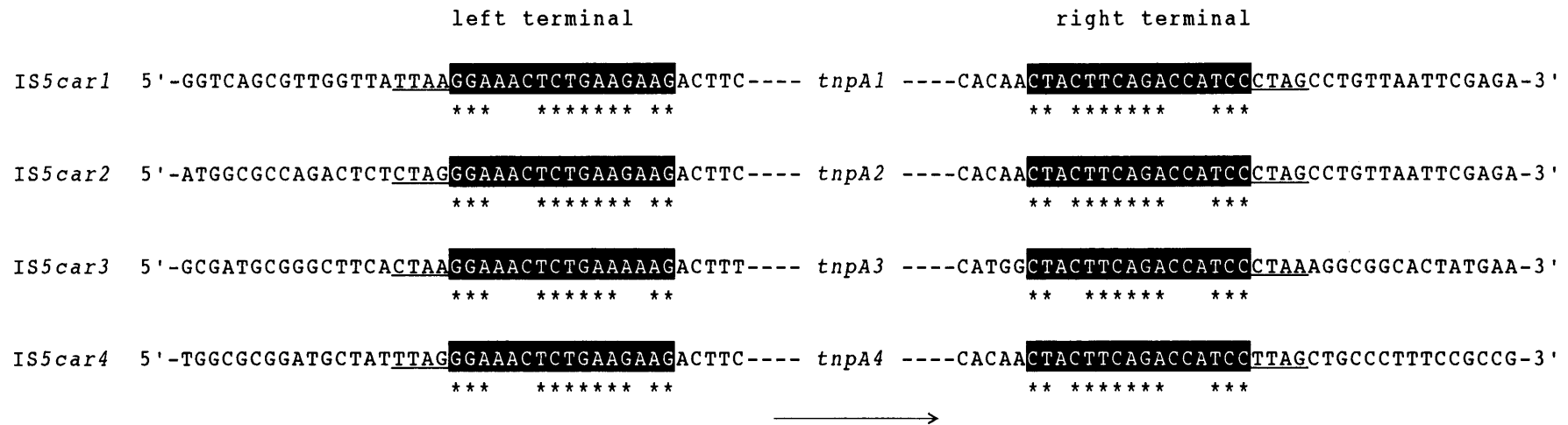


Fig. 3-7. Terminal regions of ISs identified from strain CA10 and their flanking sequences. The IRs and DRs are shown by reverse type and underline, respectively. The complementary nucleotides between the left and right IRs are shown by asterisks. The direction of transposase gene are shown by arrow.

repeats が保存されておらず、上流側が“TTAA”なのに対し下流側が“CTAG”であった (Fig 3- 7)。これらの結果から、*tnpA1*、*tnpA2*、*tnpA3*、*tnpA4* とそれら周辺の IS 様 DNA 領域を、それぞれ *IS5car1*、*IS5car2*、*IS5car3*、*IS5car4* と命名した。

また非常に興味深いことに、*IS5car2* と *antA* 遺伝子の 5'末端部分を含む 2,279- bp の DNA 領域が、*IS5car1* と ORF9 の 5'末端部分を含む 2,115- bp の DNA 領域と非常に似ていることも明らかとなった (Fig. 3- 8)。詳細に解析を行ったところ、*antA* 遺伝子 5'末端領域の 888- bp が、ORF9 の 5'末端領域 26- bp の DNA 領域とそれに続く 698- bp の DNA 領域に相当しており、ORF9 において、163- bp の DNA 領域と AT から G への replacement が起こったことが示された。加えて ORF9 の 3'側半分の領域は、*antA* 遺伝子と全く相同性を示さなかったことから、*IS5car2* と *antA* 遺伝子の 5'末端部分が transposition を起こすことにより、*IS5car1* と fusion gene である ORF9 を形成したことが強く示唆された。しかしながら、ORF9 の 5'側 698- bp DNA 領域の 3'末端には、transposition によって形成すると考えられる target site の複製は確認されなかった。

これまでの *car* 遺伝子群周辺領域に見いだされた IS の解析から、これら IS が *car* 遺伝子群や *ant* 遺伝子群の現在に至る構造形成の過程で重要な役割を果たしてきた可能性が示唆された。そこで CA10 株のゲノム中に *IS5car2* や *IS5car3* が他に何コピー存在しているのか調べる目的で、サザンハイブリダイゼーション解析を行った。*IS5car2* 中に存在する 332- bp の *PvuI-HindIII* 断片をプローブとし、CA10 株の total DNA に対してハイブリダイゼーションを行ったところ、*IS5car1*、*IS5car2*、*IS5car4* の DNA 領域に相当する 3 本のバンドを含め、4 つの陽性バンドが検出された (Fig. 3- 9A)。本実験はハイブリダイゼーション及び洗浄について非常に厳しい条件で行っており、若干相同性の低い *IS5car3* を含む DNA 領域は検出できないことから、*IS5car1*、*IS5car2*、*IS5car4* に加えて、少なくとももう 1 つはこれらとほぼ同様の IS が存在することが示された。同様に、*IS5car3* 中に存在する 880- bp の *PstI-DraI* 断片をプローブとし、CA10 株の total DNA に対してハイブリダイゼーションを行ったところ、1 つの陽性バンドしか検出されなかったことから (Fig. 3- 9B)、CA10 株は *IS5car3* に類似の IS をゲノム中に 1 コピーしか有していないことが明らかとなった。

さらに *antABC* 遺伝子群が *IS5car2* と *IS5car3* に挟まれた複合トランスポゾン様構造をとっていたことから (Fig. 3- 2)、トランスポゾン転移により CA10 株のゲノム中に複数コピー存在している可能性を考え、*antA* 遺伝子のほぼ全領域を含む 1,119- bp の *SmaI* 断片 (pBCA711 より作製) をプローブとし、CA10 株の total DNA に対してハイブリダイゼーションを行った。その結果、*antA* と ORF9 の DNA 領域に相当する 2 つの陽性バンドしか検出されなかったことから (Fig. 3- 9C)、CA10 株は *antA* 遺伝子をゲノム中に 1 コピーしか有していないと考えられた。

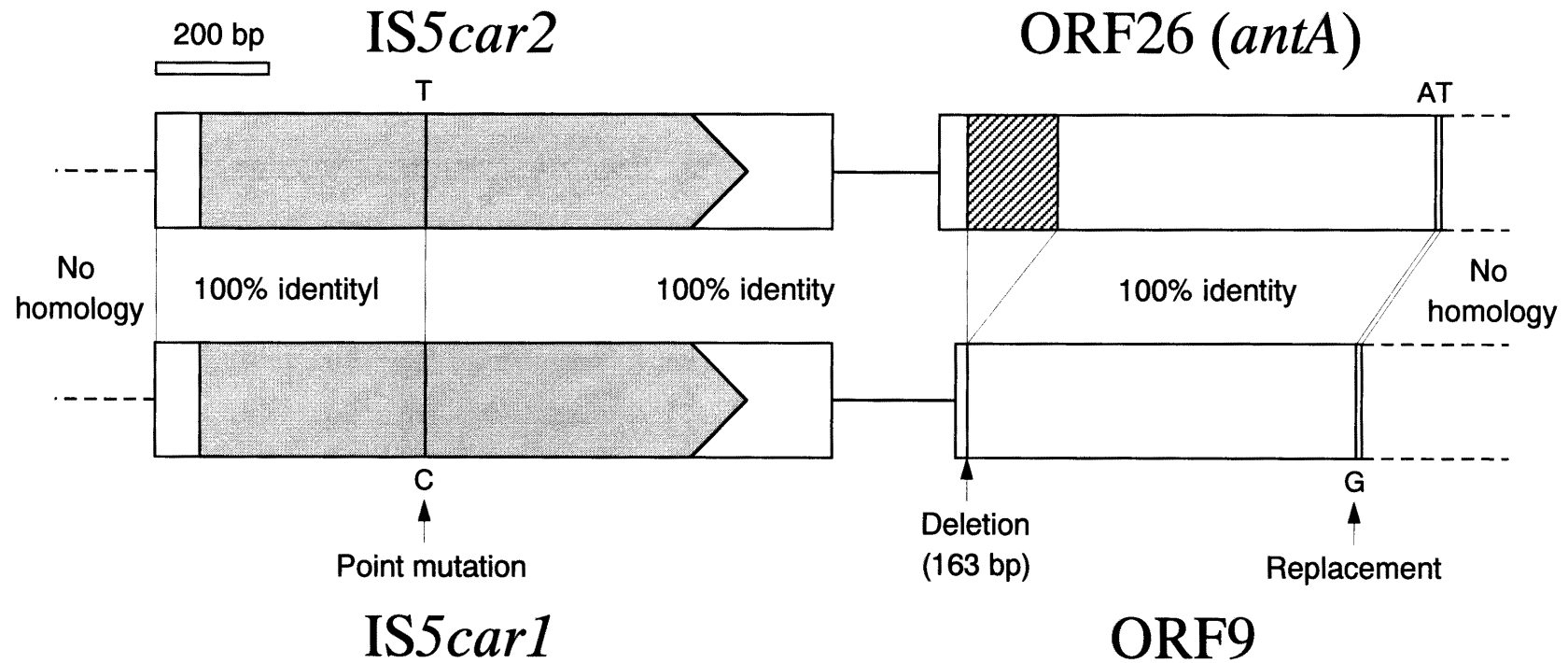


Fig. 3-8. Comparison of 2,279-bp-long DNA regions (8,878-6,600 in AB047548), containing *IS5car2* and 5'-portion of *anta* gene, with 2,115-bp-long DNA regions (25,306-27,420 in AB047548) containing *IS5car1* and 5'-portion of *ORF9*. Shaded pentagons represent the location, length, and direction of translation of transposase gene. Cross-hatching box represents the deleted region of *anta* gene in the nucleotide sequence of *ORF9*. Dotted lines represent the neighboring region of transposed DNA region.

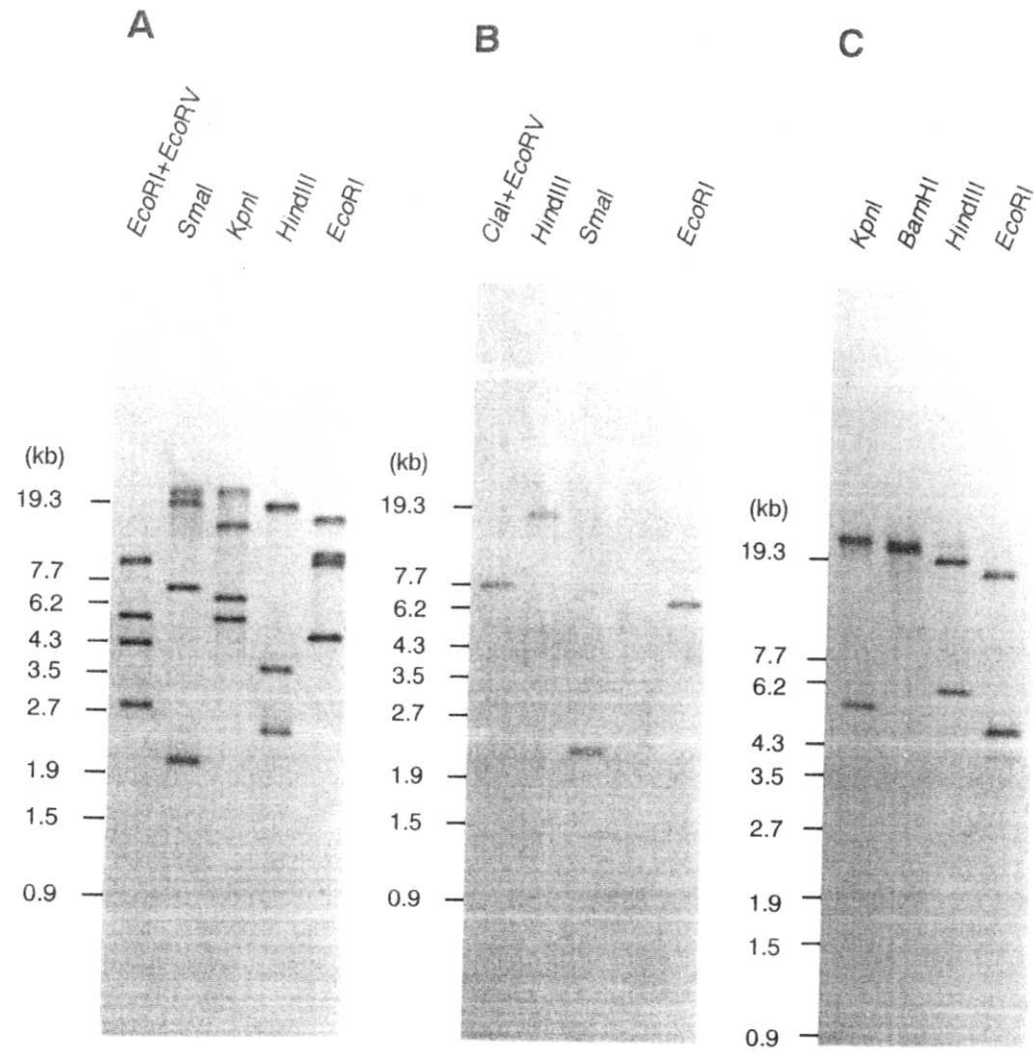


Fig. 3-9. Southern blot analyses using the 0.3-kb *PvuI-HindIII* fragment (*IS5car2*) of pBCA711 (A), the 0.9-kb *PstI-DraI* fragment (*IS5car3*) of pBCA731 (B), and the 1.1-kb *SmaI* fragment (*antA*) of pBCA711 (C) as probes. Restriction endonucleases used for digestion of total DNA of strain CA10 are shown in the panels.

3-3-5. その他 ORF の解析

(1) ORF11-12

ORF11、ORF12 の推定アミノ酸配列については、他に有意な相同性を示すタンパクは存在しなかった。しかしながら、ORF11 のほぼ全領域と ORF12 の 3'末端部分を含む 524-bp の DNA 領域（付図 2 24,440-24,963）は、ORF12 のほぼ全領域とその 5'側近傍を含む 527-bp の DNA 領域（付図 2 23,923-24,449）と 87%の高い identity を示すことが明らかとなった。これら 2つの DNA 領域は 10-bp の塩基配列 AAACCTGCTG によって重なっており、この配列は 2つの領域の両末端にも見出された。

(2) ORF17-21

ORF17、ORF18、ORF19 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、他の芳香族化合物分解系 multicomponent dioxygenase system の各コンポーネント reductase component、terminal oxygenase large subunit、small subunit と相同性を示した。ORF17 推定アミノ酸配列には、plant-type の [2Fe-2S]クラスターとの結合に関与する共通アミノ酸配列 $CX_4CX_2CX_{28}C$ [Otaka and Ooi 1989]が存在していた（付図 2）。また、ORF18 推定アミノ酸配列の N 末端には、Rieske-type の [2Fe-2S]クラスターとの結合に関与するアミノ酸配列 $CXHX_{16-17}CXXH$ [Rieske et al., 1964]や、反応に直接関与すると考えられる二価鉄イオンの結合領域と考えられる配列 [Jiang et al., 1996]が存在していた (Fig. 3-4)。これらの結果より、ORF17、ORF18、ORF19 にコードされるタンパク質は、Class IA [Batie et al., 1991]に属する multicomponent dioxygenase の各コンポーネントと推測された。一方、ORF20 と ORF21 は、それぞれ short-chain alcohol dehydrogenase と dienolacton hydrolase と相同性を示した (Table 3-4)。現在のところ、これら ORF がどんな基質の分解に関与する酵素遺伝子群であるのかは不明である。

(3) ORF22-24 及び ORF30-31

ORF22 と ORF23 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、AraC/XylS ファミリー [Gallegos et al., 1997] と呼ばれる一群の転写制御タンパクと相同性を示した (Table 3-4)。AraC/XylS ファミリーの転写制御タンパクのアミノ酸配列で、特によく保存されている 17 個のアミノ酸残基（ただし、AraC/XylS ファミリーの転写制御タンパクにおいて 17 個全てが保存されているものではない）のうち [Gallegos et al., 1997]、それぞれ 11 アミノ酸残基と 13 アミノ酸残基が ORF22 と ORF23 においても保存されていた（付図 2）。

一方、ORF24、ORF30、ORF31 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS

PROT protein database より検索した結果、外膜上の channel forming protein、ABC transporter substrate binding protein、ABC transporter membrane spanning protein とそれぞれ相同性を示した (Table 3-4)。これら相同性検索の結果から、各 ORF が有機化合物を細胞内に輸送するために機能していると推測されるが、詳細については現在のところ不明である。

(4)ORF39

ORF39 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、YkoW (*Bacillus cereus* ATCC14579) [Okstad et al., 1999] や hypothetical protein slr1305 (*Synechocystis* sp. PCC6803) [accession number S76238] の 3'末端領域 (約 300 アミノ酸残基) と 36-39%の identity を示した。なおこれら 2 つのタンパク質は、それぞれ 840 と 892 アミノ酸残基から構成されている。

3-3-6. Catechol 代謝に関与する遺伝子群 (*cat* 遺伝子群) の単離と解析

CA10 株 total DNA のコスミドライブラリーを作製し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した *catRB* 遺伝子を含む pTE11 [Kimura et al., 1996] の 1.1-kb *Sa*I 断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果、5 個の陽性クローン (pSCos801-805) が得られたため、ハイブリダイゼーション解析とともに制限酵素地図の作製を行った。さらにサブクローンとして pUCA811 と pBCA821 を作製し、8,918-bp の領域に関して塩基配列を決定しコンピュータ解析を行ったところ、8 個の ORF (ORF_{cat}1-ORF_{cat}8 と命名) が認められた (Fig. 3-10) (決定した塩基配列と 8 個の ORF の推定アミノ酸配列及び推定 SD 配列 [Shine and Dalgarno 1975] を付図 3 [論文の末尾に添付] に示した)。この DNA 領域の GC 含量は 66.4% であり、CA10 株の total DNA の GC 含量の値 61.9% [Ouchiyama et al., 1993] と比較的近い値を示した。各 ORF の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果を Table 3-7 に要約した。

(1)ORF_{cat}1-4

ORF_{cat}1、ORF_{cat}2、ORF_{cat}3、ORF_{cat}4 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、*Pseudomonas* 属細菌で同定されている *cis,cis*-muconate cycloisomerase、muconolactone- δ -isomerase、*cat* オペロンの転写制御タンパク、catechol 1,2-dioxygenase とそれぞれ高い相同性を示した (Table 3-7)。ORF_{cat}1 推定アミノ酸には、Mn の配位に関与する Asp (D) 及び Glu (E) 残基と、酵素活性に直接関与する Lys (K) 及び Glu (E) 残基 [Gerlt and Gassman, 1992; Hoier et al., 1994; Helin et al., 1995] が確認された (付図 3)。また ORF_{cat}2 推定アミノ酸には、活

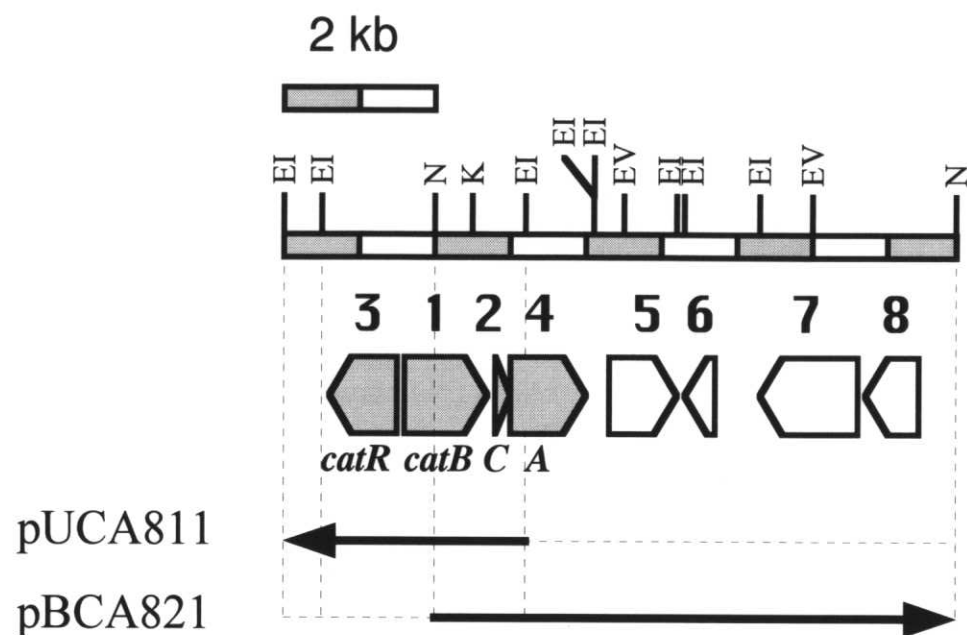


Fig. 3-10. Physical map of the 8.9-kb *EcoRI-NotI* DNA region containing *catRBCA* genes. The pentagons and triangles in the physical map indicate the size, location and the direction of transcription of the ORFs derived from the DNA sequence analysis. The shaded pentagons and triangles represent the *cat* gene. The location of the subcloned DNA fragments and orientation of the transcription from *lac* promoter of cloning vector are indicated by the length and the direction of the arrows, respectively. Only restriction sites of relevant enzymes are shown. Restriction site designations are: EI, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; K, *KpnI*; N, *NotI*.

Table 3-7. Genes isolated in *cat* gene cluster and its flanking region.

ORFs (Gene name)	Position in accession no. AB047272	Probable function	Calculated G+C molecular content mass (Da) (%)	Identity (%)	Homology		accession no.	
					Name of protein	Source		
ORF _{cat1} (<i>catB</i>)	1,612-2,733	<i>cis,cis</i> -Muconate cycloisomerase	40,193	66.8	85	CatB	<i>P. putida</i> strain RB1	P08310
					84	CatB	<i>P. putida</i> strain PRS2000	U12557
ORF _{cat2} (<i>catC</i>)	2,750-3,040	Muconolactone δ -isomerase	11,285	62.2	92	CatC	<i>P. putida</i> strain mt-2	D50858
					89	CatC	<i>P. putida</i> strain RB1	P00948
ORF _{cat3} (<i>catR</i>)	1,475-594	Positive regulator of <i>cat</i> operon	31,985	68.1	70	CatR	<i>P. putida</i> strain PRS2000	U12557
					69	CatR	<i>P. putida</i> strain RB1	P20667
ORF _{cat4} (<i>catA</i>)	3,080-4,009	Catechol 1,2-dioxygenase	33,946	65.4	70	CatA	<i>P. putida</i> strain mt-2	S66469
					69	CatA	<i>P. arvilla</i> strain C-1	S66468
ORF _{cat5}	4,311-5,180	Unknown	31,612	70.8	35	Hypothetical protein	<i>Deinococcus radiodurans</i> strain R1	H75588
					22 ^a	Probable lipase	<i>Deinococcus radiodurans</i> strain R1	C75472
ORF _{cat6}	5,748-5,299	Unknown	16,088	67.1	36 ^b	PilJ	<i>P. aeruginosa</i> strain PAO1	AE004478
					36 ^b	MCP	<i>Pyrococcus horikoshii</i> strain OT3	AP000007
ORF _{cat7}	7,584-6,331	Channel-forming protein	45,930	65.9	61	BenF	<i>P. putida</i>	AF218267
					40	PhaK	<i>P. putida</i> strain DOT-T1E	AF031417
ORF _{cat8}	8,401-7,712	ABC transporter subunit	25,212	66.4	51	ORFL protein	<i>Alcaligenes eutrophus</i> strain NH9	D64144
					51	OhbG	<i>P. aeruginosa</i> strain JB2	AF087482

^a Homology was observed only in about 290 amino acids in C-terminus of probable lipase identified from *Deinococcus radiodurans* strain R1.

^b Homology was observed only in about 150 amino acids in C-terminus of MCP, PilJ.

性中心を構成するアミノ酸残基 [Katti et al., 1989] が保存されており、ORF_{cat}4 推定アミノ酸には、Fe との結合に関与すると報告されている His (H) 及び Tyr (Y) 残基 [Hartnett et al., 1990; Lipscomb and Orville 1992] が保存されていた (付図 3)。これらの結果より、ORF_{cat}1、ORF_{cat}2、ORF_{cat}3、ORF_{cat}4 はそれぞれ catechol の代謝に関与する一連の酵素群をコードしていると考えられたため、それぞれ *catB*、*catC*、*catR*、*catA* と命名した。

(2) ORF_{cat}5-8

ORF_{cat}7 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、BenF (*P. putida*) [accession number AF218267] と PhaK-like protein (*P. putida* DOT-T1E) [Ramos et al., 1998] にそれぞれ、61%、40%の identity を示した。BenF や PhaK-like protein の機能については報告がないものの、*P. putida* U 株で同定された PhaK については、外膜の外からペリプラズム領域への phenylacetic acid の輸送に関与する外膜タンパクであると報告されている [Olivera et al., 1998]。この結果から、ORF_{cat}7 は芳香族化合物の輸送に関わる channel-forming protein である可能性が示唆された。また、ORF_{cat}8 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、ABC transporter subunit protein と相同性を示した (Table 3-7)。詳細なデータは示さないが、ORF_{cat}8 のさらに下流域にも ORF の 3'末端と思われる領域が確認されており、これが ABC-transporter ATP-binding protein と相同性を示すことから、ORF_{cat}7 の下流域からは一連の ABC transporter をコードする遺伝子群が存在するものと推測された。

一方、ORF_{cat}5 の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS PROT protein database より検索した結果、*Deinococcus radiodurans* R1 株の hypothetical protein [White et al., 1999] の C 末端領域と 35%の最も高い identity を示した他、各種 lipases や esterases と 15-22%程度の identity を示した。ORF_{cat}6 の推定アミノ酸配列については、methyl-accepting chemotaxis proteins (MCP) [Kawarabayashi et al., 1998] の 3'末端領域と相同性を示した (Table 3-7)。これら ORF の機能については、現在のところ不明である。

3-3-7. *car* 遺伝子群、*cat* 遺伝子群及び IS の局在性

CA10 株を溶菌して抽出した DNA 溶液を電気泳動に供したところ、約 50 kb と 166 kb よりも大きなサイズに相当する位置の 2カ所にそれぞれバンドが確認された (Fig. 3-11A)。CA10 株の 16S-rDNA (塩基配列を付図 4 に示す) をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、Fig. 3-11B に示したように下側のバンドとハイブリダイズしたことから、約 50 kb に相当するバンドが chromosome であることが

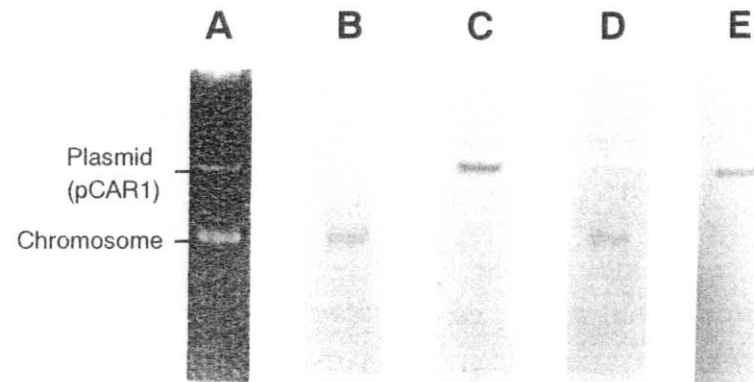


Fig. 3-11. Southern hybridization analysis of chromosome and plasmid detected in strain CA10 cell using the 16S rRNA gene (*EcoRI-PstI* fragment of pTCA16S) (B), *car* gene (*EcoRI* insert of pUCA1) (C), *cat* gene (*SalI* fragment of pTE11) (D), and *tnpA2* gene (*PvuI-HindIII* fragment in IS5*car2*) (E) as probes. Photograph of ethidium bromide-stained agarose gel is shown in A.

明らかとなった。次に、*car* 遺伝子群を含む 6.9- kb *EcoRI* 断片をプローブとして用いたところ、chromosome ではない上側のバンドとハイブリダイズしたことから (Fig. 3- 11C)、CA10 株における CAR 分解に必須な *car* 遺伝子群と *ant* 遺伝子群はこのメガプラスミド上にコードされていることが示された。そこで、このメガプラスミドを pCAR1 と命名した。

一方、*catRB* 遺伝子を含む 1.1- kb *Sall* 断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、chromosome とハイブリダイズしたことから (Fig. 3- 11D)、CA10 株の CAR 分解に関与する *cat* 遺伝子群も、他のカテコール分解菌の *cat* 遺伝子群と同様に chromosome 上に位置していることが明らかとなった。

さらに、4つの相同性の高い IS が *car* 遺伝子群や *ant* 遺伝子群の周辺領域に見いだされ、サザンハイブリダイゼーションの結果から IS5*car1*、IS5*car2*、IS5*car4* とほぼ同一の IS がもう 1 コピー存在することが確認されていた (Fig. 3- 9A)。そこで、この 4 番目の IS が pCAR1 上にあるのか chromosome 上にあるのか明らかにする目的で、IS5*car2* 内部の *PvuI*-*HindIII* 断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。Fig. 3- 11E に示すように、chromosome ではなく明らかに pCAR1 に陽性バンドが確認されたことから、これら関連する全ての IS が pCAR1 上に存在することが明らかとなった。

3-4. 考察

本章では、既に解析が行われている CAR の初発酸化酵素 CarAaAcAd、メタ開裂酵素 CarBaBb、加水分解酵素 CarC の反応によって生成する HPD と AN の分解代謝系酵素遺伝子群の塩基配列決定と機能解析を行った。

相同配列の検索、SDS-PAGE 解析及び酵素活性測定の結果から、メタ開裂経路によく見られる HPD を TCA サイクルの中間体まで代謝する一連の酵素遺伝子群が、*carAd* 遺伝子の下流域に存在することが明らかとなった。この結果、CAR を HPD と AN へ、さらに HPD を TCA サイクル中間体へと代謝する *car* 遺伝子群が 13 遺伝子 (*carAaAaBaBbCAcORF7AdDORF33ORF34FE*) から成ることが分かった。Biphenyl [Kikuchi et al., 1994; Hofer et al., 1994]、toluene [Harayama and Rekik, 1993; Lau et al., 1994]、isopropylbenzene [Habe et al., 1996]、phenol [Shingler et al., 1992]、naphthalene [Bosch et al., 2000] の様な他の芳香族化合物分解系遺伝子群では、一般に、メタ開裂経路の酵素群を構成する hydratase、acetaldehyde dehydrogenase (acylating)、aldolase をコードする遺伝子は、この順番にタンデムに並んで存在する場合が多い。しかしながら、CA10 株の *car* 遺伝子群においては、*carD* 遺伝子と *carF* 遺伝子の間に機能未知の ORF33 と ORF34 が挿入されていた。このようにメタ開裂経路の酵素遺伝子群が通常とは異なる遺伝子構造をとる例は、これまでに 2 例しか知られていない。Biphenyl 分解菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 株の *bph* オペロンにおいては、メタ開裂酵素 (EtbC)、加水分解酵素 (BphD)、hydratase (BphE)、aldolase (BphF) をコードする遺伝子群が *etbCbphDEF* オペロンを形成しているが、acetaldehyde dehydrogenase (acylating) をコードする *bphG* 遺伝子はその周辺領域に存在していないことが明らかとなっている [Masai et al., 1997]。また、3- (3-hydroxyphenyl)propionic acid 分解菌 *Comamonas testosteroni* TA441 株の *mhp* オペロンにおいては、機能未知の 2 つの ORF (ORF4 と ORF5) が *mhpD* 遺伝子と *mhpF* 遺伝子の間に挿入されていた [Arai et al., 1999]。これら ORF4 及び ORF5 と相同性の高い遺伝子が同じ TA441 株の chlorocatechol 分解系遺伝子群や poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) 生合成遺伝子群の中に見いだされることから、ORF4 と ORF5 の遺伝子産物が何らかの機能を持つ可能性が示唆されるが、これら ORF の遺伝子破壊を行った結果、3- (3-hydroxyphenyl)propionic acid 分解活性には何ら影響を及ぼさないことが確認されている [Arai et al., 1999]。

本研究で見いだされた CA10 株の CarF と CarE は、*C. testosteroni* TA441 株 [Arai et al., 1999] や *E. coli* K-12 株 [accession number AE000142] 由来の MhpF 及び MhpE と 67-83% の非常に高い identity を示しているのに対し、CarD は MhpD と 40-45% 程度の identity しか示さなかった。また、*carD* 遺伝子と *carE* 遺伝子の間に挿入されている ORF33 と ORF34 は、*C. testosteroni* TA441 株の *mhpD* 遺伝子と *mhpE* 遺伝子の間に挿入されている ORF4 及び ORF5 と相同性を示さないことも明らかとなった。

carAaAaBaBbCAcORF7AdD 遺伝子群と *mhp* 遺伝子群が、相同性のない全く異なる遺伝子群であることを考えると、*carFE* 遺伝子は gene shuffling などにより後から挿入され、現在の *car* 遺伝子群を形成している可能性が強く示唆された。詳細な説明は割愛するが、*carFE* 遺伝子が *carAaBaBbCAcAdD* 遺伝子群とクラスターを成していない新規 CAR 資化菌 *Agrobacterium* sp. J3 株が既に取得・解析されている事実や [中井, 2001] CA10 株において *carFE* 遺伝子が、*carAaAaBaBbCAcORF7AdD* 遺伝子群とは異なる mRNA として転写されている事実 [野尻ら, 2000]も、この仮説を強く指示するものと考えられる。

また、相同配列の検索及びサザンハイブリダイゼーション解析の結果から、AN を CAT へと変換する *ant* 遺伝子群が、*carAa* 遺伝子上流約 21 kb の位置に 1 コピーのみ存在することが明らかとなった。現在のところ、大腸菌内で *antABC* 遺伝子の発現や活性を確認することに成功していないが、ノーザンハイブリダイゼーション解析の結果、CAR で生育させた CA10 株において明らかに *antABC* 遺伝子の転写産物が確認されることから (Fig. 3-5)、AntABC が CA10 株の CAR 代謝において、AN から CAT への反応に関与しているものと強く推測された。さらに機能解析は全く行っていないものの、相同配列の検索結果から、CA10 株には CAT をオルト開裂経路により TCA サイクル中間体まで代謝する *cat* 遺伝子群も存在することが明らかとなった。これまでに何種類かの CAR 資化菌が単離され、代謝経路や代謝系酵素・遺伝子について研究が行われているが [Bressler et al., 2000]、CAR 分解に関与する全ての酵素遺伝子群を明らかにしたのは、本研究が初めてである (Fig. 3-12)。

さらに相同配列の検索結果より、*car* 遺伝子群と *ant* 遺伝子群の間の領域に、様々な機能を持つと推測される複数の ORF の存在を明らかにした。これら ORF のうち、有機化合物の細胞内への輸送に関与すると推測される ORF24、ORF30 及び ORF31 や、芳香族化合物分解系の AraC/XylS ファミリー転写制御タンパクと推測される ORF22 と ORF23 については今後遺伝子破壊などを行い、CA10 株の CAR 分解系に必須な遺伝子であるのかを明らかにしていく必要がある。

一方、我々は *car* 遺伝子群と *ant* 遺伝子群の全遺伝子構造を明らかにしていく過程で、先に述べた *carFE* 遺伝子が gene shuffling などにより後から挿入されたと推測した以外にも、*car* 遺伝子群が現在のユニークな遺伝子構造を形成するに至った遺伝子再構成の痕跡をいくつか見出すことができた。その結果を Fig. 3-13 に要約した。

1 番目に、*antABC* 遺伝子群を含む IS5*car2* と IS5*car3* に挟まれた領域が複合トランスポゾン様の構造をとっており、transposition によって現在の ORF30 と ORF24 の間に転移してきたことが推測された。IS5 サブグループにおいては、挿入に伴って標的配列[(C/ T)TA(G/ A)]の 4 塩基もしくは中央の TA のみが duplicate されることが知られている。IS5*car2* と IS5*car3* のボーダー領域に見られる direct repeat は互いに一致して

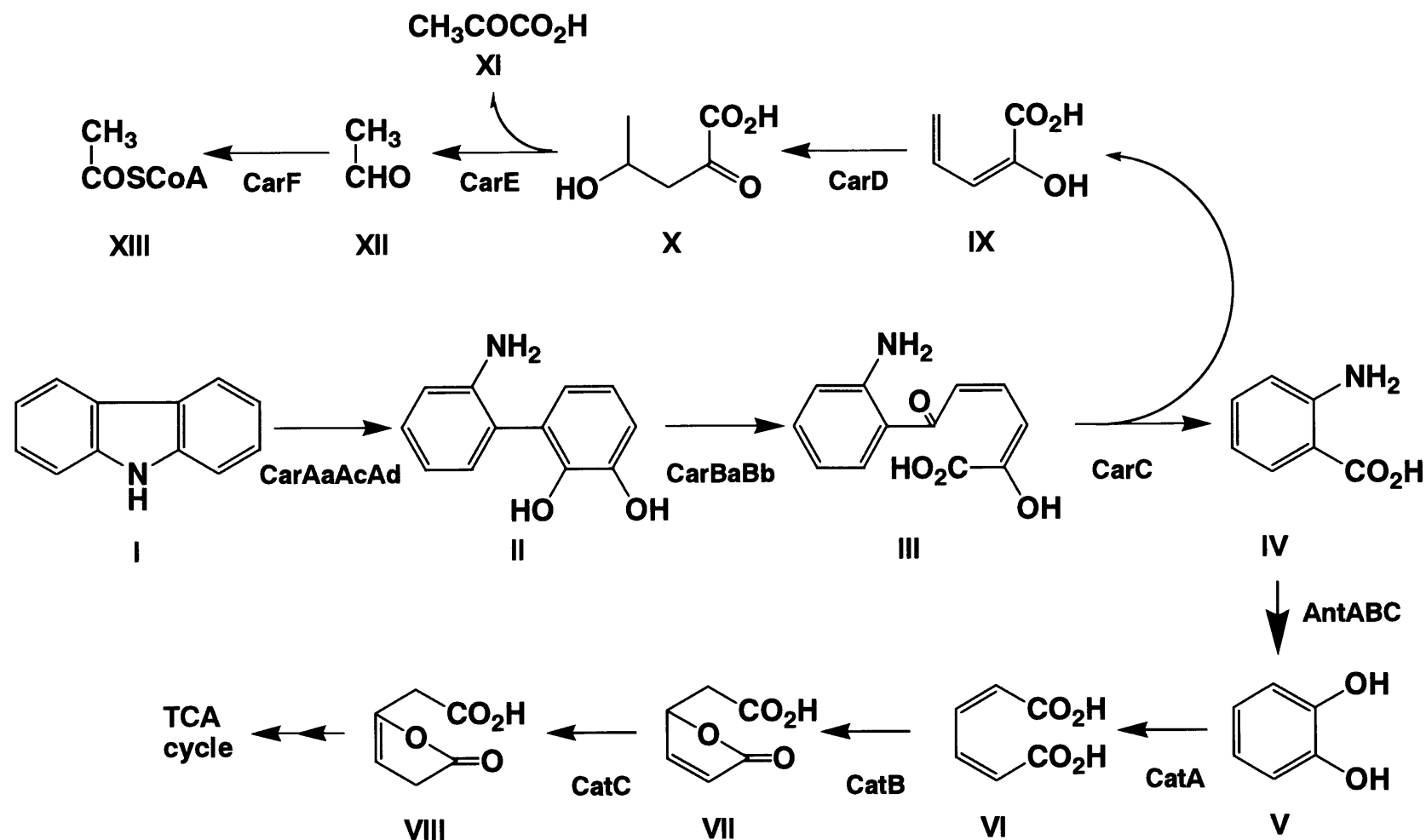


Fig. 3-12. Degradation pathway of carbazole in *Pseudomonas* sp. strain CA10. Enzyme designations: CarAaAcAd, carbazole 1,9a-dioxygenase; CarBaBb, 2'-aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase; CarC, 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)-hexa-2,4-dienoic acid (*meta*-cleavage compound) hydrolase; CarD, 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase; CarE, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase; CarF, acetaldehyde dehydrogenase (acylating); AntABC, anthranilate 1,2-dioxygenase; CatA, catechol 1,2-dioxygenase; CatB, *cis,cis*-muconate lactonizing enzyme; CatC, muconolactone δ -isomerase. Compounds: I, carbazole; II, 2'-aminobiphenyl-2,3-diol; III, 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)-hexa-2,4-dienoic acid (*meta*-cleavage compound, HOADA); IV, anthranilic acid; V, catechol; VI, *cis,cis*-muconic acid; VII, muconolactone; VIII, β -keto adipic acid enol-lactone; IX, 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid; X, 4-hydroxy-2-oxovaleric acid; XI, pyruvic acid; XII, acetaldehyde; XIII, acetyl-CoA.

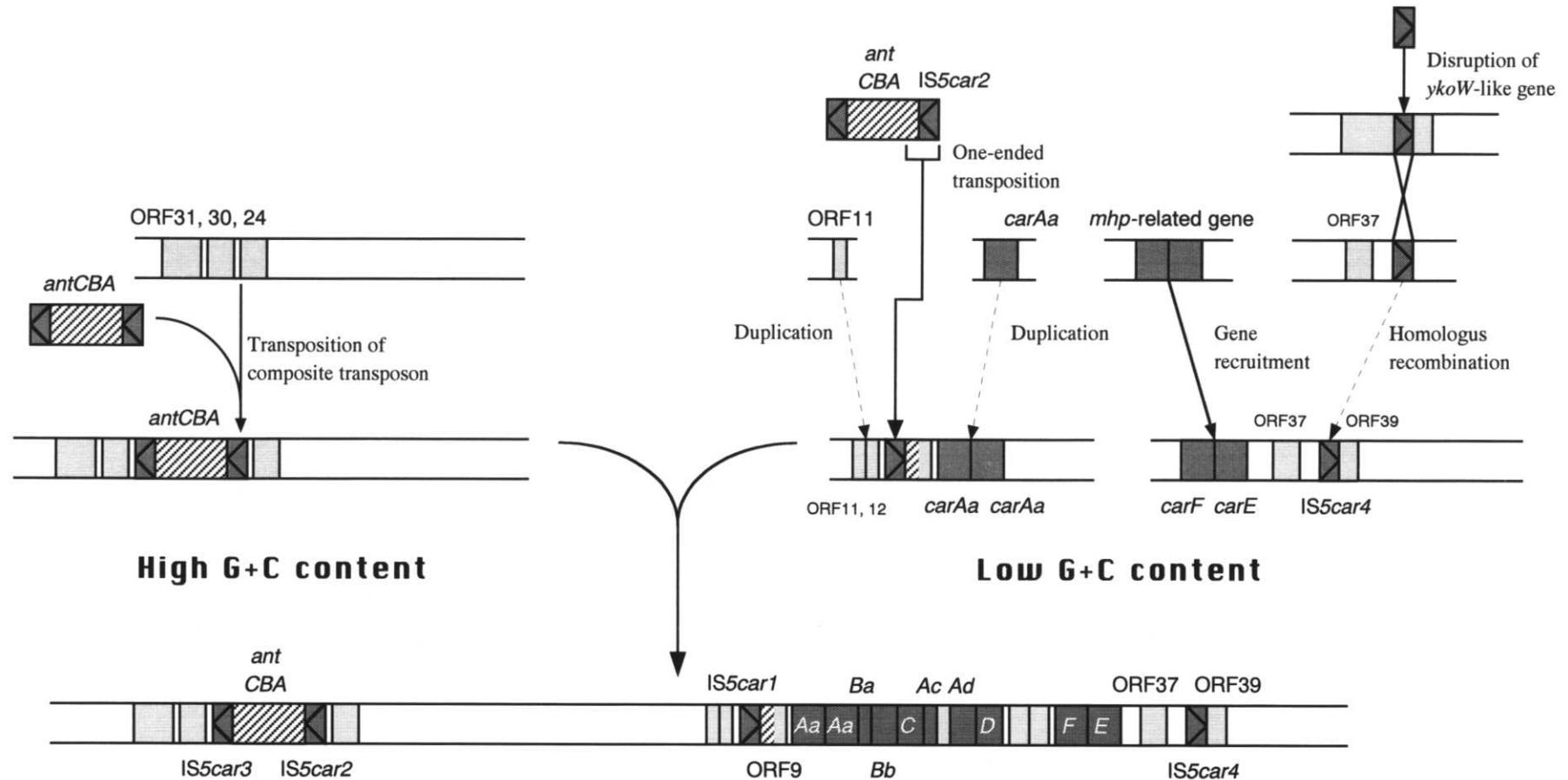


Fig. 3-13. Proposed model of the developmental process of novel structure in the *car* gene cluster and its flanking region. Shaded boxes represent the *car* genes and several neighboring ORFs. Shaded box with triangle indicates the ISs. Striped boxes represent the *ant* genes or the transposed DNA region from *antA* gene within ORF9. The arrows with solid line indicate the transposition (recombination). The arrows with broken line indicate the duplication or homologous recombination.

はいないものの、中央の TA については両 direct repeat 間で保存されていた (Fig. 3-7)。また、CA10 株の *cat* 遺伝子群の解析においても見られたように、有機化合物の細胞内への取り込みに関与するタンパクをコードする遺伝子群はクラスターをなして存在している例が多い。Channel-forming protein と推測される ORF24 と ABC transporter subunit と推測される ORF30 が、この複合トランスポゾンによって分断されていることを考えても、この遺伝子領域が複合トランスポゾンの transposition によって形成された可能性が高いと思われる。

2 番目に、ORF9 は 5'末端部分のみが *antA* 遺伝子と相同性を示す fusion gene であり、IS5*car2* とそれに続いて存在する *antA* 遺伝子の 5'末端部分 (888- bp) の transposition によって、IS5*car1* とそれに続く ORF9 の 5'末端部分 (698- bp) が形成されたものと推測された (Fig. 3-8)。このような transposition の様式は "one-ended transposition" と呼ばれ、片側の IR が欠失した Tn3、Tn21、Tn1721 において報告されている [Arthur et al., 1984; Avila et al., 1984; Möstsh and Schmitt 1984]。また、monobromoacetate 資化菌 *Xanthobacter autorophicus* GJ10 株に見いだされた IS1247 も、その直下流に存在する *dhIB* 遺伝子のみを伴って転移することが報告されている [van der Ploeg et al., 1995]。しかし、IS1247 とそれに続く *dhIB* 遺伝子の transposition の場合と比べ、IS5*car1* と続く ORF9 の 5'末端部分を含む DNA 領域の末端部分に標的配列 [(C/ T)TA(G/ A)] の 4 塩基もしくは中央の TA の duplication が確認されなかった。またこの ORF9 5'末端領域において、*antA* 遺伝子には存在した 163- bp 領域の欠失と AT から G への replacement が確認されたが (Fig. 3-8)、このような欠失が one-ended transposition と関連するのかについても大変興味深い。

加えて、この IS5*car2* の one-ended transposition により IS5*car1* が形成された結果、全 *car* 遺伝子群を含む IS5*car1* と IS5*car4* に挟まれた領域が複合トランスポゾン様の構造をとることになる。*carAaAcAd* 遺伝子にコードされる CARDO が塩素化ダイオキシンの骨格を破壊できることを考えると、この複合トランスポゾンが他の領域にも転移してダイオキシン分解能が増強されるのかなどについても興味もたれる。

3 番目に、ORF11 と ORF12 の周辺領域で遺伝子の duplication が起こったことが推測された (Fig. 3-13)。これら duplication が起こったと推測される DNA 領域の両端には、10- bp の DR (AAACCTGCTG) が確認され、527- bp DNA 領域 (ORF12 側) の 3'末端に存在する DR と 524- bp DNA 領域 (ORF11 側) の 5'末端に存在する DR がオーバーラップすることも明らかとなった (付図 2)。これら DR は 10- bp の長さしかないが、相同組換えが起こった痕跡と考えられる。

一方、序章でも述べたように *carAa* 遺伝子を含む 1,263- bp の DNA 領域が、3 塩基 (GGC) を挟んでタンデムに duplication していることが明らかとなっている [Sato et al., 1997a] (Fig. 1-6)。この 527- bp DNA 領域と 524- bp DNA 領域の相同性が 87%で

あったのに対し、*carAa* を含む2つの DNA 領域は1塩基を除いて全く一緒であった。これら duplication した DNA 領域同士で塩基配列が保存されている程度が異なっているが、これは CA10 株が CAR を唯一の炭素源、窒素源、エネルギー源として生育するのに2コピーの *carAa* 遺伝子が必須であることから、*carAa* においては点変異の蓄積が少ないことも考えられる。

4番目に、元来 *Bacillus cereus* の *ykoW* [Okstad et al., 1999] 様遺伝子内に挿入されたと考えられる IS と元々 ORF37 の下流に存在していた IS との間で相同組換えが起こり、現在の IS5*car4* が形成されたことが推測された (Fig. 3-12)。

ORF39 の推定アミノ酸残基は 276 残基であるが、相同性を示したタンパク質は 730 残基 (slr1305) や 1,580 残基 (YkoW) ともっと大きなタンパクであること、これらのタンパクと相同性を示す領域が ORF39 の推定開始コドンからさらに IS5*car4* 末端のボーダー領域まで続いていることなどを考えると、かつて CA10 株内に存在した intact な *ykoW* 様遺伝子が、IS などの transposition により分断されたことが示唆された。しかしながら、IS5*car4* 末端の直下流に、IS の挿入によって分断されたと推定される *ykoW* 様遺伝子 (ORF39) は存在したが、逆に分断された *ykoW* 様遺伝子の 5'側領域は、これまで確認されたいずれの IS の近傍にも存在していなかった。これらのことを考えると、*ykoW* 様遺伝子内に挿入されたと考えられる IS と元々 ORF37 の下流に存在していた IS との間で相同組換えが起こった結果、現在の IS5*car4* 下流域の遺伝子構造が形成された可能性が高く、この仮説はサザンハイブリダイゼーション解析の結果 pCAR1 上に4番目の IS5*car1* 様遺伝子が存在する事実 (Fig. 3-9A, Fig. 3-11E) からも支持される。この未同定の IS の直上流に、分断された *ykoW* 様遺伝子の 5'側領域が存在する可能性が高いと考えられる。

car 遺伝子群及び *ant* 遺伝子群の周辺領域に存在した IS と高い相同性を示す IS は、*P. putida* の plasmid pPGH1 上に存在する IS1384 [accession number AF052751] や、*P. stutzeri* AN10 株の naphthalene 分解系遺伝子群の周辺領域 [Bosch et al., 1999ab, 2000] において確認されている。さらに、AN10 株で見出された IS 様配列と相同性の高い DNA 領域が、他の芳香族化合物分解能を持つ pseudomonads に存在しているという報告 [Bosch et al., 1999a,b, 2000] を考えると、IS5*car1* や IS5*car3* と類似の IS は、pseudomonads やその近縁種に広く存在しており、先に述べたような分解系遺伝子群の伝播や構造の再編に寄与しているものと推測される。

5番目に、DNA 領域の GC 含量の違いから、ORF13 あるいはその周辺で gene fusion が起こったことが推測された。CA10 株の total DNA の GC 含量は 61.9% [Ouchiyama et al., 1993] であるのに対し、*carAaAaBaBbCAcORF7Ad* 遺伝子群の GC 含量は 48.0-53.3%、ORF9 の 3'末端及び ORF11-12 の GC 含量は 49.2-50.7%、IS5*car4* より下流の遺伝子領域 (ORF39-40) の GC 含量も 38.5-52.3%と GC 含量が低いことが明らか

になった (Table 3-4)。一方で、*antA* 遺伝子と相同性を示す ORF9 の 5'末端領域や ORF13 よりも上流域に関しては、IS を除いて、CA10 株の total DNA の GC 含量と同等あるいはそれより高い GC 含量の値を示した (Table 3-4)。これらの結果を考えると、中間的な GC 含量 (55.0%) を示す ORF13 あるいはその周辺で gene fusion が起こったことが推測されるが、そのメカニズムに関する情報を得るためには、さらに ORF40 下流域などについても詳細な遺伝子解析が必要となるであろう。

car 遺伝子群及び *ant* 遺伝子群がメガプラスミド pCAR1 上に、*cat* 遺伝子群が CA10 株の chromosome 上にコードされている事実 (Fig. 3-11) を考えると、CA10 株が pCAR1 を獲得したことにより、効率良く CAR を代謝できるようになったとも考えられた。現在までに我々は、新たに複数の CAR 資化菌を解析し、CA10 株の *car* 遺伝子群と類似の遺伝子群を chromosome 上に保持する菌や、pCAR1 と類似のメガプラスミド上に保持する菌などを多数単離している [Widada, 2000]。このように pCAR1 と類似のメガプラスミドを保持する CAR 資化菌が存在することは、pCAR1 が自然環境中で CAR 分解能の伝播に重要な役割を果たしていることを示唆している。一方、*car* 遺伝子群と類似の遺伝子群を chromosome 上に保持する菌が存在したことは、pCAR1 やその派生プラスミドが、chromosome など異なるレプリコン間で integration/ excision を行うタイプの伝達性プラスミド [Ka and Tiedje, 1994] である可能性を示している。実際、chromosome 上に 2 コピーの *car* 遺伝子群を保持する *Pseudomonas* sp. K23 株を供与菌、CAR 資化能のない *Pseudomonas* sp. DS1 株を受容菌として接合を行うと、*car* 遺伝子が転移し、形質転換株では pCAR1 と同様な大きさのメガプラスミドとして存在していることが示されている [羽部ら, 2001a]。今後は、pCAR1 の全塩基配列 (約 190- kb と推定) を決定するなど詳細な解析を行っていくことで、メガプラスミド内で遺伝子構造が変化した痕跡や、メガプラスミドの伝播・転移、組換えに関与する因子などが明らかになっていくものと期待される。