

Sphingomonas paucimobilis の γ -HCH 分解関与
酵素群とそれらの遺伝子に関する研究

Studies on enzymes and genes for γ -HCH degradation
in *Sphingomonas paucimobilis*

永 田 裕 二

1995年(平成7年)

Sphingomonas paucimobilis の γ -HCH 分解関与
酵素群とそれらの遺伝子に関する研究

Studies on enzymes and genes for γ -HCH degradation
in *Sphingomonas paucimobilis*

永 田 裕 二

1995年(平成7年)

目次

目次	1
略称	6
序章	7
第1章 トランスポゾン Tn5 による γ -HCH dehydrochlorinase (LinA) 活性	
欠失変異株の分離とその性質	19
1-1. 緒言	19
1-2. 材料および方法	20
(1) 菌株・プラスミドおよび培地	20
(2) DNA の取り扱い	20
(3) γ -PCCH の合成	20
(4) pKTY320::Tn5 の作製	20
(5) 接合伝達法	23
(6) <i>E. coli</i> の形質転換法	23
(7) <i>E. coli</i> からのプラスミドの回収 (small scale)	23
(8) <i>Sphingomonas paucimobilis</i> の全 DNA の調製	24
(9) ショ糖密度勾配遠心による DNA の分画	25
(10) <i>in vitro</i> packaging	25
(11) <i>E. coli</i> への形質導入	26
(12) 粗酵素抽出液の調製	26
(13) γ -HCH および γ -PCCH 分解活性測定法	26
(14) ガスクロマトグラフィー (GC) 分析	26
(15) プレート上での γ -HCH 分解活性検出法	27
(16) 塩基配列決定用鋳型プラスミドの回収	27
(17) アルカリ変性による一本鎖 DNA の調製	27
(18) DNA 塩基配列決定法	28
(19) サザンブロット解析	28
(20) DNA ブロープの作製	29
(21) オリゴヌクレオチドの末端ラベリング	29
(22) アガロースゲルからの DNA の回収	30

1-3. 結果	30
(1) γ -HCH 分解活性に欠陥を持つ Tn5 変異株の分離	30
(2) UT61 と UT64 のサザンブロット解析	32
(3) UT61 と UT64 の Tn5 挿入部位の決定	34
(4) LinA による UT64 の γ -HCH 分解活性の相補	34
1-4. 考察	38
第2章 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene halohydrase (LinB) 遺伝子 のクローン化とその性質	43
2-1. 緒言	43
2-2. 材料および方法	45
(1) 菌株およびプラスミド	45
(2) GC-MS 分析	45
(3) deletion mutant の作製	45
(4) プラスミドの迅速調製法	45
(5) 遺伝子産物の <i>E. coli</i> 内での大量発現	47
(6) SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	47
(7) 休止菌体調製法	48
(8) 塩素イオン濃度測定法	49
(9) 塩基配列の accession number	50
2-3. 結果	50
(1) linA 遺伝子を保持する <i>P. putida</i> の作製	50
(2) LinB 活性を有するコスミドクローンの取得	50
(3) PB401 による γ -HCH 分解産物の同定	52
(4) linB 遺伝子のサブクローニング	54
(5) LinB 活性の <i>E. coli</i> 中での再構成	54
(6) deletion 解析と linB 遺伝子の塩基配列の決定	54
(7) データベースからの LinB 推定アミノ酸配列の相同配列の検索	56
(8) linB 遺伝子のサザンブロット解析	61
(9) linB 遺伝子の <i>E. coli</i> 内での大量発現と産物の同定	61
(10) UT26 および LinB を高発現させた <i>E. coli</i> MV1190 の γ -HCH 分解代謝中間体	

以外の基質に対する脱ハロゲン活性	6 4
2-4. 考察	6 4
第3章 LinB の精製とその性質	6 9
3-1. 緒言	6 9
3-2. 材料および方法	6 9
(1) 使用菌株およびプラスミド	6 9
(2) タンパク質の定量	6 9
(3) LinB 活性の測定法	6 9
3-3. 結果	7 0
(1) <i>E. coli</i> 内での LinB の大量発現	7 0
(2) 硫酸分画	7 0
(3) BUTYL-TOYOPEAL 650M による疎水カラムクロマトグラフィー	7 0
(4) DEAE Sephadex A-50 による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	7 2
(5) DEAE-TOYOPEAL 650M による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	7 2
(6) Sephadex G-75 によるゲルろ過カラムクロマトグラフィー	7 2
(7) 精製のまとめ	7 2
(8) LinB の分子量の測定	7 2
(9) LinB の至適 pH	7 7
(10) LinB の基質特異性	7 7
3-4. 考察	8 2
第4章 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase (LinC) 遺伝子 のクローン化とその性質	8 4
4-1. 緒言	8 4
4-2. 材料および方法	8 4
(1) 菌株およびプラスミド	8 4
(2) 2,5-DDOL を含む assay solution の作製	8 4
(3) 2,5-DDOL 代謝産物の蓄積法	8 4
(4) LinC 活性測定法	8 6
(5) γ -HCH plate の作製	8 6
(6) <i>Sphingomonas paucimobilis</i> からの全 RNA の回収	8 6

(7) ノーザンブロット解析.....	88
(8) 塩基配列の accession number	89
4-3. 結果	89
(1) 2,5-DDOL dehydrogenase (LinC) 活性を有するコスミドクローンの単離	89
(2) Compound I の同定	90
(3) <i>linC</i> 遺伝子のサブクローニング	90
(4) 制限酵素による <i>linC</i> 遺伝子のマッピングと塩基配列の決定	92
(5) <i>linC</i> 遺伝子以外の 2,5-DDOL dehydrogenase 遺伝子 (<i>linX</i>) の単離	92
(6) 仮想 <i>linX</i> 遺伝子のサブクローニング、deletion 解析、および塩基配列の決定	96
(7) LinC, LinX 推定アミノ酸相同配列のデータベースからの検索	101
(8) <i>linC</i> 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析	101
(9) <i>linC</i> , <i>linX</i> , および ORFUP の <i>E. coli</i> 中での大量発現と産物の同定	105
(10) LinC 活性を失った変異株の単離とその性質	105
(11) γ -HCH 分解関与遺伝子群の UT26 内での転写レベルでの発現	108
4-4. 考察	110
第5章 トランスポゾン Tn5 による 2,5-dichlorohydroquinone 分解能に	
欠陥を持つ変異株の分離とその性質	115
5-1. 緒言	115
5-2. 材料および方法	115
(1) 菌株およびプラスミド	115
(2) 休止菌体の調製	115
(3) 2,5-DCHQ 分解活性測定法	116
(4) HQ 分解活性測定法	116
5-3. 結果	117
(1) 2,5-DCHQ 分解能に欠陥を持つ Tn5 変異株の分離	117
(2) 休止菌体による 2,5-DCHQ 分解活性の定量化	117
(3) 休止菌体による HQ 分解活性の定量化	120
(4) UT102, UT103 の Tn5 挿入部位のクローニング	120
5-4. 考察	124

第6章 γ -HCH 分解代謝系酵素群の細胞内局在性の解析	128
6-1. 緒言	128
6-2. 材料および方法	129
(1) 菌株およびプラスミド	129
(2) G (一) 細菌の分画法	129
(3) LinA, LinB 活性測定法	133
(4) LinC 活性測定法	133
(5) LinD 活性 (2,5-DCHQ 分解活性) 測定法	133
(6) LinW 活性 (HQ 分解活性) 測定法	134
(7) β -lactamase 活性測定法	134
(8) β -galactosidase 活性測定法	135
(9) pyruvate dehydrogenase 活性測定法	136
(10) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 活性測定法	136
(11) phosphatase 活性測定法	137
6-3. 結果	137
(1) UT26 における γ -HCH 分解酵素活性の局在性の解析	137
(2) <i>E. coli</i> における LinA, LinB 活性の局在性の解析	138
6-4. 考察	143
終章 (総合考察)	146
参考文献	152
謝辞	159
文献リスト	160
論文の内容の要旨	161

略称

Ap	ampicillin
BAP	bacterial alkaline phosphatase
Ble	bleomycin
BSA	bovine serum albumin
Cm	chloramphenicol
DCB	dichlorobenzene
2,5-DCHQ	2,5-dichlorohydroquinone
2,5-DCP	2,5-dichlorophenol
2,5-DDOL	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-bis (<i>p</i> -chloro-phenyl) ethane
DEPC	diethylpyrocarbonate
2,4,5-DNOL	2,4,5-trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol
DTT	1,4-dithiothreitol
ECD	electron capture detector
FID	flame ionization detector
GC	gas chromatography
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
HCH	hexachlorocyclohexane
HPLC	high-performance liquid chromatography
HQ	hydroquinone
IPTG	isopropylthio- β -D-galactopyranoside
Km	kanamycin
LB	Luria broth
NAD	nicotinamide-adenine dinucleotide
Nal	nalidixic acid
OD	optical density
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
ORF	open reading frame
PCCCH	pentachlorocyclohexene
PCP	pentachlorophenol
PNP-P	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
RT	retention time
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Str	streptomycin
Tc	tetracyclin
THB	trihydroxybenzene
TCA	trichloroacetic acid
1,2,4-TCB	1,2,4-trichlorobenzene
TCCH	tetrachlorocyclohexadiene
1,4-TCDN	1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene
TeCB	tetrachlorobenzene
TeCCH	3,4,5,6-tetrachloro-1-cyclohexene
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

序章

人類は有機化学工業の発達に伴って様々な化合物を生み出し利用してきたが、こうした化合物（人為起源物質）のほとんどは、それまで自然界に存在しなかった非天然化合物（xenobiotics）であり、生物がそれまでに出会ったことのない化合物であると考えられる。こうした非天然化合物の中でも PCB（polychlorinated biphenyl）などように応用範囲が広く様々な用途で利用されたものや、BHC（benzenehexachloride）、DDT（1,1,1-trichloro-2,2-bis [p-chlorophenyl] ethane）などのように農薬用、あるいは公衆衛生用に広域に渡って使用されたものは、とりわけ環境中に大量に放出された。しかし、自然界にはこうした物質の分解代謝系は十分に確立しておらず、環境中に蓄積されるという結果をもたらした。中でも人体に有害なものに関しては環境汚染物質として人類の健康を脅かしているが、環境中からの有効な除去方法は現在までに確立されていない。一方、細菌を中心とする微生物の中には、このような非天然化合物に対しても分解資化能を発達させたものも存在する。

ナイロンオリゴマー分解菌は、その代表的な例である。Kinoshita らは、ナイロン工場の廃液中からナイロン（6-aminohexanoate）環状 2 量体を炭素源及び窒素源として生育する細菌 *Flavobacterium* sp. KI72 を分離した [Kinoshita et al., 1975]。これは、ナイロン工業が日本で成立してから約 30 年後のことである。本菌は、環状 2 量体を開環する酵素 (EI) [Kinoshita et al., 1977] と直鎖状オリゴマーを単量体化する酵素 (EII) [Kinoshita et al., 1981] を持っていた。両酵素ともアミダーゼとして基質特異性が高く、調べられた他のアミド結合には全く反応しなかった。このことから、単に基質特異性の広いアミダーゼを有する菌が選択されたわけではないことが示唆された。また、比活性も他のアミダーゼに比べ 1～2 桁小さい値であり、新生酵素の可能性を強く支持する結果が示された。EI と EII の遺伝子（それぞれ *nylA*, *nylB*）はプラスミド pOAD2 上にコードされているが、同じプラスミド上に *nylB* と極めて相同性の高い遺伝子 *nylB'* が存在していた [Okada et al., 1983]。*nylB'* 産物（EII'）の活性が EII と比べて著しく低いことから、EI は、EII' から重複進化して生じたと考えられている。EI と EII' は、392 アミノ酸のうち 46 箇所異なるが、このうちわずか 2 アミノ酸の人工的置換で EII レベルの活性になることも示されており [根来誠司, 1992]、極少数のアミノ酸置換で比較的容易に高活性型の酵素に変化し得るものと考えられる。更に、プラスミド上では比較的速い速度で進化が起こるものと思われ、人為起源基質への進化・適応にプラスミドが大きな役割を果たしている可能性も示唆されている。

一方、Furukawa と Miyazaki は *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 から [Furukawa and Miyazaki, 1986]、Kimbara らは *Pseudomonas* sp. KKS102 から [Kimbara et al., 1988]、Erickson と

Mondello は、*Pseudomonas* strain LB400 から [Erickson and Mondello, 1992]、それぞれ PCB/biphenyl 分解に関与する *bph* 遺伝子群を単離し、その後も詳細な解析が進められている。他の PCB/biphenyl 分解菌としては、グラム陰性菌では *Pseudomonas* をはじめ *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Moraxella* など [Furukawa et al, 1989] が、グラム陽性菌では *Rhodococcus* [Asturias et al, 1994; Maeda et al, 1995] が報告されている。更に、これらの菌株からも分解に関与する遺伝子群が取られ、比較、検討が行われている。その結果、これらが保持する PCB/biphenyl 分解に関与する遺伝子群は、遺伝子の並びなどに違いがみられるものの、基本的にはお互いに非常によく似た構造を持ち、同じ反応経路で分解を行っていることが明らかになった。このような結果から、biphenyl分解菌、及び分解遺伝子は自然界に比較的広く存在し、co-oxidation によって PCB も分解していると考えられている。また、これらの遺伝子群は他の芳香族化合物の分解代謝に関与する遺伝子群とも相同性を示しており [van der Meer et al, 1992]、起源を同じくする遺伝子が自然界に広く拡がっていることが示唆されている。

人為起源の有機塩素化合物の中でも、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) は、土壤中で速やかな分解を受けることが知られているが、2,4-D の分解遺伝子についても、PCB/biphenyl 分解系遺伝子群同様、ある程度のバリエーションを示しながら、基本的には同じいくつかの遺伝子が世界中に拡がっていることが示されている [Ka et al, 1994]。

人為起源物質の中でも有機ハロゲン化物（特に塩素、フッ素；一般に炭素との結合の強さは電気陰性度が増すほど強くなる。すなわち結合の強さは、 $F > Cl > Br > I$ ）による環境汚染がとりわけ問題となっている。それは、難分解であると共に、人体にとっても有害であるからである。しかし、自然界には、こうした有機ハロゲン化物をも分解する微生物も存在する。言い方を換えれば有機ハロゲン化物に対しても変換活性を持つような酵素が存在する。これらの酵素には、PCB 分解における初発酸化酵素のように非ハロゲン化物のアナログとしてハロゲン化物に対しても酵素活性を持つようなもの、すなわち、ハロゲンがついていようがいまいが同じ活性を示すものと、積極的にハロゲンと炭素の結合を切断する dehalogenase と呼ばれる一群の酵素とがある [Fetzner and Lingens, 1994; Janssen et al, 1994]。dehalogenase は反応機構から7つの種類に分類されている (Fig. 0-1 [Janssen et al, 1994])。こうした酵素は、人為起源の有機ハロゲン化物の増加に伴ってその機能を発達させていったと考えられるが、天然にも菌類がリグニン代謝の際に生産する CAM (chlorinated anisyl metabolites) [de Jong et al, 1994]、海洋中の藻類が生産する VHOC (volatile halogenated organic compounds) [Gashwend et al, 1985] 等のように、もともとかなりの量のハロゲン化物が存在していることも示されており、酵素自体の起源はそれほど新しいものではない可能性もある。

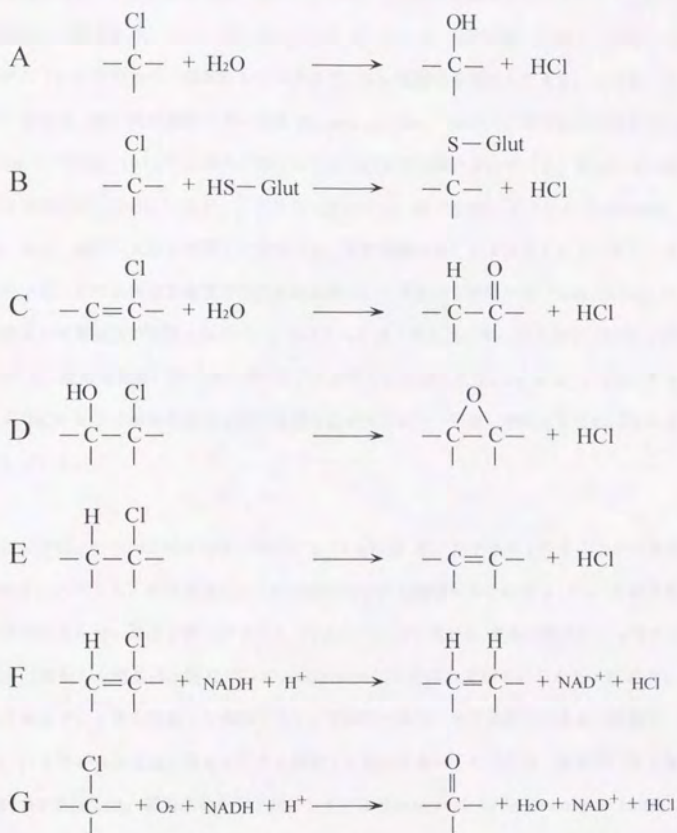


Fig. 0-1 Enzyme-catalyzed dehalogenation reactions in microbial cultures that grow on halogenated organic compounds. (A) Hydrolytic dehalogenation, (B) glutathione substitution, (C) hydration, (D) intramolecular substitution, (E) dehydrohalogenation, (F) reduction, (G) oxygenation. Redrawn from reference [Janssen *et al.*, 1994].

以上のような背景をふまえて、当研究室では有機塩素系の人為起源物質で、環境汚染物質としても代表的である γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, γ -BHC, lindane) に注目し、その微生物分解について研究を開始した。 γ -HCH は、第二次世界大戦前にアメリカで開発された代表的な人工の有機塩素系殺虫剤である。その作用機構は、昆虫などのはしご状神経を麻痺させるということはわかっているが詳細は不明である。 γ -HCH は、殺虫スペクトルの広さ、効力の高さに加え、非常に安価であることから 1940 年頃から一般家庭から農業まで、広い範囲で使用されてきた。その後、人体への蓄積性と有害性（強い変異原性とガン原性 [Bhunya and Jena, 1992]）、環境中での残留性が指摘され [立川涼ら, 1970]、1971 年以降わが国では全面的に使用が禁止されている。他の先進諸国でも、現在では使用が禁止されているが、イギリス [Marks *et al.* 1989]、オランダ [Backmann, *et al.* 1988a] など、過去に大量に使用した地域では、依然残留汚染に悩まされている。また、インド、中国、旧ソ連などの発展途上地域では経済的な理由から現在でも使用が続けられている。さらに最近、低緯度の熱帯地域で使用された HCH のほとんどは上昇気流に乗って大気中に拡散し [Takeoka *et al.* 1991]、高緯度地域に降り注いでいることが明らかになった [Iwata *et al.* 1993]。すなわち、現在でも HCH による環境汚染は地球規模で広がっており、早急に解決しなければならない問題を提起している。

HCHには理論上 9 つの立体異性体が存在する (Fig.0-2) が、化学合成で作ることができるのは、8 つである。このうち、化学合成した工業原体に含まれる割合が多いのは α 、 β 、 γ 、 δ 体であるが、実際に殺虫効果を持つのは γ 体だけであり (Table 0-1 [山下恭平ら, 農業の科学])、 γ 体を 99 % 以上の純度に精製した製品は、特にリンデン (lindane) と呼ばれている。しかし、経済的に苦しい発展途上地域では γ 体を精製して利用するケースは希であり、化学合成したままの状態、すなわち α 、 β 、 γ 、 δ 体からなる混合物をそのまま利用するケースが多い。そのため、環境中にも γ 体以外にも α 、 β 、 δ が放出され、環境汚染を引き起こしている [Iwata *et al.* 1993; Iwata *et al.* 1994]。特に β 体は、塩素原子が全て equatorial の位置に存在するために化学的に最も安定であり、環境中での残留性も最も高い [Stewart and Chisholm, 1971]。更に、急性毒性は最も低い反面、体脂肪蓄積性が高いことから生物濃縮も指摘され、慢性毒性も高いことから環境汚染物質としても重要である [山下恭平ら, 農業の科学]。

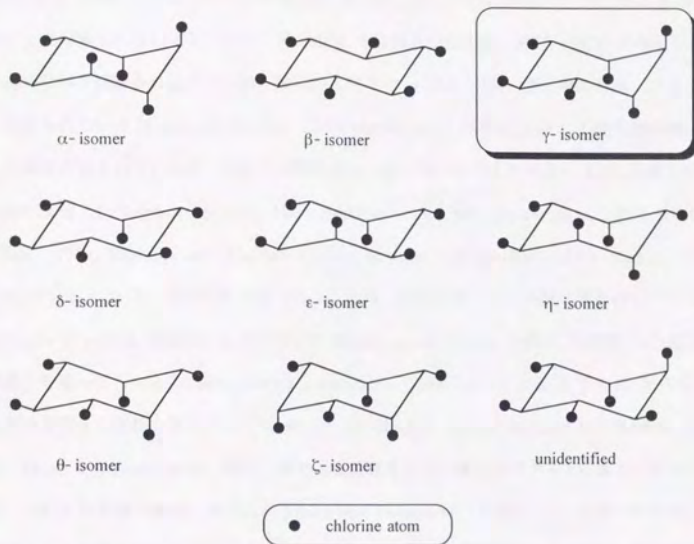


Fig. 0-2 Stereoisomers of hexachlorocyclohexane

Table 0-1 HCH の異性体の構造と生物活性 [山下恭平ら, 農薬の科学]

異性体	立体配座	BHC 工業製品 の組成%	相対殺虫 力 チャバネ ゴキブリ	急性経口毒性 LD ₅₀ (mg/kg) ラット	慢性毒性 無影響濃 度 ^{a)} (ppm)	体脂肪蓄 積 ^{b)} (ppm)
α	a a e e e e	55~80	3.6	500	10	120
β	e e e e e e	5~14	—	>6,000	<10	2,000
γ	a a a e e e	8~15	100	125	50	120
δ	a e e e e e	2~16	0.3	1,000	~800	—
ε	a e e a e e	3~5	—	—	—	—
η	a e a a e e	—	0.7	—	—	—
θ	a e a e e e	—	—	—	—	—

a) ラット, 104 週間摂食, b) ラット, 20 週間 100 ppm 摂食.

γ -HCH は好気的な畑土壌ではほとんど分解されずに残留するが、嫌気的な湛水土壌では比較的速やかに分解されることが知られている [Yoshida and Castro, 1970; Stewart and Chisholm, 1971; MacRae *et al.*, 1967; Guenzi, *et al.* 1971; Raghu and MacRae, 1966]。滅菌した土壌では、 γ -HCH の分解がほとんどみられないこと、及び1度 γ -HCH を分解させた土壌に再び γ -HCH を加えると1回目より速い分解が観察されること、から嫌気的条件下の γ -HCH 分解は微生物の作用によるものであると考えられている [Raghu and MacRae, 1966; MacRae *et al.*, 1967]。 γ -HCH の微生物分解は過去に多くの研究が成されているが、それらは嫌気的な分解についてのものが多い [大久長範と山口益郎, 微生物の生態 12; Stehunathan *et al.*, 1969; MacRae *et al.*, 1969; Jagnow *et al.*, 1977; Heritage and MacRae, 1977a; Heritage and MacRae, 1977b; Heritage and MacRae, 1979; Mathur and Saha, 1975]。 MacRae らは、窒素気流下で γ -HCH を唯一の炭素源として集積培養を行い、*Clostridium sphenoides* を γ -HCH 分解菌として取得した [MacRae *et al.*, 1969]。本菌は、 γ -HCH から還元的に塩素2原子を取って γ -3,4,5,6-tetrachloro-1-cyclohexene (TeCCH) に、 α -HCH からは δ -TeCCH に、それぞれ変換する活性を有していた [Heritage and MacRae, 1977a; Heritage and MacRae, 1977b]。また、Ohisa と Yamaguchi は、湛水土壌の土壌溶液をアミノ酸とペプチドに富んだ条件にすることで、 γ -HCH 分解菌の集積に成功した [Ohisa and Yamaguchi, 1978b]。この土壌培養系から γ -HCH 分解菌として分離されてきたのは、いずれも *Clostridium* 属細菌であった [Ohisa and Yamaguchi, 1978a]。更に、これらのうちの一つの菌株、*Clostridium rectum* の γ -HCH 分解反応及び反応機構について解析し、アミノ酸依存的に tetrachlorocyclohexene (TeCCH)、monochlorobenzene が生じること (Fig. 0-3 [Ohisa *et al.*, 1980])、すなわち、HCH が Stickland 反応 (アミノ酸間の電子の授受によって ATP を生成する反応) の電子受容体となることによって ATP の生成を伴って脱塩素されることを示している (Fig. 0-4) [Ohisa *et al.*, 1982; 大久長範, 山口益郎, 微生物の生態 12]。

γ -HCH の好気的な微生物分解としては次のような研究がある。Yule らは、耕地土壌の混合物を DDT, dieldrin, lindane, heptachlor を添加して好気的に6カ月間還流したところ、lindane のみが分解し、分解産物として γ -PCCH が検出されたことを報告している [Yule *et al.*, 1967]。さらに、この土壌から γ -HCH から脱塩酸できるとされる *Bacillus* 属の細菌も分離している [Yule *et al.*, 1967]。Tu は、実験室土壌系で lindane、塩素イオンの量の変化と菌数、呼吸量の関係を調べることで、 γ -HCH の好気的分解に微生物が関与していることを明らかにし、代謝産物として γ -PCCH, α -TeCCH, γ -TeCCH, pentachlorobenzene を同定した [Tu, 1975]。更に、砂壤土から好気的に分離された147種の微生物 (細菌と菌類) の γ -HCH 資化能を調べたところ、71種が γ -HCH を唯一の炭素源として生育した [Tu, 1976]。そのうち13種類 (細菌10, 菌類3) について γ -HCH の分解代謝を

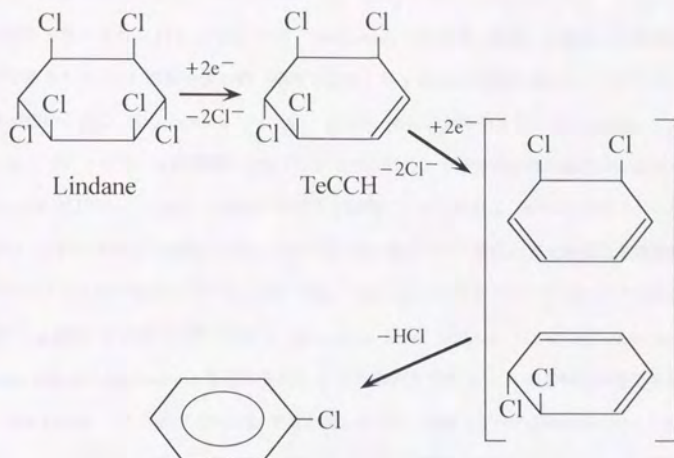


Fig. 0-3 Proposed pathway of lindane degradation by cell-free extracts of *Clostridium rectum* strain S-17 in the presence of DTT. Redrawn from reference [Ohisa *et al*, 1980]

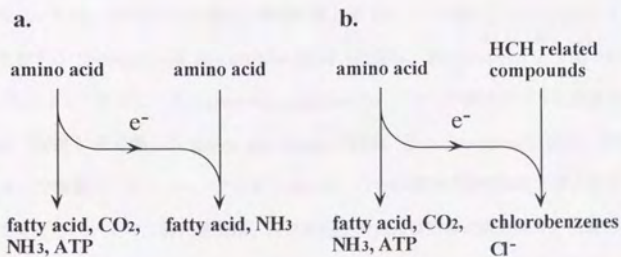


Fig. 0-4 ATP synthesis associated with conversion of hexachlorocyclohexane related compounds. a: normal Stickland reaction. b: HCH related compounds serve as the artificial electron acceptors of the Stickland reaction. Redrawn from reference [Ohisa *et al*, 1982; 大久長範, 山口益郎, 微生物の生態 12]

検討したところ、分解代謝物として γ -PCCH, α -TeCCH, β -TeCCH, γ -TeCCH, pentachlorobenzene が、検出された [Tu, 1976]。更に、*Pseudomonas* sp. No.62 では、これらに加えて 1,2,3,4-TeCB, 1,2,4,5-TeCB も検出された [Tu, 1976]。一方、Mastumura らも土壌、底質、水圏などの環境中から好氣的に分離された 354 種類の微生物（細菌と菌類）の γ -HCH 分解能を調べたところ、71 種類に分解能が認められた [Mastumura et al., 1976]。更にこれらのうち、*Pseudomonas putida* ATCC17484 の γ -HCH 分解経路について検討したところ、2 通りの分解代謝経路が認められた [Mastumura et al., 1976]。一方は、 γ -PCCH を経る主経路であり、他方は、NAD に依存し、 γ -TeCCH と副産物の α -HCH を生じる経路である。 γ -TeCCH は、更に FAD 依存の還元的脱塩素機構を経て分解されていくことが示唆されている。近年では、Bachmann らがオランダの HCH で汚染された底質土壌で α -HCH の好氣的分解を確認し [Bachmann et al., 1988a], PCCH, tetrachlorobenzene, trichlorobenzene, dichlorobenzene などを生じる好氣的条件下での α -HCH の分解代謝経路を推定している [Bachmann et al., 1988b]。すなわち、PCCH を経て、tetrachlorobenzene (TeCB), trichlorobenzene (TCB), dichlorobenzene (DCB) を生じる経路である (Fig. 0-5)。また、Sahu らは、インドのサトウキビの根圏土壌から α -, β -, γ -HCH を好氣的に分解できる *Pseudomonas* 属細菌を分離している [Sahu et al., 1990]。

本学の土壌学研究室では、農学部構内の試験圃場に於て 1974 年から毎年 1 回 γ -HCH を散布し、土壌での変動を追跡する研究を開始した。最初の 2 年間はほとんど分解は観察されなかったが、3 年目から急激な分解が観察され、一ヵ月で 15 ppm の γ -HCH がほとんど消失した [Wada et al., 1989]。更に Senoo らは、10 年目の土壌から集積培養、単コロニー分離によって γ -HCH を唯一の炭素源として生育する *Sphingomonas paucimobilis* SS86 (以前は、*Pseudomonas* と分類されていたが、Yabuuchi らによって新たに *Sphingomonas paucimobilis* という分類カテゴリーが提唱された [Yabuuchi et al., 1990]) を分離した [Senoo and Wada, 1989]。*S. paucimobilis* SS86 は、単独で γ -HCH を好氣的に分解資化できるユニークな菌であるが、この分解能は比較的短期間に獲得された可能性もあると考えられ、その分解代謝経路、及び遺伝子構造には興味を持たれた。しかし、注意を要するのは、前述したように、土壌、底質、水圏などの環境中から好氣的に分離された 354 種類の微生物（細菌と菌類）のうち、71 種類が γ -HCH の分解能を示したという報告 [Mastumura et al., 1976] や、砂壌土から好氣的に分離された 147 種の微生物のうち、71 種が γ -HCH を唯一の炭素源として生育したという報告 [Tu, 1976] もあり、もともと存在した γ -HCH 分解菌が集積され分離されてきた可能性も否定できない点である。しかし、同じ試験圃場から集積培養されてくるのは、

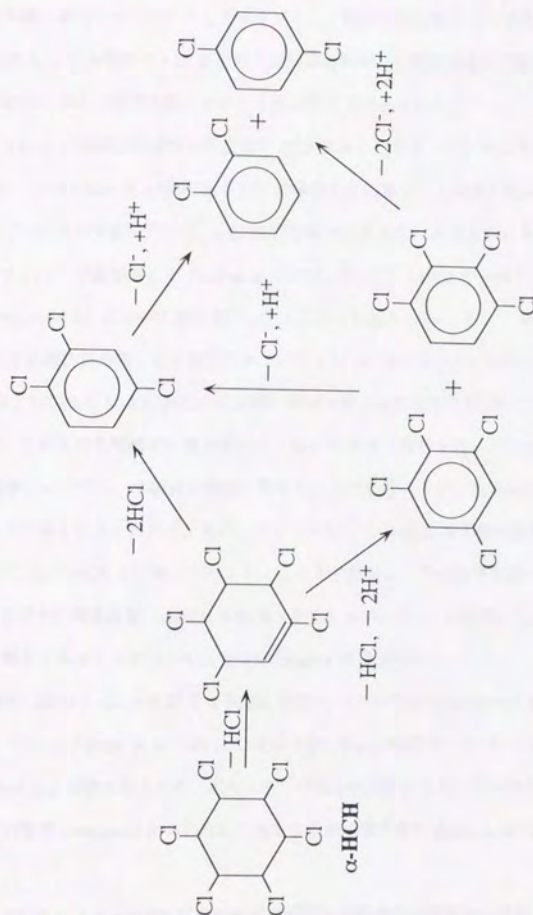


Fig. 0-5 Proposed initial steps of alpha-HCH degradation under aerobic conditions in a slurry of contaminated soil. Redrawn from reference [Bachmann *et al.*, 1988b]

SS86 タイプの細菌ばかりであり、少なくとも一般に広く土壤中に存在する細菌のかかなりの割合のものが、もともと γ -HCH 資化能を有しているというわけでもなさそうである。

当研究室では本菌に遺伝子マーカーとしてナリジキシン酸耐性を導入した変異株 UT26 [Imai *et al.*, 1989] を材料として 本菌株の γ -HCH 分解代謝経路の解明、分解関与遺伝子群の単離と解析を行ってきた。本研究に先立つ研究で明らかにした結果を以下にまとめる。

UT26 による γ -HCH の初期分解過程は検出器に ECD を用いたガスクロで検出可能である (Fig. 0-6)。すなわち、5~10 ppm の γ -HCH を UT26 の菌体と反応させ、反応液を酢酸エチルで抽出したものについてガスクロ分析を行うと、 γ -HCH が分解されて生じたと考えられる 3 つのピーク (Compound A, B, C, D) が観察される [Imai *et al.*, 1989]。そこで、 γ -HCH が分解されて最初に検出される物質 (Compound A) について検討を行ったところ、Yule ら、Tu、そして Matsumura らによって γ -HCH の好氣的代謝産物として報告されていた γ -PCCH であることが同定された [Imai *et al.*, 1989]。この結果、UT26 における γ -HCH の分解の最初の反応は脱塩化水素反応であることが明らかになったので、この反応を触媒する酵素遺伝子、*linA* の単離と解析を行った [Imai *et al.*, 1991]。*linA* 遺伝子の特徴については、本研究の結果と併せて本文でも述べるが、相同配列が見出されず新規な酵素遺伝子であると考えられる。更に、クローン化した *linA* 遺伝子を大腸菌中で高発現させたものについて SDS-PAGE 上で単一のバンドになるまで精製し、その特徴を調べたところ、*LinA* は γ -HCH 及びその関連物質 (α -HCH, δ -HCH, γ -PCCH, α -PCCH) しか基質にしない、基質特異性のかなり狭い酵素であることが明らかになった [Nagata *et al.*, 1993]。

linA 遺伝子産物 (*LinA*) は、 γ -HCH を γ -PCCH を経て、1,2,4-TCB (Compound D) にまで分解する活性を示した (Fig. 0-7 [Imai *et al.*, 1991])。ところが、1,2,4-TCB は、UT26 によってそれ以上分解されない dead-end 産物であるため、次のステップは γ -PCCH からガスクロでピークとして検出される未同定の物質 Compound B への反応であることが示唆された [Imai *et al.*, 1992]。

本研究では、UT26 による γ -PCCH 以降の分解代謝反応を触媒する酵素群の特徴を明らかにし、それらの酵素遺伝子の単離と解析を行うことを目的とした。本研究で得られる結果は、微生物が人為起源物質に対して分解資化能を獲得するための遺伝子の適応・進化機構の解明にとって重要なデータとなるものと期待される。と同時に、現在も進む地球的規模の HCH 汚染の微生物を利用した除去法の開発のための基礎研究という意味でも重要な研究となるものと考えられる。

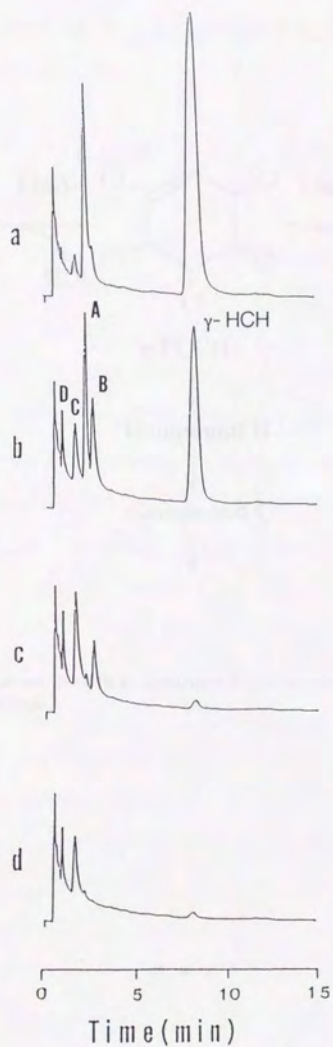


Fig. 0-6 Time-course of degradation of γ -HCH by UT26. GC analysis was performed under the condition described in Materials and Methods (p26). The incubation periods were 0 (a), 2 (b), 8 (c), and 60 (d) min, respectively.

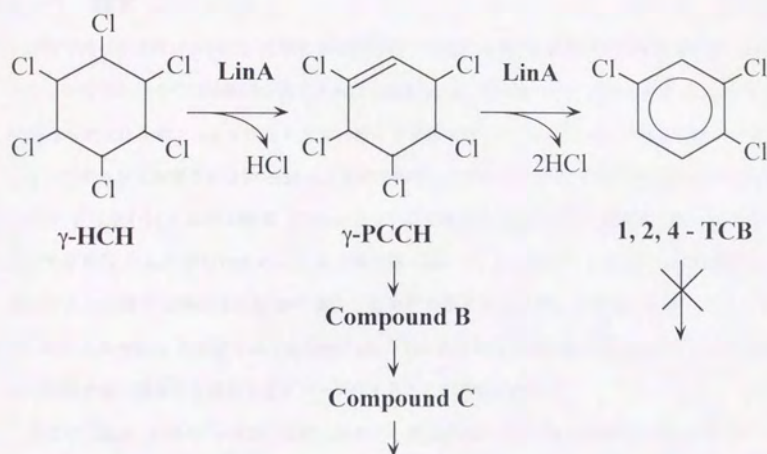


Fig. 0-7 Proposed initial pathway for γ -HCH degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Compound B and C have not been identified.

第1章

トランスポゾン Tn 5 による γ -HCH dehydrochlorinase (LinA) 活性に欠陥を持つ変異株の分離とその性質

1-1. 緒言

序章で述べたように、 γ -HCH 分解の最初の段階の脱塩化水素反応を触媒する酵素遺伝子 *linA* がクローン化され、その塩基配列が決定された [Imai et al, 1991]。 *linA* 遺伝子産物 (LinA) は、 γ -HCH を γ -PCCH を経て 1,2,4-TCB にまで分解する活性を持つ (Fig. 0-7) が、1,2,4-TCB は、UT26 によってそれ以上分解されない dead-end 産物であり、UT26 の γ -HCH 分解代謝過程においては、 γ -PCCH を 1,2,4-TCB 以外の物質 (Compound B) に変換する反応が主要分解経路であると考えられる。すなわち、LinA は UT26 の γ -HCH 分解代謝において、 γ -HCH から γ -PCCH への初発分解を触媒し、それ以降の分解反応には他の遺伝子産物が必要であると考えられる。いずれにしても、UT26 による γ -HCH の分解を論ずるためには、 γ -PCCH 以降の代謝経路を明らかにし、*linA* 以外の γ -HCH の分解に関与する遺伝子をクローン化することが必要である。

そこで、*linA* 以外の γ -HCH 分解に関与する遺伝子のクローン化を目的として、 γ -PCCH から Compound B を生じる反応に働く遺伝子のクローン化を γ -PCCH を基質として活性を検出器に ECD を用いたガスクロマトグラフィー (GC) で検定する方法で試みた。ジーンライブラリーの作製には、1) *linA* のクローン化と同様に、目的遺伝子本来のプロモーターからの発現を期待するコスミドベクターを使うもの、2) ベクターのプロモーターを利用して目的遺伝子を発現させようという発現ベクターを用いるもの、の2通りの方法を採用した。しかし、いずれの方法でも十分な数のクローンをスクリーニングしたにも関わらず目的クローンが得られなかった。原因は、この反応には互いに離れた複数の遺伝子が関与している、あるいは活性の発現に UT26 特有の環境が必要であるためではないかと考えられた。すなわち、ポジティブセレクションは不可能であることが示唆された [永田裕二, 1991]。そこで、本章では、トランスポゾン Tn5 を利用した γ -HCH 分解活性に欠陥を持つ変異株の取得を試みた。その結果、残念ながら *linA* 以外の目的遺伝子に変異が入った変異株は取得できなかったが、*linA* 遺伝子に Tn5 が挿入したことにより LinA 活性を失った変異株が得られ、この変異株の解析の結果、 γ -PCCH から Compound B を生じる反応にも LinA 活性が必要であることが明らかになった。

1-2. 材料および方法

(1) 菌株・プラスミドおよび培地

本章で使用した菌株およびプラスミドを Table 1-1 に示した。*E. coli* HB101 [Maniatis *et al.*, 1982] は遺伝子ライブラリー作製のための宿主として用いた。遺伝子ライブラリーの作製には広宿主域コスミドベクター pKS13 [Kimbara *et al.*, 1989] を使用した。培地は完全培地としては L 培地 (LB) を無機培地としては W 培地を用いた (Table 1-2)。選択培地にはテトラサイクリン (Tc)、アンピシリン (Ap)、ナリジキシン酸 (Nal) をそれぞれ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。培養は *S. paucimobilis* については 30 $^{\circ}\text{C}$ 、*E. coli* については 37 $^{\circ}\text{C}$ で行った。*S. paucimobilis* の菌体の長期的保存には、培養液に 15% の glycerol を加え、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

(2) DNA の取り扱い

本研究で使用した制限酵素およびその他の酵素類は宝酒造、東洋紡、ペーリンガー・マンハイム社のいずれかのものを購入し、説明書の指示に従って用いた。DNA の連結はライゲーションキット (宝酒造) を利用し、添付の説明書の指示に従って用いた。

その他の組換え DNA 関連操作は、Maniatis らの成書 [Maniatis *et al.*, 1982] に従って行った。

(3) γ -PCCH の合成

γ -PCCH は、Nakazima らの方法 [Nakazima *et al.*, 1949] で γ -HCH より合成した。

- ① 5 g の γ -HCH を 750 ml のアセトンに溶解する。
- ② 液温を 37 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ に保ちながら、1,250 ml の 0.02 N NaOH を急速に加える。
- ③ NaOH を加え始めてから 20 分後に 0.1 N HCl を溶液が酸性になるまで加えて反応を中止する。
- ④ 反応液を水蒸気蒸留し、反応物をアセトンと共に留出する。
- ⑤ 留出液から反応物をエーテル抽出する。
- ⑥ 抽出物を減圧蒸留によって精製する。

(4) pKTY320::Tn5 (Fig. 1-1) の作製 [de Bruijn *et al.*, 1984; de Bruijn, 1987]

- ① Tn5 を保持する *E. coli* LE392 (λ 467) に pKTY320 を導入する。
- ② この株を Km (50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む L 培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、3 日間培養する。
- ③ 新しい培地に植え継ぎ、プラスミドを回収する。
- ④ 回収したプラスミドで *E. coli* JA221 を形質転換し、Km、Ap 耐性株を選択する。
- ⑤ このうち 1 株が保持するプラスミドを pKTY320::Tn5 (Fig. 1-1) として用いた。

Table 1-1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. paucimobilis</i>		
UT26	HCH ⁺ Nal ^r	[Imai, 1989]
UT61	HCH ⁺ Nal ^r <i>linA</i> ::Tn5	This study
UT64	HCH ⁻ Nal ^r <i>linA</i> ::Tn5	This study
<i>E. coli</i>		
HB101	F ⁻ <i>hsdS recA ara proA lacY galK rpsL xyl mtl supE</i>	[Maniatis, 1982]
MV1184	Δ (<i>stl-recA</i>)::Tn10 Δ <i>lac-pro ara thi rpsL</i> Φ 80d <i>lacZ</i>	
	Δ M15F ⁻ <i>traD proAB lacZ</i> Δ M15	[Vieira, 1987]
JA221	<i>leu trp thr thi lacI recA hsdR hsdM</i>	[Clarke, 1978]
LE392 (λ 467*)	F ⁻ <i>met trp lacY galK galT supE supF hsdR</i> (λ 467)	[deBruijn, 1984]
* λ 467	<i>b221 rex</i> ::Tn5 <i>cl857 Oam29 Pam80</i>	
Plasmids		
pRK2013	ColE1::RK2 <i>Tra</i> ⁺ <i>Km</i> ^r	[Figurski, 1979]
pKS13	RK2 replicon; <i>cos</i> <i>Mob</i> ⁺ <i>Tc</i> ^r	[Kimbara, 1989]
pKSR613	pKS13 with 24.4-kb UT61 DNA containing Tn5	This study
pKSR645	pKS13 with 20.5-kb UT61 DNA containing Tn5	This study
pUC18	pMB9 replicon; <i>Ap</i> ^r	[Vieira, 1987]
pTM61L	pUC18 carrying 6.7-kb <i>SalI</i> fragment of pKSR613	This study
pTM61S	pUC18 carrying 3.8-kb <i>SalI-EcoRI</i> fragment of pKSR613	This study
pTM64L	pUC18 carrying 6.0-kb <i>SalI-EcoRI</i> fragment of pKSR645	This study
pTM64S	pUC18 carrying 3.6-kb <i>SalI-EcoRI</i> fragment of pKSR645	This study
pKTY320	p15A replicon; <i>Ap</i> ^r <i>Cm</i> ^r <i>Mob</i> ⁺	[Kimbara, 1989]
pKTY320::Tn5	<i>Ap</i> ^r <i>Cm</i> ^r ::Tn5 (<i>Km</i> ^r <i>Ble</i> ^r <i>Str</i> ^r)	This study

HCH⁺, grown on γ -HCH

Table 1-2. Composition of media used in this study

W medium

per liter:	
KH ₂ PO ₄	1.7 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9.8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
salt solution*	10 ml

*salt solution (per liter):

MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
stock salt solution**	100 ml

**stock salt solution

MgO	10.75 g
CaCO ₃	2.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.5 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.44 g
MgSO ₄ ·4H ₂ O	1.12 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25 g
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.28 g
H ₃ BO ₃	0.06 g
conc. HCl	51.3 ml

LB broth

per liter:	
Bact tryptone	10 g
Bact yeast extract	5 g
NaCl	5 g
pH 7.0	

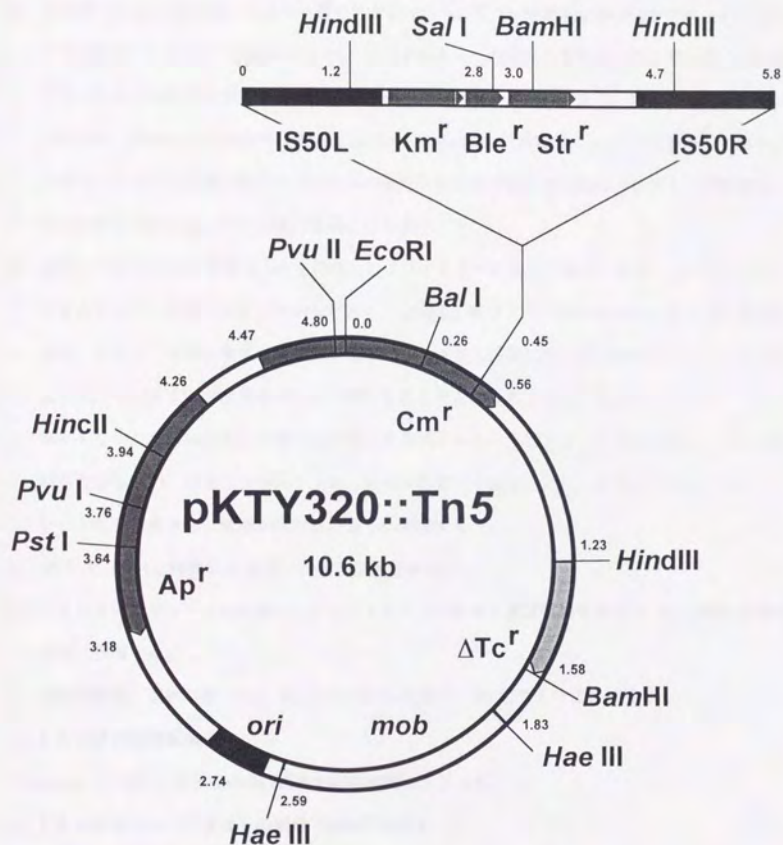


Fig. 1-1 Restriction map of a suicide plasmid, pKTY320::Tn5.

Tn5 (5.8-kb) was inserted at the 0.45-kb site of pKTY320 (4.81-kb). The size of this plasmid is about 10.6-kb.

(5) 接合伝達法 [Ruvkun and Ausubel, 1981]

- ① プラスミド供与菌、受容菌、ヘルパー菌 (HB101 / pRK2013) をそれぞれ薬剤を含む L 培地で一晚培養する。
- ② 受容菌 1.0 ml、供与菌、ヘルパー菌それぞれ 0.5 ml ずつの培養液を希釈管等で混合し、ミリポア濾過カートリッジ (SWINNEX-25) (フィルター、パッキンの中に入れ、組み立てた状態でアルミホイルなどに包んであらかじめオートクレーブで滅菌しておく) に取り付けしたシリンジに入れ、菌体をフィルター (孔径 0.22 ないし 0.45 μm 、直径 2.5 cm) 上に濾過して移す。
(先に、ピストンを抜いたシリンジのみをセットしてから混合液を加え、ピストンで培養液を押し出すようにする。下から吸引濾過しても良い。)
- ③ 薬剤を含まない LB 培地 2 ml を同様にしてフィルターに通し、菌体を洗う。(一旦、シリンジをカートリッジからはずしてからピストンを抜き、再びシリンジのみセットして L 培地を加え、ピストンで押し出す。シリンジをカートリッジに装着したままの状態ではピストンを引き抜くと、フィルターが浮き上がったり破けたりしてしまうので注意する。)
- ④ カートリッジを解体して、3 種の菌が共存するフィルターをピンセットで取り出し、これを薬剤を含まない L 培地のプレート上に、菌体が存在する面を上にして置く。(フィルターとプレート面を密着させ、気泡が入らないように注意する。)
- ⑤ 30 $^{\circ}\text{C}$ で 4 ~ 12 時間程度放置し、接合伝達させる。
- ⑥ フィルターをプレートから剥がし、フィルター上の菌体を滅菌試験管中で 1 ml の滅菌生理食塩水に懸濁する。
- ⑦ 適宜希釈後、選択培地 (NaI、Km を含む) に塗布し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 1 ~ 2 日培養する。

(6) *E. coli* の形質転換法

Maniatis らの RbCl 法 [Maniatis *et al.*, 1982] に従って行った。

(7) *E. coli* からのプラスミドの回収 (small scale)

試薬

Solution I	25 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
Solution II	0.2 N	NaOH
	1 %	SDS

操作

- ① 1.5 ~ 2 ml の培養液から遠心により菌体を集める。
- ② 100 μ l の Solution I に懸濁し、室温で 5 分間放置する。
- ③ 200 μ l の Solution II を加え、穏やかに攪拌し、氷上で 5 分間放置する。
- ④ 150 μ l の 5 M 酢酸カリウム溶液 (pH 4.8) を加え、攪拌し、10 分間以上氷上に放置する。
- ⑤ 遠心により菌体残さを除き、上清をフェノール・クロロホルム処理する。
- ⑥ 2.5 倍量のエタノール又は等量のイソプロパノールを加え、ドライアイス上で 5 分間放置する。
- ⑦ 15,000 $\times g$ で 15 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を捨てる。
- ⑧ 70 % エタノールで洗浄後、減圧乾燥する。
- ⑨ 100 μ l の TE buffer に溶解する。
- ⑩ 1 μ l の RNase [10 mg / ml in 50 mM Acetate buffer (pH 5.0)] を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間放置する。
- ⑪ フェノール・クロロホルム処理する。
- ⑫ 10 μ l の 5 M 酢酸アンモニウムを加えて、エタノール沈殿する。
- ⑬ 70 % エタノールで洗浄後、減圧乾燥する。
- ⑭ 適量 (30 μ l 程度) の TE buffer (P25 参照) に溶解する。

(8) *Sphingomonas paucimobilis* の全 DNA の調製

全 DNA の調製は、Marmur の方法 [Marmur, 1961] を基本にして一部改良した方法を用いた。

試薬

TESS buffer	30 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	5 mM	EDTA
	50 mM	NaCl
	25 % (W/V)	Sucrose
リゾチーム溶液	5 mg / ml	in TESS
プロテアーゼ K 溶液	5 mg / ml	in TESS

操作

- ① 5 ml の一夜培養液を 100 ml の L 培地に植菌し、30 $^{\circ}$ C で 6 ~ 8 時間振とう培養する。
- ② 7,000 $\times g$ で、10 分間遠心し集菌する。約 0.3 g の湿菌体を得る。
- ③ 50 ml の TESS buffer で洗浄する。
- ④ 6 ml の TESS buffer に再度懸濁する。
- ⑤ 2 ml のリゾチーム溶液を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間放置する。

- ⑥ 1 ml のプロテアーゼ K 溶液を加え、37 ℃で 30 分間放置する。
- ⑦ 1 ml の 10 % SDS 溶液を加えてよく攪拌する。
- ⑧ フェノール処理を 2 回行う。適宜 TESS buffer で希釈する。
- ⑨ フェノール・クロロホルム処理を 2 回以上行い界面に生じる白い物質を完全に除去する。

適宜 TESS buffer で希釈する。

- ⑩ 等量の冷エタノールを静かに加え、ガラス棒で攪拌しながら生じる DNA を巻きとる。
- ⑪ 70 % エタノールで 1 回、純エタノールで 1 回洗浄する。
- ⑫ 乾燥後、滅菌水に溶解する。

(9) ショ糖密度勾配遠心による DNA の分画

試薬

TES buffer	20 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	5 mM	EDTA
	1 M	NaCl
TESS buffer	40 %	Sucrose in TES buffer
TE buffer	10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	1 mM	EDTA

操作

- ① TES buffer と TESS buffer を使って、40 % から 12 % まで 4 % 間隔で 8 種類のショ糖溶液を作製する。
- ② 40 % 蔗糖濃度のものから順に 1.2 ml ずつ日立 13PA チューブに重層する。
- ③ 5,000 xg で 10 分間遠心する。
- ④ DNA 溶液 (最大 500 μ l) を静かに重層する。
- ⑤ 日立 RPS40-T スイングローターを用い、26,000 rpm (121,000 xg) で、18 時間、4 ℃ で遠心する。
- ⑥ ベリスタポンプを用いて、チューブ下層より 500 μ l ずつエッペンドルフチューブに分取する。
- ⑦ 電気泳動で目的の大きさの断片を含む画分を選択する。
- ⑧ エタノール沈殿後、TE buffer に溶解する。

(10) *in vitro* packaging

コスミドベクターのパッケージングは、*in vitro* packaging kit GIGAPACK PLUS (Stratagene 社) を用いて添付の説明書に従って行った。

(11) *E. coli* への形質導入

in vitro packaging したコスミドライブラリーは、以下の方法で *E. coli* に導入した。

- ① *E. coli* HB101 を 0.2 % マルトース、10 mM MgSO_4 を含む L 培地で、 $\text{OD}_{550} = 0.4 \sim 0.5$ ままで培養する。
- ② 4,000 rpm (2,500 $\times g$)、5 分間の遠心により集菌する。
- ③ 4 ml の 10 mM MgSO_4 溶液に懸濁する。
- ④ 懸濁液 200 μl に対して *in vitro* packaging した溶液 20 μl を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間放置する。
- ⑤ 1 ml の L 培地を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間放置する。
- ⑥ 適宜希釈して選択プレートにまく。

(12) 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製した。

- ① 200 ml の培養液から集めた菌体を 100 ml の 50 mM Tris buffer (pH 7.5) に懸濁する。
- ② 再度遠心し、集めた菌体を -20 $^{\circ}\text{C}$ で凍結させる。
- ③ 菌体と当重量 (約 0.3 g) の海砂で菌体を破碎し、1 ml の Tris buffer に懸濁する。
- ④ 15,000 $\times g$ 20 分間遠心し、上清を粗酵素抽出液とした (1 μl あたり約 36 μg のタンパクを含む)。

(13) γ -HCH 及び γ -PCCH 分解活性測定法

γ -HCH 及び γ -PCCH の分解活性の測定は、以下の手順で行った。

- ① プレート上で生育させたコロニーの一部を爪楊枝でかきとり、100 μl の Assay solution (5 ppm γ -HCH or γ -PCCH in W medium) に懸濁する。*in vitro* assay の場合は、粗酵素抽出液を 5 μl (約 180 μg のタンパクを含む)、生成した LinA [Nagata *et al.* 1993] を約 9.5 μg を加えた。
- ② 30 $^{\circ}\text{C}$ (*in vitro* assay の場合は 37 $^{\circ}\text{C}$) で適当な時間 (5 分から 20 分くらい) 放置する。
- ③ 100 μl の酢酸エチルを加えて 2 分間 vortex する。
- ④ 遠心後、上部の酢酸エチル層を回収する。
- ⑤ GC (ECD) で γ -HCH の分解の有無を検定する。

(14) ガスクロマトグラフィー (GC) 分析

ガスクロマトグラフィー分析は日立 263-30 にて行い、検出器は ECD (電子捕獲検出器) を用いて行った。測定条件は Table 1-3 に示した。

Table 1-3. Condition for GC analysis

Column	silicon OV17 (2 % chromosorb W) glass column (2.6 mm i.d. x 2 m)
Column Temperature	175 °C
Injection Temperature	250 °C
Gas flow rate	50 ml / min

(15) プレート上での γ -HCH 分解活性検出法

菌体を生育させたプレート上に γ -HCH 溶液 (50 mg / ml in EtOH) を噴霧する。エタノールが揮発すると、 γ -HCH の白い粉末がプレート表面を覆う。分解能を持つ菌体部分及びその周囲は γ -HCH の白い粉末が分解により消失し、クリアゾーンを形成する。

(16) 塩基配列決定用鋳型プラスミドの回収

試薬

PEG-NaCl	20 %	PEG 6000
	2.5 M	NaCl

操作

- (7) の方法でプラスミドを回収し、50 μ l の TE buffer (P25 参照) に溶解する。
- PEG-NaCl を 30 μ l 加え、氷上で 1 時間放置し、プラスミドを沈殿させる。
- 15,000 $\times g$ で 15 分間遠心し、上清を除く。
- 70 % エタノールで洗浄する。
- 真空乾燥する。
- 30 μ l の TE buffer に溶解し、2 μ l を電気泳動し DNA 量を確認する。

pUC 系のプラスミドだと、通常約 10 μ g 程度得られる。

(17) アルカリ変性による一本鎖 DNA の調製

操作

- プラスミド DNA 溶液 ($\sim 2 \mu$ g) に 2 mM EDTA を 2 μ l、2 N NaOH を 2 μ l 加え、滅菌水で全量を 20 μ l にする。
- 室温で 5 分間放置し変性させる。
- 8 μ l の 5 M 酢酸アンモニウムを加える。
- 100 μ l のエタノールを加え、エタノール沈殿する。

⑤ 沈殿を70%エタノールで洗浄後、真空乾燥する。

⑥ 7 μ l の滅菌水に溶解し、Sequence 反応に用いる。

(18) DNA 塩基配列決定法

本研究における DNA 塩基配列の決定は、SequenaseTM version 2 kit (United States Biochemical 社)、Bca BESTTM dideoxy sequencing kit (宝酒造)、あるいは、オートシーケンサー Applied Biosystems model 373A DNA sequencing system (Applied Biosystems) のいずれかを用い、dideoxy 法で行った。操作は、それぞれの説明書に従って行った。

電気泳動は、6% アクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=19:1)、8 M 尿素含有ゲルで TBE buffer (89 mM Tris、89 mM ほう酸、2 mM EDTA) を使って行った。オートシーケンサー以外の泳動後のゲルは乾燥し、オートラジオグラムをとった。

(19) サザンブロット解析

試薬

変性液	1.5 M	NaCl
	0.5 M	NaOH
中和液	1.5 M	NaCl
	0.5 M	Tris
	1 mM	EDTA
20 x SSC	3 M	NaOH
	0.3 M	クエン酸ナトリウム ($\text{Na}_3\text{citrate}$)
50 x Denhardt's Solution	1 %	BSA
	1 %	Ficol
	1 %	polyvinylpyrrolidone
DNA ハイブリダイゼーション溶液		
	6 x	SSC
	5 x	Denhardt's Solution
	0.5 %	SDS

操作

① 電気泳動したゲルを 0.25 M HCl で 30 分処理し、DNA の断片化を行う。

② 変性液で 30 分間 2 回処理する。

③ 中和液で 15 分間 2 回処理する。

- ④ ナイロンメンブレン Hybond N (Amersham 社) 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 で軽く洗い、風乾する。
- ⑥ 長波長 UV ($\lambda = 256 \text{ nm}$) を 5 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 cm^2 あたり 5 ml の DNA ハイブリダイゼーション液に 5 分間煮沸したサケ精子 DNA (10 mg / ml) を 10 μl / ml 加え、プラスチックバッグあるいは、ハイブリローター (日本ジェネティクス) 中で適当な温度条件下 (通常は 56 $^{\circ}\text{C}$) で 1 ~ 2 時間ブレハイブリダイズを行う。
- ⑧ ^{32}P ラベルしたプローブを加え、ブレハイブリダイズと同じ温度で 12 時間以上ハイブリダイズさせる。
- ⑨ フィルターを 2 x SSC + 0.1 % SDS で 15 分間 1 回洗う。
- ⑩ フィルターを 1 x SSC + 0.1 % SDS で 10 分間 2 回洗う。
- ⑪ 風乾後、オートラジオグラムをとる。

(20) DNA プローブの作製

プローブの作製は、ランダムプライマーラベリングキット (宝酒造) を用いて、説明書に従いランダムプライマー法で行った。

(21) オリゴヌクレオチドの末端ラベリング

操作

- ① 次の反応液を用意する。

1 μl	オリゴヌクレオチド (約100 ng)
5 μl	10x kination buffer
1 μl	T4 polynucleotide kinase
5 μl	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$
38 μl	水 (全量を 50 μl にする)

- ② 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間反応させる。
- ③ 2 μl の 0.5 M EDTA を加え反応を止め、450 μl の 50:20 (10:1 でも可) TE buffer を加える。
- ④ あらかじめ TE buffer で洗浄しておいた NAP カラム (ファルマシア社) にこの溶液を load する。最初の 500 μl を捨て、その後の 800 ~ 1000 μl を分取し、これをラベル化プライマー溶液として用いる。

(22) アガロースゲルからの DNA の回収

ウルトラフリー C3-HV (日本ミリボア工業) を用いた以下の方法で行った。

- ① 通常の DNA 用アガロースにて電気泳動を行い、長波長 UV 照射下で目的のバンドを含むゲルを切り出し、C3-HV のフィルター付きカップに入れる。
- ② -80°C で 5 分間凍らせる。
- ③ 37°C で 5 分間静置し、解凍する。
- ④ 10,000 rpm (6,700 $\times g$) で 10 分間 4°C で遠心する。
- ⑤ TE buffer 200 μl を加える。
- ⑥ 10,000 rpm (6,700 $\times g$) で 10 分間 4°C で遠心する。
- ⑦ フェノール・クロロホルム処理を行う。
- ⑧ 2-butanol で約 100 μl まで濃縮する。
- ⑨ 1/10 容の 5 M 酢酸アンモニウムを加え、エタノール沈殿を行う。
- ⑩ 適当量の TE buffer (P25 参照) に溶解する。

1-3. 結果

(1) γ -HCH 分解活性に欠陥を持つ Tn5 変異株の分離

1-2 (4) で述べたように、Tn5 を保持する *E. coli* にプラスミド pKTY320 を導入することにより pKTY320 に Tn5 を飛ばし、pKTY320::Tn5 を作製した (Fig. 1-1)。これを三親接合伝達法で UT26 に導入し、多数のカナマイシン (Km) 耐性株を得た。Km 耐性株の出現頻度は、受容菌 1 個あたり 6.2×10^{-5} 個であった。pKTY320::Tn5 は、*Pseudomonas* (*Sphingomonas*) 中で複製できない suicide vector であるため、Km 耐性株は、UT26 のゲノム中に Tn5 が挿入した株であると考えられる。

こうして得られた 500 株の Km 耐性株のプレート上のコロニーに γ -HCH の噴霧を行い、 γ -HCH の分解能に欠陥を持つと考えられるクリアゾーンを形成しない株を 7 株選択し、UT61~UT67 と命名した。これらは、プレート上に噴霧した γ -HCH を UT26 に比べ、非常にゆっくりと分解するもの (UT61, UT62, UT63, UT66, UT67) と、 γ -HCH を全く分解しないもの (UT64, UT65) の 2 種類に分類された (Fig. 1-2)。

a



b



Fig. 1-2 γ -HCH degradation activity of UT26 and its mutants. γ -HCH solution (50 mg / ml in ethanol) was sprayed on UT26 (left), UT61 (center), and UT64 (right) grown on a LB plate. The plate was incubated at 30 °C for one day (a), and for two days (b). UT26 make a clear zone within one day, while UT61 did so after two days. UT64 could not degrade γ -HCH at all.

更に、これらについて GC で γ -HCH の分解パターンを検討したところ、前者は、retention time (RT) より γ -PCCH と思われる物質を一時蓄積し、ゆっくりと γ -HCH を分解していったが、後者は γ -HCH の分解性を全く示さなかった（データは示さない）。これらの結果は、UT61 タイプのものは LinA 活性と次の段階の活性（ γ -PCCH 分解活性）の両方の活性が UT26 に比べて弱くなっていること、及び UT64 タイプのものは LinA 活性を完全に失っていることを示している。

(2) UT61 と UT64 のサザンブロット解析

変異が確かに Tn5 の挿入によって引き起こされていることを確認するために、UT61 と UT64 の全 DNA に対して Tn5 の 3.5-kb *Hind*III 断片 (Fig. 1-4 参照) をプローブとしたサザン解析を行った。その結果、UT61 と UT64 の全 DNA を *Eco*RI 消化したものに対して、1 本のバンドしか認められなかった（データは示さない）。Tn5 には、*Eco*RI 認識部位は存在せず、このことは、UT61 と UT64 のゲノムにはそれぞれ 1 コピーずつの Tn5 の挿入が起こっていることを示している。

UT61 と UT64 は、共に LinA 活性に欠陥を持つことから、*linA* 遺伝子に Tn5 の挿入あるいは何らかの組換えが起こっていることが予想された。UT26 は、比較的高頻度で *linA* 周辺領域の欠失により γ -HCH 分解能を失うことがわかっており [今井亮三, 1990]、Tn5 の挿入以外で変異が引き起こされている可能性も考えられた。そこで次に、*linA* 遺伝子を含む 1.2-kb *Hinc*II 断片をプローブとした UT61 と UT64 の全 DNA に対するサザン解析を行った。結果を Fig. 1-3a に示す。いずれの場合もバンドが認められ、単に *linA* 遺伝子の欠失により活性が失われているのではないことがまず明らかになった。UT64 の全 DNA を *Hind*III で消化したものに対しては、4.8-kb と 2.5-kb の 2 本のバンドが検出された。これは、UT64 の *linA* 遺伝子内の 3' 側領域に Tn5 が挿入したと考えるとよく一致する結果であり、UT64 の *linA* 周辺領域の遺伝子構造は、Fig. 1-3b の様に予想される。これに対して、UT61 では、8.0-kb と 4.8-kb の 2 本のバンドが検出された。この結果は、Tn5 の挿入だけでは説明することができないが、バンドの大きさより、Fig. 1-3b において Tn5 挿入部より右側下流の断片に組換えが生じてサイズが大きくなったことが考えられる。また、この断片においてプローブと相同な領域は僅かであり、UT64 では弱いシグナルを与えているが UT61 では強いシグナルとなっていることを考えると、この大きくなった断片には *linA* の構造遺伝子が重複して存在し、この遺伝子が UT61 の弱い LinA 活性の原因となっている可能性も考えられる。いずれにせよ、UT61 の遺伝子構造については更に詳細な解析が必要であるが、本研究の目的とは直接関係がないと思われたため、それ以上の解析は行わなかった。

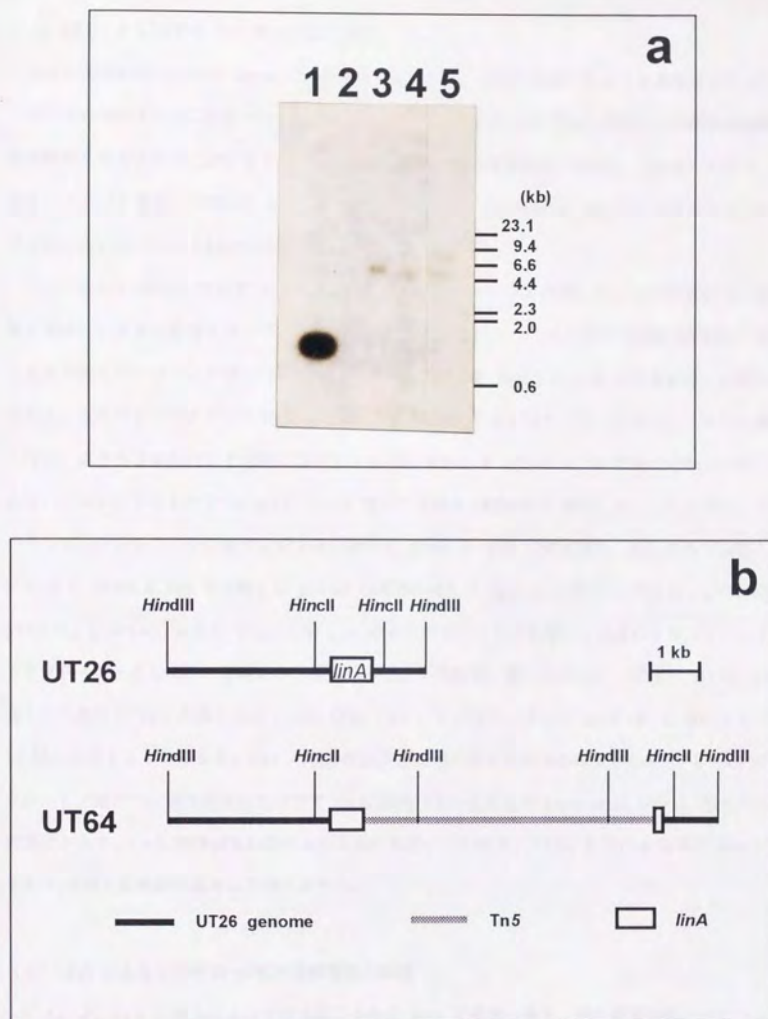


Fig. 1-3. Structure of the *linA*-containing DNA fragments of UT26 and UT64.

(a) Total DNAs from UT26, UT64, and UT61 were digested with *Hind*III, electrophoresed, blotted, and hybridized with a 1.2-kb *Hinc*II fragment (containing *linA*) as a probe. Lanes: 1, 1.2-kb *Hinc*II fragment; 2, lambda DNA digested with *Hind*III; 3, total DNA from UT26; 4, total DNA from UT64; 5, total DNA from UT61. (b) Proposed structure of mutagenized *Hind*III fragment of UT64, as compared with the *linA*-containing 5-kb *Hind*III fragment of UT26.

(3) UT61 と UT64 の Tn5 挿入部位の決定

Tn5 の両端には inverted repeat が存在する (Fig. 1-4)。これに相補するような適当なオリゴヌクレオチドを合成すればこれをプライマーとして用いることによって Tn5 が挿入した部位の両側の塩基配列を決定することができる。そこで、Tn5 の両端の塩基配列 (IS50L、IS50R) の中で、左端から 78~97 番目、右端から 41~60 番目の配列と相補する様な 20 mer のオリゴヌクレオチド 5'-GTCAGATCCTGGAAAACGGG-3' を合成した。

次に、*E. coli* HB101 中に UT61 及び UT64 のコスミドバンクを作製した。この中から Km 耐性株を選択し、任意に数株を選んでプラスミドを回収した。Tn5 の挿入部位の両側の配列を十分な大きさで含んだクローンを得るため、これらのプラスミドを *EcoRI* と *Sall* で二重消化した断片に対して、上述のオリゴヌクレオチドを末端ラベル化したものをプローブとしてサザンブロット解析を行い、適当な 2 本のバンドを生じるプラスミドを UT61 と UT64 についてそれぞれ一つずつ選んだ。UT61 由来のものを pKS613、UT64 由来のものを pKS645 と命名した。これらから、上述のオリゴヌクレオチドと交雑する計 4 種の断片を *EcoRI* と *Sall* で切り出し、*Sall* のみで切断した pUC18 と *EcoRI* と *Sall* で切断した pUC18 の両方に対して ligation を行い、pTM61L、pTM61S、pTM64L、pTM64S を得た (Fig. 1-5)。この 4 つのプラスミドを用い、上述のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてシーケンシングを行った。その結果、驚いたことに、UT61、UT64 は、全く同じ部位に Tn5 が挿入されていた (Fig. 1-6)。この挿入によって LinA は、C 末のアミノ酸 22 個が欠落することになる。*linA* の塩基配列決定の際に得られた deletion mutant でも *linA* の C 末のアミノ酸が 10 個程度削れただけで LinA 活性は失われたため [Imai *et al.*, 1991]、恐らくこの欠失によって、LinA 活性は失われるものと思われる。この結果、UT61 と UT64 は共に *linA* に関する Tn5 挿入変異株であることが示された。

(4) LinA による UT64 の γ -HCH 分解活性の相補

UT64 は、Tn5 の挿入によって引き起こされた *linA* 変異株であり、他の変異は起こっていないことが強く示唆されたので、その粗酵素抽出液の γ -HCH、 γ -PCCH 分解活性を検討し、更に、粗酵素抽出液に精製した LinA [Nagata *et al.*, 1993] を加えることによって活性が回復されるか否かの検討を行った。

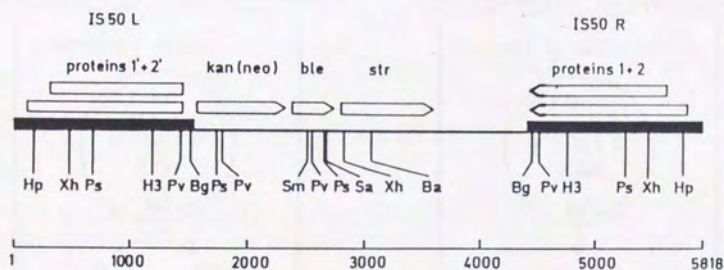


Fig. 1-4 Physical map of Tn5.

The abbreviations used for restriction enzymes are as follows: Hp, *Hpa*I; Xh, *Xho*I; Ps, *Pst*I; H3, *Hind*III; Pv, *Pvu*II; Bg, *Bgl*II; Sm, *Sma*I; Sa, *Sal*I; Ba, *Bam*HI. The position of the coding regions for the Tn5-encoded proteins, and their direction of transcription is indicated by open arrows. Proteins 1+2 are involved in Tn5 transposition, and proteins 1' + 2' represent truncated versions of 1+2. The data presented are taken from reference [de Bruijn, 1987]. The scale provided is in base pairs.

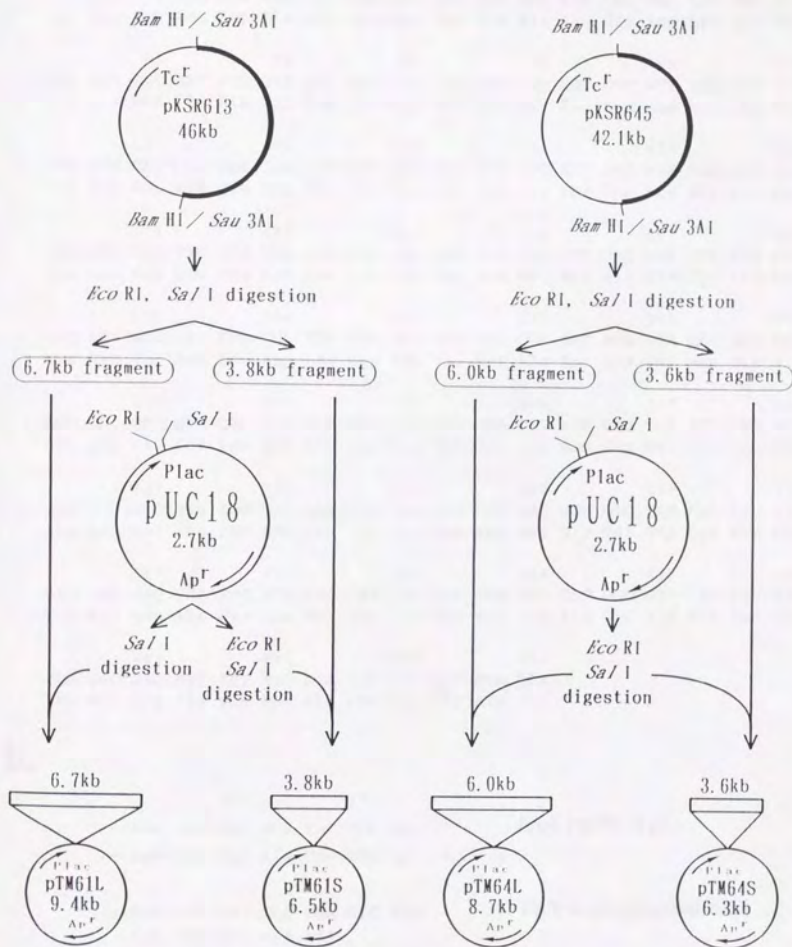


Fig. 1-5 Construction of plasmid, pTM61L, pTM61S, pTM64L, and pTM64S.

a.

9	18	27	36	45	54
ATG AGT GAT CTA GAC	ATA CTT GCA AGC	CGG GCC GCG ATT	CAG GAC CTC TAC	TCT	
Met Ser Asp Leu Asp	Ile Leu Ala Ser	Arg Ala Ala Ile	Gln Asp Leu Tyr	Ser	
63	72	81	90	99	108
GAC AAG CTC ATT GCC	GTA GAC AAG CGC	CAA GAG GGC CGT	CTC GCT TCT ATT	TGG	
Asp Lys Leu Ile Ala	Val Asp Lys Arg	Gln Glu Gly Arg	Leu Ala Ser Ile	Trp	
117	126	135	144	153	162
TGG GAT GAT GCA GAG	TGG ACC ATT GAG	GGA ATC GGC ACC	TAC AAG GGC CCG	GAA	
Trp Asp Asp Ala Glu	Trp Thr Ile Glu	Gly Ile Gly Thr	Tyr Lys Gly Pro	Glu	
171	180	189	198	207	216
GCG CTC GAT TTG GCC	AAT AAC GTA CTC	TGG CCA ATG TTT	CAC GAA TGT ATT	CAT	
Ala Leu Asp Leu Ala	Asn Asn Val Leu	Trp Pro Met Phe	His Glu Cys Ile	His	
225	234	243	252	261	270
TAT GGA ACC AAT CTG	CGC TTG GAA TTT	GTG AGC GCG GAC	AAG GTA AAT GGT	ATT	
Tyr Gly Thr Asn Leu	Arg Leu Glu Phe	Val Ser Ala Asp	Lys Val Asn Gly	Ile	
279	288	297	306	315	324
GGC GAC GTC CTT CTC	CTT GGA AAT CTC	GTC GAA GGT AAT	CAG TCG ATT CTT	ATC	
Gly Asp Val Leu Leu	Leu Gly Asn Leu	Val Glu Gly Asn	Gln Ser Ile Leu	Ile	
333	342	351	360	369	378
GCT GCG GTC TTC ACG	GAT GAG TAT GAG	CGB CGT GAC GGG	GTG TGG AAG TTC	TCT	
Ala Ala Val Phe Thr	Asp Asp Glu Tyr	Glu Arg Arg Asp	Gly Val Trp Lys	Phe Ser	
387	396	405	414	423	432
AAG CGC AAC GCA TGC	ACG AAC TAT TTC	ACC CCG CTG GCC	GGC ATT CAT TTC	GCA	
Lys Arg Asn Ala Cys	Thr Asn Tyr Phe	Thr Pro Leu Ala	Gly Ile His Phe	Ala	
441	450	459	468		
CCG CCC GGC ATT CAT	TTC GCA CCG TCC	GGC GCA TAA			
Pro Pro Gly Ile His	Phe Ala Pro Ser	Gly Ala ***			

b.

387	396	
---AAG CGC AAC GCA TGC ACG AAC---	<i>linA</i> (wild type)	
---Lys Arg Asn Ala Cys Thr Asn---		
---AAG CGC AAC GCC TGA CTC TTA---	<i>Tn5</i> -mutagenized <i>linA</i>	
---Lys Arg Asn Ala ***		

Fig. 1-6 Inserted site of Tn5 in the *linA* gene.

(a) The nucleotide and amino acid sequences of the *linA* gene of UT26 are shown. The inserted site of Tn5 in *linA* is indicated by a white bold arrow. This site was the same in UT61 and UT64. A direct repeat sequence is indicated by fine arrows. (b) A part of the *linA* sequence in UT26 (upper part) and Tn5 mutagenized sequence in UT61 and UT64 (lower part). *** indicates the termination codon.

UT64 の粗酵素抽出液のみでは、菌体そのままで分解活性を検討した場合と同様、 γ -HCH を全く分解することができなかった。驚いたことに、有機合成した γ -PCCH についても、ほとんど分解することはできなかった。更に長時間反応させたところ、非常にゆっくりながらも UT64 の粗酵素抽出液のみで γ -PCCH は分解されたが、UT26 本来の代謝産物である Compound B のピークは生じず、代わりに Compound B' のピークが生じた (Fig. 1-7a)。

次に、UT64 の粗酵素抽出液 (約 180 μ g のタンパク質を含む) に精製した LinA (約 9.5 μ g) を加えたところ、混合液は UT26 の粗酵素抽出液 (Fig. 1-7b) と同様の γ -HCH 分解活性を示した (Fig. 1-7c)。有機合成した γ -PCCH についても、UT26 の粗酵素抽出液 (Fig. 1-7d) では生じない Compound B' のピークは依然生じるものの、Compound B (Compound B')、Compound C のピークを生じる本来の分解活性が回復された (Fig. 1-7e)。Compound B'、Compound B' がどのような物質であると考えられるかについては考察で述べる。

以上の結果より、LinA は γ -HCH から γ -PCCH を生じる最初の反応だけでなく、 γ -PCCH から Compound B を生じる次の反応にも必要であることが明らかになった。また、精製した LinA には Compound B を生じさせる活性がないことから、UT64 の粗酵素抽出液中に含まれる LinA 以外の何らかの因子もこの活性に必要であることも示された。

1-4. 考察

本章において、UT26 に Tn5 mutation を導入する系を構築し、実際にこの系を用いて LinA 活性に欠陥を持つ mutant の取得に成功した。LinA 活性に欠陥を持つ mutant としては、2 種類の異なる表現型を示す株 UT61、UT64 が分離された。UT64 は、LinA 活性を全く失っていたが、UT61 は、弱いながらも依然 LinA 活性を保持していた。Tn5 挿入部位のクローン化と解析の結果、どちらの株も *linA* 遺伝子に Tn5 が挿入したことにより LinA 活性に欠陥が生じていることが示されたが、興味深いことにどちらの株も *linA* 遺伝子の同じ部位に Tn5 の挿入が起こっていた。Tn5 の挿入部位については、一般にランダムであると考えられているが、Tn5 の末端の塩基配列と相同な配列を持つ部位には、挿入が起こりやすいことが報告されている [de Bruijn *et al.* 1984]。今回明らかにした *linA* 遺伝子内の挿入部位には、そのような塩基配列を同定することはできなかったが、この領域に Tn5 が挿入しやすい hotspot の様なものが存在している可能性も考えられる。

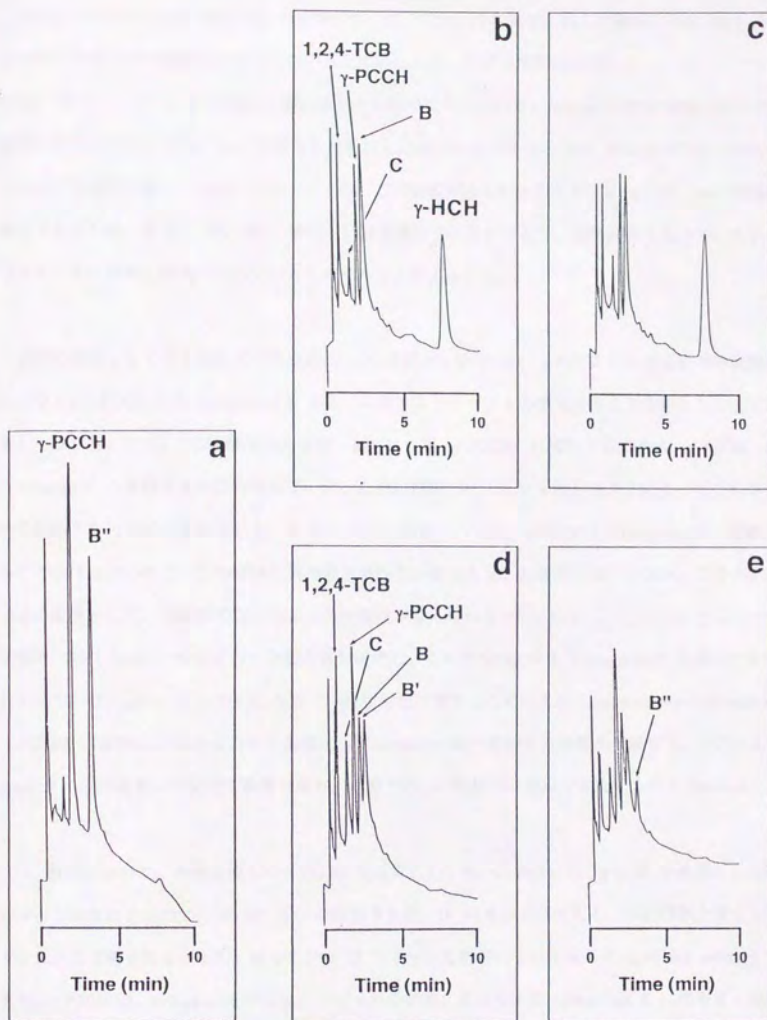


Fig. 1-7 Gas chromatogram of the metabolized products after *in vitro* incubation.

GC analysis was done as described in Materials and Methods. (a), γ -PCCH incubated with UT64 crude extract for 12 hours; (b), γ -HCH incubated with UT26 crude extract for 10 min; (c), γ -HCH incubated with UT64 crude extract plus partially purified LinA protein for 10 min; (d), γ -PCCH incubated with UT26 crude extract for 10 min; (e), γ -PCCH incubated with UT64 crude extract plus partially purified LinA protein for 10 min.

UT64 の変異は Tn5 の挿入のみで説明がつくが、UT61 の変異は、Tn5 の挿入と共に *linA* 遺伝子の周辺で何らかの組換えが起こっていると考えられる。サザン解析の結果より、UT61 では、UT26 (WT) にみられる 2.5-kb の弱いシグナルのバンドの代わりに 8.0-kb の比較的強いバンドが観察された。このことは、Tn5 が挿入したものと異なるもう一つの *linA* 遺伝子が下流に存在している可能性を示唆している。ただし、もし、この仮説が正しいとしても、UT61 の LinA 活性は微弱であるため、もう一つの *linA* 遺伝子は構造遺伝子に変異が入り、活性が弱くなっているか、プロモーター領域に変異が入っているものであると考えられる。

本章の成果として最も注目すべき点は、LinA 活性が γ -HCH から γ -PCCH を生じる最初の段階だけでなく、 γ -PCCH から Compound B を生じる次のステップにも必須であることを示したことである。すなわち、UT64 の粗酵素抽出液は γ -HCH を γ -PCCH に変換する活性も、 γ -PCCH を Compound B へ変換する活性も持たないが、これに精製した LinA を加えることによってこの2つの段階のどちらの活性も回復した。ただし、LinA 活性のみでは、 γ -PCCH を Compound B へ変換することはできないので、この段階に他の酵素活性も必要であることは言うまでもない。このメカニズムの説明として、現段階では次の2つの可能性が考えられる (Fig. 1-8)。1) LinA ともう一つの酵素 (仮に LinB と命名する) が複合体を構成し、これが γ -PCCH を Compound B へ変換する活性を持つ。2) LinA が γ -PCCH をもう一回脱塩化水素することにより tetrachlorocyclohexadiene (TCCH) に変換し、LinB はこれを基質として Compound B へ変換する活性を触媒する。TCCH は、diene タイプの非常に不安定な物質であり、本章での GC 解析では検出できないものと思われる。

GC 解析において、有機合成した γ -PCCH を基質として用いた場合には、 γ -HCH を基質とした際にはみられない2つのピーク (B', B'') が観察された。B' はゆっくりと生じ、反応時間を長くしてもそれ以上分解されなかった。従って、B' はマイナーな酵素によって生じる dead-end product であり、 γ -PCCH は、UT26 においては、メジャーな酵素によって主に Compound B に効率よく変換されているために観察されないものと考えられる。また、B'' は、UT64 の粗酵素抽出液に LinA を加えた場合にも観察されたことから、本章で用いた再構成系は、完全には UT26 の活性を再現していないと思われる。一方、B' は、反応の過程を通じて B との相対量が大まかに一定であったことから、B の立体異性体ではないかと思われる。 γ -PCCH からの反応においては、 γ -HCH からの反応では観察されない立体異性体が生じている様である。 γ -PCCH は、立体化学的には異なる形を取り得るために、有機合成した γ -PCCH はこれらの混合物となっており、こうしたピークが生じるも

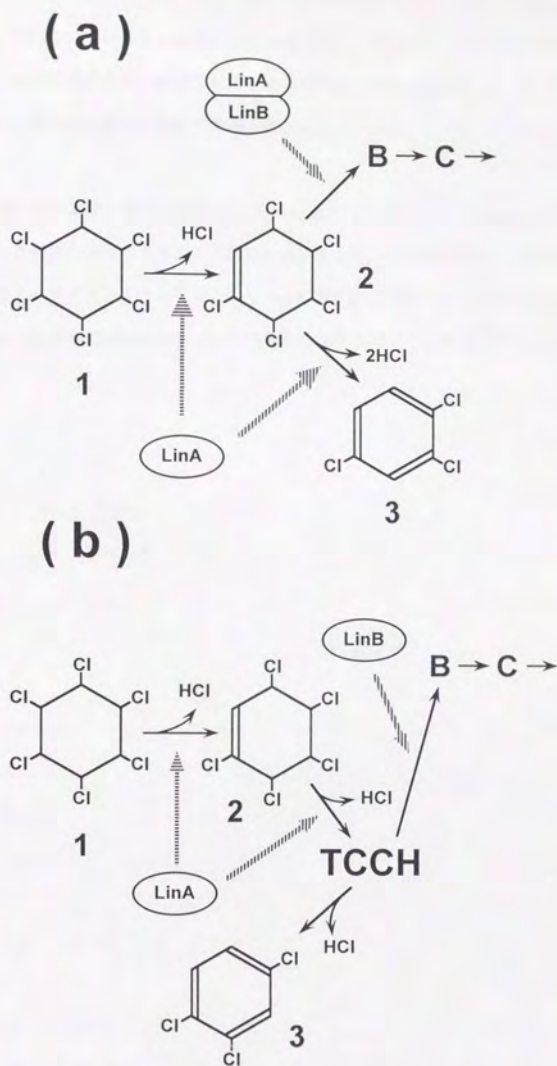


Fig. 1-8 Two possible pathways for the early steps of γ -HCH degradation in UT26.

(a) LinA and LinB form a complex which converts γ -PCCH to compound B. (b) LinA converts γ -PCCH to TCCH, then LinB converts TCCH to Compound B. compounds: 1, γ -HCH; 2, γ -PCCH; 3, 1,2,4-TCB. Compounds B and C have not been identified.

のと推察される。UT26 における γ -HCH からの反応で生じる γ -PCCH は、化学的に安定な 2 つの立体異性体のうち一つの立体異性体に限定されているようであり [Nagasawa et al, 1993]、LinA が単に化学的な反応とは異なる生物学的な反応であることを示している。

最後に、繰り返しになるが、本章の結論として、LinA が γ -PCCH から Compound B の反応に直接関与していることが明らかとなった。この反応に必要なもう一つの酵素遺伝子（仮想 *linB*）をクローン化する方法としてバックグラウンドとして LinA 活性を持つ宿主に UT26 の遺伝子ライブラリーを導入し、 γ -HCH から Compound B を生じる活性を有するクローンを選択する方法が考えられる。

第2章

1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene (1,4-TCDN) halidohydrolase (LinB) 遺伝子のクローン化とその性質

2-1. 緒言

前章において、 γ -PCCH から Compound B を生じる反応においても LinA 活性が必要であることが明らかになった。また、LinA だけではこの活性を持たないので、当然他の酵素活性も必要である。本章においては γ -PCCH から Compound B を生じる反応に必要な *linA* 以外の酵素遺伝子のクローン化を行った。その際、前章の結果を考慮し、LinA活性をバックグラウンドとして持つ *Pseudomonas putida* PpY101 を作製し、これに UT26 のコスミドライブラリーを導入し目的の活性を持つクローンを GC で検出するという方法を用いた。

また、本研究と平行して住友化学工業(株)の長沢、菊地らと共に UT26 における γ -HCH の代謝産物の同定ならびに代謝経路の推定を行っている [Nagasawa *et al.*, 1993a; Nagasawa *et al.*, 1993b]。内容については本研究の範囲ではないので省略するが、本章以降の本研究と深く関わる重要な研究であるので、以下にその結論のみを述べておく。共同研究における重要な成果は2点ある。第1の点は 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol (2,5-DDOL) と 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ) を新たに UT26 における γ -HCH の好氣的分解代謝産物として同定し、分解代謝経路を Fig. 2-1 の様に推定したことである。これにより、前章で示したモデル (Fig. 1-8) のうち、(b) のモデルが正しいことが示唆された。すなわち、仮想 LinB は LinA の作用で γ -PCCH より生じた化学的に不安定な物質、1,4-TCDN を基質とし、2,5-DDOL までの変換を触媒すると考えられる。第2の点は UT26 に 2,5-DCHQ を加えて培養した際の dissolved organic carbon (DOC) 量を測定することにより、UT26 が 2,5-DCHQ を無機化できることを示した点である。これによって、推定分解経路が確かに UT26 における主要な γ -HCH の分解資化経路であることが強く示唆された。これらの成果は本研究を進める途上で明らかになったものであるが、便宜上本章以降では既に明らかになったものとして扱うことにする。

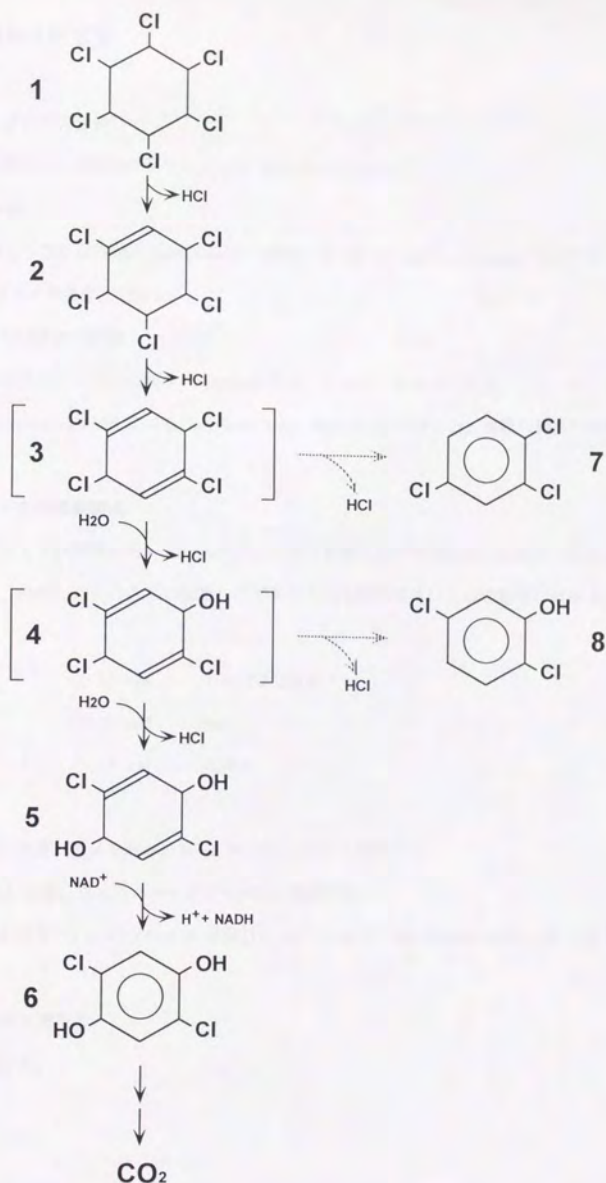


Fig. 2-1 Proposed assimilating pathway of γ -HCH by *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Compounds: 1, γ -HCH; 2, γ -PCCH; 3, 1,4-TCDN; 4, 2,4,5-DNOL; 5, 2,5-DDOL; 6, 2,5-DCHQ; 7, 1,2,4-TCB; 8, 2,5-DCP.

2-2. 材料および方法

(1) 菌株およびプラスミド

本章で新たに使用した菌株及びプラスミドを Table 2-1 に示した。

(2) GC-MS 分析

GC-MS 分析は、GCMS-QP1000 spectrometer (島津) と DB-17 capillary column (J&W Science) を用いて、Table 2-2 の条件で行った。

(3) Deletion mutant の作製

プラスミド上にクローン化した断片の deletion には、キョーエンスデリーションキット (宝酒造) を用い、exonuclease III による uni-directional deletion 法で行った。実際の操作は添付の説明書に従った。

(4) プラスミドの迅速調製法

欠失変異プラスミド作製時など、プラスミドのサイズを調べるだけの目的には簡単に迅速な以下の方法を用いた。ただし、この方法で調製したプラスミドは制限酵素による切断等には適さない。

試薬

STE buffer	10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

操作

- ① 爪楊枝の先に少量の菌体を取り、30 μ l の STE buffer に懸濁する。
- ② 軽く vortex した後、フェノール・クロロホルム処理する。
- ③ 水槽 15 μ l を取り、1 μ l の RNase A 溶液 [10 mg / ml in 50 mM Acetate buffer (pH 5.0)] を加える。
- ④ 室温で 2 分間放置する。
- ⑤ 電気泳動を行う。

Table 2-1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>P. putida</i>		
PpY101	met, NaI ^r	[Kimbara, 1989]
PpY101LA	met, NaI ^r chromosome::Tn5 (Ble ^r): <i>linA</i>	This study
PB401	PpY101LA carrying pKSR401	This study
<i>Pseudomonas</i> strain		
KKS102	BPH ⁺	[Kimbara, 1988]
<i>E. coli</i>		
MV1190	$\Delta lac-proAB\ thi\ supE\ \Delta srl-recA306::Tn10\ F'\ traD36\ proAB\ lac^r\ \Delta \Delta M15$	[Vieira,]
Plasmids		
pKTY320::Tn5::: <i>linA</i>	Ap ^r , Km ^r , Str ^r , Ble ^r ::: <i>linA</i>	This study
pKSR401	pKS13 with 34-kb UT26 DNA containing <i>linB</i>	This study
pMFY42	RSF1010 replicon, Km ^r , Tc ^r	[福田雅夫, 1989]
pYNA10	pMFY42 carrying 8-kb <i>Bgl</i> II fragment of pKSR401	This study
pUC118	pMB9 replicon, Ap ^r	[Vieira, 1987]
pUC119	pMB9 replicon, Ap ^r	[Vieira, 1987]
pMA1	pUC118 carrying 5-kb <i>Hind</i> III fragment of pKSR1	[Imai, 1991]
pYNA1	pUC118 carrying 8-kb <i>Bgl</i> II fragment of pKSR401	This study
pYNA1250	pYNA1 derivative	This study
pYNA1116	pYNA1 derivative	This study
pYNA2	pUC118 carrying 5.5-kb <i>Pvu</i> II fragment of pYNA10	This study
pYNA3	pUC118 carrying 3.3-kb <i>Eco</i> RI fragment of pYNA1	This study
pYNA3118	pYNA3 derivative	This study
pYNA3346	pYNA3 derivative	This study
pYNA4	pUC119 carrying 1.3-kb <i>Bgl</i> II- <i>Hpa</i> I fragment of pYNA1; direction of <i>linB</i> is opposite to that of <i>lac</i> promoter of pUC119	This study
pYNA4R	pUC119 carrying 1.3-kb <i>Bgl</i> II- <i>Hpa</i> I fragment of pYNA1; direction of <i>linB</i> is identical with that of <i>lac</i> promoter of pUC118	This study
pAQN	pMB9 replicon, <i>lacI^r aqn</i> , Ap ^r	[Terada, 1990]
pMYLB1	pAQN carrying <i>linB</i> in place of <i>aqn</i>	This study
pMK35	pMFY571 carrying 3.5-kb fragment containing <i>linA</i> and its promoter region, Km ^r	[今井亮三, 1990]

BPH⁺, grown on biphenyl; *aqn*, aqualysin I gene of *Thermus aquaticus*.

Table 2-2. Condition for GC-MS analysis

Column	DB-17 capillary column (1.0 μ m thick by 30 m)
Column Temperature	100 °C to 260 °C (10 °C / min)
Injection Temperature	260 °C
Gas flow rate	30 ml / min

(5) 遺伝子産物の *E. coli* 内での大量発現

本学の酵素学研究室でアクアライシンの大量発現に用いたプラスミド、pAQN [Terada *et al.*, 1990] を分与して頂き、アクアライシン遺伝子を *EcoRI*, *HindIII* で切り出して、そこに各遺伝子を挿入し、大量発現用プラスミドを作製した。本プラスミドは *lacI^s* を組み込んでいるため、非誘導時の発現がほとんど抑えられている点、pUC 系の *ori* を持つためにコピー数が増大している点で従来型の *tac* 発現ベクターに優っている。こうして作製したプラスミドを利用して *tac* プロモーター下においた各遺伝子を IPTG を用いて誘導発現させ、産物を SDS-PAGE で確認した。

試薬

Sample buffer	0.125 M	Tris-HCl (pH 6.8)
	2 %	SDS
	10 %	glycerol
	0.2 %	2-mercaptoethanol
	0.01 %	bromophenol blue (BPB)

操作

- ① 目的遺伝子を *tac* プロモーター下を持つプラスミドで *E. coli* MV1190 を形質転換する。
- ② 形質転換したコロニーをかきとり 10 ml の L 培地 (Ap を含む) に植菌する。OD₅₅₀ = 0.6 まで培養し、IPTG を最終濃度 5 mM となるように加える。コントロールには IPTG を加えない。
- ③ 3 時間培養を続け、発現を誘導する。
- ④ 培養液 1 ml 中に含まれる菌体を遠心により集菌した後、Sample buffer 100 μ l に溶解する。
- ⑤ 5 分間煮沸する。
- ⑥ 5 ~ 15 μ l を SDS-PAGE する。

(6) SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli の方法 [Laemmli, 1970] に従って行った。

試薬

30 % アクリルアミド溶液	29.2 g	acrylamide
(100 ml)	0.8 g	bis-acrylamide
泳動用緩衝液	3 g	Tris
(1000 ml)	14.4 g	glycine
	1 g	SDS

分離ゲル用緩衝液	1.5 M	Tris-HCl (pH 8.8)
	0.4 %	SDS
濃縮ゲル用緩衝液	0.5 M	Tris-HCl (pH 6.8)
	0.4 %	SDS
染色液	0.05 %	Coomassie Brilliant Blue R-250
	50 %	methanol
	10 %	acetic acid
脱染色液	10 %	methanol
	10 %	acetic acid

操作

- ① 分離ゲルを作製する。特に記述のない限り 12.5 % アクリルアミドゲルを用いた。4.2 ml の 30 % アクリルアミド溶液、2.5 ml の分離ゲル用緩衝液、3.3 ml の蒸留水を混ぜ合わせる。これに、30 μ l の過硫酸アンモニウム溶液と 10 μ l の TEMED を加え、ゲル板に流し込む。上部にブタノールを重層して、空気中の酸素との接触を断つ。30 ~ 60 分後にゲルが固まったら、上部のブタノールを蒸留水で洗い流し、残った水をできるだけ除去する。
- ② 濃縮ゲルを作製する。0.75 ml の 30 % アクリルアミド溶液、1.25 ml の濃縮ゲル用緩衝液、3.0 ml の蒸留水を混ぜ合わせる。これに、15 μ l の過硫酸アンモニウム溶液と 10 μ l の TEMED を加え、分離ゲル上に重ねる。コームを挿し込み、試料穴を作製する。
- ③ 試料穴に試料をのせ、20 mA で dye front がゲルの下端 5 mm 程度に達するまで電気泳動を行う。
- ④ 耳付きのゲル板を剥がし、濃縮ゲルを切り取ってから、ゲルをゲル板から水中ですばやく剥く。
- ⑤ 水を捨て、染色液に浸して 65 $^{\circ}$ C で 20 ~ 30 分放置する。
- ⑥ 染色液を捨て、軽く水洗いしてから脱色液に浸し、65 $^{\circ}$ C で 20 ~ 30 分放置する。
- ⑦ 脱色液を交換し、室温で緩やかに振とうしながらバックの染色液を除く。
- ⑧ 3 % グリセロール液に移し、2 時間以上室温で緩やかに振とうする。
- ⑨ ゲルドライヤーを用いて、濾紙にゲルを固定する。

(7) 休止菌体調製法

Dehalogenase 活性を測定する際に、本章で用いた休止菌体は以下の方法で調製した。

試薬

M 培地	1.5 g	KH_2PO_4
	1.5 g	Na_2HPO_4
	4.0 g	NH_4NO_3
	10 mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	10 mg	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	5 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	5 mg	Yeast extract
		(pH 7.0)

蒸留水で 1000 ml に fill up する。

操作

- ① NaCl を含まない L 培地で菌体を培養する。
- ② リン酸バッファー (50 mM KH_2PO_4 -KOH, pH 7.2) で 3 回洗浄する。
- ③ M 培地に 菌体湿重量が 50 mg / ml になるように懸濁する。これを休止菌体として用いる。
- ④ 休止菌体 3 ml に、基質を 20 μmol / ml 加える。
- ⑤ 24 時間激しく振とうする。
- ⑥ 遠心後、上清 1 ml の塩素イオン濃度を定量する。

(8) 塩素イオン濃度測定法

塩素イオン濃度の測定は、チオシアン酸第二水銀比色定量法 [Iwasaki et al, 1952] で行った。

試薬

FAS	6 g	$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
	6 N	HNO_3 で 100 ml に fill up する。
Hg solution	0.3 g	$\text{Hg}(\text{SCN})_2$
	100 %	ethanol で 100 ml に fill up する。

操作

- ① (6) で作製したサンプル 1 ml をエッペンドルフチューブに取る。
- ② 100 μl Hg solution を加える。
- ③ 200 μl FAS を加え、よく混合する。
- ④ 室温で 10 分間放置した後に、460 nm の吸光度を測定する。
- ⑤ 定量は、KCl, KBr, KI を用いて作製した検量線を使って行った。

(9) 塩基配列の accession number

本章で明らかにした *linB* 遺伝子の塩基配列は、DDBJ, EMBL, GenBank nucleotide sequence data base に登録しており、accession number は D14594 である。

2-3. 結果

(1) *linA* 遺伝子を保持する *P. putida* の作製

不安定な基質である 1,4-TCDN の 2,5-DDOL への変換に関与すると考えられる仮想 *linB* 遺伝子のクローン化を目的として、コスミドクローンの活性を GC で直接検討する際の宿主として用いるために *LinA* 活性を安定に発現する *P. putida* PpY101 株を作製した。前章で作製したプラスミド pKTY320::Tn5 (Fig. 1-1) を *Sma*I で消化し、*linA* を含む 2.4-kb *Nco*I-*Bam*HI 断片を末端平滑化したものを挿入した。2.4-kb *Nco*I-*Bam*HI 断片は *linA* 構造遺伝子と *linA* が *E. coli*, *P. putida* 内で発現するのに必要な *linA* 本来のプロモーターを含んでいる [今井亮三, 1990]。こうして作製したプラスミドを pKTY320::Tn5::*linA* (Fig. 2-2) と命名し、*P. putida* PpY101 に三親接合伝達で導入し、Km 耐性株を Km と Nal を含むプレート上で選別した。pKTY320 は *P. putida* 中で複製できないので、これらの株は Tn5::*linA* を少なくとも 1 コピー、ゲノム中にも含むものと期待される。これらのうち 1 株を *P. putida* PpY101LA と命名し、以下の研究に用いた。この株は元株である *P. putida* PpY101 と比べて、*LinA* 活性の発現以外には明らかな生育速度の違い等、表現型の違いはみられなかった。また、この株は *LinA* 活性を安定に発現し、OD₅₅₀ = 0.6 の培養液 1 ml では 30 min で 0.23 µg の γ -HCH を分解した。

(2) *LinB* 活性を有するコスミドクローンの取得

広宿主域コスミドベクター pKS13 を用いて、前章で述べた方法で UT26 のジーンライブラリーを *E. coli* HB101 中に作製した。それぞれのクローンを三親接合伝達で *P. putida* PpY101LA に導入した。この *P. putida* PpY101LA 中に作製したジーンライブラリー 1,350 クローンから、*LinB* 活性を有するクローンを GC (ECD) で検索した結果、4 個のポジティブクローンが得られた。PB401 に代表されるこれらのクローンは γ -HCH を Compound II (retention time [RT] = 2.2 min) を経て Compound I (RT = 1.0 min) と Compound III (RT = 3.1 min) に変換する活性を示した。Compound I, II, III の RT は、それぞれ 1,2,4-TCB, γ -PCCH, 2,5-DDOL (UT26 によって γ -HCH から生じたもの) の RT と一致した。Compound I は PB401 によっても、UT26 によってもそれ以上分

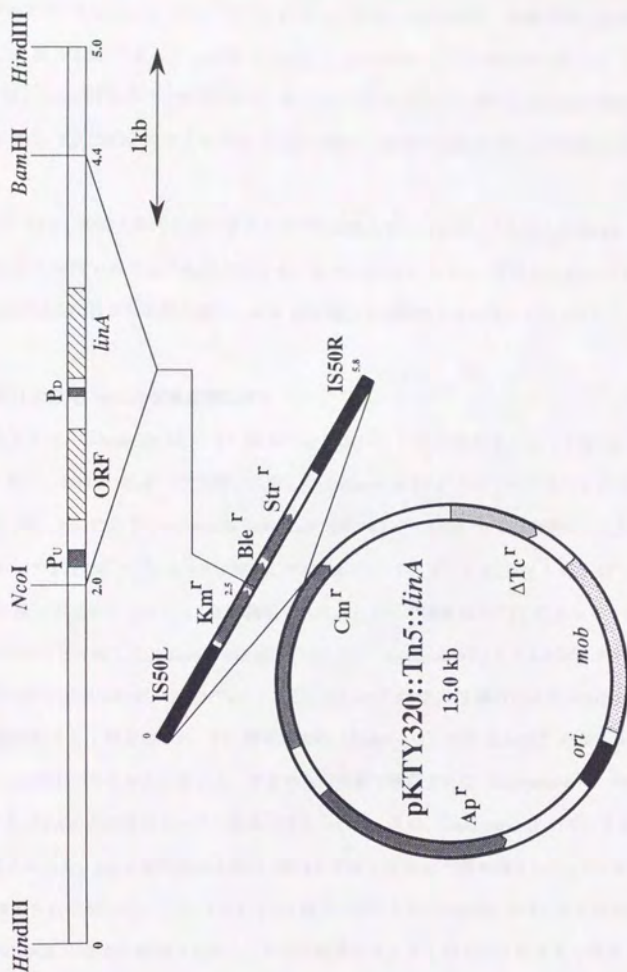


Fig. 2-2 Restriction map of plasmid, pKTY320::Tn5::linA

The 2.4-kb *Nco*I-*Bam*HI fragment was inserted at the *Sma*I site of pKTY320::Tn5. The size of plasmid is 13.0-kb.

解されなかったが、Compound III は UT26 によって完全に分解された。次節で詳しく述べるが、Compound III は UT26 によって γ -HCH から生じる 2,5-DDOL とその特徴が一致した。1,2,4-TCB と γ -PCCH は、LinA 活性だけで生じるので、新しくクローン化された断片には LinA 活性の存在下で γ -PCCH から 2,5-DDOL を生じる活性 (LinB 活性) を触媒する酵素遺伝子が存在していると考えられる。

PB401 は 34-kb の挿入断片を持つプラスミドを保持していたので、これを pKSR401 と命名した。pKSR401 を保持する *P. putida* PpY101 も、*E. coli* HB101 も LinA 活性を示さなかった。このことは、pKSR401 に含まれる挿入断片上には *linA* 遺伝子が存在していないことを示している。

(3) PB401 による γ -HCH 分解産物の同定

前述したように、Compound III の RT は UT26 によって γ -HCH から生じた 2,5-DDOL の RT と一致した。更に、PB401 によって大量に生産した Compound III についてマスペクトルを測定した。結果を Fig. 2-3 に示す。molecular ion peak (M^+ ; $m/z = 180$) および複数の fragment peak ($M^+ - H$, $m/z = 179$; $M^+ - 2H$, $m/z = 178$; $M^+ - 4H$, $m/z = 176$; $M^+ - H_2O$, $m/z = 162$; $M^+ - H_2O - OH$, $m/z = 145$; $M^+ - H_2O - CO$, $m/z = 134$) が観察された。これらの特徴は UT26 によって γ -HCH から生じた 2,5-DDOL と一致した [Nagasawa et al, 1993b] ので、Compound III を 2,5-DDOL と同定した。

また、データは示さないが、1,2,4-TCB, γ -PCCH, 2,5-DCP も GC-MS 解析により PB401 による γ -HCH の代謝産物として同定された。GC 解析の条件 (Table 1-3) では 2,5-DCP の RT が 1.0 min であり、1,2,4-TCB のそれと一致する。すなわち、前節で観察された Compound I のピークは 1,2,4-TCB と 2,5-DCP の混合ピークであると考えられる。また、Compound II のピークが γ -PCCH であると考えられる。LinA 活性のみを持つ PB101 では γ -HCH の代謝産物として γ -PCCH と 1,2,4-TCB しか検出されなかった。一方、LinA, LinB 両方の活性を持つ PB401 ではこれらに加えて 2,5-DCP と 2,5-DDOL が新たに観察された。これらの結果は Fig. 2-1 の UT26 による γ -HCH の推定分解代謝経路を支持するものである。すなわち、 γ -HCH は LinA の作用で 2 段階の脱塩化水素を受け、化学的に不安定な中間体の 1,4-TCND を生じる。1,4-TCND は更に LinB の作用で 2 段階の水酸化反応を伴う脱塩素を受け、2,5-DDOL を生じる。1,2,4-TCB と 2,5-DCP は、それぞれ化学的に不安定な中間体である 1,4-TCND と 2,4,5-DNOL から spontaneous に生じていると考えられる。ただし、2,5-DDOL の標準物質が入手できなかったため定量的な解析は行わなかった。

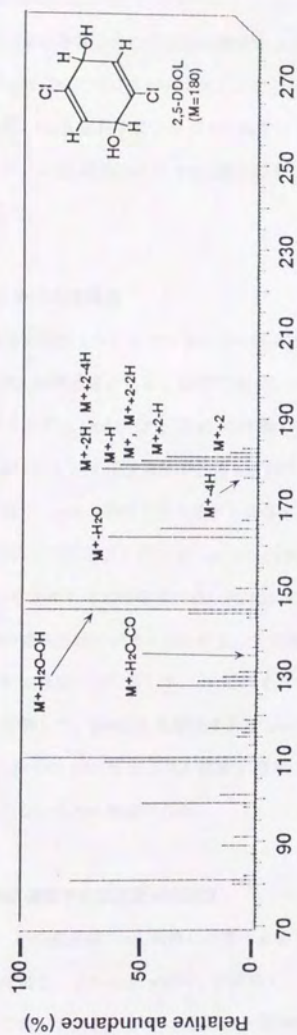


Fig. 2-3 Mass spectrum of Compound III. Compound III was identified as 2,5-DDOL. The ionization energy of MS was 70eV and the GC condition was described in Materials and Methods.

(4) *linB* 遺伝子のサブクローニング

pKSR401 を *Bgl*II で消化したところ、ベクターを含む 20-kb 以上の断片とサブクローン化に適した 3 つの断片 (8-, 5-, 1.8-kb) を生じた。これらの断片を RSF1010 由来の複製起点を持つ広宿主域ベクター pMFY42 の *Bgl*II site にサブクローン化し、*P. putida* PpY101LA に導入して LinB 活性の検討を行った。その結果、LinB 活性を持つクローンは全て 8-kb の挿入断片を持つ全長 19-kb のプラスミドを保持しており、LinB 活性はこの 8-kb 断片由来であると考えられたので、このプラスミドを pYNA10 と命名した。

(5) LinB 活性の *E. coli* 中での再構成

E. coli 中で直接 LinB 活性を検出することができれば今後の操作において非常に便利であるので、*E. coli* 中での LinB 活性の再構成を行った。前節で述べた pKSR401 由来の 8-kb *Bgl*II 断片を pUC118 に挿入してプラスミド pYNA1 (Fig. 2-4) を作製し、これを pMK35 を保持する *E. coli* MV1190 に導入した。pMK35 は *linA* 構造遺伝子と *E. coli* 中での発現に必要な *linA* 本来のプロモーターを含むプラスミドであり、pUC 系のプラスミドと共存することができる [今井亮三, 1990]。pYNA1 と pMK35 の両方のプラスミドを含む *E. coli* MV1190 は PB401 に比べて割合は少ないものの γ -HCH から 2,5-DDOL を生じる活性を示した。PB401 に比べて 2,5-DDOL が生じる割合が低い原因として LinA 活性の強さの違いが考えられる。すなわち、*P. putida* PpYLA が 30 分間で 0.23 μ g の γ -HCH しか分解できないのに対して、pMK35 を保持する *E. coli* MV1190 では 30 分間で 1 μ g 以上の γ -HCH を分解した。pMK35 を保持する *E. coli* MV1190 においては LinB に比べて LinA の相対活性が強く、多くの γ -HCH が 1,2,4-TCB に変換されてしまうために PB401 に比べて少量の 2,5-DDOL しか生じないものと推測される。

(6) deletion 解析と *linB* 遺伝子の塩基配列の決定

8-kb *Bgl*II 断片のうち、どの部分が LinB 活性に必要であるかを exonuclease III を用いて pYNA1 の deletion プラスミドを作製し、これらを pMK35 を保持する *E. coli* MV1190 に導入して LinB 活性を検討することによって調べた。Fig. 2-4 に deletion 解析の結果をまとめた。pYNA4 あるいは pYNA4R に含まれる約 1.1-kb の領域が LinB 活性に必要であることが明らかになった。次に、pYNA4 あるいは pYNA4R と pMK35 を保持する *E. coli* MV1190 を IPTG で処理したところ、pYNA4R を保持するものは IPTG で誘導をかけないものに比べて著しい量の 2,5-DDOL を γ -HCH から生じた。この結果より、*linB* 遺伝子の方向は Fig. 2-4 に示す様に推定された。

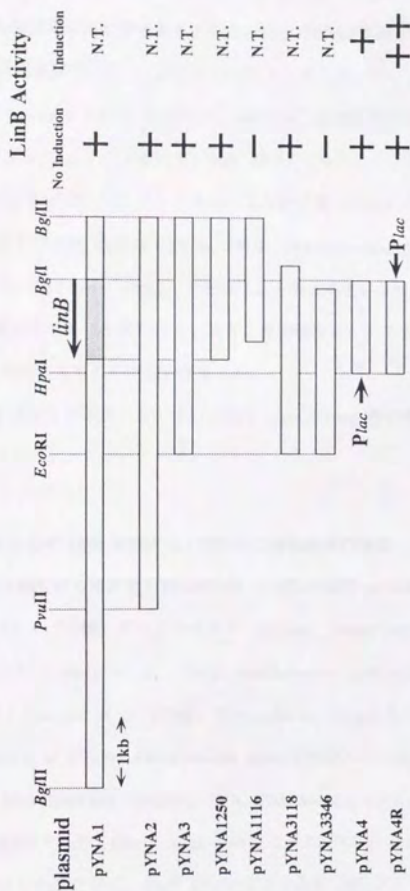


Fig. 2-4 Partial restriction map and deletion analysis of the 8.0-kb *Bgl*II fragment. The direction of transcription by the *lac* promoter of pYNA4 and pYNA4R are indicated by the short arrows. The procedure for the measurement of LinB activity and the conditions for induction are described in Materials and Methods. The deduced location and direction of the *linB* gene are indicated by the arrow above the partial restriction map of the 8.0-kb *Bgl*II fragment. N.T., not tested; *Plac*, *lac* promoter.

次に、この 1.1-kb の領域とその隣接する領域の両方の strand について塩基配列の決定を行った。結果を Fig. 2-5 に示す。1.1 kb の領域に重なる形で 885-bp の open reading frame (ORF) が見出された。また、この領域中には十分な大きさを持つ他の ORF は見出されなかった。この ORF の方向は IPTG による誘導実験で推定した遺伝子の方向と一致した。更に、この ORF の上流には推定 SD 配列 [Shine and Dalgarno, 1975] および、*E. coli* の α^{70} 認識配列のコンセンサス配列と相同性を持つ配列が見出されたので、この ORF を *linB* 遺伝子と命名した。*LinB* の推定アミノ酸配列を Fig. 2-5 併せて示す。*LinB* は 295 アミノ酸からなる分子量 33,050 の蛋白をコードしていると推定される。*linB* 遺伝子の G+C 含量は 62.5 % であり、*Sphingomonas paucimobilis* の type strain の G+C 含量が 65 % [Palleroni, 1984] であることを考えると、G+C 含量の点では典型的な *S. paucimobilis* 型の遺伝子であると思われる。コドン使用頻度についても G+C 含量を反映し、3 番目に G ないし C を使用するものの割合が多かった。

また、塩基配列を決定した領域においては安定な stem & loop 等の明らかなターミネーター様配列は見出されなかった。

(7) データベースからの *LinB* 推定アミノ酸配列の相同配列の検索

LinB の推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を SWISS-PROT protein data bank より検索した。その結果、花虫類 (サンゴ虫類) のウシシイタケ (*Renilla reniformis*) の *Renilla-ruciferin* 2-monooxygenase (*LUCI*) [Lorenz et al, 1991]、*Xanthobacter autotrophicus* GJ10 の haloalkane dehalogenase (*DhlA*) [Janssen et al, 1989]、*Moraxella* sp. strain B の haloacetate dehalogenase (*DehH1*) [Kawasaki et al, 1992]、*Pseudomonas* strain CF600 の 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (*DmpD*) [Nordlund and Shingler, 1990]、*Pseudomonas putida* F1 の 2-hydroxy-6-oxo-2,4-heptadienoate hydrolase (*TodF*) [Menn et al, 1991] とそれぞれ 41.2 %, 29.3 %, 22.6 %, 20.5 %, 25.3 % の相同性を示した。ただし、*TodF* については全長約 300 アミノ酸のうち、N 末側 200 アミノ酸の相同性スコアである。また、Rat [Knehr et al, 1993]、Mouse [Grant et al, 1993]、Human [Beetham et al, 1993] の soluble epoxide hydrolase とも部分的ではあるが相同性を示した。*LinB* を含めたこれらの蛋白の alignment を Fig. 2-6a に、Clustal V [Higgins et al, 1992] を用いて作製した系統樹を Fig. 2-6b に示す。*LinB* と相同性を示したこれらの酵素は *LUCI* を除いて全てが加水分解酵素である (Fig. 2-7)。これらの蛋白の中で、*DhlA* が酵素学的特徴が最も解析されており、かつ、*LinB* との相同性も高いため、両者の alignment を特に Fig. 2-8 に示した。両者は後述するように活性中心と考えられているアミノ酸残基が保存されており、その周辺で特に高い相同性を示すこと

-270 -260 -250 -240 -230 -220
 TGTITGGC CAGGCGTGG CACTCAACAT ATCGATGAGA TTCTGCGGT CTGGTATCG ACTCACAAAA
 -210 -200 -190 -180 -170 -160 -150
 CCTTCTCGA TCTTTCGAT GCGCCGCGG CTAGGAAAG CTACGCGCTG AGAGGCGCT GGTGGCGCTA
 -140 -130 -120 -110 -100 -90 -80
 CGCGTCATC CATCGATGCT CCGGCAAG CTCTCGCTC GACGGCAATG GCTAGAAAGA TTCTGSAAT
 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10
 GACATGATAT TCATCATGCG ATATGATCG CGACCGGCG AGACCAGAAA ATGCTCAG GAGATATATG
 10 20 30 40 50 60
 ATG AGC CTC GGC GCA AAG TTT GGC GAG AAG AAA TTC ATT GAG ATC AAG GGC CGC CGC
 Met Ser Leu Gly Ala Lys Pro Phe Gly Glu Lys Lys Phe Ile Glu Ile Lys Gly Arg Arg
 70 80 90 100 110 120
 ATG GCC TAT ATC GAT GAA GGC ACC GGC GAT CCG ATC CTC TTC CAG CAC GGC AAT CCG ACG
 Met Ala Tyr Ile Asp Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ile Leu Phe Gln His Gly Asn Pro Thr
 130 140 150 160 170 180
 TCG TCC TAT CTG TGG CGC AAT ATC ATG CCG CAT TGC GCC GCG CTG GGA CCG CTG ATC GCC
 Ser Ser Tyr Leu Trp Arg Asn Ile Met Pro His Cys Ala Gly Leu Gly Arg Leu Ile Ala
 190 200 210 220 230 240
 TGT GAC CTG ATC GGC ATG GGC GAT TCG GAC AAG CTC GAT CCG TCG GGC CCC GAG CGT TAT
 Cys Asp Leu Ile Gly Met Gly Asp Ser Asp Lys Leu Asp Pro Ser Gly Pro Glu Tyr
 250 260 270 280 290 300
 GCC TAT GCC GAG CAT CGT GAC TAT CTC GAC GCG CTG TGG GAG GCG CTC GAT CTC GGC GAC
 Ala Tyr Ala Glu His Arg Asp Tyr Leu Asp Ala Leu Trp Glu Ala Leu Asp Leu Gly Asp
 310 320 330 340 350 360
 AGG GAT GTT CTG GTC GTG CAT GAC TGG GCG TCC GCC CTC GCG TTC GAC TGG GCG CGC CGC
 Arg Val Val Leu Val Val His Asp Trp Gly Ser Ala Leu Glu Phe Asp Trp Ala Arg Arg
 370 380 390 400 410 420
 CAC CGC GAG CGT GTA CAG CGG ATT GCC TAT ATG GAA GCG ATC GCC ATG CCG ATC GAA TGG
 His Arg Glu Arg Val Gln Gly Ile Ala Tyr Met Glu Ala Ile Ala Met Pro Ile Glu Trp
 430 440 450 460 470 480
 GCG GAT TTT CCC GAA CAG GAT CCG GAT CTG TTT CAG GCC TTT CCG TCG GAG GCG GCG GAA
 Ala Asp Phe Pro Glu Gln Asp Arg Asp Leu Phe Gln Ala Phe Arg Ser Gln Ala Gly Glu
 490 500 510 520 530 540
 GAA TTG GTG TTG CAG GAC AAT GTT TTT GTC GAA CAA GTT CTC CCC GGA TTG ATC CTG GCG
 Glu Leu Val Leu Leu Asp Asn Val Phe Val Glu Gln Val Leu Pro Gly Leu Ile Leu Arg
 550 560 570 580 590 600
 CCC TTA AGC GAA GCG GAG ATG GCC GCC TAT CCG GAG CCC TTC CTC GCC GCC GAA GCC CGT
 Pro Leu Ser Glu Ala Glu Met Ala Ala Tyr Arg Glu Pro Phe Leu Ala Ala Glu Ala Arg
 610 620 630 640 650 660
 CGA CGC ACC CTG TCT TGG CCT CCG CAA ATC CCG ATC GCA GGC ACC CCG GCC GAC GTG GTC
 Arg Pro Thr Leu Ser Thr Pro Arg Gln Ile Pro Ile Ala Gly Thr Pro Ala Asp Val Val
 670 680 690 700 710 720
 GCG ATC GCC CCG GAC TAT GCC GCG TGG CTC AGC GAA AGC CCG ATT CCG AAA CTC TTC ATC
 Ala Ile Ala Arg Asp Tyr Ala Gly Trp Leu Ser Glu Ser Pro Ile Pro Lys Leu Phe Ile
 730 740 750 760 770 780
 AAC GCC GAG CCG GGA GCC CTG ACC ACG GGC CGA ATG CCG GAC TTC TGC CCG ACA TGG CCA
 Asn Ala Glu Pro Gly Ala Leu Thr Thr Gly Arg Met Arg Asp Phe Cys Arg Thr Trp Pro
 790 800 810 820 830 840
 AAC CAG ACC GAA ATC ACG GTC GCA GCG GCC CAT TTC ATC CAG GAG GAC AGT CCG GAC GAG
 Asn Gln Thr Glu Ile Thr Val Ala Gly Ala His Phe Ile Gln Glu Asp Ser Pro Asp Glu
 850 860 870 880 890 900
 ATT GCG GCG GCG ATT GCG GCG TTT GTC CCG CGA TTG CCG CCA TAA TC CGGAACCGGC
 Ile Gly Ala Ala Ile Ala Ala Phe Val Arg Arg Leu Arg Pro Ala ***
 910 920 930 940 950 960 970
 TCATTTTCTA AGATCCGAAC AAACCAAGA CGCGCGGACG CGGATCACCC GCGCAGGACA ATAGGAGAGA
 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 CGACATGAG CGAAGCATT TTTCACACTG AAGATAGGT GGTGAGGCC GGGCTGAAGC GTTTTGGCGC
 1050 1060
 CGATCAGCG ATCGTCATGG TCAACCTCC

Fig. 2-5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *S. paucimobilis* *linB* gene. The deduced amino acid sequence is given below the nucleotide sequence. The putative Shine-Dalgarno sequence [Shine and Dalgarno, 1975] is boxed. Nucleotides in the upstream region of *linB* which show homology to *E. coli* positions -35 (TTGACA) and -10 (TATAAT) are underlined.

a

LinB	1	SLGAKPFGE---KKFIEIKGR---HAI	29
Luci	1	T---SKVVDPEQRKMITGQHWARCTQHVLDSF---IN	44
DhlA	1	THAIRT---PDQR---FSLNQDVFSPHYLDDLPQV	46
DehH1	1	DDF---GFKNST---VTVD---VDIA	26
DmpD	1	THAP---QNSPEIGREITAA---GRTNLS	29
TodF	1	THV---NAEIGRHVLG---GRTNLS	27
YES Rat	231	S---PW---DVSHGVTVVK---FIRLHFVMS	256
YES Mouse	231	N---PW---DVSHGVTVVK---FIRLHFVMS	255
YES Human	231	SCNPS---DMSRGVTVVK---FVRLHFVMS	257
LinB	30	DPILF---CHGNPTSSYL---SNIMHC---AGL	74
Luci	45	NAIF---LGNAASSYL---SHVYHI---EPVAC	86
DhlA	47	EDVFLCLHGFPTWSYL---SHHIVFAESGAV	91
DehH1	27	PIVLM---LHGFPQNRANA---S---VAQLAEB	71
DmpD	30	FLVM---LHGFPQNRANA---S---VAQLAEB	73
TodF	28	NVPL---VHGSGVTEA---S---VAQLAEB	75
YES Rat	257	PALCLC---HGFPES---FESHVQI	300
YES Mouse	256	PALCLC---HGFPES---FESHVQI	299
YES Human	258	PALCLC---HGFPES---FESHVQI	301
LinB	75	-SGFERATAYEHRDYLDALEA---GDRVV	123
Luci	87	-SGGQKALLDRYKLTANTEL---PKLIT	135
DhlA	92	-VDEKVTFFEHFNLALIER---RHITIG	139
DehH1	72	LPDSNMFRTFAHQDLVNRHET---ERFV	120
DmpD	76	--ADACNRDVRVDHAGVGLDAEL---EQAN	122
TodF	74	--HGIRGVESVVAHAGILDAEL---DRVD	120
YES Rat	301	-FEIEFAMELLCKENVTFLDR---GIPQAV	348
YES Mouse	300	-FEIEFAMELLCKENVTFLDR---GIPQAV	347
YES Human	302	-FEIEFAMELLCKENVTFLDR---GIPQAV	349
LinB	124	AVOGIAYESA---IAMPKE---WADFFE	168
Luci	136	KIKAIYRAES---VVDVIE---SWDEWFO	180
DhlA	140	PKRLIINACLMTDPVTFQAFSAFVTPADG	189
DehH1	121	AVLSLTVQILVPTVAMFNTNRLVAASVNH	170
DmpD	123	VRRVLVLSAGV---EFPIEGLOAV---WGY	162
TodF	121	VRRVLVLSAGV---EFPIEGLOAV---WGY	160
YES Rat	349	VYRAVASLNTFFMFPDQVSPMK	370
YES Mouse	348	VYRAVASLNTFFMFPDQVSPMK	370
YES Human	350	VYRAVASLNTFFMFPDQVSPMK	370
LinB	169	VEQVLFGILRLPLSAEHA---YREFFLA	213
Luci	181	VKTMLFSKIMKLEPEFA---YLEPFKE	227
DhlA	190	SHRWAFY---LTERAS---AAFPDVSQAVK	230
DehH1	171	FP---YETCLFG---WATKVSDFDQQLMAY	208
DmpD	163	FA---FDRNLVNHLEALRYQ---SIRPG	210
TodF	161	FA---YDRSLVSEALRYK---STRPG	208
LinB	214	GTPADVVAIARDYAGVLSSEF---IPKLF	259
Luci	228	GKFDQVQVHHTHATLIRASDGLPHEIS	273
DhlA	231	QACIDISTRATGF---KQNDNGQTFMAIG	258
DehH1	209	SCSDYRAAAIDLEH---DSADIQRKVECP	256
DmpD	211	AARALFHETLVIG---REDQIIPLOTS	257
TodF	209	QDIRDIRHETLILG---RDDRVIPL	255
LinB	260	PH---QTEITVAGN---LOCFDEIGAAIA	295
Luci	274	PH---TEFIVAGV---LOCFDEIGAAIA	311
DhlA	279	FE---PLEIADAG---HVFQFQVVAEAL	310
DehH1	257	AKRCHNTNNSLPGCH---FVDFPAKTE	294
DmpD	258	TQIEHAARFASL---VDFPAKTE	283
TodF	256	VQIFQNRGFRIL---VDFPAKTE	276

b

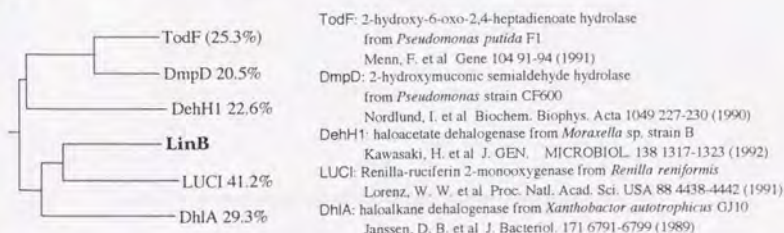
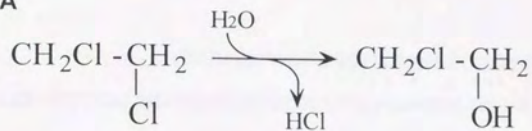
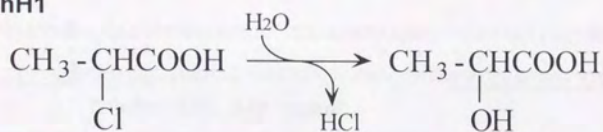


Fig. 2-6 Sequence alignment (a) and phylogenetic tree (b) of α/β hydrolase fold enzymes. The amino acid residues which are highly conserved among them are shown in white letters against black. The amino acid residues which are conserved among all of them are marked with asterisk. Putative active site residues of DhlA (Asp-124, Asp-260, His-289) are marked with pluse [Janssen *et al.*, 1989].

DhIA



DehH1



TodF, DmpD

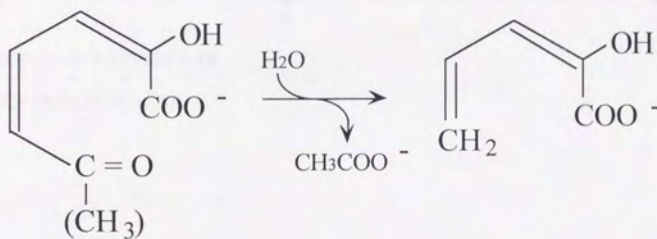


Fig. 2-7 Three types of α/β -hydrolase fold enzymes homologous to LinB.


```

LinB 1' MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDP--ILFQHGNPTSS
          * * *.***. * * *.***. *
Dh1A 1" MINAIRTPDQRFNSNLDQYFPSPNYLDDLPGYPGLRAHYLDEGNSDAEDVFLCLHGPTWS

LinB 43' YLWRNIMPHCAGLG-RLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYAYAEHRDYLDALWEALDLGDR
          **.*.***. * * *.***.***. * * *.***.***.***.***.
Dh1A 61" YLYRKMI PVFAESGARVIAPDFFGKSDK--PVDEEDYTFEFHRNFLALIERLDL-RN

LinB 102' VVLVVH DWGSALGFDWARRHRERVQGIAYMEAIAM--PIEWADFPEQDRDLFQAQRSQAG
          ...*.*.*.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
Dh1A 118" ITIVVQ DWGGFLGLTLPADPSRFKRLIIMNACLMTDPVTQPAFSAFVTQPADGFTAWK-
          * * *.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
          ° Nucleophilic Asp region

LinB 160' EELVLQDNVFEQVLPGLILRLPLSEAEMAAYREPFLAAEARRPTLSWPRQIPIAGTP-AD
          **.*.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
Dh1A 177" YDLVTPSDLRLDQFMKRW-PTLTEAEASAYAAPFPDTSYQAGVRKFKPMVAQRDQACID
          * * *.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
          Cap domain region

LinB 219' VVAIARDY--AGWLSESPKLFINAEPGALTGRMRDFCRTWPNQTEITVAGAEFIQED
          * * *.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
Dh1A 236" ISTEAISFWQNDWNGQTFMAIGMKDKLLGPDVMYPMKALINGCPEPLEIADAG-EFVQEF
          * * *.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
          ° °
          His region

LinB 277' SPDEIGAAIAAFVRRRLRPA
          . . *.***. *
Dh1A 295" GEQVAREALKHFAETE

```

Fig. 2-8 Comparison of the deduced amino acid sequences of LinB and Dh1A.

The amino acid residues are shown in the one-letter code, and gaps have been introduced to obtain optimum alignment among the proteins. The Dh1A sequence is derived from the data of [Janssen *et al.*, 1989]. The amino acid residues which are conserved in the sequences compared are marked with asterisks, and similar amino acid residues are marked with dots. Asp-124 of Dh1A is a putative nucleophilic residue essential for the catalysis. ○, putative active site residues of Dh1A (Asp-124, Asp-260, and His-289).

から、LinB も DhlA 同様に加水分解的脱塩素反応を触媒するものと思われる。また、LUCI も実際の反応メカニズムが研究されているわけではなく、LinB 同様活性中心と考えられるアミノ酸残基が保存されていることから、oxygenase ではなく hydrolase である可能性が高いと考えられる。

(8) *linB* 遺伝子のサザンブロット解析

linB 遺伝子を含む 1.3-kb *HpaI*-*BglII* 断片をプローブとして UT26 の全 DNA を *BglII*、*BglII* + *PvuII*、*EcoRI* でそれぞれ消化したものについてサザンブロット解析を行った (Fig. 2-9; lane 3, 4, 5)。その結果、いずれの場合にも 1 本のバンドのみが認められた。このことは、クローン化した *linB* 遺伝子が確かに UT26 由来のものであること、および、UT26 には *linB* と塩基配列レベルで高い相同性を持つ他の遺伝子は存在しないことを示している。また、データは示さないが、UT26 からアルカリ法で回収される 4 つのプラスミドとは *linB* 遺伝子はハイブリダイズしなかった。このことは、*linB* 遺伝子が染色体上に存在していることを示唆している。*dhlA* 遺伝子はプラスミド上に存在していることが示されており [Tardif *et al.*, 1991]、この点では *linB* 遺伝子は *dhlA* 遺伝子とは異なる特徴を持つと考えられる。ただし、*linB* 遺伝子が超巨大プラスミドや、線状プラスミド上に存在している可能性は今回の実験では否定することはできない。

linB のクローン化の際に宿主として用いた *E. coli* HB101 [Maniatis *et al.*, 1982]、*P. putida* PpY101 [Kimbara *et al.*, 1989]、及び PCB 分解菌の *Pseudomonas* sp. KKS102 [Kimbara, 1988] にについてもサザンブロット解析により *linB* 相同配列の検索を行った。Fig. 2-9 (lane 6,7,8) に示すように今回用いた条件 (ハイブリダイズ、洗いともに 56 °C) では、これらの G (-) 細菌からは *linB* と高い相同性を示す配列は検出されなかった。

(9) *linB* 遺伝子の *E. coli* 内での大量発現と産物の同定

linB 遺伝子産物を同定するために、*linB* 遺伝子を *tac* プロモーター支配下で IPTG による誘導で発現可能なプラスミド pMYLB1 を作製した。pMYLB1 を保持する *E. coli* MV1190 を IPTG で処理し、全蛋白について SDS-PAGE で解析を行った (Fig. 2-10)。その結果、IPTG で誘導をかけた菌体の全蛋白にのみ約 32-kD の蛋白のバンドが認められた (lane 2)。この大きさは *linB* 遺伝子産物の推定分子量 33.1-kD とよく一致した。更に、この 32-kD 蛋白の N 末アミノ酸配列を決定したところ、formyl-methionine の切断は受けているものの 16 番目のイソロイシンまで塩基配列から推定されるアミノ酸配列と完全に一致した。これにより、32-kD の蛋白が確かに *linB* 遺伝子産物であることが確認された。

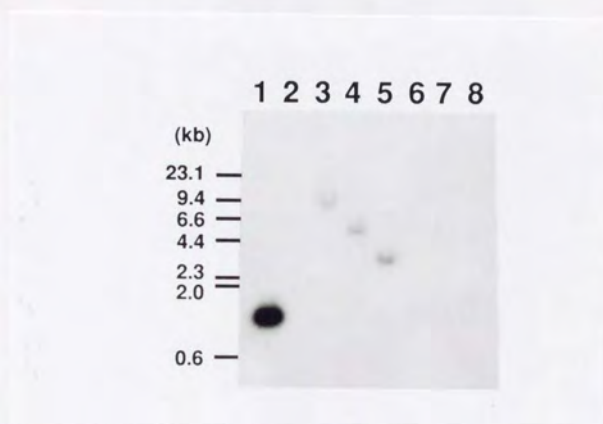


Fig. 2-9 Southern blot analysis of 1.3-kb *HpaI*-*BglI* fragment of pYNA1.

Lanes: 1, 1.3-kb *HpaI*-*BglI* fragment of pYNA1; 2, lambda DNA digested with *HindIII*; 3, total DNA from UT26 digested with *BglII*; 4, total DNA from UT26 digested with *BglII*-*PvuII*; 5 total DNA from UT26 digested with *EcoRI*; 6, total DNA from *P. putida* PpY101 digested with *EcoRI*; 7, total DNA from *E. coli* HB101 digested with *EcoRI*; 8, total DNA from *P. sp.* KKS102 digested with *EcoRI*.

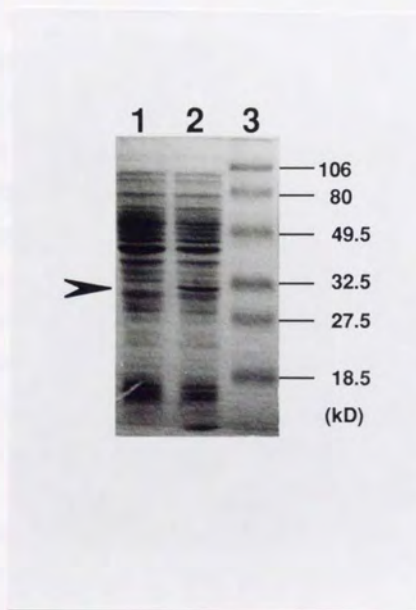


Fig. 2-10 SDS-PAGE analysis of LinB protein produced in *E. coli* MV1190 carrying plasmid pMYLB1. The conditions for induction and electrophoresis are as described in Materials and Methods. Total proteins of induced *E. coli* MV1190 cells carrying plasmid pMYLB1 (lane 2) and of noninduced cells (lane 1) are shown. The low-range molecular weight standards (lane 3) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) were used to estimate the size of the LinB protein (indicated by the arrowhead).

(10) UT26 及び LinB を高発現させた *E. coli* MV1190 の γ -HCH 分解代謝中間体以外の基質に対する脱ハロゲン活性

LinB の推定アミノ酸配列は DhIA のそれと相同性を示したため、LinB の基質特異性に興味を持たれた。そこで本章では予備的な実験として UT26 及び LinB を高発現させた *E. coli* MV1190 の休止菌体を作製し、 γ -HCH 分解代謝中間体以外の基質に対する脱ハロゲン活性について検討を行った。基質としては monochloroalkane 類の他に、dichloroalkane 類、multihalogenated alkane 類、塩素以外の halogenated alkane 類、chlorinated aliphatic alcohol 類、chlorinated aliphatic acid 類を用い、チオシアン酸第二水銀法で定量した脱ハロゲン活性を 1-chlorobutane の値を 100 とした相対活性で求めた。その結果を Table 2.3 にまとめた。*E. coli* MV1190 自体は、今回検討を行った基質に対しては脱ハロゲン活性を示さなかったもので、LinB を高発現させた *E. coli* MV1190 の値は LinB の活性であると考えられる。monochloroalkane 類については少なくとも C = 12 までの長鎖のものや、塩素原子を炭素鎖の内部に含むものも LinB の基質となることが示唆された。また、dichloroalkane 類、塩素以外の halogenated alkane 類、chlorinated aliphatic alcohol 類についても基質となり得るが、multihalogenated alkane 類と chlorinated aliphatic acid 類については、ほとんど LinB の基質とならないことが強く示唆された。また、UT26 の LinB を高発現させた *E. coli* を比較すると、全体的な傾向としては両者の間に顕著な差異は認められなかった。ただし、C = 14 の長鎖 chloroalkane に対する値には比較的大きな差がみられたことから、UT26 に長鎖 alkane に対する monooxygenase による脱塩素活性が存在している可能性も考えられる。しかし、UT26 と *E. coli* の膜構造の差、基質の取り込み機構の存在の有無などに起因している可能性も否定できず、UT26 に LinB 以外のこうした基質に対する dehalogenase が存在していないとも考えられる。

2-4. 考察

本章において、*Sphingomonas paucimobilis* の γ -HCH 分解代謝に関与する *linA* に続く酵素遺伝子 *linB* の単離とその解析を行った。*linB* 遺伝子のスクリーニングに際しては γ -PCCH から 2,5-DDOL を生じる反応に LinA 活性が必要であることが前章で明らかになっていたので、*linA* 遺伝子をトランスポゾンを利用して補った宿主を用いて、 γ -HCH から 2,5-DDOL を生じる活性を有するクローンを選択した。LinB は、LinA の作用で γ -PCCH から生じた化学的に不安定な物質 1,4-TCDN を基質としていることは、ほぼ間違いのないと思われ、本章で用いたクローニング方法は他の化学的に不安定な物質を基質とする酵素遺伝子のクローニング方法としても有効であると考えられる。

Table 2-3 Substrate ranges of UT26 and *E. coli* overproducing LinB

Substrate	Reaction rate of *	
	UT26	<i>E. coli</i> overproducing LinB
monochloroalkanes		
1-chloropropane (C3)	56	61
1-chlorobutane (C4)	100	100
1-chloropentane (C5)	85	115
1-chlorohexane (C6)	79	96
1-chloroheptane (C7)	88	107
1-chlorooctane (C8)	96	112
1-chlorononane (C9)	50	83
1-chlorodecane (C10)	48	58
laurylchloride (C12)	65	44
1-chlorotetradecane (C14)	69	8
n-octadecylchloride (C18)	2	2
1-chloroeicosane (C20)	5	1
1-chlorodocosane (C22)	1	4
2-chlorobutane (C4)	65	49
2-chlorooctane (C8)	65	81
3-chlorohexane (C6)	30	24
dichloroalkanes		
dichloromethane	7	4
1,1-dichloroethane	12	3
1,2-dichloroethane	35	57
1,3-dichloropropane	105	84
1,4-dichlorobutane	82	114
1,6-dichlorohexane	119	145
1,9-dichlorononane	128	135
multihalogenated alkanes		
1,1,1-trichloroethane	N.D.	N.D.
1,1,2,2-tetrachloroethane	1	3
halogenated alkanes		
1-bromoethane	109	140
1-bromobutane	73	152
1-iodobutane	58	148
1,2-dibromoethane	61	133
1,2-dibromopropane	58	122
chlorinated aliphatic alcohols		
2-chloroethanol	46	3
3-chloropropanol	27	39
4-chlorobutanol	9	15
6-chlorohexanol	68	93
chlorinated aliphatic acids		
chloroacetic acid	N.D.	N.D.
2-chloropropionic acid	N.D.	N.D.
3-chloropropionic acid	N.D.	1
2-chlorobutyric acid	N.D.	N.D.
3-chlorobutyric acid	8	12

* Reaction rates of the activity (chloride ion release) are expressed as the percentage of the rate with 1-chlorobutane. The amounts of chloride ion released from 20 μ mol of 1-chlorobutane by UT26 and *E. coli* overexpressing LinB were about 5.6 and 2.8 μ mol, respectively, under the conditions described in Materials and Methods.
N.D.=not detectable

LinB の推定アミノ酸配列は haloalkane dehalogenase (DhlA) と有意な相同性を示した。DhlA は 1-haloalkane 類を基質とし、水を唯一の cosubstrate として、それぞれの基質に対応するアルコールとハロゲンイオンを生じる反応を触媒する (Fig. 2-7)。この反応は、酸素や cofactor などを必要としない加水分解反応である。DhlA は 310 アミノ酸からなる推定分子量 35,144 の蛋白で、大きさの点でも LinB とよく似ている。DhlA の反応には酸素や cofactor が不要であるため、水による求核置換反応がその反応メカニズムであると考えられている。DhlA は精製され [Keuning *et al.*, 1985]、結晶化され [Rozeboom *et al.*, 1988]、X 線結晶構造解析によりその三次元構造も決定されている [Franken *et al.*, 1991]。その結果、Asp-124 が活性に必須の求核残基であり、それが His-289 及び Asp-260 によって安定化され、活性中心の triad を形成していることが示唆されている。また、DhlA の立体構造は、配列上の相同性は見られないものの dienelactone hydrolase (DLH) と似た構造をとっていることも示されている [Pathak *et al.*, 1988; Pathak and Ollis, 1990]。これらの酵素は α/β hydrolase fold family と呼ばれている。DhlA と DLH のアミノ酸配列を二次構造だけに注目し比べると、特に Asp-124 と His-289 の周辺でよく保存されている。DhlA の活性中心の 3 つのアミノ酸残基のうち、Asp-124 と His-289 は LinB でも保存されており (Asp-108, His-271)、これらのアミノ酸残基周辺での保存性は特に高い。さらに、LinB の Glu-243 が DhlA の Asp-260 の役割を果たしている可能性も考えられる。これらの結果を考えると、LinB も DhlA 同様に脱ハロゲンを伴う加水分解反応を触媒していることが強く示唆される。ところで、DhlA は N 末に LinB には存在しない余分なアミノ酸配列を持つが、これらは加水分解反応そのものには重要ではないと思われる。ただし、DhlA は炭素鎖が 4 以上の haloalkane は基質としないのに対して LinB は、少なくとも炭素鎖が 10 までの haloalkane を基質とし得るという基質特異性の違いを考えると、これらのアミノ酸配列が基質特異性の違いに効いている可能性はあると思われる。

Compound III は、2,5-DDOL と同定され、UT26 による γ -HCH の初期分解代謝経路は Fig. 2-1 のように推定された。前章で明らかにしたように、LinA は γ -HCH から γ -PCCH を生じる反応だけでなく、 γ -PCCH から 2,5-DDOL を生じる反応にも必要であるが、それは γ -PCCH から 1,4-TCDN を生じる反応を LinA が触媒しているためであることが本章において示された。しかし、前章の考察において、LinA が TCDN への反応を触媒している可能性と別の可能性として示した LinA と LinB が複合体を形成して γ -PCCH から 2,5-DDOL への変換反応を触媒している可能性も否定はできない。化学的に不安定な中間体を経る 2 段階の反応を触媒する 2 つの酵素が複合体を形成している例は、これまでも報告されており [Harayama *et al.*, 1989; Powlowski *et al.*, 1993]、LinA と LinB が同様の複合体を形成している可能性もあるものと思われる。しかし、複合体を形成している例において

は、複合体を形成している2つの酵素遺伝子は互いに隣接し、オペロンをなして存在しているのに対して、*linA* 遺伝子と *linB* 遺伝子は互いに離れて存在しており（両方の活性を持つコスミドクローンは得られなかった）、この点からは複合体を形成している可能性は低いようにも思われる。いずれにせよ、こうした観点からの今後の解析も必要であると考えられる。

LinB は γ -HCH の分解において、*LinA* の作用によって生じた不安定な中間体を基質として脱塩素を伴う加水分解反応を行っているが、*LinB* が他の haloalkane dehalogenase とはかなり異なるユニークな酵素であるのか、一般に haloalkane dehalogenase は、こうしたものも基質とし得るのかという点も大変興味を持たれる点である。この点を明らかにするには *LinB* 自身の基質特異性を明らかにすると共に、他の haloalkane dehalogenase が γ -HCH の分解中間体のようなものを基質とし得るのかについても検討を加える必要がある。本章において行った実験の結果を見る限りでは *LinB* は DhlA など他の haloalkane dehalogenase が基質としない長鎖の haloalkane や 2-chlorobutane, 3-chlorohexane など基質とし得ると考えられ、*LinB* が haloalkane dehalogenase の中でも基質特異性の広い特殊な酵素である可能性を示唆している。

また、UT26 がハロゲン化脂肪族炭化水素を資化できるか否かにも興味を持たれる。*linA* の G+C 含量が *S. paucimobilis* の遺伝子としては低い (53%) のに対して *linB* の G+C 含量 (62.5%) は *S. paucimobilis* の type strain のそれ (65%) に近いことを考えると、UT26 はもともとハロゲン化脂肪族炭化水素資化性細菌であり、これに *linA* 遺伝子が飛び込んできたことによって γ -HCH 資化菌になった可能性も考えられる。しかし、予備的な実験であるが、1-chlorobutane を唯一の炭素源とした場合には UT26 の生育はみられなかった（データは示さない）。

本研究ならびに住友化学工業（株）との共同研究において、UT26 による γ -HCH の代謝産物として γ -PCCH、1,2,4-TCB、2,5-DCP、2,5-DDOL、そして、2,5-DCHQ が同定されている。1,2,4-TCB、2,5-DCP は UT26 によってそれ以上分解されない dead-end product であるが、これらは diene type の構造を持つ化学的に不安定な中間体である 1,4-TCDN、2,4,5-DNOL から安定な芳香環を持つ構造へとそれぞれ非酵素的に変換され、生じていると考えられる。第4章で詳しく述べるが、2,5-DDOL は UT26 によって更に 2,5-DCHQ へと変換され、更に UT26 は 2,5-DCHQ を無機化できる [Nagasawa et al, 1993b] ことから、これが UT26 による γ -HCH の主要な分解資化経路であると考えられる。このように主要な分解経路において複数の dead-end product を生じるということは、UT26 が γ -HCH を唯一の炭素源として生育させた時に非常に弱い生育しか示さない（第4章参照）ことと関係していると思われる。もし、UT26 の *LinB* 活性を強化してやることができれば、dead-end product の生成量を減少させることが可能となり、強力な γ -HCH 資化菌の創出も実現する

のではないと思われる。実際に *E. coli* において IPTG による誘導で LinB の発現量を上げてやることで、同量の γ -HCH から出発してより多量の 2,5-DDOL を生産することには成功しており、UT26 にもう一つの *linB* 遺伝子を導入してやるなどの比較的簡単な遺伝子操作で UT26 より効率的に γ -HCH を資化することのできる遺伝子組換え菌を創り出すことも可能なのではないかと思われる。

第3章

1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene halohydratase (LinB) の精製とその性質

3-1. 緒言

第2章でクローン化と塩基配列の決定を行った *linB* 遺伝子は 885-bp からなり、推定分子量 33.1-kD の蛋白をコードしている。この蛋白が γ -HCH 分解において示す活性は γ -HCH から LinA の作用で生じた化学的に不安定な物質、1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene (1,4-TCDN) から2段階の脱塩素を伴う水酸基の添加を行い、2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol (2,5-DDOL) を生じる反応の触媒であると考えられる。また、*linB* 遺伝子産物の推定アミノ酸配列が haloalkane dehalogenase (DhlA) [Janssen *et al.*, 1989] と有意な相同性を示し、活性中心も保存されていたことから haloalkane 類に対しても同様の活性を持つことが予測された。そして、実際に UT26、及び LinB を高発現させた *E. coli* の休止菌体を用いた脱ハロゲン活性の測定の結果、LinB がかなり基質特異性の広い dehalogenase の仲間であることが示唆された。そこで、本章では LinB を高発現させた *E. coli* より LinB を精製し、基質特異性を中心にその性質の検討を行った。

3-2. 材料および方法

(1) 使用菌株及びプラスミド

本章では LinB の大量発現の宿主として *E. coli* MV1190 (Table 1-1) を、LinB 高発現用のプラスミドとして pMYLB1 (第2章参照) を用いた。

(2) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BIO-RAD 社のプロテインアッセイキットを用いて、BSA を標準タンパクとして行った。

(3) LinB 活性の測定法

970 μ l の 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) に酵素液 20 μ l、基質 (1-chlorobutane) 10 μ l を加え、30 $^{\circ}$ C で2時間反応を行う。コントロールには 980 μ l の 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) に酵素液 20 μ l を加えたものを用いた (1-chlorobutane は、この条件では自然分解しないので基質のコントロールは不要)。反応後の遊離塩素イオン濃度を第2章、2-2 (8) の方法で測定する。活性の定義は1分間に 1nmol の塩素イオンを生じる活性を 1 Unit とした。基質特異性を検討する際には glycine-NaOH buffer (pH 8.6) を用いて、それぞれの基質に対して自然分解によって生じるハロゲンイオン量を考慮して測定した。

3-3. 結果

(1) *E. coli* 内での LinB の大量発現

E. coli 内での *linB* 遺伝子産物の大量発現には、前章で作製した pMYLB1 を利用し、IPTG によって *tac* プロモーターからの転写を誘導した。pMYLB1 で *E. coli* MV1190 を形質転換し（形質転換直後の菌体を用いるのが良い）、形質転換体のコロニーをかきとり、10 ml の L 培地で培養した。OD₅₅₀ = 0.6 程度になったところで 10 ml 全てを 2 l の L 培地に移し、培養を続けた。再び OD₅₅₀ = 0.6 程度になったところで最終濃度が 5 mM になるように IPTG を加え、更に 3 時間培養を続けて発現を誘導した。菌体を集菌し（湿重量約 10 g）、50 ml の buffer A [50 mM potassium phosphate buffer (pH7.5), 10 % glycerol, 1mM 2-mercaptoethanol] に懸濁し、sonication により菌体を破碎した。5,000 rpm (4,000 xg)、5 分の遠心により debris を除いた後に 100,000 xg、1 時間の超遠心により膜成分を除き、これを粗酵素抽出液とした。粗酵素抽出液は buffer A を用いて全量を 45 ml に調整した。

(2) 硫酸分画

粗酵素抽出液 40 ml を buffer B [50 mM リン酸 buffer (pH 7.5)] で 5 倍に希釈（全量 200 ml）した後、硫酸アンモニウムを 50 % となるようにゆっくり加え、氷上で 1 時間放置した。9,000 rpm (12,000 xg) で 20 分間遠心して沈殿物を取り除き、上清に硫酸アンモニウムを 80 % になるようにゆっくり加えた。氷上で 1 時間放置後、再度遠心し、沈殿物を回収した。これを buffer A に懸濁し全量を 14.5 ml にしたものを硫酸分画とした。

(3) BUTYL-TOYOPEAL 650M による疎水カラムクロマトグラフィー

硫酸分画 12.5 ml を buffer C [50 mM potassium phosphate (pH7.5), 40 % 硫酸] で平衡化した BUTYL-TOYOPEAL 650M カラムにチャージし、しばらく buffer C で洗浄後、同 buffer 250 ml と buffer B との間で直線的濃度勾配を作り蛋白の溶出を行った。溶出液は 5 ml ずつ分取した。溶出のパターンを Fig. 3-1 に示す。dehalogenase 活性が検出されたフラクション 119 から 126 までは回収し、一晚 buffer D [10 mM potassium phosphate buffer (pH7.5)] に対して透析したものを全量 50 ml に調整し、これを BUTYL-TOYOPEAL 画分とした。

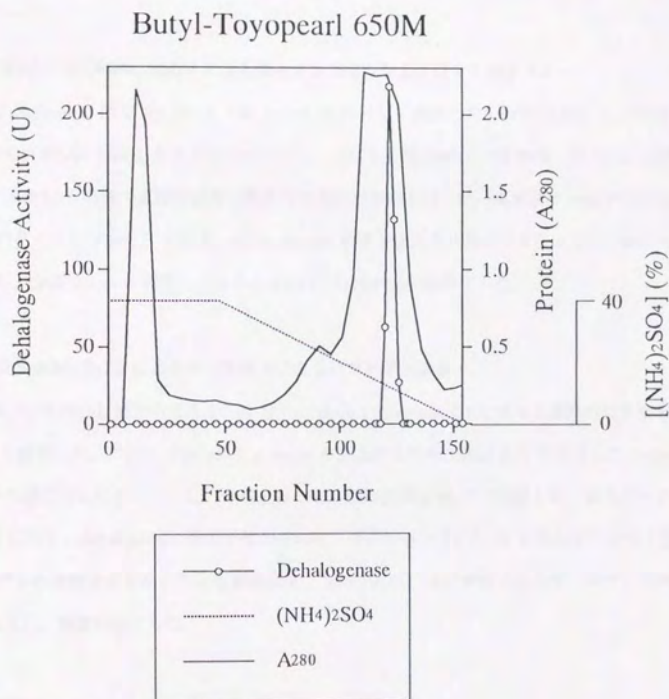


Fig. 3-1 Butyl-Toyopearl 650M column chromatography of LinB

(4) DEAE Sephadex A-50 による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

BUTYL-TOYOPEAL 画分 45 ml を buffer E [10 mM potassium phosphate (pH7.5), 10 % glycerol, 1mM 2-mercaptoethanol] で平衡化した DEAE Sephadex A-50 カラムにチャージし、しばらく同 buffer で洗浄後、同 buffer 300 ml と buffer F [200 mM potassium phosphate (pH7.5), 10 % glycerol, 1mM 2-mercaptoethanol] 300 ml との間で直線的濃度勾配を作り蛋白の溶出を行った。溶出液は 5 ml ずつ分取した。溶出のパターンを Fig. 3-2 に示す。dehalogenase 活性が検出されたフラクション 162 から 170 までを回収し、全量 45 ml に調整したものを DEAE Sephadex 画分とした。

(5) DEAE-TOYOPEAL 650M による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

DEAE Sephadex 画分 40 ml を一晩 buffer D に対して透析したものを buffer E で平衡化した DEAE-TOYOPEAL 650M カラムにチャージし、しばらく同 buffer で洗浄後、同 buffer 300 ml と buffer F 300 ml との間で直線的濃度勾配を作り蛋白の溶出を行った。溶出液は 5 ml ずつ分取した。溶出のパターンを Fig. 3-3 に示す。dehalogenase 活性が検出されたフラクション 77 から 81 までを回収し、全量 25 ml に調整したものを DEAE TOYOPEAL 画分とした。

(6) Sephadex G-75 によるゲルろ過カラムクロマトグラフィー

DEAE TOYOPEAL 画分のうち 20 ml を Centricon 10 (amicon 社) を使って最終的に体積を 300 μ l にまで濃縮した。これに 100 μ l の glycerol を加えたものを buffer B で平衡化した Sephadex G-75 ゲルろ過カラムにチャージし、分離を行った。溶出液は 5 ml ずつ分取した。溶出のパターンを Fig. 3-4 に示す。dehalogenase 活性が検出されたフラクション 14 と 15 を合わせたもの (全量 9.5 ml) をゲルろ過画分とした。ゲルろ過画分を SDS-PSGE 上で観察すると単一なバンドが得られ (Fig. 3-5)、精製が完了した。

(7) 精製のまとめ

以上の精製結果をまとめて Table 3-1 に示す。また各精製段階の SDS-PAGE パターンを Fig. 3-5 に示す。

(8) LinB の分子量の測定

SDS-PAGE から推定される分子量は 32-kD であった。また、ゲルろ過画分 2 ml を Centricon 10 (amicon 社) を使って最終的に体積を 65 μ l にまで濃縮したもののうち、30 μ l を gel filtration

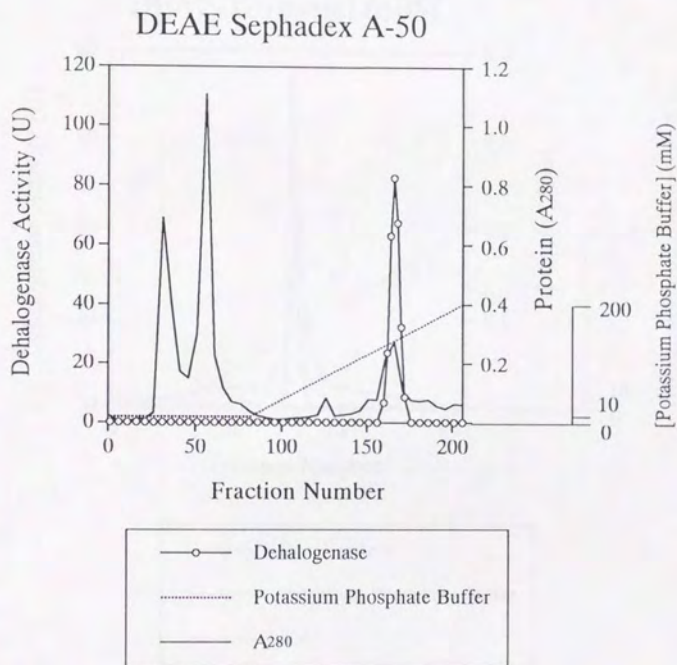


Fig. 3-2 DEAE Sephadex A-50 column chromatography of LinB

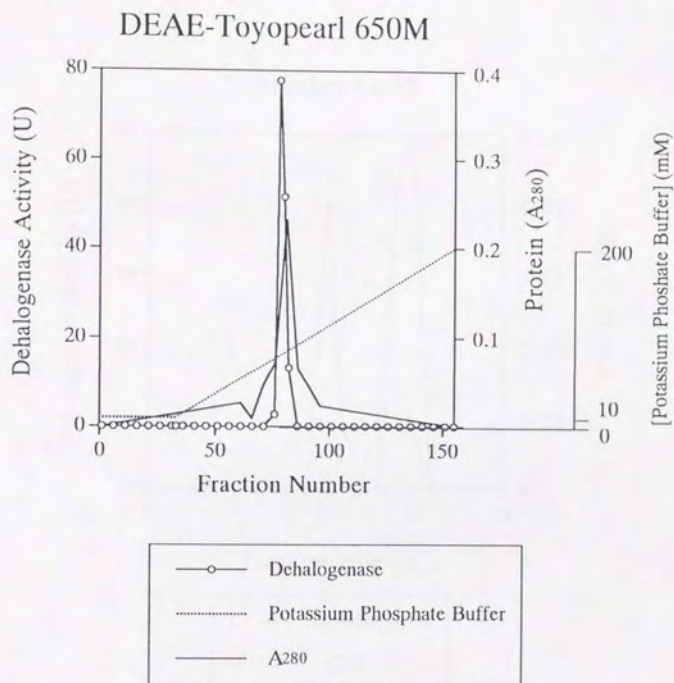


Fig. 3-3 DEAE Toyopearl 650M column chromatography of LinB

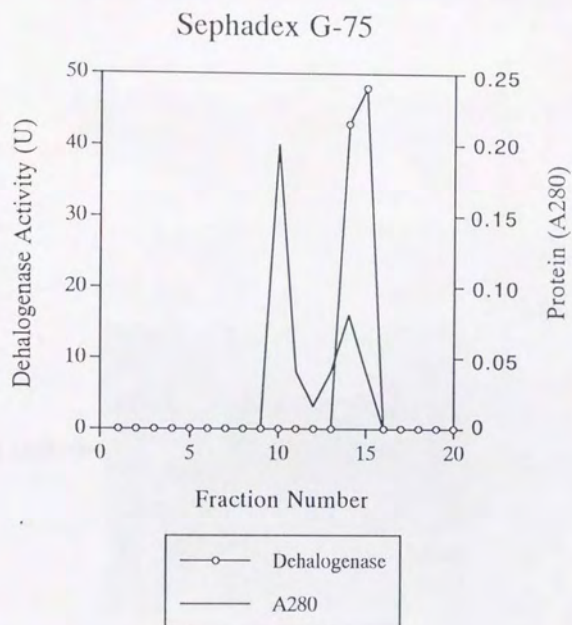


Fig. 3-4 Sephadex G-50 gel filtration chromatography of LinB

Table 3-1 Purification of LinB

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U / mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	575	1622	2.8	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	332	1488	4.5	1.6	92
Butyl Toyopearl 650M	64.6	732	11.3	4.0	45
DEAE Sephadex A-50	22.1	305	13.8	4.9	19
DEAE Toyopearl 650M	11.9	292	24.5	8.8	18
Sephadex G-75	3.4	177	52.1	18.6	11

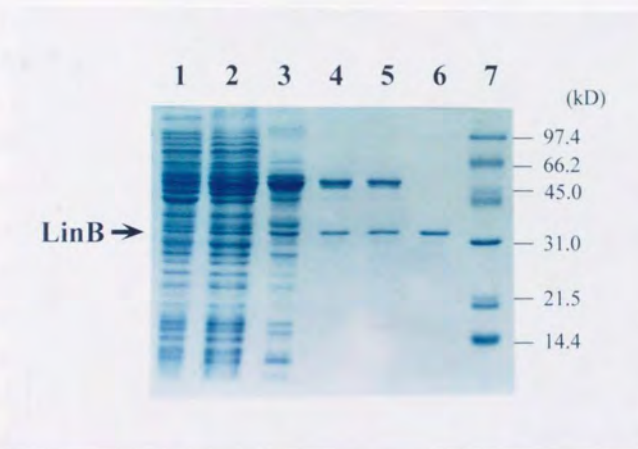


Fig. 3-5 SDS-PAGE of purification steps of LinB

Lanes: 1, crude extract; 2, (NH₄)₂SO₄; 3, butyl Toyopearl 650M; 4, DEAE Sephadex A-50; 5, DEAE Toyopearl 650M; 6, Sephadex A-50; 7, molecular mass markers (Bio-Rad Laboratories) labeled in kilodaltons.

standard (BIO-RAD 社) 50 μ l, buffer B (pH7.5) 120 μ l を加えて全量を 200 μ l とし、このうち 150 μ l をゲルろ過 Superdex 200HR 10/30 にチャージし、分子量を測定したところ LinB の分子量は 30-kD であった (Fig. 3-6)。若干の違いはあるものの、いずれの値も塩基配列から予想される LinB の推定分子量 33.1-kD とほぼ同じ値であり、LinB が単量体として存在していることが示された。

(9) LinB の至適 pH

LinB の至適 pH について検討を行った。pH=6~8 は potassium phosphate buffer、pH=7.4~8.6 は tricine-NaOH buffer、pH=8.6~10 は glycine-NaOH buffer で、1-chlorobutane を基質とし、脱塩素活性を測定した。potassium phosphate buffer での pH=7.5 の値 (精製段階での脱塩素活性を測定した条件) を 1 とした場合の相対活性を Fig. 3-7 に示す。この結果、LinB の至適 pH は 8.2 付近のアルカリ寄りであることが明らかになった。

(10) LinB の基質特異性

第2章で述べたように LinB は基質特異性の広い脱ハロゲン酵素であることが示唆されていた。そこで、精製した LinB について第2章で resting cell を用いて検討したのと同じ基質に対する脱ハロゲン活性の測定を行った。結果を Table 3-2 に示す。LinB は、少なくとも C = 12 までの monochloroalkane 類、dichloroalkane 類、halogenated alkane 類、chlorinated aliphatic alcohol 類については基質とし得るが、multihalogenated alkane 類と chlorinated aliphatic acid 類については、ほとんど基質としないことが示された。全体的な傾向としては第2章で休止菌体を用いて測定した値 (Table 2-3) と顕著な差は見られなかった。この結果、LinB は基質特異性の広い脱ハロゲン酵素であることが示された。休止菌体で測定した値に比べて、精製した LinB を用いて測定した値は過剰量の基質を用いて短時間の反応で算出した値であり、数値的にも LinB の特徴を反映した信用できる値であると考えられる。そこで、monochloroalkane の鎖長と活性の関係を Fig. 3-8 に示した。DhlA の値と比較すると DhlA が、C = 3 以下の短鎖の monoalkane を良い基質とするのに対して、LinB は C = 7 の基質に対する活性をピークとし、長鎖の monoalkane まで比較的良好な基質とすることが明らかになった。

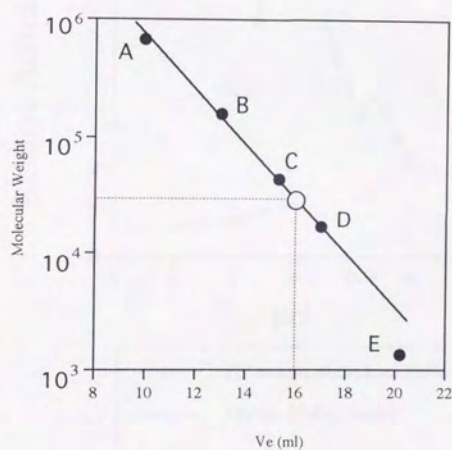


Fig. 3-6 Molecular weight of LinB was determined as 30-kD by Superdex 200R 10/30 gel filtration chromatography. Molecular weight markers are as follows: A, Thyroglobulin (670,000-kD); B, gamma globulin (158,000-kD); C, Ovalbumin (44,000-kD); D, Myoglobin (17,000-kD); E, Vitamin B-12 (1,350-kD)

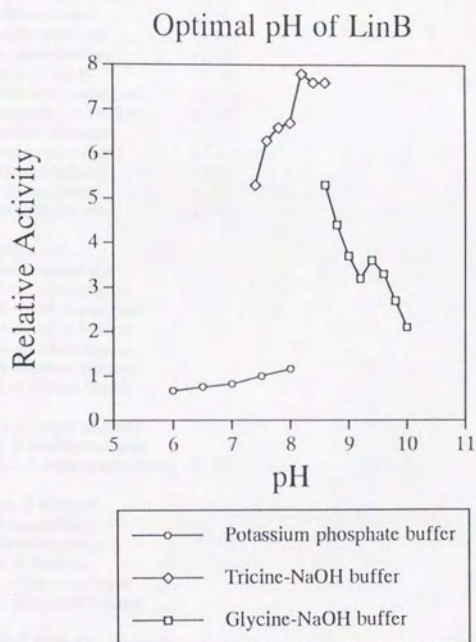


Fig. 3-7 Optimum pH of LinB

Table 3-2 Substrate specificity of purified LinB

Substrate	Relative activity ^a (%)
monochloroalkanes	
1-chloropropane (C3)	135
1-chlorobutane (C4)	100
1-chloropentane (C5)	120
1-chlorohexane (C6)	145
1-chloroheptane (C7)	161
1-chlorooctane (C8)	139
1-chlorononane (C9)	70
1-chlorodecane (C10)	27
laurylchloride (C12)	7
1-chlorotetradecane (C14)	1
n-octadecylchloride (C18)	N. T.
1-chloroeicosane (C20)	N. T.
1-chlorodocosane (C22)	N. T.
2-chlorobutane (C4)	101
2-chlorooctane (C8)	47
3-chlorohexane (C6)	19
dichloroalkanes	
dichloromethane	N. D.
1,2-dichloroethane	10
1,3-dichloropropane	63
1,4-dichlorobutane	84
1,6-dichlorohexane	83
1,9-dichlorononane	100
1,1-dichloroethane	7
multihalogenated alkanes	
1,1,1-trichloroethane	1
1,1,2,2-tetrachloroethane	N.D.
halogenated alkanes	
1-bromoethane	257
1-bromobutane	234
1-iodobutane	126
1,2-dibromoethane	355
1,2-dibromopropane	241
chlorinated aliphatic alcohols	
2-chloroethanol	13
3-chloropropanol	N.D.
4-chlorobutanol	90
6-chlorohexanol	116
chlorinated aliphatic acids	
chloroacetic acid	3
2-chloropropionic acid	N.D.
3-chloropropionic acid	N.D.
2-chlorobutyric acid	2
3-chlorobutyric acid	N.D.

^a Relative to 1-chlorobutane = 100

N.D. = not detectable

N.T. = not tested

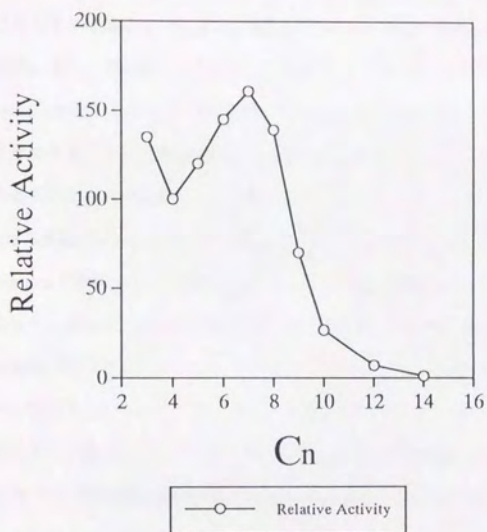


Fig. 3-8 Relationship of carbon-chain length and dehalogenase activity of LinB.
Relative to 1-chlorobutane ($C=4$) = 100.

3-4. 考察

塩基配列からの推定アミノ酸配列の比較によって、LinB は DhIA と相同性を持ち、同様の反応メカニズムでハロアルカンの加水分解的脱ハロゲン反応を行う酵素であることが予想された（第2章参照）。また、休止菌体を用いた解析から、LinB がかなり基質特性の広い dehalogenase であることが示唆されていた（Table 2-3）。本章では LinB の性質についてもう少し詳細な解析を行うために、1-chlorobutane の脱塩素活性を指標として *E. coli* 内で大量発現させた LinB を SDS-PAGE 上で単一のバンドになるまで精製した。LinB の至適 pH は 8.2 で、DhIA のそれと同じであった [Keuning et al. 1985]。また、単量体として存在して活性を示しているという点でも DhIA と同様であった [Keuning et al. 1985]。このような酵素学的な特徴からも LinB が DhIA と同タイプの酵素であると考えられる。ここで興味深いのは両者の基質特異性の違いである。DhIA が短鎖のハロアルカンしか基質としないのに対して、LinB は、C=7 のクロロアルカンピークとして、少なくとも C=10 の長鎖クロロアルカンまで脱塩素活性を示した。これまでに、いくつかの haloalkane dehalogenase が精製され、基質特性を中心にその特徴が調べられているが、全アミノ酸配列が明らかになっているものは少なく、DhIA と LinB は、構造と基質特異性の相関関係を検討するための格好の材料であるとも考えられる。実際に、コンピューター解析の結果、LinB の活性中心およびそこへつながるトンネル部分は DhIA のそれに比べて大きく、より大きな基質に適しているらしいということも示唆されており (Jiri Damborsky, personal communication)、それを証明するためにも、LinB の X 線結晶構造解析等を行い、立体構造を明らかにする必要があるものと思われる。

LinB の基質特異性の結果は休止菌体の値と比べて、全体の傾向に違いはみられなかったが、C=12 以上の長鎖の値については、休止菌体の方が明らかに強い活性を示した。休止菌体は 24 時間反応させているのに対して、LinB 精製酵素では 2 時間後の値を測定しており（すなわち、過剰量の基質の存在下で初速をみている）、数値は LinB 精製酵素のものの方が信用できる。従って、休止菌体の値は、弱い活性を拾ってしまっている可能性もあるものと思われる。もう一つの可能性としては、UT26 には長鎖アルカンに対する monooxygenase 活性が存在し、その作用で長鎖の haloalkane に対する脱塩素活性が検出されるということも考えられる。長鎖 *n*-alkane で誘導した休止菌体について脱ハロゲン活性を検討し、もし、誘導をかけた場合に長鎖のクロロアルカンの脱塩素活性が増すのであれば、UT26 に monooxygenase による脱塩素活性が存在している可能性が強くなる。

本章では、精製した LinB を用いて、LinA と合わせた γ -HCH の分解活性の検討は行わなかった。今後、両酵素を精製することにより、 γ -HCH から 1,2,4-TCB, 2,5-DCP, そして 2,5-DDOL を生じる反応の kinetics を解析し、UT26 が菌体内でどのような酵素的バランスを取っているのか、副産物を最小限に抑えるためにはどのような条件にすればよいか、等の検討を行っていく必要がある。

第4章

2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase (LinC) 遺伝子のクローン化とその性質

4-1. 緒言

前章までに、 γ -HCH を 2,5-DDOL にまで変換するのに必要な UT26 の酵素遺伝子 *linA*, *linB* のクローニングとその遺伝子および遺伝子産物の性質についての解析を行った。 γ -HCH は *LinA* と *LinB* の作用で 1,2,4-TCB, 2,5-DCP, 2,5-DDOL にまで変換されるが、1,2,4-TCB と 2,5-DCP は UT26 によってそれ以上分解されない dead-end 産物であった [Imai *et al.*, 1992; Nagasawa *et al.*, 1993a]。一方、2,5-DDOL は UT26 によって更に 2,5-DCHQ に変換されること、および 2,5-DCHQ は UT26 によって無機化されることが本研究と平行して明らかになっている [Nagasawa *et al.*, 1993b]。そこで、本章においては 2,5-DDOL を 2,5-DCHQ に変換する脱水素活性を有する UT26 由来の遺伝子をクローン化し、その性質についての解析を行った。

4-2. 材料および方法

(1) 菌株およびプラスミド

本章で新たに使用した菌株およびプラスミドを Table 4-1 に示した。

(2) 2,5-DDOL を含む assay solution の作製

第2章で用いた pKSR401 を保持する *P. putida* PpY101LA (PB401) を LB 培地で一晚培養する。この培養液を 200 ml の W 培地 [γ -HCH (50 μ g/ml), methionine (50 μ g/ml), tetracyclin (60 μ g/ml), glucose (0.5%) を含む] に接種し、30 $^{\circ}$ C で 72 時間培養する。遠心 (10,000 \times g 10 min) で菌体を除いた後、上清をメンブレンフィルター (0.2 μ m pore size; Schleicher & Schuell 社) でろ過する。この 2,5-DDOL を 54~172 μ M 含む溶液を assay solution として用いた。この溶液は少量の 1,2,4-TCB と 2,5-DCP も含むが、これらは、LinC 活性の測定を通じて不変であった。

(3) 2,5-DDOL 代謝産物の蓄積法

100 ml の pKSR501 を保持する *P. putida* PpY101 (PB501) の LB 培地 (NaI, Tc を含む) 一晚培養液から、遠心 (10,000 \times g, 10 min) により菌体を回収する (湿重量約 0.3 g の菌体を得られる)。この菌体を 200 ml の 2,5-DDOL を含む assay solution に再懸濁する。30 $^{\circ}$ C で 1 時間培養し、遠心 (10,000 \times g, 10 min) 後の上清を (2) と同様の方法でろ過したものを酢酸エチルで抽出し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。

Table 4-1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. paucimobilis</i>		
UT72	HCH ⁻ Nal ^r Δ <i>linC</i> genome::Tn5	This study
Plasmids		
pKSR501	pKS13 with 23 -kb UT26 DNA containing <i>linC</i>	This study
pKSR50101	pKS13 with 6.2-kb UT26 DNA containing <i>linC</i>	This study
pKSR1	pKS13 with 27 -kb UT26 DNA containing <i>linA</i> , <i>linX</i> , and ORFUP	[Imai, 1991]
pBFR1	pUC118 carrying 6-kb <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pKSR501	This study
pBFR2	pUC119 carrying 4-kb <i>Bgl</i> II- <i>Bam</i> HI fragment of pBFR1	This study
pBFR41	pUC119 carrying 1.2-kb <i>Sal</i> I fragment of pBFR1	This study
pBFR42	direction of <i>linC</i> is identical with <i>Plac</i> of pUC119 pUC119 carrying 1.2-kb <i>Sal</i> I fragment of pBFR1	This study
pBFR41 Δ N	direction of <i>linC</i> is opposite to <i>Plac</i> of pUC119	This study
pBFR41 Δ P	pBFR41 derivative	This study
pBFR42 Δ E	pBFR41 derivative	This study
pIMH3	pBFR42 derivative	This study
pIMH324	pUC18 carrying 2.15-kb <i>Hinc</i> II fragment of pIMA1	This study
pIMH325	direction of <i>linX</i> is identical with <i>Plac</i> of pUC18	This study
pIMH306	pIMH3 derivative	This study
pIMH307	pIMH3 derivative	This study
pIMH308	pIMH3 derivative	This study
pIMH331	pIMH3 derivative	This study
pIMH3R	pIMH3 derivative	This study
pIMH3R02	pUC18 carrying 2.15-kb <i>Hinc</i> II fragment of pIMA1	This study
pIMH3R04	direction of <i>linX</i> is opposite to <i>Plac</i> of pUC18	This study
pIMH3R27	pIMH3R derivative	This study
pIMH3R08	pIMH3R derivative	This study
pIMH3R29	pIMH3R derivative	This study
pIMH3R11	pIMH3R derivative	This study
pIM27	pIMH3R derivative	This study
pIM27A	pUC18 carrying 2.7-kb fragment containing ORFUP and <i>linA</i>	This study
pMYLC1	pUC118 carrying 0.9-kb fragment containing ORFUP	This study
pMYLC21	pAQN carrying <i>linC</i> in place of <i>aqn</i>	This study
pMYLC22	pAQN carrying <i>linX</i> in place of <i>aqn</i>	This study
pMYLC31	pAQN carrying <i>linX</i> in place of <i>aqn</i>	This study
	pAQN carrying ORFUP in place of <i>aqn</i>	This study

aqn, aqualysin I gene of *Thermus aquaticus*.

(4) LinC 活性測定法

プレート上のコロニーの一部を爪楊枝でかきとり、(2)で作製した 2,5-DDOL を含む assay solution 100 μ l に懸濁する。*E. coli* は 37 $^{\circ}$ C、それ以外は 30 $^{\circ}$ C で 2~3 時間反応させた後に、反応液を酢酸エチルで抽出し、これを GC (ECD) 解析することによって LinC 活性の有無を検討する。なお、本章の研究においては定性的な活性の有無が重要であり、特に厳密な定量的な解析は必要としなかったため活性 1 Unit の定義は行わなかった。

(5) γ -HCH plate の作製

γ -HCH のエタノール溶液 (50 mg / ml) 1~2 ml を 100 ml の W 培地 (寒天 1.5 % を加え、溶解したもの) に加え、懸濁した状態でプレートにする。 γ -HCH は飽和量を超えており、白濁したプレートとなる。

(6) *Sphingomonas paucimobilis* からの全 RNA の回収

全 RNA の回収には Ausubel らの成書に記載された a. プロトプラスト法 [Ausubel *et al.*, 1987] あるいは、放線菌からの回収方法である b. Kirby 法 [Hopwood *et al.*, 1985] を用いた。

a. プロトプラスト法 [Ausubel *et al.*, 1987]

試薬

プロトプラスト化 buffer	15 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	8 mM	EDTA
	0.45 M	Sucrose
G (ー) 菌溶菌 buffer	10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	10 mM	NaCl
	1 mM	sodium citrate
	1.5 %	SDS
飽和 NaCl 溶液	100 ml	の水に 40 g の NaCl を加え飽和させる。

操作

- ① 10 ml の L 培地で OD₅₅₀ = 0.3 まで培養した菌体を遠心により集菌し、10 ml のプロトプラスト化 buffer に懸濁する。
- ② 80 μ l のリゾチーム溶液 (50 mg / ml) を加え、氷上で 15 分間放置しプロトプラスト化させる。
- ③ プロトプラストを 4,000 rpm (2,900 \times g)、5 分間遠心して集める。
- ④ 上清を捨て、少量残ったプロトプラスト化 buffer にプロトプラストを懸濁する。

- ⑤ 15 μ l の diethylpyrocarbonate (DEPC) を加える。
- ⑥ 0.5 ml の G (一) 菌溶菌 buffer を加え穏やかに混ぜエッペンドルフチューブに移す。
- ⑦ 37 $^{\circ}$ C で 5 分間放置後、氷上に移す。
- ⑧ 250 μ l の飽和 NaCl 溶液を加え、氷上に移す。
- ⑨ 氷上に 10 分間放置した後、15,000 \times g で 15 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心する。
- ⑩ 上清をエッペンドルフチューブにとり、3 倍量のエタノールを加え、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間放置する。
- ⑪ 15,000 \times g で 15 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し、沈殿を 70 % エタノールで洗浄後、乾燥させる。
- ⑫ 50 ~ 100 μ l の水 (DEPC 処理したもの) に溶解する。

b. Kirby 法 [Hopwood *et al.* 1985]

試薬

PBS	0.14 M	NaCl
(phosphate-buffered saline)	2.7 mM	KCl
	10.1 mM	Na_2HPO_4
	1.8 mM	KH_2PO_4
		(pH 7.4)
Kirby ^{FK} mix	0.1 g	TSA \cdot Na ¹
	0.3 g	<i>p</i> -aminosalicylic acid
	1 ml	phenol mix ²
	0.5 ml 1 M	Tris-HCl (pH 8.3)
		水で 10 ml に fill up する。

1; Triisopropylphenylsulfonic acid sodium salt

2; 0.1 % の 8-OH quinoline を含むフェノールを Tris-HCl (pH 8.0) で飽和させたもの。

これのみ、使用直前に加える。

操作

- ① 10 ml 程度の培養液より遠心により菌体を集め、PBS で菌体を洗浄後、4 ml の Kirby mix に懸濁する。
- ② sonication により菌体を破壊する。
- ③ 1 分間 vortex を行い、DNA を分断する。

- ④ フェノール・クロロホルム処理を2回行う。
- ⑤ 上層を取り、1/10容の3 M 酢酸ナトリウム (pH 6.0) を加える。
- ⑥ イソプロパノール沈殿を行う。
- ⑦ 70 % エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、1 ml の水に溶解する。
- ⑧ 3 ml の4 M 酢酸ナトリウム (pH 6.0) を加える。
- ⑨ -20 °C で、2 時間以上放置する。
- ⑩ 遠心により沈殿を回収し、70 % エタノールで洗浄後、乾燥させる。
- ⑪ 50 ~ 100 μ l の水 (DEPC 処理したもの) に溶解する。

(7) ノーザンブロット解析

試薬

RNA 用水	0.1 %	DEPC を加え一晩放置後、 オートクレーブしたものを RNA 用水として使用した。
10 x MOPS buffer	0.2 M	MOPS (pH 7.0)
	150 mM	sodium acetate
	10 mM	EDTA
20 x HCHO buffer	20 mM	EDTA
	2 %	SDS
	400 mM	sodium phosphate buffer (pH 6.8)

別々にオートクレーブしてから混合する。

20 x SSPE	3.6 M	NaCl
	0.2 M	sodium phosphate buffer (pH 7.7)
	2 mM	EDTA
電気泳動 buffer	1 x	MOPS
	5 %	formalin
ハイブリダイゼーション液	5 x	SSPE
	50 %	formamide
	5 x	Denhart's solution
	0.5 %	SDS

操作

ゲルの作製

- ① 電子レンジで 0.6 g のアガロースを 48 ml の RNA 用水に溶かす。
- ② 6 ml の 10 x MOPS buffer と 6 ml のホルマリンを加えた後、固化させる。

サンプル調製

- ① RNA 6 μg を含む試料（水で 500 倍希釈したものの OD_{260} を測定し、 $1.0 \text{ OD} = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ として計算）に脱イオン化ホルムアミド 7 μl 、ホルマリン 2 μl 、20 x HCHO buffer 1 μl を加え、RNA 用水で全量を 20 μl にする。
- ② 65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間処理後、室温で 10 分間放置する。
- ③ BPB 液を 1 μl 加え、アプライする。
- ④ 50 V で約 1 時間半電気泳動する。

トランスファー・固定化

- ① ゲルをサザンブロッティングと同様にトランスファーを行う。ただし、20 x SSC の代わりに 20 x SSPE を用いる。
- ② メンブレンを風乾し、UV で RNA をメンブレンに固定する。

ハイブリダイゼーション

- ① ハイブリダイゼーション液に変性サケ精子 DNA を 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ となるように加え、42 $^{\circ}\text{C}$ で 1 ~ 2 時間プレハイブリダイゼーションを行う。
- ② プローブを加え、更に 1 晩ハイブリダイズさせる。
- ③ 2 x SSPE、0.1 % SDS 溶液で 42 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間 2 回洗浄する。
- ④ 1 x SSPE、0.1 % SDS 溶液で 42 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間洗浄する。
- ⑤ 風乾後、オートラジオグラムをとる。

(8) 塩基配列の accession number

本章で明らかにした塩基配列は DDBJ, EMBL, GenBank nucleotide sequence data base に登録しており、accession number は *linC* については D14595、*linX*, ORFUP については D23722 である。

4-3. 結果

(1) 2,5-DDOL dehydrogenase (LinC) 活性を有するコスミドクロンの単離

第 2 章で *P. putida* PpY1011A 中に作製した UT26 のジーンライブラリーを用いて、LinC 活性を有するクロンのスクリーニングを GC (ECD) を用いて行った。1,350 クローンについてスク

リーニングを行った結果、20 個のポジティブクローンを得た。PB501 に代表されるこれら全てのクローンは、PB401 を用いて γ -HCH から作製した 2,5-DDOL を Compound I (次節において 2,5-DCHQ と同定) に変換する活性を示した。なお、PB501 は LinB 活性を示さなかった。また、Compound I 及び 2,5-DCHQ の標準物質 (Kodak) は UT26 によっては分解されたが、PB501 によっては分解されなかった。PB501 が保持するプラスミドを pKSR501 と命名した。pKSR501 は 22.5-kb の挿入断片を保持していた。pKSR501 を LinA 活性を持たない *P. putida* PpY101 及び *E. coli* HB101 に導入したところ、いずれの場合も LinC 活性を示したが、LinA 活性は示さなかった。以上の結果、LinC 活性の発現には LinA 活性が不要であること、及び、LinC 活性を有するクローンには *linA*, *linB* 遺伝子が含まれていないことが明らかになった。

(2) Compound I の同定

PB501 によって 2,5-DDOL から生じた Compound I の RT は 2,5-DCHQ の標準物質、及び UT26 によって γ -HCH から生じた 2,5-DCHQ の RT と一致した。更に詳細に同定するために Compound I のマスマスペクトルを測定した (Fig. 4-1)。Compound I は分子イオンピーク (M^+ , $m/z = 178$) とフラグメントピーク ($M^+ - 2H$, $m/z = 176$; $M^+ - 2H - CO$, $m/z = 148$) を示したが、これらの特徴は 2,5-DCHQ の標準物質、及び UT26 によって γ -HCH から生じた 2,5-DCHQ のスペクトルの特徴 [Nagasawa et al, 1993b] と一致した。これらの結果から、PB501 によって 2,5-DDOL から生じた Compound I は 2,5-DCHQ であると結論した。2,5-DCHQ は 2,5-DDOL から脱水素活性を持つ酵素 (LinC) によって生じるものと考えられる。UT26 において、GC のピークエリアの面積からおおよその定量分析を行った結果、35 μ mol の γ -HCH から、少なくとも 11 μ mol の 2,5-DCHQ が生じていた。すなわち、約 3 分の 1 の γ -HCH が dead-end 産物とならずに、資化経路を流れているものと考えられる。しかし、1,2,4-TCB, 2,5-DCHQ は揮発性であり、本研究で用いたシステムでは正確な定量分析は不可能であった。

(3) *linC* 遺伝子のサブクローニング

pKSR501 の *Bam*HI と *Hind*III による消化で 5 つの断片 (22-, 6.3-, 6.2-, 6.0-, 4.0-kb) を生じる。これらの断片を pUC118 を用いてサブクローン化し、組換えプラスミドを *E. coli* MV1190 に導入した。形質転換体の LinC 活性を測定したところ、活性を示すものは全て 6.2-kb の挿入断片を保持していた。この結果、pKSR501 由来の 6.2-kb *Bam*HI-*Hind*III 断片中に 2,5-DDOL を 2,5-DCHQ に変換する活性 (LinC 活性) に必要な遺伝子が存在していることが明らかになった。

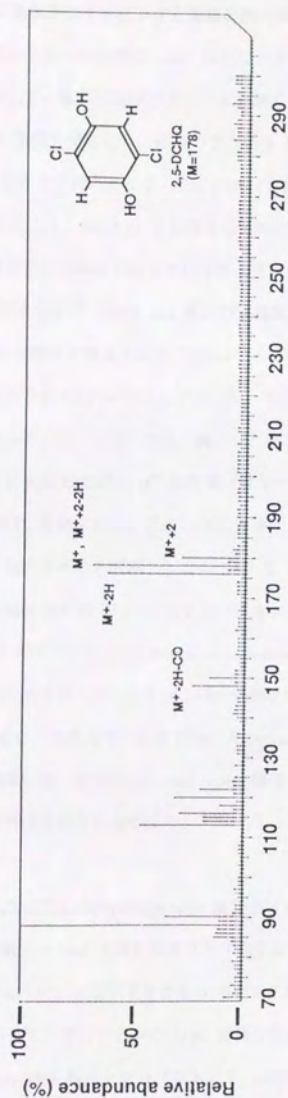


Fig. 4-1 Mass spectrum of Compound I. Compound I was identified as 2,5-DCHQ. The ionization energy of MS was 70eV and the GC condition was described in Materials and Methods.

(4) 制限酵素による *linC* 遺伝子のマッピングと塩基配列の決定

6.2-kb *Bam*HI-*Hind*III 断片中のどの領域に *LinC* 活性に必要な遺伝子が存在しているかを決定するために、制限酵素を利用して一連の欠失プラスミドを作製し、これらの欠失プラスミドを保持する *E. coli* MV1190 の *LinC* 活性を測定した。結果のまとめを Fig. 4-2 に示す。0.9-kb *Nru*I-*Sa*I 断片が *LinC* 活性に必要であることが明らかになった。pBFR41 あるいは pBFR42 を保持する *E. coli* MV1190 を IPTG 処理したところ、pBFR41 を保持するものが IPTG 処理により強い *LinC* 活性を示した。この結果より、遺伝子の方向は Fig. 4-2 に示すように予想された。

次に、0.9-kb *Nru*I-*Sa*I 領域を含む 1.2-kb *Sa*I 断片の塩基配列を両方のストランドについて決定したところ、*LinC* 活性を示す領域と重なる形で 750-nt からなる ORF が見出された (Fig. 4-3)。この領域には他の有意な大きさの ORF は存在しなかった。また、この ORF の方向は IPTG 誘導実験で予想される方向と一致していた。ORF の直上流には、推定 SD 配列 [Shine and Dalgarno, 1975]、更にその上流には *E. coli* における σ^{70} 依存性プロモーターの -10、-35 領域のコンセンサス配列とよく一致する配列が見出された。以上の事実より、この ORF が *LinC* 活性を示す酵素遺伝子をコードしている可能性が高いと判断し、この ORF を *linC* と命名した。*linC* は塩基配列より、250 アミノ酸からなる推定分子量 25,644 のタンパクをコードしていると予想される。また、*linC* の G+C 含量は 64.3% であり、*Sphingomonas paucimobilis* の type strain の total G+C 含量 (65%) [Palleroni, 1984] 及び *linB* の G+C 含量 (62.5%) と非常に近い値であった。G+C 含量で見ると、*linC* は *linA* の場合とは異なり、*linB* 同様、*Sphingomonas* 型の遺伝子であると予想される。塩基配列を決定した領域には、安定な inverted repeat 構造を取ると予想される配列などのターミネーターと予想される配列は見出されなかった。

(5) *linC* 遺伝子以外の 2,5-DDOL dehydrogenase 遺伝子 (*linX*) の単離

前述したように本章で単離した *LinC* 活性を示すコスミドクローンは *LinA*, *LinB* 活性を示さなかった。また、第 2 章で述べたように *linB* 遺伝子を含むコスミドクローンは *LinC* 活性を示さなかった。そこで、*linA* 遺伝子を含むコスミドクローンが *LinC* 活性を示すか否かについて検討を行った。その結果、*linA* を含む 27-kb 挿入断片を持つプラスミド pKSR1 を保持する *P. putida* PpY101 (PB101) [Imai *et al.*, 1991] が *LinC* 活性を示した。しかし、活性の強さは PB501 に比べて弱かった (Fig. 4-4)。湿重量 1 mg の菌体と比較した場合、PB501 は 100 μ l の assay solution に含まれる 2,5-DDOL を 120 min で完全に 2,5-DCHQ に変換したが、PB101 は 50 % 以下しか変換することが出来なかった。

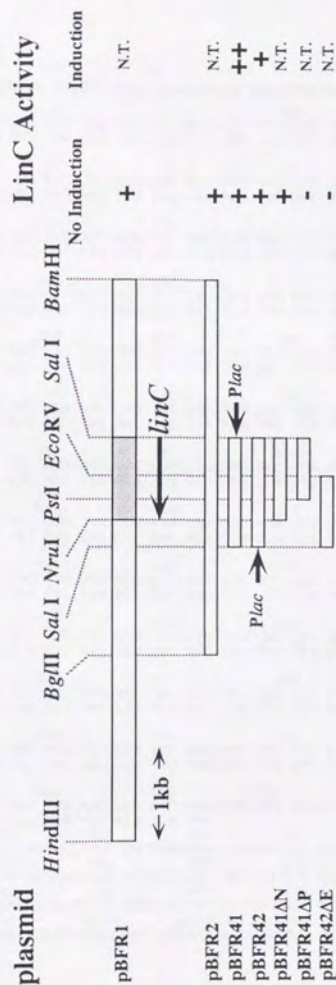


Fig. 4-2 Deletion analysis of the 6.2-kb *Bam*HI-*Hind*III fragment. The directions of transcription by *lac* promoter of pBFR41 and pBFR42 are indicated by the short arrows. The procedure for the measurement of LinC activity and the condition for induction are described in Materials and Methods. Deduced location and direction of the *linC* gene is indicated by the arrow under the partial restriction map of the 6.2-kb *Bam*HI-*Hind*III fragment. N. T., not tested. ; *Plac*, *lac* promoter.

-80
GTGGAC CGGCGAATA

-70 -60 -50 -40 -30 -20 -10

TGGCATGACC GTGGCTCTCA AGTTCCAGTA ATGAACCGG AACGCCGATA AGAACTGTT GGAG SATAG

10 20 30 40 50 60

ATG TCT GAT TTG AGC GGC AAG ACG ATA ATC GTG ACG GGT GGT GGC AGC GGC ATC GGC CGC

Met Ser Asp Leu Ser Gly Lys Thr Ile Ile Val Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ile Gly Arg

70 80 90 100 110 120

GCC ACC GTG GAA TTG CTG GTG GCC AGT GGT GCC AAC GTT CCG GTG GCG GAC ATC AAC GAC

Ala Thr Val Glu Leu Leu Val Ala Ser Gly Ala Asn Val Pro Val Ala Asp Ile Asn Asp

130 140 150 160 170 180

GAG GCC GGT GAG GCG GTC GTC GCT ACG TCT GGC GGA AAG GCC GGC TAT TTC CCG TGC GAC

Glu Ala Gly Glu Ala Val Val Ala Thr Ser Gly Gly Lys Ala Ala Tyr Phe Arg Cys Asp

190 200 210 220 230 240

ATC GCA CAG GAA GAG GAC GTG AAG GCA CTT GTC GCG CAG ACT CTG GCG GCG TTC GGC GGC

Ile Ala Gln Glu Glu Asp Val Lys Ala Leu Val Ala Gln Thr Leu Ala Ala Phe Gly Gly

250 260 270 280 290 300

CTT GAC GGC TCG TTC AAC AAT GCG GCG ATC CCG CAG GCC GGA CTG CCG CTT GCC GAA GTG

Leu Asp Gly Ser Phe Asn Asn Ala Ala Ile Pro Gln Ala Gly Leu Pro Leu Ala Glu Val

310 320 330 340 350 360

TCG CTC GAA CCG TTT CCG CAG AGC ATG GAT ATC AAT GTA ACC GGC ACG TTC CTG TGC ATG

Ser Leu Glu Arg Phe Arg Gln Ser Met Asp Ile Asn Val Thr Gly Thr Phe Leu Cys Met

370 380 390 400 410 420

AAG TAC CAG ATC CTT GCG ATG ATC GAG CCG GCG ACG AAG GGA TCG ATC GTC AAC ACC GCA

Lys Tyr Gln Ile Leu Ala Met Ile Glu Arg Gly Thr Lys Gly Ser Ile Val Asn Thr Ala

430 440 450 460 470 480

TCC GCC GCT GGC GTG GTC GGC GTG CCG ATG CAC GCG GAA TAT GTC GCG GCG AAG CAT GCG

Ser Ala Ala Gly Val Val Gly Val Pro Met His Gly Glu Tyr Val Gly Ala Lys His Ala

490 500 510 520 530 540

GTG GTC GCG CTG ACC CCG GTG GCG GCG GCA GAC TAT GGC AAC CAC GCG ATT CCG GTG AAG

Val Val Gly Leu Thr Arg Val Ala Ala Ala Asp Tyr Gly Lys His Gly Ile Arg Val Asn

550 560 570 580 590 600

GCG CTT GTG CCC GCG GCG GTG CCG ACG CCT ATG CTG CAG CCG GCG ATG GAC AAT GAT GCG

Ala Leu Val Pro Gly Ala Val Arg Thr Pro Met Leu Gln Arg Ala Met Asp Asn Asp Ala

610 620 630 640 650 660

GGC CTT GAG CCC TAT CTG AAC TCG ATC CAC CCG ATC GCG CCG TTC AGC GAA CCG CAC GAG

Gly Leu Glu Pro Tyr Leu Asn Ser Ile His Pro Ile Gly Arg Phe Ser Glu Pro His Glu

670 680 690 700 710 720

CAG GCC CAG GCC GCC GTA TGG TTG CTG TCC GAC GCG GCT TCG TTC GTC ACC GCG TCC TGC

Gln Ala Gln Ala Ala Val Trp Leu Leu Ser Asp Ala Ala Ser Phe Val Thr Gly Ser Cys

730 740 750 760 770 780

CTT GCA GCA GAC GGC GGC TTT ACC GCG ATC TGA TCATTTT ACGGAGCAGC CTCATGACAC

Leu Ala Ala Asp Gly Gly Phe Thr Ala Ile ***

790 800 810 820 830 840 850

AGCATCAAGA TACTCGCGAC GATCCCGCGC CGGAAGGACA TTTCGGAACA GCAGTTCCAC GATCACTGGC

860 870 880 890 900 910 920

GCCATCGCA CGGCACACTC AGCAAGAAGA TCGCGTGCTT GCGCGGCTAT GTGCAATGCG ACCGGATGTT

930 940 950 960 970 980 990

CTCTCGCTG CTGCGTGATA CACAGCTGCG CTACGACGCG AATTACGAGC TGTGATATGA CAGTCTCGAC

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060

GATCGGCTCA ACATGGGCAA AGATCCCGCG CATCGCAAT ACAACATCCC CGACGACCG CTGTTGCTCG AC

Fig. 4-3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *S. paucimobilis* *linC* gene. The deduced amino acid sequence is given below the nucleotide sequence. The putative Shine-Dalgarno sequence [Shine and Dalgarno, 1975] is boxed. Nucleotides in the upstream region of *linC* which show homology to *E. coli* positions -35 (TTGACA) and -10 (TATAAT) are underlined.

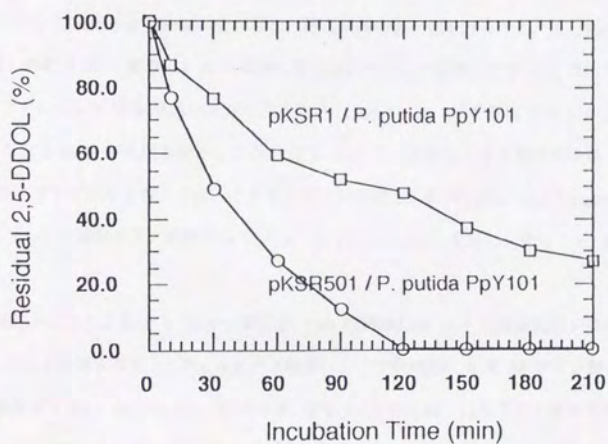


Fig. 4-4 2,5-DDOL degradation activity of PB501 containing the *linC* gene and PB101 containing the *linX* gene. A 1-mg (wet weight) amount of PB501 cells degraded 100 % of 2,5-DDOL in 100 μ l of assay solution in 120 min, while PB101 cells degraded less than 50 % in 120 min.

1.2-kb *Sal*I 断片をプローブとしてサザン解析を行った結果、本章で単離した 20 個のコスミドクローン全てに、この断片が含まれているが、pKSR1 には含まれていないことが明らかになった（データは示さない）。すなわち、pKSR1 に含まれる 2,5-DDOL dehydrogenase 遺伝子は *linC* 遺伝子とは異なる遺伝子であると考えられた。そこで、この新たな 2,5-DDOL dehydrogenase 遺伝子を仮想 *linX* と命名した。

（6）仮想 *linX* 遺伝子のサブクローニング、deletion 解析、及び塩基配列の決定

仮想 *linX* 遺伝子のサブクローニングを行った結果、*linA* を含む 5-kb *Hind*III 断片を持つプラスミド pIMA1 [Imai et al, 1991] を保持する *E. coli* MV1190 に LinC 活性がみられた。そこで更に領域の限定を行ったところ、*linA* の上流に位置する 2.15-kb *Hinc*II 断片に LinC 活性に必要な遺伝子が存在していることが明らかになった。2.15-kb *Hinc*II 断片を保持するプラスミド pIMH3 及び pIMH3R について deletion plasmid を作製し、活性領域の縮小化を行ったところ、Fig. 4-5 に示すように *linA* の約 1-kb 上流の 0.8-kb の領域に限定された。この領域を含む *linA* 遺伝子の上流域の両ストランドについて塩基配列を決定したところ（Fig. 4-6）、活性領域とちょうど重なる形で 750-nt からなる ORF が見出された。この ORF は 250 アミノ酸からなる推定分子量 25,492 のタンパクをコードしていると考えられ、その直上流には推定 SD 配列 [Shine and Dalgarno, 1975] も存在した。LinX の推定アミノ酸配列は LinC と 33.1% の identity を示し、その G+C 含量は 59.3% であった。

更に興味深いことに、*linX* と *linA* の間の約 1-kb の領域には *linX* と塩基配列レベルで高い相同性 (69%) を示す領域が存在し (Fig. 4-6 の下線部)、この領域内に N 末 58 アミノ酸が LinX の推定アミノ酸配列と高い identity (70.7%) を示す (Fig. 4-7) 444-nt、148 アミノ酸からなる推定分子量 15,874 のペプチドをコードしていると予想される ORF が存在した (ORFUP と命名; Fig. 4-6)。*linX* と高い相同性を示す領域は、Fig. 4-6 で、1,411~1,415 番目の 5 個の G を 4 個に、1,873~1,874 番目の 2 個の C を 3 個に、それぞれ変更するだけで、1,996~1,998 の TAA を終始コドンとする LinX 全体と 64% の相同性を示す ORF (Fig. 4-8) をコードする領域に変化させることが可能である。しかし、この領域を *tac* プロモーター下で発現誘導しても LinC 活性はみられず (Fig. 9a)、後述するように短いペプチドの誘導発現がみられることから、シークエンスエラーではなく、塩基配列としては *linX* と似ているが、LinC 活性を持ったタンパク質はコードしていないものと思われる。

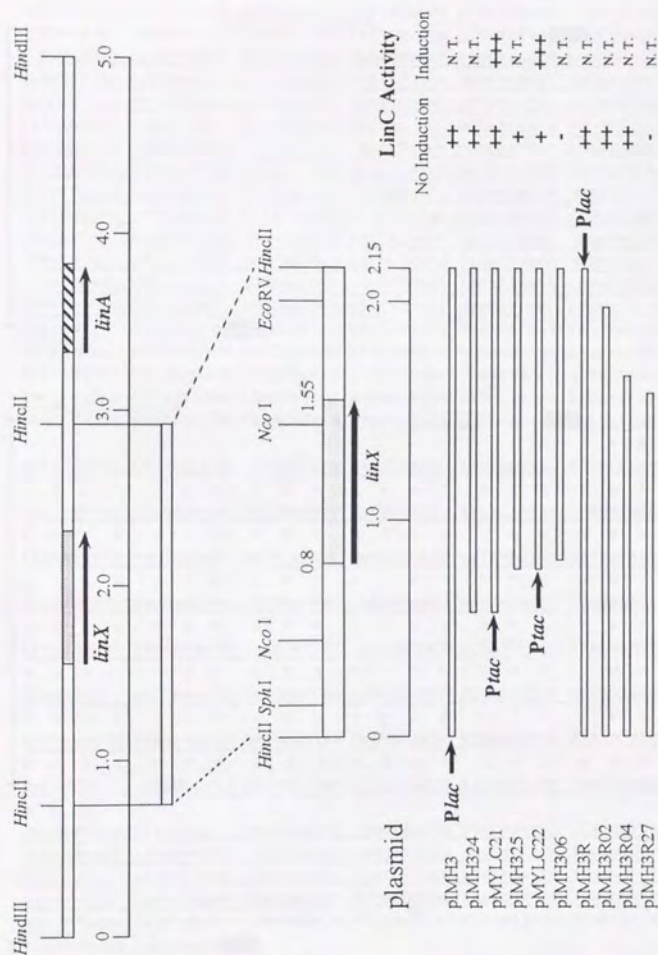


Fig. 4-5 Deletion analysis of the 2.15-kb *HincII* fragment.

The directions of transcription by *lac* or *tac* promoter of pIMH3, pIMH3R, pMYLC21, and pMYLC22 are indicated by the short arrows. The procedure for the measurement of LinC activity and the condition for induction are described in Materials and Methods. Location and directions of the *linX* and *linA* genes are indicated by the arrows under the partial restriction map. N. T., not tested; *Plac*, *lac* promoter; *Ptac*, *tac* promoter.



Fig. 4-6 Nucleotide sequences of the *S. paucimobilis* *linX* gene and upstream region of the *linA* gene.

The deduced amino acid sequence of ORFUP is given below the nucleotide sequence. The putative Shine-Dalgarno sequences [Shine and Dalgarno, 1975] of *linX*, ORFUP, and *linA* are boxed. Nucleotides in the upstream region of *linX* which show homology to *E. coli* positions -35 (TTGACA) and -10 (TATAAT) are dotted underlined. Nucleotide sequences show homology (70.7 %) to each other are underlined.


```

LinX  MSNRMAGKVALVTGAASGLGAAQARLFAKEGAKVVVADLNVEMGNKVVAEIQESGGEAYR 60
      *.**.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
ORFUP  MANRLAGKVALITGGASGLGAAQAKRFAEEGAKVVIGDLNEEMAKGVVAEIRAAGGDALF 60

```

Fig. 4-7 Comparison of the deduced amino acid sequences of LinX and ORFUP in 60 amino acid residues of the NH₂ terminal. The amino acid residues which are conserved in the sequences compared are marked with asterisks, and similar amino acid residues are marked with dots.

```

LinX   1  MANRLAGKVALITGGASGLGAAQAKR-FAEEGAKVVIGDLNEEMA-KGVV 48
      * * * * *
ORFUP2 1  MSNRMAGKVALVTGAASGLGAAQA-RLFAKEGAKVVVADLNVEMGNK-VV 48
      * * * * *
      49 AEIRAAGGDALFI-RLDVTDAASWNNIA--AAVDG-FGGLTTLNTAGI 94
      * * * * *
      49 AEIQESG--ARPIVRLDITDAASW--AGAVEAAV-GAFGKLTLYNTAGI 93
      * * * * *
      95 IHFGGFEE-ESIEGWNKMVAVNQTAIFLGKA-AIPELVKSGNGSIINIS 142
      * * * * *
      94 IH-GAMIQDETLEGWSKMIAVNQTAFLGLKMVA-PEIARSGNGAILNIS 141
      * * * * *
      143 SL---IGMFPTAGNASYCATKAARIMSKAAALEFVDRGVRVNTIVPGGM 189
      * * * * *
      142 SLVSVICE-P--GLISYAATKSAVRAMTKVAALEYVGQGVVNTIVPGGM 188
      * * * * *
      190 NTPITANVPPD-VL--KQQT SQIPMKG LGDPIDIANGALFLASDEAKYIT 236
      * * * * *
      189 KTPMQANVTPEQVEWYKAQ---IPMGDLGEPNDIAYGALYLLSDEAKYVT 235
      * * * * *
      237 GVDLPIDGGWSGV 250
      * * * * *
      236 GTELFIDGGWSSAA 249

```

Fig. 4-8 Comparison of the deduced amino acid sequences of LinX and mutagenized ORFUP (ORFUP2). The amino acid residues which are conserved in the sequences compared are marked with asterisks.

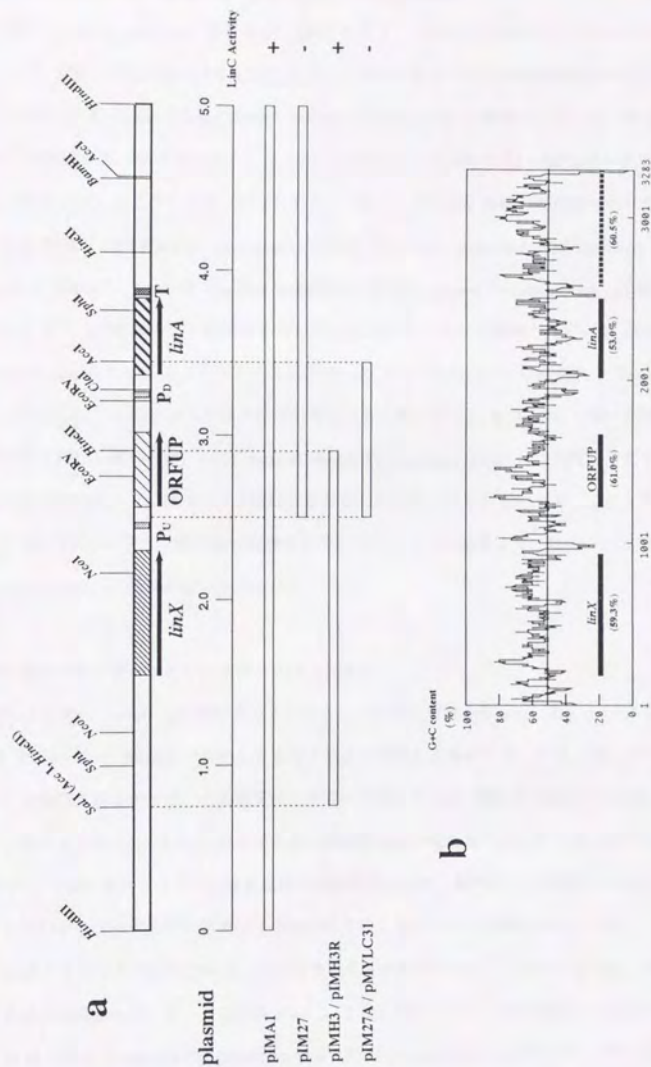


Fig 4-9 a. Restriction map and deletion analysis of the 5-kb *Hind*III fragment containing the *linA*, *linX*, and ORFUP genes. Location and directions of *linA*, *linX*, and ORFUP genes are indicated by the arrows under the restriction map. b. G+C base content profile of the region containing the *linA*, *linX*, and ORFUP genes.

(7) LinC, LinX 推定アミノ酸相同配列のデータベースからの検索

SWISS-PROT protein data bank より LinC, LinX 推定アミノ酸配列と相同性を示すタンパクを検索したところ、少なくとも Table 4-2 に示した 24 の異なるタンパクと有意な相同性を示した。これらのタンパクは一般に short-chain alcohol dehydrogenase family と総称されている一群 [Jörnvall et al, 1981; Neidle et al, 1992; Persson et al, 1991] であり、これらのタンパクがお互いにそうであるように、LinC, LinX もこれらのタンパクに対して全体として 30% 前後の相同性を示した。その中でも、LinC は特に *Streptomyces hydrogenans* 由来の 20- β -hydroxysteroid dehydrogenase (45.2%) [Marekov et al, 1990] と、LinX は *Bacillus megaterium* 由来の glucose dehydrogenase (41.8%) [Jany et al, 1984] とそれぞれ最も高い相同性を示した。Neidle らによって提唱されている short-chain alcohol dehydrogenase family のコンセンサス配列 [Neidle et al, 1992] との alignment を Fig. 4-10 に示す。LinC, LinX は、このコンセンサス配列に対してもそれぞれ 43.7%, 44.9% と高い相同性を示した。考察でも詳しく述べるが、short-chain alcohol dehydrogenase family には活性に重要であると考えられる保存性の高い 13 個のアミノ酸残基が存在し、LinC, LinX においても、これらのうちそれぞれ 12 個、11 個のアミノ酸残基が保存されていた。こうした結果より、LinC, LinX も NAD^+ 依存性の dehydrogenase 活性を持つものと考えられる。

(8) linC 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析

linC 遺伝子を含む 1.2-kb *SalI* 断片をプローブとしたサザン解析を行った (Fig. 4-11a)。UT26 の全 DNA を *Bam*HI と *Hind*III で消化したものと *SalI* で消化したものに対しては 1 本のポジティブシグナルしか検出されなかった。この結果は、クローン化した linC 遺伝子が確かに UT26 由来であること、及び UT26 中には linC 遺伝子と高い相同性を持つ塩基配列は存在しないことを示している。ただし、linX 遺伝子のように塩基配列の相同性はないが、他の宿主で発現させると LinC 活性を示すタンパクをコードしている遺伝子が他にも存在している可能性は残されている。

UT26 にはアルカリ法で回収される 4 つのプラスミドが存在するが、これらには linC 遺伝子はハイブリダイズしなかった (データは示さない)。また、同じ G (-) 菌である *P. putida* PpY101 [Kimbara et al, 1989], *E. coli* HB101 [Maniatis et al, 1982], *Pseudomonas* sp. KKS102 (PCB 分解菌; short-chain alcohol dehydrogenase family の *bphB* 遺伝子を持つ) [Kimbara et al, 1988] の全 DNA にも linC と高い相同性を持つ配列は存在しなかった。このことは、linC 遺伝子そのものが一般に広く分布している遺伝子であるというわけではないことを示している。

Table 4-2 Identities between LinC/LinX and members of the short-chain alcohol dehydrogenase family

Protein	Swiss/Prot Code	Identity (%) to LinC / LinX	References
1. 20- β -hydroxysteroid dehydrogenase	2BHD_STREX	45.2 / 39.9	[Marekov, 1990]
2. Glucose dehydrogenase	DHGA_BACME	33.9 / 41.8	[Jany, 1984]
	DHGB_BACME	32.1 / 40.2	[Heilmann, 1988]
	DHG_BACSU	33.1 / 41.0	[Heilmann, 1988]
3. N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase	DHMA_FLASI	33.3 / 32.9	[Yamamoto, 1991]
4. 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase	3BHD_COMTE	34.7 / 38.6	[Yin, 1991]
5. Keto-acyl reductase	ACT3_STRCO	32.6 / 29.8	[Hallam, 1988]
	DHK1_STRVN	32.5 / 30.8	[Sherman, 1989]
	DHK2_STRVN	(30.5) / 33.1	[Sherman, 1989]
6. Adipocyte P27 protein	AP27_MOUSE	31.4 / 26.2	[Navre, 1988]
7. 7- α -hydroxysteroid dehydrogenase	HDHA_ECOLI	32.5 / 32.5	[Yoshimoto, 1991]
	BA71_EUBSP	31.3 / 30.0	[Gopal-, 1990]
	BA72_EUBSP	32.1 / 31.3	[Gopal-, 1990]
8. 3-oxoacyl- [acyl-carrier protein] reductase	FABG_ECOLI	27.5 / 36.5	[Rawlings, 1992]
	FABG_CUPLA	34.8 / 33.3	[Klein, 1992]
9. Ribitol dehydrogenase	RIDH_KLEAE	(31.3) / 28.9	[Morris, 1974]
10. Nodulation protein G	NODG_RHIME	29.6 / 27.8	[Debellé, 1986]
	NODG_AZOBR	(28.2) / (29.2)	[Delledonne, 1990]
	NODG_RHIMS	25.6 / 26.6	[Horvath, 1986]
11. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase	PGDH_HUMAN	(29.5) / (32.3)	[Krook, 1990]
12. Acetoacetyl-CoA reductase	PHBB_ZOORA	31.3 / 33.3	[Peoples, 1989a]
	PHBB_ALCEU	(28.7) / 30.9	[Peoples, 1989b]
13. <i>Cis</i> -benzene glycol dehydrogenase	BNZE_PSEPU	32.0 / 31.7	[Irie, 1987]
14. <i>Cis</i> -toluene dihydrodiol dehydrogenase	TODD_PSEPU	32.0 / 31.7	[Zylstra, 1989]
15. Nitrogen fixation protein FixR	FIXR_BRAJA	30.2 / 29.0	[Thöny, 1987]
16. 1,2-Dihydroxycyclohexa-3,5-diene carboxylate dehydrogenase	BEND_ACICA	27.4 / 30.2	[Neidle, 1992]
	XYLL_PSEPU	27.7 / 29.8	[Neidle, 1992]
17. Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	GUTD_ECOLI	(32.0) / (24.9)	[Yamada, 1987]
18. Hypothetical 26.8 kD protein	YINL_LISMO	(30.2) / (31.3)	[Gallard, 1991]
19. EnvM protein	ENVM_SALTY	23.8 / 23.3	[Turnowsky, 1989]
	ENVM_ECOLI	24.2 / 23.3	[Bergler, 1992]
20. Biphenyl- <i>cis</i> -diol dehydrogenase	BPHB_PSEPS	30.1 / 30.5	[Taira, 1992]
21. Corticosteroid 11-b-dehydrogenase	DH11_RAT	(27.3) / (26.9)	[Agarwal, 1989]
22. 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	ENTA_ECOLI	30.2 / 31.0	[Liu, 1989]
23. C- α -dehydrogenase	LIGD_PSEPA	24.8 / (32.8)	[Masai, 1993]
24. D- β -hydrobutyrate dehydrogenase	BDH_RAT	(27.0) / 27.0	[Churchill, 1992]

() : identity in less than 200 amino acid residues

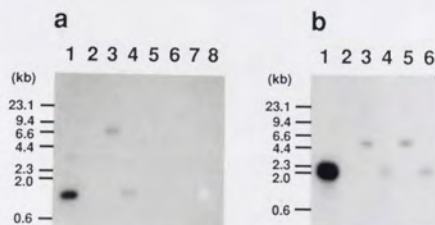


Fig. 4-11 Southern blot analysis of the 1.2-kb *Sal*I and 2.15-kb *Hinc*II fragments. **a**, 1.2-kb *Sal*I fragment containing the *linC* gene was used as a probe. Lanes: 1, 1.2-kb *Sal*I fragment; 2, lambda DNA digested with *Hind*III; 3, total DNA from UT26 digested with *Bam*HI-*Hind*III; 4, total DNA from UT26 digested with *Sal*I; 5, total DNA from UT72 digested with *Bam*HI; 6, total DNA from *P. putida* PpY101 digested with *Eco*RI; 7, total DNA from *E. coli* HB101 digested with *Eco*RI; 8, total DNA from *P. sp.* KKS102 digested with *Eco*RI. **b**, 2.15-kb *Hinc*II fragment containing the *linX* gene was used as a probe. Lanes: 1, 2.15-kb *Hinc*II fragment; 2, lambda DNA digested with *Hind*III; 3, total DNA from UT72 digested with *Hind*III; 4, total DNA from UT72 digested with *Hinc*II; 5, total DNA from UT26 digested with *Hind*III; 6, total DNA from UT72 digested with *Hinc*II.

一方、*linX* 遺伝子と *linA* 遺伝子を含む 5-kb *Hind*III 断片をプローブとして用いたサザン解析は本研究と同じ条件で過去に行っているが、*linC* 遺伝子同様に UT26 中にも、類縁菌中にも、高い相同性を示す配列は存在しないという結果が得られている [Imai et al, 1991]。

(9) *linC*, *linX*, 及び ORFUP の *E. coli* 中での大量発現と産物の同定

linC, *linX*, 及び ORFUP のタンパク産物を同定するために、それぞれの遺伝子を *tac* プロモーター支配下においた高発現プラスミド、pMYLC1 (*linC*)、pMYLC21 (*linX*)、pMYLC22 (*linX*)、及び pMYLC31 (ORFUP) を作製した。pMYLC22 は *linX* 遺伝子の 5' 末端側について得られた deletion plasmid の中で *LinC* 活性に必要な最小領域を含むものであるのに対して、pMYLC21 は、これに加えて 198-nt の上流域を含むものである (Fig. 4-6)。これらのプラスミドを *E. coli* MV1190 に導入し、IPTG 処理による誘導発現実験を行った結果を Fig. 4-12 に示す。pMYLC1 と pMYLC22 をそれぞれ含むものは、*linC*, *linX* の塩基配列から予想される分子量とほぼ同じ大きさの 28-kD のタンパク産物の誘導が確認された。また、pMYLC31 を含むものは、やはり塩基配列から予想されるものとはほぼ一致する 14-kD のタンパク産物の誘導が確認された。以上の結果より、*linC*, *linX*, そして ORFUP 遺伝子産物の大きさは、それぞれ 28-, 28-, 14-kD であることが確認された。一方、pMYLC21 を保持する *E. coli* MV1190 では、IPTG 処理をしなくても 28-kD のタンパク産物を高発現していた。この結果は、*E. coli* 中でも機能するプロモーターが *linX* 遺伝子上流の -229 から -32 の領域に存在することを示唆している。実際に、この領域内に *E. coli* における σ^{70} 依存性プロモーターの -10、-35 領域のコンセンサス配列とよく一致する配列が見出されており (Fig. 4-6)、こうした配列が *E. coli* 内で機能している可能性も考えられる。

(10) *LinC* 活性を失った変異株の単離とその性質

第1章では、Tn5 を挿入した株をプレート上に生育させ、そのコロニーに γ -HCH を噴霧し、その分解のされ方を観察することによって γ -HCH 分解能に欠陥を持つ変異株を選択した。その結果、 γ -HCH dehydrochlorinase (*LinA*) 活性に欠陥を持つ変異株、UT64, UT61 が得られた。その際に、 γ -HCH の分解によるクリアゾーン形成能は野生株と変わらないが、野生株は γ -HCH の分解に伴ってコロニーの色が褐色になるのに対して、長期間放置してもコロニーの色が褐色にならない変異株も数株得られた (Fig. 4-13a)。考察で詳しく述べるが、褐色の物質は γ -HCH の代謝産物由来であると予想される。UT72 に代表されるこれらの株の γ -HCH 分解活性を GC で検討したところ、 γ -HCH を γ -PCCH を経て 2,5-DDOL にまで分解することはできたが、2,5-DDOL を 2,5-DCHQ に変換

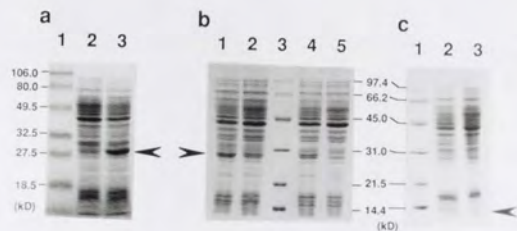


Fig. 4-12 SDS-PAGE analysis of LinC, LinX, and ORFUP proteins produced in *E. coli* MV1190.

The conditions for induction and for electrophoresis were as described in Materials and Methods. **a**, Overexpression of LinC. LinC protein is indicated by the arrow. Lanes: 2, total proteins of not-induced *E. coli* MV1190 carrying plasmid pMYLC1; 3, total proteins of induced one carrying pMYLC1. **b**, Overexpression of LinX. LinX protein is indicated by the arrow. Lanes: 1, total proteins of induced one carrying pMYLC21; 2, total proteins of not-induced one carrying pMYLC21; 4, total proteins of induced one carrying pMYLC22; 5, total proteins of not-induced one carrying pMYLC22. **c**, Overexpression of ORFUP. ORFUP protein is indicated by the arrow. Lanes: 2, total proteins of induced one carrying pMYLC31; 3, total proteins of not-induced one carrying pMYLC31. Lane 1 of **a**, lane 3 of **b**, and lane 1 of **c** are the low-range molecular weight standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.).

a



b



Fig. 4-13 γ -HCH degradation activity (a) and assimilation ability (b) of UT26 and its mutants. a. γ -HCH solution (50 mg / ml in ethanol) was sprayed on UT26, UT64, and UT72 grown on a LB plate. The plate was incubated at 30 °C for one day. b. UT26, UT64, and UT72 were streaked on a W medium plate containing γ -HCH as a sole source of carbon and energy source. The plate was incubated at 30 °C for one week. UT26 grew slowly on it, while UT64 and UT72 did not.

することは出来なかった。また、2,5-DCHQについては UT26 と同様に分解することが出来た。この結果、UT72 は γ -HCH 分解活性において LinC 活性のみが失われていると考えられる。

UT72 から回収した全 DNA に対して、*linC* を含む 1.2-kb *SalI* 断片、*linX* を含む 2.15-kb *HincII* 断片をプローブとしてサザン解析を行った (Fig. 4-11b)。1.2-kb *SalI* 断片をプローブとした場合にはハイブリダイズするバンドは検出されなかった。2.15-kb *HincII* 断片をプローブとした場合には UT26 と全く同じパターンのバンドが検出され、この領域には組換えが起こっていないことが強く示唆された。これらの結果は UT26 が Tn5 の挿入によって生じた LinC mutant ではなく、spontaneous な (あるいは、Tn5 を導入する操作において何らかの圧がかかった可能性はある) *linC* 遺伝子の欠落によって生じた mutant である可能性を強く示唆している。

UT26 は γ -HCH を唯一の炭素源、エネルギー源とした無機培地 (W 培地) のプレート (γ -HCH plate と呼ぶ) 上で非常にゆっくりとはあるが生育することができる (Fig. 4-13b)。これに対して UT72 は最初に塗布した菌体の作用で γ -HCH plate にクリアゾーンを形成することは可能であるが、菌体の生育は観察されなかった (Fig. 4-13b)。また、データは示さないが、*linC* を含む 6.2-kb *BamHI*-*HindIII* 断片を pKS13 に導入して作製したプラスミド pKSR50101 を三親接合伝達法で UT72 に導入した結果、この株は γ -HCH plate 上での生育が可能になった。これらの結果は *linC* 遺伝子が UT26 における γ -HCH 資化経路において必須の遺伝子であることを強く示唆している。

(1.1) γ -HCH 分解関与遺伝子群の UT26 内での転写レベルでの発現

これまでの研究で UT26 の γ -HCH 分解関与遺伝子群として *linA*, *linB*, *linC*, *linX* を獲得している。*linA* については UT26 内で基質の有無に関わらず転写レベルで構成的に発現していることがノーザン解析で示されている [今井亮三, 1990]。また、活性の発現については、LinA 活性に加えて LinB, LinC 活性も構成的に発現していることが、反応にラグタイムがないこと、完全培地で培養した UT26 の粗酵素抽出液にも十分な活性が検出されることから示唆されている。本節では、*linB*, *linC*, *linX* 遺伝子の転写レベルの発現について検討を行った。第5章で詳しく述べるが、2,5-DCHQ の分解活性 (LinD 活性) は、10 ppm の γ -HCH (実際は、 γ -HCH が分解されて生じた 2,5-DCHQ が誘導基質になっているらしい) を加えて1時間程度培養することにより誘導されることがわかっていて、そこで、 γ -HCH によって誘導をかけたものとかけないものからそれぞれ全 RNA を回収し、*linA*, *linB*, *linC*, *linX* 遺伝子をプローブとしたノーザン解析を行った (Fig. 4-14)。その結果、量的に *linA* ほどではなく、また、*linA* の様にきれいな特異的なバンドではないものの、*linB*, *linC* 遺伝子では構成的発現が観察されたが、*linX* 遺伝子の発現はみられなかった。*linC* をプローブとした

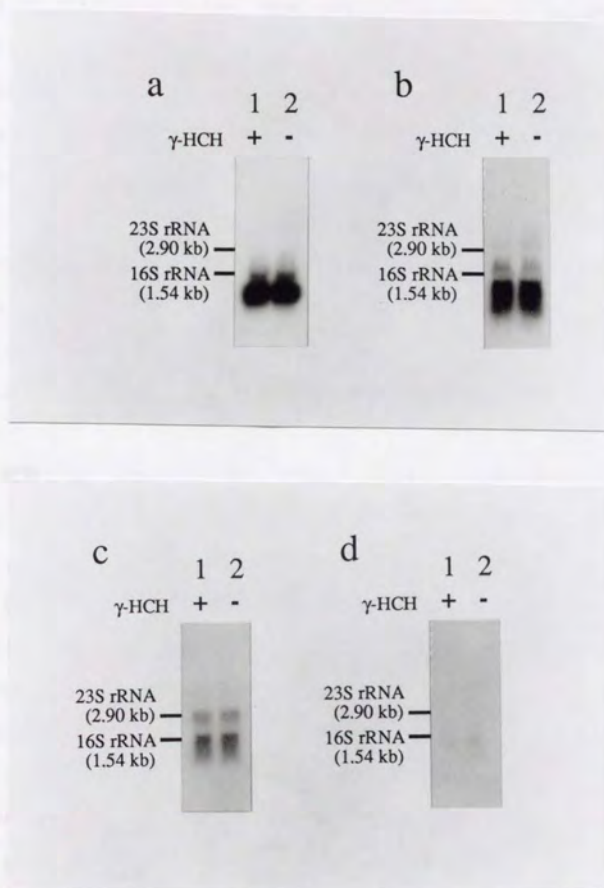


Fig. 4-14 Northern blot analysis of genes involved in the degradation of γ -HCH. Total RNAs were prepared from UT26 incubated with (lane 1) or without (lane 2) γ -HCH. 1.2-kb *HincII* fragment containing the *linA* gene (a), 1.3-kb *HpaI-BglI* fragment containing the *linB* gene (b), 1.2-kb *SalI* fragment containing the *linC* gene (c), and 1.0-kb *NcoI* fragment containing part of the *linX* gene (d) were used as probes.

際のパンドは非特異的なパンドのようにも見えるが、UT72（すなわち、*linC* 遺伝子を持たない）の全 RNA に対してはこのようなシグナルは観察されず（データは示さない）、*linC* 遺伝子由来の mRNA が存在しているものと思われる。*linB*, *linC* のパンドがクリアでないのは、RNA の回収法に問題があり分解してしまっている可能性も考えられるが、1) 4-2 (6) で記述した 2 種類の方法で全 RNA を回収したが、いずれも同様の結果であった、2) *linA* の RNA はきれいなパンドとして検出される、という理由から、*linA* では遺伝子の下流にきれいなターミネーター構造が存在するのに対して、*linB*, *linC* には存在しないことが原因となっており、*linB*, *linC* では mRNA が不安定である、あるいは、もともと mRNA のサイズにばらつきがありスメアなパンドになる、などの可能性の方が高いように思われる。いずれにせよ、基質の有無に関わらず *linB*, *linC* 遺伝子は構成的に発現しているが、*linX* 遺伝子は発現していないことが確認された。ただし、 γ -HCH を唯一の炭素源として加えた無機培地で培養するなどすれば、発現の上昇が起こる可能性は否定できない。

4-4. 考察

本章において、UT26 の γ -HCH 分解代謝に必要な 2,5-DDOL dehydrogenase 遺伝子の単離と解析を行った。UT26 のゲノム中には少なくとも 2 つの 2,5-DDOL dehydrogenase 活性を有するタンパクをコードしている遺伝子、*linC*, *linX* が存在することが明らかになったが、次の 3 点から *linC* が UT26 における γ -HCH 分解に必須の遺伝子であり、*linX* は不要な遺伝子であると考えられる。1) *linC* 活性を失った mutant である UT72 は *linC* 遺伝子全体を欠失していたが、*linX* 遺伝子には組換え、欠失などが起こっていなかった。2) UT72 は γ -HCH を唯一の炭素源として生育することが出来ないが、プラスミドで *linC* 遺伝子を補ってやることで生育可能となった。3) ノーザン解析の結果、*linC* は構成的に発現していたが、*linX* は γ -HCH を加えても発現が見られなかった。*linX* がどのような遺伝子であるかについては次の 2 つの可能性が考えられる。1) *linX* は他の宿主中で強制的に発現させたために *linC* 活性を示したが、本来は 2,5-DDOL 以外の物質を基質とする dehydrogenase であり、本来の基質によって発現も誘導される。2) *linX* は 2,5-DDOL dehydrogenase 遺伝子と進化的に関連した遺伝子である。UT26（あるいは SS86）は γ -HCH 資化能を比較的最近獲得した可能性もあると考えられ、その資化能も非常に弱い。すなわち、UT26 は効率の良い γ -HCH 分解遺伝子群を獲得する途上にあり、*linX* 遺伝子、及び *linX* と *linA* 遺伝子の間の *linX* 遺伝子と相同性の高い領域の存在もその痕跡の一つである可能性がある。

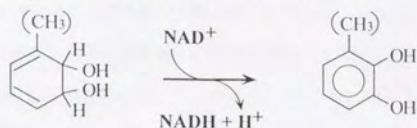
linC 遺伝子を保持する *P. putida* は、*linX* 遺伝子を保持するものより、強い *LinC* 活性を示した。この原因は、*E. coli* 中で *lac* プロモーターを利用して両遺伝子を発現させた場合の両者の活性には大きな差が見られなかったことから、*P. putida* 中での両遺伝子の発現レベルの違いによるものである可能性が高いと考えられる。両者の specific activity に違いがある可能性もあるが、この点については精製した両酵素の活性比較をする必要があり、現段階では何とも言えない。

LinC, *LinX* の推定アミノ酸配列は short-chain alcohol dehydrogenase family と有意な相同性を示した。これらの酵素には2ヶ所の高く保存された領域が存在する [Neidle *et al.*, 1992; Persson *et al.*, 1991]。一つめの部分は酵素の N 末端に存在する NAD^+ 結合部位であり、 $\beta\alpha\beta$ の二次構造をとる。もう一つの部分は 150 から 154 番目のアミノ酸残基周辺の領域であり、150 番目のチロシンと 154 番目のリシンは short-chain alcohol dehydrogenase family に属する酵素の中で特に高い保存性を示す。154 番目のリシンは全ての酵素で保存されているわけではないが、150 番目のチロシンは、部位指定変異導入によりアラニンに変えたところ、活性が失われたという 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase での実験結果が報告されており [Ensor and Tai, 1991]、活性中心ではないかと考えられている。いずれにせよ、*LinC*, *LinX* でも、こうしたアミノ酸残基はかなり高く保存されており、*LinC*, *LinX* も NAD^+ 依存性の dehydrogenase 活性を持つものと推測される。

short-chain alcohol dehydrogenase family に属する酵素は、細菌から human まで広く分布していることが知られており、これらの基質特異性についても興味を持たれる。これらの中でも *LinC* と比較的性质が近いと考えられる細菌の BphB (biphenyl-*cis*-diol dehydrogenase) [Fukuda *et al.*, 1994], BnzB (*cis*-benzene glycol dehydrogenase [Irie *et al.*, 1987] = TodD, *cis*-toluene dihydrodiol dehydrogenase [Zylstra and Gibson, 1989]) (Fig. 4-15) を高発現させた *E. coli* は、*LinC* 活性を示さなかった（データは示さない）。この結果は、これらの酵素の基質特異性が極端に広いわけではなく、きちんとある基質に対する特異性が存在することを示唆している。

これまでの研究で UT26 の γHCH の初期分解過程に関与する3つの酵素遺伝子 (*linX* 遺伝子は除く) の単離と解析を行った (Table 4-3)。これら3つの酵素遺伝子について2つの興味深い特徴があげられる。第1の点は G+C 含量が、*linB*, *linC* に比べて *linA* のみが極端に低い点である。*linA* 周辺領域に限っても、*linA* 遺伝子の G+C 含量の周辺領域との違いがはっきりとわかる (Fig. 4-9b)。G+C 含量を見る限りでは、*linA* のみが G+C 含量の低い生物から比較的最近導入された遺伝子である可能性が高いと考えられる。第2の点は、これら3つの遺伝子のうち2つ以上の遺伝子を含むコスミドクローンが一つも得られなかった点である。コスミドクローンは 20~30-kb の断片を含んでおり、これらの遺伝子は互いに 20~30-kb 以内の領域に近接しては存在しないと考

Cis-toluene dihydrodiol dehydrogenase (TodD)
 = *Cis*-benzene glycol dehydrogenase (BnzB)



Biphenyl-*cis*-diol dehydrogenase (BphB)

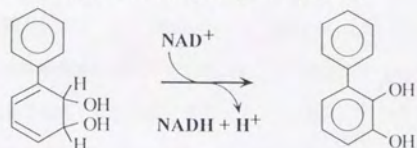


Fig. 4-15 Two members of the short-chain alcohol dehydrogenase family

Table 4-3 Four genes for the early steps of γ -HCH degradation from *S. paucimobilis* UT26

	No. of Nucleotide (bp)	No. of Amino Acid Residue	Molecular Mass (kD)	G+C Content (%)	Function	Expression in UT26
<i>linA</i>	465	155	17.3	53.0	Dehydrochlorinase	Constitutive
<i>linB</i>	885	295	33.1	62.5	Chlorohydrolase	Constitutive
<i>linC</i>	750	250	25.6	64.3	Dehydrogenase	Constitutive
<i>linX</i>	750	250	25.5	59.3	Dehydrogenase	No expression

られる。すなわち、少なくともオペロンは形成していないといえる。芳香族化合物の分解代謝系遺伝子群などは通常オペロンとして存在し、共通の発現制御を受けていることを考えると γ -HCH 分解に関与する遺伝子群は特殊な例であると考えられる。同様の報告としては *Pseudomonas* sp. strain DNT の 2,4-dinitrotoluene 分解系遺伝子群の例がある [Suen and Spain, 1993]。いずれにせよ、この点からも UT26 の γ -HCH 分解代謝系が比較的最近創出されたものであることが窺われる。

Tn5 挿入変異導入法によって獲得した LinC 活性を失った mutant である UT72 は *linC* 遺伝子を完全に失った mutant であった。データは示さないが、*linC* を欠落した mutant は菌体を凍結保存から起こしたり、高温で処理してやるなどのストレスで比較的容易に得ることが出来る。Tn5 を導入する過程において何らかのストレスが加わり、*linC* 遺伝子が欠落したものと考えられる。*linA* 遺伝子の場合も同様に比較的容易に遺伝子の欠落を起こすことがわかっており [今井亮三, 1990]

(ただし、お互いに独立である。すなわち、どちらか一方を落としたもののみが高頻度で取れ、両方の遺伝子を同時に欠落するものは取れない)、両遺伝子は共に通常のアルカリ法で回収されてくるプラスミド上には存在しないが、回収が困難な超巨大プラスミド、線状プラスミド、あるいは転移因子などの移動しやすい遺伝子上に存在している可能性が強い。ちなみに、*linB* 遺伝子は安定であり、これまでの研究で *linB* 遺伝子を欠落した mutant は得られていない。*linB* 遺伝子は、*linA*、*linC* 遺伝子とは性質が異なり、クロモソーム上の安定な領域に存在するものと思われる。

本章までの研究で、 γ -HCH を 1,2,4-TCB、2,5-DCP、2,5-DCHQ に変換する分解経路を明らかにし、その反応を触媒する酵素遺伝子と単離と解析を行った。これまでの研究で UT26 は 1,2,4-TCB と 2,5-DCP は分解できないが [Imai *et al.* 1992; Nagasawa *et al.* 1993a]、2,5-DCHQ は無機化できること [Nagasawa *et al.* 1993b] が明らかになっている。これに加えて本章では 2,5-DCHQ を生じるのに必要な遺伝子 *linC* が欠落した mutant では γ -HCH を唯一の炭素源、エネルギー源としては生育できないが、この遺伝子をプラスミドで補ったところ資化能が復活するという結果が得られた。これらの結果は、2,5-DCHQ を経る経路が UT26 における γ -HCH の分解資化経路であることを強く示唆している。最近、chlorohydroquinone などのハイドロキノン系の化合物を代謝中間体として経る経路が pentachlorophenol などの芳香族化合物分解系で報告されてきており [Apajalahti and Salkinoja-Salonen, 1987a; Apajalahti and Salkinoja-Salonen, 1987b; Orser *et al.* 1993; Schenk *et al.* 1989; Steiert and Crawford, 1986; Uotila *et al.* 1992; Xun *et al.* 1992]、特に *Burkholderia* (以前は *Pseudomonas* と呼ばれていた) *cepacia* AC1100 の 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid 分解代謝系では、まさに、2,5-DCHQ がその中間体として報告されている (Fig. 4-16) [Sangodkar *et al.* 1988; Chakrabarty, 1992; Daubaras and Chakrabarty, 1992; Haugland *et al.* 1991; Daubaras *et al.* 1995]。

hydroquinone 体以降の反応経路としては trihydroxybenzene (THB, benzenetriol) を経て環開裂を起こす経路が多いようであるが [Sangodkar *et al.*, 1988; Chakrabarty, 1992; Daubaras and Chakrabarty, 1992; Haugland *et al.*, 1991; Daubaras *et al.*, 1995; Uotila, 1993], hydroquinone 体が直接の環開裂物質となるケースも報告されており [Darby *et al.*, 1987; Larway and Evans, 1965; Spain and Gibson, 1991, Fig. 5-6]、UT26 の場合がどちらであるか、あるいはいずれとも異なるものであるかは現在までのところ全く不明である。この点については第 5 章でもう少し考察を加える。

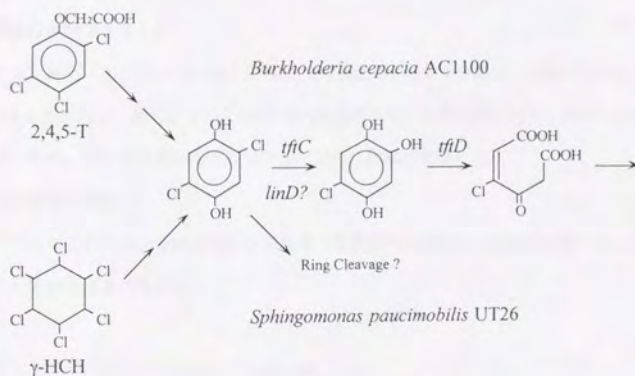


Fig. 4-16 2,5-DCHQ is an intermediate on the proposed 2,4,5-T degradation pathway in *Burkholderia cepacia* AC1100, and on the γ -HCH degradation pathway in *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

第5章

トランスポゾン Tn 5 による 2,5-dichlorohydroquinone 分解能に欠陥を持つ変異株の分離とその性質

5-1. 緒言

これまでの研究で UT26 の γ -HCH 分解に必要な3つの酵素遺伝子の単離と解析を行った。その結果、これら3つの遺伝子にコードされる酵素の作用で、 γ -HCH は 1,2,4-TCB、2,5-DCP、そして 2,5-DCHQ にまで変換されることが明らかになった。繰り返して述べているように 1,2,4-TCB 及び 2,5-DCP は UT26 によってそれ以上変換を受けないが [Imai *et al.* 1992; Nagasawa *et al.* 1993a]、2,5-DCHQ は更に変換を受け無機化される [Nagasawa *et al.* 1993b]。すなわち、 γ -HCH は UT26 中で 2,5-DCHQ を経て完全分解されと考えられ、UT26 による 2,5-DCHQ の分解代謝経路及び分解関与酵素遺伝子群にも興味を持たれる。そこで本章では UT26 の 2,5-DCHQ 分解代謝系を明らかにする第一歩として、2,5-DCHQ 分解能に欠陥を持つ Tn5 mutant の分離とその性質についての解析を行った。

5-2. 材料および方法

(1) 菌株およびプラスミド

本章では、新たに UT26 の mutant, UT102, UT103, UT116 を分離し、実験に用いた。その表現型は、Table 5-1 にまとめた。また、Tn5 挿入部位のクローニングの際にいくつかのプラスミドを作製し、用いたが、良好な結果が得られなかったために詳細は省略した。

(2) 休止菌体の調製

本章で行った 2,5-DCHQ 分解活性に欠陥を持つ変異株の分解活性の定量化の際には、以下の方法で調製した休止菌体を利用した。

試薬

buffer A	50 mM	KH_2PO_4
	KOH	で pH を 7.0~7.5 に調整する
buffer B	20 mM	KH_2PO_4
	KOH	で pH を 7.0 に調整する
Sample buffer	10 %	glycerol
	20 mM	KH_2PO_4
	KOH	で pH を 7.0~7.5 に調整する

操作

- ① 菌体を 10 ml の L 培地入りの L-tube で前培養する。
- ② 2 ml の前培養液を 200 ml の LB 培地入りの坂口フラスコ 2 本に接種する。
- ③ full-growth まで培養する。
- ④ 一方の坂口フラスコに 2,5-DCHQ を最終濃度 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ (ppm) になるように加えて、更に 1 時間培養を続ける。2,5-DCHQ を加えたものを誘導をかけたもの、加えなかったものを誘導をかけなかったものとして使用する。
- ⑤ それぞれを 9,000 rpm ($12,000 \times g$) で 10 分間遠心して集菌する。
- ⑥ buffer A で 3 回洗浄する。
- ⑦ 菌体湿重量が $500 \text{ mg} / \text{ml}$ となるように Sample buffer に懸濁する。
- ⑧ $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 -80°C で保存する。
- ⑨ 活性測定の際に、 $900 \mu\text{l}$ の buffer B を加えたもの (10 倍希釈) を休止菌体として用いた。

(3) 2,5-DCHQ 分解活性測定法

2,5-DCHQ 分解活性の測定は、GC (ECD) を用いた以下の方法で行った。

- ① (2) で作製した休止菌体 1 ml に $1 \mu\text{l}$ の 2,5-DCHQ ($1.78 \text{ mg} / \text{ml}$ in EtOH) を加える (最終濃度 $10 \text{ nmol} / \text{ml}$) 。
- ② 30°C で反応させ、適当な時間で $100 \mu\text{l}$ ずつサンプリングする。
- ③ $100 \mu\text{l}$ の酢酸エチル (内部標準として 1 ppm の $\gamma\text{-HCH}$ を含む) で抽出する。
- ④ GC (ECD) で残存 2,5-DCHQ 量を定量する。

活性 1 Unit は、2,5-DCHQ 1 nmol を 1 分間に分解する活性と定義した。

(4) HQ 分解活性測定法

HQ の分解活性の測定は HQ が分解されて生じた物質が示すと考えられる 320 nm の吸収スペクトルの上昇を分光光度計で測定した。

- ① (2) で作製した休止菌体 1 ml に $10 \mu\text{l}$ の HQ ($11.0 \text{ mg} / \text{ml}$ in EtOH) を加える (最終濃度 $1 \mu\text{mol} / \text{ml}$) 。HQ を加えないものをもう 1 本用意してコントロールとする。
- ② 30°C で反応させ、適当な時間で $200 \mu\text{l}$ ずつサンプリングする。
- ③ 遠心により菌体を落として、 $150 \mu\text{l}$ の上清をとる。
- ④ 蒸留水を $450 \mu\text{l}$ 加え (4 倍希釈)、 A_{320} を測定する。
- ⑤ 試料の $A_{320} = A$ 、コントロールの $A_{320} = B$ として、 $(A-B) \times 4$ を求める。

活性 1 Unit は、以上の条件で A_{320} を 1 分間に 0.001 上昇させる活性と定義した。

5-3. 結果

(1) 2,5-DCHQ 分解能に欠陥を持つ Tn5 変異株の分離

第1章で述べた方法で pKTY320::Tn5 (Fig. 1-1) を三親接合伝達により UT26 に導入し、多数の Km 耐性株を得た。得られた 3,350 株の Km 耐性株についてプレート上でコロニーを形成させ、 γ -HCH の噴霧を行った。その結果、他の株に比べて速く褐変する株を3株取得し UT102、UT103、UT116 と命名した (Fig. 5-1)。これら3株のコロニーをかきとり、2,5-DCHQ 分解活性をGC (ECD) で検討したところ、UT26 に比べて明らかに分解活性が弱くなっていた。 γ -HCH の噴霧による褐変の原因は不明であるが、以下の3点から褐変は 2,5-DCHQ 由来であり、2,5-DCHQ が蓄積すると褐変が生じることは間違いないと思われる。第1、第2の点は、第4章で述べたように γ -HCH の分解代謝中間体として 2,5-DCHQ を生じる wild type の UT26 においても今回得られた mutant ほどではないが褐変がみられること、および LinC 活性を失ったことにより γ -HCH から 2,5-DCHQ を生じない mutant、UT72 では γ -HCH の噴霧による褐変が見られないこと、である。また、第3の点は本章で明らかになったように、2,5-DCHQ 分解活性が弱くなった mutant に強い褐変が見られる、ということである。2,5-DCHQ の水溶液を放置すると自然酸化によりキノン体を生じて赤変するが、その色とコロニーの褐変とは明らかに色が異なっている。むしろ、カテコール系の物質が蓄積した際にポリマー化してみられる褐変に近い色であると思われる、2,5-DCHQ からもこのようなものが生じている可能性が高いと考えられる。いずれにしても、プレート上のコロニーの色の変化を観察するという比較的簡単な方法で 2,5-DCHQ 分解活性に欠陥を持つ mutant の分離に成功した。

(2) 休止菌体による 2,5-DCHQ 分解活性の定量化

前節で分離した 2,5-DCHQ 分解能に欠陥を持つ mutant の 2,5-DCHQ 分解活性が実際にどの程度落ちているかを休止菌体を用いて定量的な比較を行った。1 ml の休止菌体に加えた 10 nmol の 2,5-DCHQ の減少の仕方を Fig. 5-2 に示す。予備的な実験で、2,5-DCHQ 分解能の発現にはタイムラグがあり、 γ -HCH (実際は分解されて生じる 2,5-DCHQ が誘導基質になっているらしい)、2,5-DCHQ、HQ が誘導基質になることが明らかになったので、10 ppm の 2,5-DCHQ で1時間誘導をかけたものとかけなかったものの活性の違いについても同時に検討した。誘導をかけた UT26 休止菌体では、2 分間で 10 nmol の 2,5-DCHQ をほぼ全て分解してしまったが、その他のものでは 10 分間後でも 2,5-DCHQ の減少は認められなかった (Fig. 5-2a)。これらのものについて更に時

a

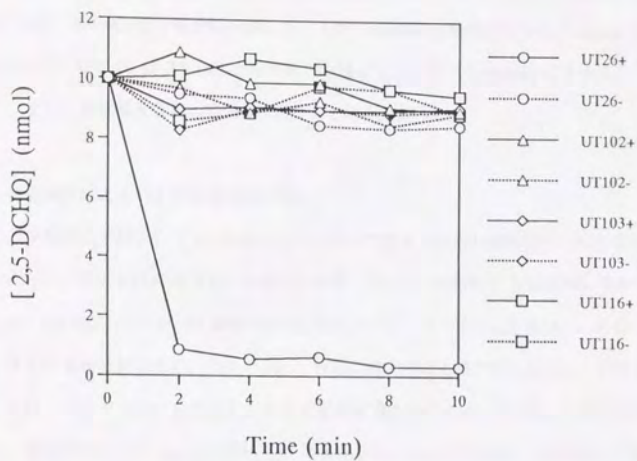


b



Fig. 5-1 γ -HCH degradation activity of UT26 and its mutants.
 γ -HCH solution (50 mg / ml in ethanol) was sprayed on UT26 and its mutants grown on a LB plate (**a**). The plate was incubated at 30 °C for two days (**b**). All of them made clear zones as a result of γ -HCH degradation. UT102, UT103, and UT116 turned brown more rapidly than UT26 (wild type).

a



b

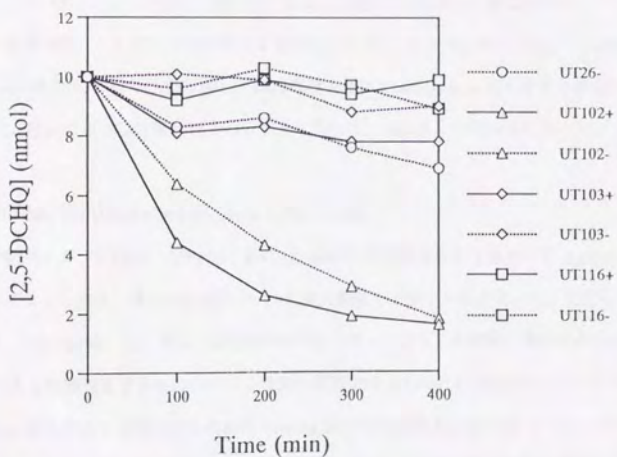


Fig. 5-2 2,5-DCHQ degradation activity of resting cells of UT26 and its mutants. 1 ml of resting cell mixtures containing 50 mg of resting cells (wet weight) were incubated with 10 nmol of 2,5-DCHQ. Incubation periods were 0 to 10 min (a), and 0 to 400 min (b). +, induced by 2,5-DCHQ; -, uninduced.

間を延長して測定したところ (Fig. 5-2b)、UT102 休止菌体では、誘導をかけたものもかけないものも 400 min で約 8 nmol の 2,5-DCHQ の分解が観察された。それ以外のものでは分解はほとんど観察されなかった。以上の結果より 1) 2,5-DCHQ 分解活性は誘導的に発現すること、2) UT102 は弱い 2,5-DCHQ 分解活性を残しているが、regulation 機能が失われた mutant であること、3) UT103 と UT116 は 2,5-DCHQ 分解活性をほぼ完全に失った mutant であること、が明らかになった。また、活性量を算出した値を Table 5-1 にまとめた。

(3) 休止菌体による HQ 分解活性の定量化

次に、予備的な実験として 2,5-DCHQ のアナログである HQ の分解活性についても検出器に FID を用いた GC、及び HPLC を用いて検討した結果、UT103 は UT26 とほぼ同レベルの分解活性を示したが、UT102、UT116 は分解活性を示さなかった (データは示さない)。また、HQ の分解とリンクして黄色物質を生じ、320 nm 付近に吸光度の上昇が見られることが明らかになった (Fig. 5-3)。GC や HPLC を用いるよりも 定量性が良かったので、320 nm の吸光度の上昇を指標として、休止菌体による HQ の分解活性の 定量化を行った。その結果、2,5-DCHQ で誘導をかけた UT26 と UT103 では、ほぼ同レベルの活性が認められたが、それ以外のものでは活性が全く認められなかった (Fig. 5-4)。また、活性量を算出した値を Table 5-1 にまとめた。

以上の結果より、1) HQ の分解活性も誘導的であり、2,5-DCHQ が inducer となり得ること、2) UT103 は、HQ の分解活性に関しては誘導性も含めて wild type と何ら変わりがないこと、3) UT102 と UT116 は HQ 分解活性をほぼ完全に失っていること、が明らかになった。

(4) UT102、UT103 の Tn5 挿入部位のクローン化

以上の結果より、UT102、UT103、UT116 はそれぞれ異なる表現型を示す mutant であることが明らかになったので、次にそれぞれの Tn5 挿入部位のクローン化を行った。ただし、UT116 については 2,5-DCHQ と HQ 両方の分解活性を失っており、分解関与遺伝子が丸ごと欠失した mutant である可能性も考えられたので、今回の研究では UT102 と UT103 についてのみ行った。まず、Tn5 挿入部位を増幅させるために inverse PCR 法を試みた。UT102 と UT103 の全 DNA を回収し、これを *Eco*RI で切断後、連結反応を行い、Tn5 の両端の塩基配列と相補する 2 種類のプライマー (5'-GTCAGATCCTGGAAAACGGG-3'、5'-GGTTCCGTTTCAGGACGCTAC-3') を用いて Tn5 挿入部位の増幅を試みたが、いずれのプライマーを用いた場合にも UT26 の全 DNA を用いた際にも認められる数本の DNA 断片の増幅以外の特異的な DNA 断片の増幅は認められなかった

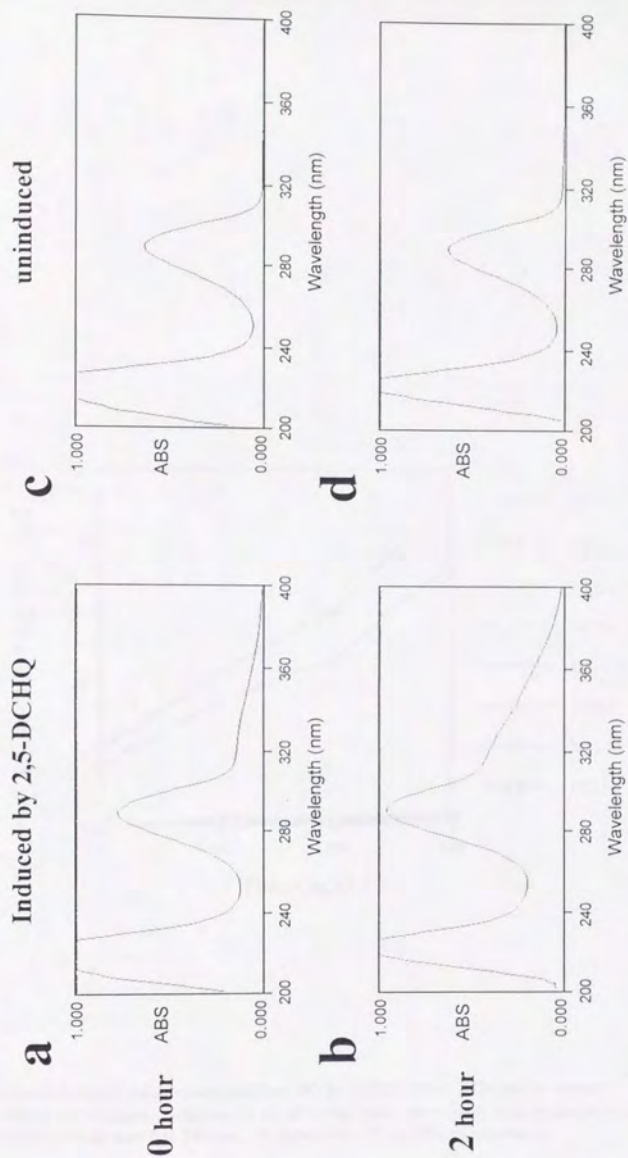


Fig. 5-3 Spectral change of hydroquinone by resting cells of UT26 incubated with (a and b) or without (c and d) 2,5-DCHQ. 1 ml of resting cell mixtures containing 50 mg of resting cells (wet weight) were incubated with 1 μ mol of HQ. Incubation periods were 0 hour (a and c), and 2 hour (b and d).

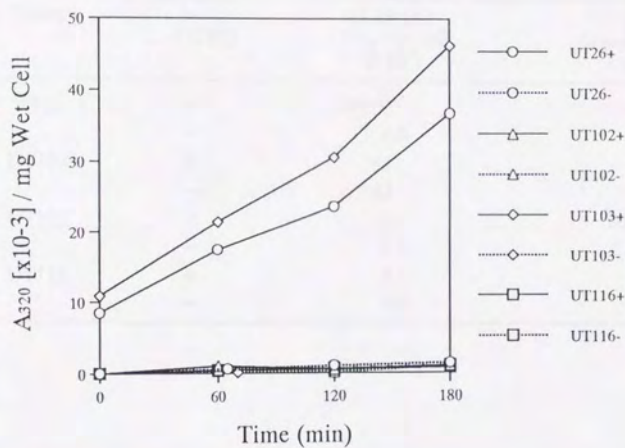


Fig. 5-4 Accumulation of yellow compound from HQ by resting cells of UT26 and its mutants.

1 ml of resting cell mixtures containing 50 mg of resting cells (wet weight) were incubated with 1 μmol of HQ. Incubation periods were 0 to 180 min. +, induced by 2,5-DCHQ; -, uninduced.

Table 5-1 2,5-DCHQ and HQ degradation activity of UT26 and its mutants

Strain	Induction by 2,5-DCHQ	Degradation activity of	
		2,5-DCHQ U/mg wet cell ($\times 10^4$)	HQ U/mg wet cell ($\times 10^3$)
UT26	+	>1000	160
	—	1.6	7.8
UT102	+	42	5.6
	—	41	5.6
UT103	+	1.1	200
	—	0.5	5.6
UT116	+	0.5	3.9
	—	0.6	5.6

(データは示さない)。UT26 ゲノム中に Tn5 の末端部分と相同な配列が存在するらしく、本方法では Tn5 挿入部位のクローン化がうまくいかないことが明らかになった。そこで、第1章で用いたのと同じ方法で Tn5 挿入部位のクローン化を行った。すなわち、UT102、UT103 の全 DNA より、pKS13 を用いてコスミドバンクを大腸菌中に作製し、Km 耐性株を選択することにより Tn5 挿入部分をクローン化した。更に、この断片をプローブとして用いて UT26 の全 DNA より作製したコスミドバンクからコロニーハイブリダイゼーションによって Tn5 が挿入する前の挿入部分のクローン化を行った。その結果、UT102 由来のプローブからは 11 個、UT103 由来のプローブからは 7 個のポジティブクローンの獲得に成功した。UT102 由来のプローブは、UT103 のポジティブクローンと、UT103 由来のプローブは、UT102 のポジティブクローンとそれぞれクロスハイブリダイズせず (データは示さない)、UT102 と UT103 はそれぞれある程度離れた部位に Tn5 の挿入が起こっていることが示された。

しかし、それぞれのポジティブクローンについて、*E. coli*、*P. putida* PpY101 両方の宿主において 2,5-DCHQ と HQ の分解活性の検討を行ったが、活性は検出されなかった。また、ポジティブクローンが有するコスミドを三親接合伝達法で UT102 及び UT103 にそれぞれ戻してみたが、活性の回復はみられなかった。このように、得られた UT102、UT103 の Tn5 挿入部位が実際に 2,5-DCHQ 分解に関与しているか否かは、現在までのところ不明である。

5-4. 考察

本章の意義は大きく2つある。一つは UT26 における 2,5-DCHQ 及び HQ の分解活性が誘導的に発現することを示した点、もう一つはこれらの分解能に欠陥を持つ Tn5 mutant の単離に成功した点である。

UT26 における 2,5-DCHQ 分解活性が誘導的に発現することは、以前からこの活性の発現にタイムラグがみられることから示唆されていたが、本章の研究においてこの点をはっきりと示すことができた。2,5-DCHQ 以降の分解反応に制御系が存在するということは、これ以降の分解代謝系は *linA*、*linB*、*linC* 遺伝子が構成的に発現していた γ -HCH から 2,5-DCHQ までの代謝系とは異なり、生物にとってかなり確立された分解代謝系であることを強く示唆している。すなわち、他の芳香族化合物の分解代謝に関与する遺伝子群がオペロンをなして存在し、共通の制御を受けているのと同様であると考えられる [van der Meer et al. 1992]。

本章において 2,5-DCHQ 分解能に欠陥を持つ3つの mutant、UT102、UT103、UT116 を獲得

したが、興味深いことにこれら3つの mutant は、全て異なる表現型を示した (Table 5-1)。すなわち、UT102 は 2,5-DCHQ に対しては弱い分解能を残しているが、HQ の分解能と 2,5-DCHQ 分解活性発現制御に欠陥を持つ mutant であり、UT103 は HQ 分解能に関しては UT26 (wild type) と変わらない分解能と誘導性を持っているが、2,5-DCHQ 分解能を失った mutant、そして、UT116 は 2,5-DCHQ、HQ 両方の分解能を全く失った mutant であった。こうした結果を総合すると、Fig. 5-5 のような可能性が考えられる。すなわち、2,5-DCHQ 分解に直接関与する酵素遺伝子を *linD*、HQ 分解に直接関与する酵素遺伝子を *linW* と仮定すると、これら2つの遺伝子は共通の *cis*-element によって制御を受けている (おそらくオペロンを形成)。UT102 では *linW* 遺伝子に Tn5 が挿入したことにより、HQ 分解活性を失う。更に、Tn5 が挿入された極性効果によって下流にある *linD* 遺伝子にも影響が出て、弱い活性を構成的に発現することになる。UT103 では *linD* 遺伝子に Tn5 が挿入したことにより 2,5-DCHQ 分解活性を失うが、上流に存在する *linW* 遺伝子は制御系を含めて全く影響を受けないため、HQ 分解活性は WT のままである。また、UT116 は UT72 同様、2,5-DCHQ、HQ 分解に関与する遺伝子が丸ごと抜け落ちた mutant、あるいは制御系の mutant であると考えられる。しかし、クローン化した UT102 と UT103 それぞれの Tn5 挿入部位近辺の塩基配列はお互いにクロスハイブリダイズせず、この仮説と矛盾するものである。ただし、UT102 と UT103 それぞれの Tn5 挿入部位としてクローン化してきた断片は、*E. coli*, *P. putida* PpY101 中で 2,5-DCHQ 分解活性も、HQ 分解活性も示さず、更に、mutant に導入しても変異を相補することはできなかったことを考えると、本章でクローン化した遺伝子が正しいものであるかという点に疑問が残る。また、これらの mutant の中で、Tn5 の挿入とは全く無関係にこうした組換えが起こっている可能性も否定することはできない。最近、*P. putida* PpY101 中で 2,5-DCHQ 分解活性を示す遺伝子断片のクローン化に成功したが、その遺伝子断片と UT26、UT102、UT103、UT116 の全 DNA に対するサザン解析の結果は、Tn5 の挿入とは無関係に Fig. 5-5 のような組換えが起こっている可能性を支持するものであった (データは示さない)。

本章で新たに HQ が UT26 によって分解されて黄色の物質を生じることが明らかになった。この黄色物質は未同定であるが、HQ の環開裂物質として黄色の γ -hydroxymuconic semialdehyde が生じるという報告もあり [Larway and Evans, 1965; Darby et al, 1987; Spain and Gibson, 1991] (Fig. 5-6)、UT26 においても同様の活性が存在しているのかもしれない。また、HQ の分解に関わる遺伝子 (*linW*) が、UT26 における γ -HCH 分解に直接関与しているか否かは現段階で不明であるが、少なくとも HQ 分解活性も 2,5-DCHQ によって誘導を受けること、2,5-DCHQ 分解活性とリンクしていること (UT102 や UT116 のような mutant がとれる) を考えると、遺伝的に近い存在である

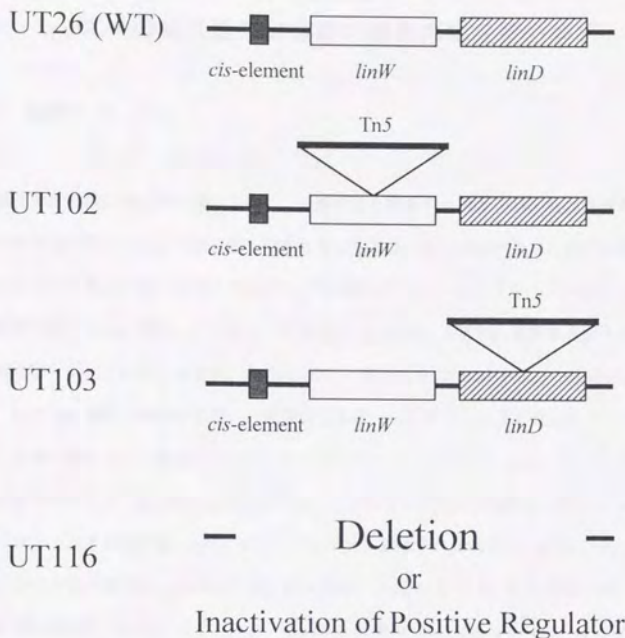


Fig. 5-5 Proposed structure of genes involved in the degradation of 2,5-DCHQ and HQ of UT26 and its mutants. *linD*, proposed gene involved in the degradation of 2,5-DCHQ; *linW*, proposed gene involved in the degradation of HQ.

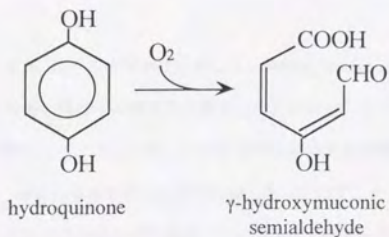


Fig. 5-6 Proposed pathway for degradation of HQ in *Moraxella* sp. [Spain and Gibson, 1991] and *Pseudomonas putida* JD1 [Darby *et al.*, 1987].

第6章

γ -HCH 分解代謝系酵素群の細胞内局在性の解析

6-1. 緒言

難分解性物質の微生物分解を論じる際に、分解反応を触媒する酵素の局在性は基質との接触という意味で重要な問題である。一般に難分解性物質は脂溶性である場合が多く、自然拡散により細胞内に取り込まれる場合が多いと考えられるが、分解酵素群をコードしているオペロン中に外膜に存在し、基質の取り込みに関与していると考えられる permease と思われる酵素遺伝子がコードされている例も報告されている。例えば、alkane 資化に関与する *Pseudomonas oleovorans* の OCT plasmid 上の *alk* 遺伝子群の中には、外膜蛋白である AlkL をコードする遺伝子 (*alkL*) が存在しており、基質の取り込みに関与していると考えられている [van Beilen et al, 1992]。ナイロンオリゴマー分解プラスミド pOAD2 上のエキソ型ナイロンオリゴマー分解酵素 (EII)、エンド型ナイロンオリゴマー加水分解酵素 (EIII) をコードしている遺伝子 (それぞれ、*nylB*, *nylC*) の上流には、オリゴペプチド取り込みに関係する5個の遺伝子 (*oppA*, *B*, *C*, *D*, *F*) と相同な遺伝子が見出されている [根来誠司, 1994]。また、PCB / biphenyl 分解菌 *Alcaligenes xylosoxidans* strain A41 由来の *bph* オペロン中にも *alkL* と相同な配列を持つ遺伝子が見出されている [Maeda et al, 1994]。

一方、難分解性物質の分解代謝系の酵素の局在性については、膜結合蛋白か可溶性蛋白かの検討は酵素の精製との関係でなされており、多くのものが可溶性であること、一部の oxygenase, dehydrogenase, β -etherase 等が膜酵素であることなどが知られている [Witholt et al, 1990; Masai et al, 1989; Masai et al, 1993] が、それ以上の詳しい局在性に関しては現在のところほとんど知見がない。

そこで、本章においては *E. coli* での分画法に準じて、*Sphingomonas paucimobilis* UT26 の細胞内成分を分画し、 γ -HCH 分解に関与する酵素群が細胞内のどの部分に存在するかを各分画の酵素活性を測定することにより推定した。その結果、 γ -HCH 分解の初発反応に関わる LinA、LinB 両酵素活性の多くが periplasm 画分に存在することが明らかになったので、クローン化した *linA* 及び *linB* 遺伝子を実験室で発現させた場合の大腸菌中での両遺伝子産物活性の局在性についても検討を加えた。

6-2. 材料および方法

(1) 菌株およびプラスミド

本章では新たに pMYBA1 (Fig. 6-1)、pFBA1 (Fig. 6-2)、pMLZ2 (Fig. 6-3) を作製し用いた。

(2) G (-) 細菌の分画法

UT26 及び大腸菌の細胞内成分の分画は Nossal と Heppel の方法 [Nossal and Heppel, 1966] で行った。

試薬

buffer A	50 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
buffer B	20 %	sucrose (W/V)
	2mM	EDTA
	30 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
buffer C	10 %	glycerol
	1 mM	2-mercaptoethanol
	30 mM	Tris-HCl (pH 7.5)

操作

- ① 200 ml の菌体培養液から、遠心により集菌する。
- ② 60 ml の buffer A で菌体を洗浄し、遠心により再び集菌する。これを繰り返す。
- ③ 20 ml の buffer B に菌体を懸濁する。
- ④ 室温 (約 24 °C) で 8 分間放置する。
- ⑤ 12,000 rpm (18,000 xg) で 6 分間遠心し、集菌する。
- ⑥ 上清を捨て、残った液もキムワイプなどで完全に除く。
- ⑦ 20 ml の氷冷した蒸留水に懸濁する。
- ⑧ 氷上で 10 分間放置する。
- ⑨ 12,000 rpm (18,000 xg) で 6 分間遠心し、上清に最終濃度が buffer C と同じになるように glycerol、2-mercaptoethanol、Tris-HCl (pH7.5) を加えたものを periplasm 画分とする。
- ⑩ ベレットを 18 ml の buffer C に懸濁し、更に 2 ml のアセトンを加える。
- ⑪ sonication により、菌体を破壊する。
- ⑫ 5,000 rpm (3,000 xg)、5 分間の遠心により debris を除く。
- ⑬ 上清を 100,000 xg、1 時間の超遠心分離にかける。
- ⑭ 上清を cytoplasm 画分、ベレットを membrane 画分とする。

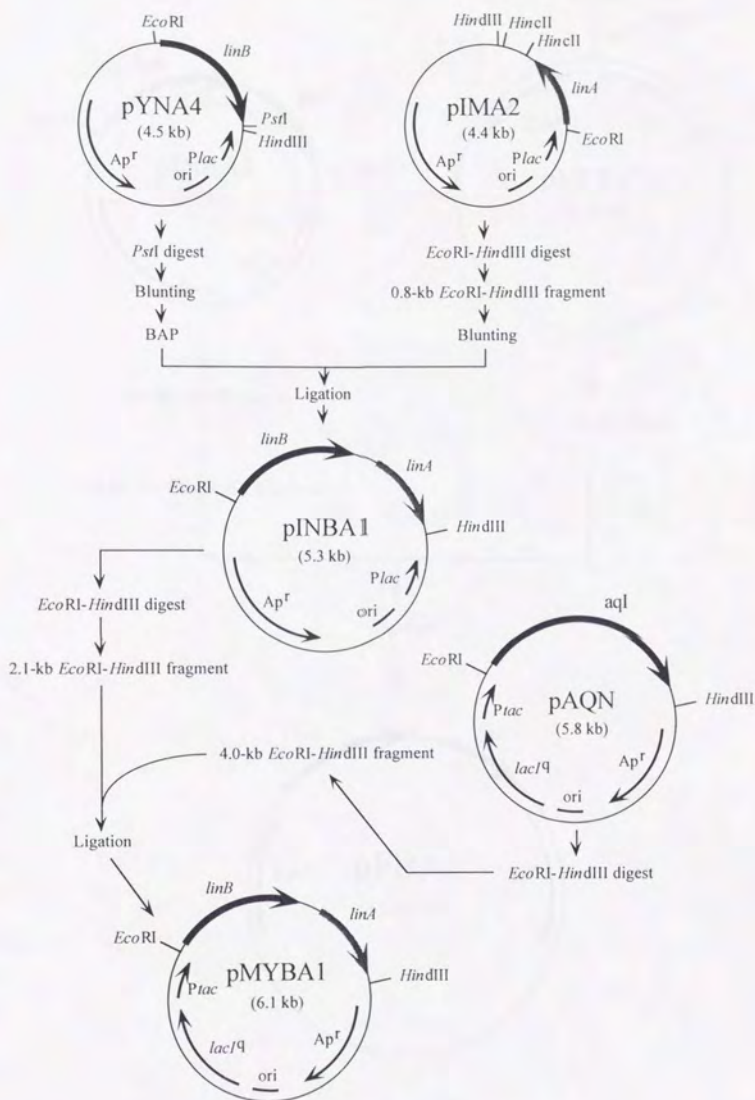


Fig. 6-1 Construction of plasmid pMYBA1, which produces large amounts of LinA and LinB under control of *tac* promoter.

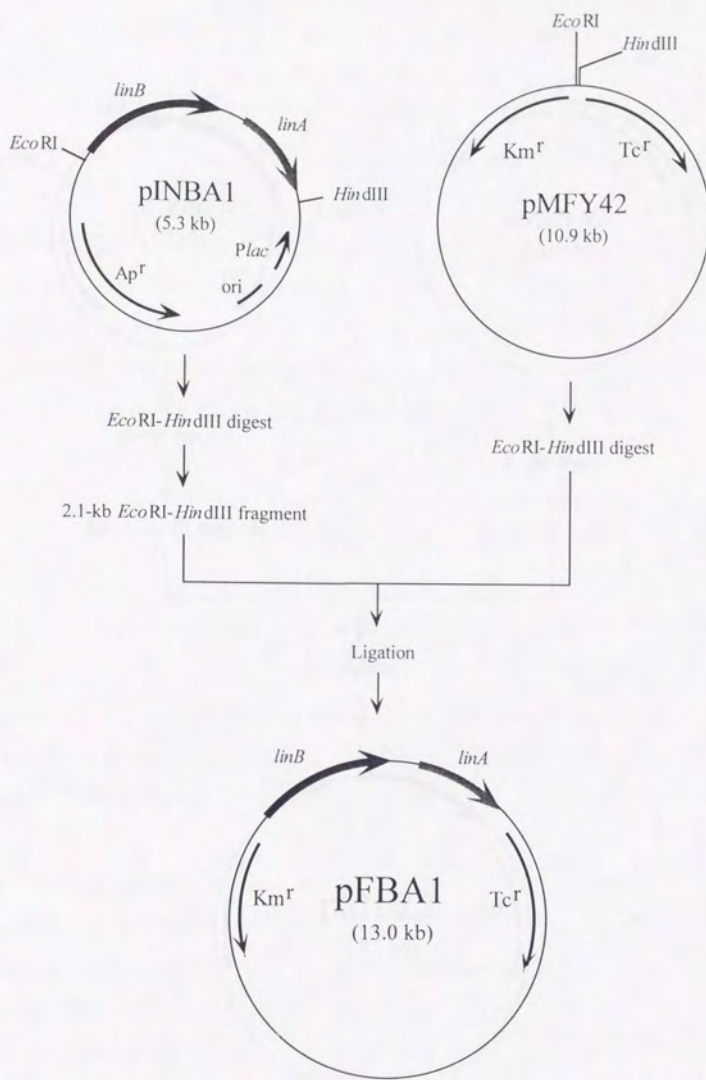


Fig. 6-2 Construction of plasmid pFBA1, which produces small amounts of LinA and LinB in *E. coli*.

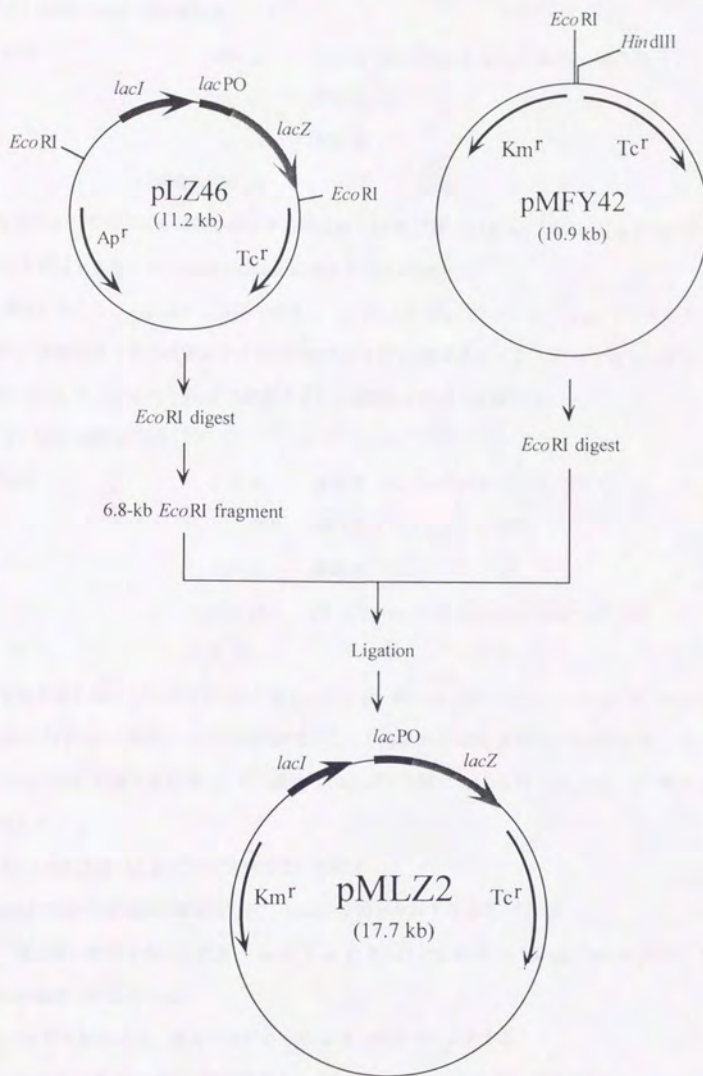


Fig. 6-3 Construction of plasmid pMLZ2, which produces LacZ under control of *lac* promoter.

(3) LinA、LinB 活性測定法

反応液	5,390 μ l	50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)
	55 μ l	酵素液
	55 μ l	基質液*
全量 5,500 μ l		

* 基質液としては LinA 活性を測定する際には γ -HCH 溶液 (14.5 mg / 500 μ l in ethanol) を LinB 活性を測定する際には 1-chlorobutane 原液をそのまま用いた。

基質液を加えることによって反応を開始し、0, 30, 60, 90, 120 min 後に 1 ml ずつサンプリングを行い、遊離塩素イオン濃度をチオシアン酸第2水銀法 [第2章2-2 (8)] で比色定量を行う。

活性 1Unit は 1 分間に 1 nmol の塩素イオンを遊離する活性と定義した。

(4) LinC 活性測定法

反応液	100 μ l	基質液 (5.4 nmol の 2,5-DDOL を含む) [第4章4-2 (2) で作製]
	100 μ l	酵素液
	800 μ l	50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)
全量 1 ml		

基質液を加えることによって反応を開始し、0, 30, 60, 90, 120 min 後に 100 μ l ずつサンプリングを行い、100 μ l の酢酸エチル (内部標準として 1 ppm の γ -HCH を含む) で抽出する。GC (ECD) で 2,5-DDOL の減少量を測定した。活性 1Unit は 1 分間に 1 nmol の 2,5-DDOL を分解する活性と定義した。

(5) LinD 活性 (2,5-DCHQ 分解活性) 測定法

2,5-DCHQ 分解活性の測定は、GC (ECD) を用いた以下の方法で行った。

- ① 適当量の酵素を含む反応液 1 ml に 1 μ l の 2,5-DCHQ 溶液 (1.78 mg / ml in EtOH) を加える (最終濃度 10 nmol / ml)。
- ② 30 $^{\circ}$ C で反応させ、適当な時間で 100 μ l ずつサンプリングする。
- ③ 100 μ l の酢酸エチル (内部標準として 1 ppm の γ -HCH を含む) で抽出する。
- ④ GC (ECD) で残存 2,5-DCHQ 量を定量する。

活性 1Unit は、2,5-DCHQ 1 nmol を 1 分間に分解する活性と定義した。

(6) LinW 活性 (HQ 分解活性) 測定法

HQ の分解活性の測定は、第 5 章と同様に HQ が分解されて生じると考えられる 320 nm の吸収スペクトルの上昇をスペクトロフォトメーターで測定した。

- ① 適当量の酵素を含む反応液 1 ml に 10 μ l の HQ (11.0 mg / ml in EtOH) を加える (最終濃度 1 μ mol / ml)。HQ を加えないものをもう 1 本用意してコントロールとする。
- ② 30 $^{\circ}$ C で反応させ、適当な時間で 200 μ l ずつサンプリングする。
- ③ 遠心により菌体を落として、150 μ l の上清をとる。
- ④ 蒸留水を 450 μ l 加え (4 倍希釈)、 A_{320} を測定する。
- ⑤ 試料の $A_{320} = A$ 、コントロールの $A_{320} = B$ として $(A-B) \times 4$ を求める。

活性 1 Unit は、以上の条件で A_{320} を 1 分間に 0.001 上昇させる活性と定義した。

(7) β -lactamase 活性測定法 [澤井哲夫 and 高橋郁子, 1978; Sargent, 1968]

試薬

反応 buffer	0.1 M	potassium phosphate (pH 7.0)
基質溶液	40 mM	Ampicillin (Na salt) in 反応 buffer
I_2 -KI solution	stock solution	を acetate buffer で 20 倍に希釈
stock solution	100 g	の KI を 60~70 ml の水に溶解し、20.3 g の I_2 を加える。 これを 500 ml に fill up する。
acetate buffer	80 g	の無水酢酸ナトリウム (あるいは、132.7 g の 3 水和物) を 500 ml の水に溶解し、 氷酢酸 で pH を 4.0 に調整する。これを 2 l に fill up する。

操作

- ① 1.5 ml の反応 buffer に 200 μ l の酵素液を加え、30 $^{\circ}$ C で 5 分加温する。コントロール (BlankB) には酵素液を加えない。
- ② 300 μ l の基質溶液を加え、30 $^{\circ}$ C で適当な時間反応を行う。
- ③ 4 ml の I_2 -KI solution を加えて反応を止める。
- ④ BlankB に 200 μ l の酵素液を加える。
- ⑤ 室温で 10 分間放置する。
- ⑥ OD_{540} を測定する。Sample の値を S, BlankB の値を B とする。
- ⑦ 2 ml の反応 buffer と 4 ml の I_2 -KI solution を混合したものの OD_{540} も測定し、これを BlankA (A) とする。

- ⑧ 以下の反応式を用いて Unit 計算を行う。β-lactamase の活性 1U は基質 1 μmol の β-ラクタム環を 1 分間で加水分解する活性とした。

Units / ml of enzyme solution

$$= \frac{B-A}{A} \times \frac{32}{F(3.7)} \times \frac{1}{T(20)} \times \frac{1}{0.2}$$

F: 基質水解物のヨウ素消費等量 T: 反応時間

(8) β-galactosidase 活性測定法 [Lederberg, 1950]

試薬

2×Z buffer	0.12 M	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O
	0.08 M	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O
	0.02 M	KCl
	0.002 M	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	0.1 M	β-mercaptoethanol
		pH 7.0
ONPG 溶液	4 mg / ml	ONPG
stop solution	1M	Na ₂ CO ₃

操作

- ① 250 μl の 2×Z buffer と水で適当に希釈した酵素液とで全量を 500 μl とし、30℃で5分加温する。コントロールには酵素液を加えない。
- ② 100 μl の ONPG 溶液を加え反応を開始する。
- ③ 30℃で、適当な時間反応を行う。
- ④ 250 μl の 1M Na₂CO₃ を加え、反応を止める。
- ⑤ コントロールに被検試料と同量の酵素液を加える。
- ⑥ OD₄₂₀ を測定する。
- ⑦ 以下の反応式を用いて Unit 計算を行う。β-galactosidase 活性 1U は、1分間で 1 nmol の ONP を生じる活性とした。

Units / ml of enzyme solution

$$= \frac{A_{420} \times 10^6}{\epsilon(21300)} \times 0.85 \times \frac{1}{0.25} \times \frac{1}{T}$$

ε: モル吸光係数 (pH 10.2) T: 反応時間

(9) pyruvate dehydrogenase 活性測定法

[Hayakawa *et al.*, 1966; Friedemann and Haugen, 1943]

反応液組成	50 mM	phosphate buffer (pH 6.0)
	0.55 mM	pyruvate
	1 mM	NAD ⁺
	10 mM	MgCl ₂

酵素溶液：全体量の10分の1以内

試薬

10 %	TCA
0.1 %	2,4-dinitrophenyl hydrazine
100 %	toluene
10 %	NaCO ₃
1.5 N	NaOH

操作

- ① 反応液を、30℃で10分放置
- ② 反応液1 ml をとり、10% TCA 5 ml に加える。
- ③ 遠心分離してタンパク質を除き、1 ml の0.1% 2,4-dinitrophenyl hydrazine を加え、10分反応させる。
- ④ 8 ml のトルエンを加え2分間はげしく攪拌する。
- ⑤ ビベットで、トルエン層をとる。
- ⑥ 5 ml の10% NaCO₃を加え、2分間はげしく攪拌する。
- ⑦ 下層を5 ml とる。
- ⑧ 5 ml の1.5 N NaOH を加える。
- ⑨ 5分から10分放置し、pyruvate の残存量を540nm で比色定量する。

活性1 Unit は、以上の条件で A_{540} を1分間に0.001減少させる活性と定義した

(10) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 活性測定法 [Duggleby and Dennis, 1974]

試薬

反応液	100 ml	Tris-HCl (pH 8.75)
	1 mM	NAD ⁺
	20 mM	K ₂ HPO ₄

0.2 mM	EDTA
20 mM	NaF
3.3 mM	cystein
1 mM	glyceraldehyde 3-phosphate

全液量の 10 分 1 以内の酵素溶液

操作

反応液を 30℃ で反応させ、340nm の吸収 (NADH の生成量) を測定する。

活性 1 Unit は 1 分間に 1 μ mol の NADH を生成する活性と定義した。

モル吸光係数は 6220 を用いた。

(11) phosphatase (pH 6.0) 活性測定法 [Dassa *et al.*, 1980]

試薬

反応液	50 mM	Phosphate Buffer (pH6.0)
	20 mM	<i>p</i> nitrophenylphosphate (PNP-P)
STOP solution	0.1 N	NaOH

操作

反応液を 30℃ で適当な時間反応し、10 倍量の STOP solution を加える。410 nm の吸光度を測定することによって、PNP-P の加水分解物 (黄色) の生成量を測定する。

活性 1 Unit は、以上の条件で A_{410} を 1 分間に 0.001 上昇させる活性と定義した

6-3. 結果

(1) UT26 における γ -HCH 分解酵素活性の局在性の解析

前章の結果により 2,5-DCHQ 以降の分解活性 (LinD、LinW 活性) は誘導性であることが示されたので、10 ppm の 2,5-DCHQ で誘導をかけた UT26 菌体について分画を行い、 γ -HCH 分解酵素活性 (LinA、LinB、LinC、LinD、LinW 活性) の局在性について検討を行った。分画の正当性は、

1) 各画分のタンパク質パターンを SDS-PAGE で確認した結果、各画分に特徴的なバンドが現れていること (Fig. 6-4)、2) cytoplasm に局在する pyruvate dehydrogenase と glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase の酵素活性の 90 % 以上が cytoplasm 画分に検出されたことによって示した。また、タンパク量も periplasm には全体の 10 % 以下であり、菌体の lysis 等によって cytoplasm の酵素が大量に放出されるというようなことは起こっていないと考えられる。ただし、

periplasm に局在する phosphatase の活性は 26 % しか periplasm 画分に存在せず、残りの 74 % は cytoplasm 画分に残っていた。このことは、今回の研究で用いた浸透圧ショック法ではペリプラズム酵素の放出が完全でない可能性を示唆している。

酵素活性分布の結果を Table 6-1 に示す。LinA、LinB、LinD 活性のそれぞれ 58、80、78 % は periplasm 画分に、LinC 活性の全ては membrane 画分に、LinW 活性の 84 % は cytoplasm 画分にそれぞれ検出された。前述のように、periplasm 酵素である phosphatase 活性の 26 % しか periplasm 画分に観察されなかったことを考えると、LinA、LinB、LinD 活性の大部分は periplasm に存在すると考えても良さそうである。特に注目されるのは、既に遺伝子のクローン化、遺伝子産物の解析を終了している LinA、LinB 活性の大部分が periplasm 画分に検出された点である。

(2) *E. coli* における LinA、LinB 活性の局在性の解析

前節で、UT26 において LinA、LinB 活性の大部分が periplasm 画分に存在することが明らかになった。そこで、次にクローン化した *linA* 及び *linB* 遺伝子を大腸菌中で発現させた場合の大腸菌中での両遺伝子産物の局在性について検討を行った。*linA* と *linB* を同時に発現するプラスミドとして、pMYLBA1 (Fig. 6-1)、pFBA1 (Fig. 6-2) を作製した。pMYBA1 は pUC 系プラスミド由来の複製起点を持つ多コピープラスミドであり、IPTG 添加により *tac* プロモーター支配下で *linA* と *linB* を同時に大量発現することができる。一方、pFBA1 は *linA* と *linB* を低発現する。

分画の正当性は cytoplasm 酵素の β -galactosidase、periplasm 酵素の β -lactamase の活性分布を測定することによって確認した。*linA* と *linB* を pFBA1 を用いて発現させる場合には pUC119 を pMYBA1 を用いて発現させる場合には本研究で新たに作製した pMLZ2 (Fig. 6-3) を共存させることによって β -galactosidase、 β -lactamase 両酵素活性を *E. coli* MV1190 内で発現させた。

酵素活性分布の結果を Table 6-2a, b に示す。いずれの場合も、 β -galactosidase、 β -lactamase 両酵素活性の局在性より、分画はうまく行われていると結論した。*linA*、*linB* を低発現させた場合には cytoplasm 画分に弱い LinA、LinB 活性が認められただけで、他の画分には両酵素活性は認められなかった。一方、*linA*、*linB* を高発現させた場合には、かなりの部分の LinA、LinB 活性が periplasm 画分に見出された。特に、LinB 酵素活性の半分以上は periplasm 画分に検出された。更に、各画分に含まれる蛋白を SDS-PAGE 上で確認したところ、LinA、LinB と思われる蛋白のバンドが periplasm 画分でも認められた (Fig. 6-5)。以上のように *linA*、*linB* 両遺伝子を高発現させた場合、UT26 ほどではないが *E. coli* においても LinA、LinB 活性の多くが periplasm 画分に見出された。この結果より、*E. coli* においても LinA、LinB 両酵素を periplasm 空間に移行させるため

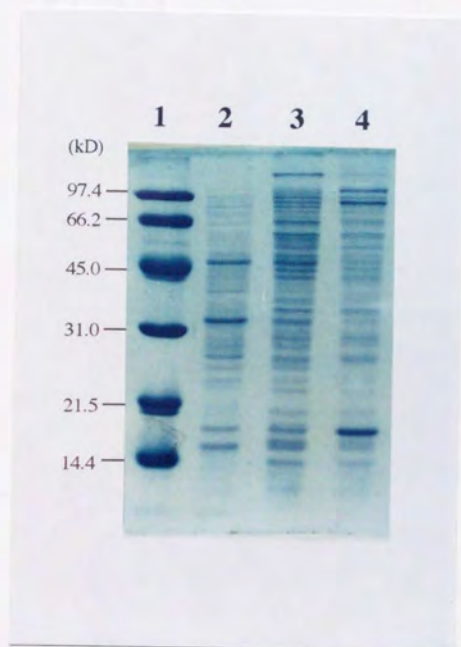


Fig. 6-4 SDS-PAGE analysis of proteins which constitute periplasmic (lane 2), cytoplasmic (lane 3), and membrane (lane 4) fraction, respectively from *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

Table 6-1 Subcellular localization of enzymes involved in the degradation of γ -HCH in *S. paucimobilis*.

	Protein (mg)	LinA (U)	LinB (U)	LinC (U)	LinD (U)	LinW (U)	Phosphatase (pH 6.0) ($\times 10^{-4}$ U)	Glyceroaldehyde 3-phosphate dehydrogenase ($\times 10^{-4}$ U)	Pyruvate dehydrogenase (U)
periplasm	12.2 (8%)	1508 (58%)	702 (80%)	N. D.	73 (78%)	N. D.	33 (26%)	16 (10%)	N. D.
cytoplasm	95.3 (63%)	1099 (42%)	180 (20%)	N. D.	13 (14%)	1041 (84%)	92 (74%)	148 (90%)	1364 (100%)
membrane	45 (30%)	N. D.	N. D.	6.2 (100%)	7 (7%)	197 (16%)	N. T.	N. T.	N. T.
total	152.5 (100%)	2606 (100%)	881 (100%)	6.2 (100%)	93 (100%)	1238 (100%)	N. T.	N. T.	N. T.

N. D. = Not Detectable

N. T. = Not Tested

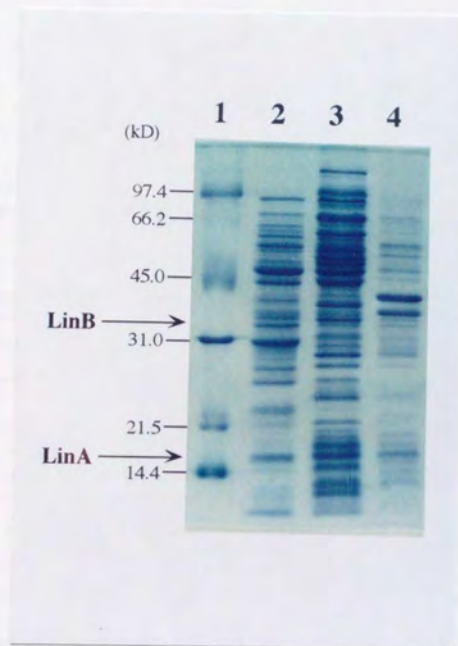


Fig. 6-5 SDS-PAGE analysis of proteins which constitute periplasmic (lane 2), cytoplasmic (lane 3), and membrane (lane 4) fractions, respectively from *E. coli* MV1190 harbouring pMYBA1 and pMLZ2.

Table 6-2a Subcellular localization of enzymes in *E. coli* MV1190 containing pMYBA1 and pMLZ2

	Protein (mg)	LinA (U)	LinB (U)	β -lactamase (U)	β -galactosidase (U)
periplasm	17.5 (12%)	779 (31%)	73 (63%)	4520 (98%)	2
cytoplasm	91.8 (64%)	1738 (69%)	43 (37%)	81 (2%)	2800 (99%)
membrane	35 (24%)	11	N.D.	4	32 (1%)
total	144.3 (100%)	2528 (100%)	116 (100%)	4605 (100%)	2834 (100%)

N. D. = Not Detectable

Table 6-2b Subcellular localization of enzymes in *E. coli* MV1190 containing pFBA1 and pUC119

	Protein (mg)	LinA (U)	LinB (U)	β -lactamase (U)	β -galactosidase (U)
periplasm	11 (7%)	N. D.	N. D.	7160 (99%)	22
cytoplasm	109 (67%)	24 (100%)	14 (100%)	104 (1%)	25000 (89%)
membrane	42.6 (26%)	N. D.	N.D.	4	3000 (11%)
total	162.6 (100%)	24 (100%)	14 (100%)	7268 (100%)	28022 (100%)

N. D. = Not Detectable

の何らかの機構が存在する可能性が示唆された。

6-4. 考察

UT26 での分画ははばうまくいっていると思われるが、本来 periplasm 酵素であるはずの phosphatase 活性の多くが cytoplasm 画分に残っていることを考えると、periplasm 成分が osmotic shock によって完全には放出されていないと思われる。*Sphingomonas* は *E. coli* に比べ、電子密度の高いペプチドグリカン層が存在することが知られており [Yabuuchi et al, 1990]、これが *E. coli* に適用されている osmotic shock では periplasm 空間に存在する蛋白を完全に放出するのには不十分なものになっている可能性がある。また、SDS-PAGE のパターンをよくみると、少量ではあるが細胞内可溶性酵素が漏出している可能性もある。すなわち、*Sphingomonas* の分画については若干の改良の余地があると思われる。これに対して *E. coli* での分画は確立された方法である上に、 β -galactoside、 β -lactamase の活性がうまく分画できており、十分に信用できるものと考えられる。*linA*、*linB* 遺伝子を高発現させた場合、*LinA*、*LinB* 活性の多くが periplasm 画分に局在しているのは興味深い。ただし、*linA*、*linB* 遺伝子を低発現させた場合には periplasm 画分には活性が見出されなかった。活性が弱すぎるため活性の分布は信憑性が乏しいとも考えられるが、*E. coli* では高発現した場合のみ *LinA*、*LinB* を periplasm 空間に移動する機構が存在する可能性もある。

本研究では *LinA*、*LinB* 活性の多くが periplasm 画分に存在するという現象を示しただけであるが、そのメカニズムにも興味を持たれる。グラム陰性細菌の periplasm には、binding protein (maltose binding protein, arabinose binding protein, histidine binding protein etc.)、scavenging protein (acid phosphatase, alkaline phosphatase, ADP-glucose hydrolase, carboxypeptidase II etc.)、detoxifying protein (alkylsulfatohydrolase, β -lactamase etc.)、等が存在するが、塩基配列が明らかになっているものには全て 20-40 アミノ酸のシグナルペプチド (positive charged アミノ酸残基に囲まれた疎水性の α -helix 構造をとる領域) が存在し、periplasm への移行に伴ってシグナルペプチドの切断が起こっていることが知られている [Oliver, 1987]。*LinA*、*LinB* の場合には塩基配列から推定されるアミノ酸配列には明らかにシグナルと思われる配列 [Pugsley, 1993] がないことに加え、*E. coli* で高発現させた *LinA*、*LinB* の N 末端アミノ酸配列はホルミルメチオニンが切断を受けているだけでシグナルペプチドの切断は観察されなかった。ホルミルメチオニンの切断は分泌とは無関係で、*E. coli* のタンパクにはよくみられる現象である [Livingston and Leder, 1969]。しかし、シグナルペプチドの切断無しにタンパクが細胞質膜を通過し分泌される例も知られている。

E. coli の hemolysin がその一つの例である [Felmlee *et al.*, 1985]。この場合には ATP 依存性の translocator, HlyB と HlyD が膜の横断に関与している [Blight and Holland, 1990; Doige and Ames, 1993; Dinh *et al.*, 1994]。一方、*E. coli* の leader peptidase は活性領域を periplasm 側に持つ膜結合酵素であるが、本酵素もシグナル配列を持たずに、膜間に存在する電気化学ポテンシャルさえあれば periplasm 側への移行が起こることが示されている [Wolfe and Wickner, 1984]。また、べん毛の flagellin も、シグナルペプチドの切断無しに細胞質膜を通過していることも示されている [Gill and Agabian, 1982]。更に、pentachlorophenol (PCP) 分解菌、*Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723 の *pcpA* 遺伝子産物（機能は不明であるが、PCP によって誘導され、PCP 分解に関与しているらしい）はシグナル配列を持たないが、periplasm に存在することが明らかになっている [Xun and Orser, 1991]。LinA, LinB がいかなる機構で periplasm へ移行しているかは非常に興味深い。*E. coli* で大量発現させた LinA, LinB の場合にはシグナル配列の切断は観察されなかったが、*S. paucimobilis* の場合には切断が起こっている可能性も否定することはできない。この可能性を検証するためには *S. paucimobilis* から LinA, LinB を精製し、それらの N 末配列を読んでみるのも有効かと思われる。

LinC 活性は膜画分からのみ検出された。alcohol dehydrogenase が膜酵素である例は AlkJ の例もあり [van Beilen *et al.*, 1992]、LinC に関しても予想されるアミノ酸配列からは明らかなシグナル配列は見出されなかったが、こうしたタイプの膜酵素である可能性が高いと思われる。シグナル配列は存在しないが活性が膜画分から検出される例としては β -etherase の例が知られており [Masai *et al.*, 1991]、構造遺伝子の内部に存在する疎水性の高い領域で膜に結合している可能性も考えられる。また、LinA, LinB 同様に、クローン化した遺伝子を用いて *E. coli* 内で発現させた LinC の局在性についても検討の必要があると思われる。ただし、注意を要するのは LinC の活性値が LinA, LinB, LinD に比べて極端に低い点である。すなわち、分画した際に LinC 活性のほとんどが失活してしまっている可能性も考えられ、LinC の局在性については今回の結果からだけでは最終的に結論付けられないと思われる。

今回の研究では酵素の局在性を活性でしかみていないが、LinC のように酵素が失活している、あるいは補因子などの関係で活性が検出できていない可能性も考えられる。蛋白自身の局在性を調べるためには抗体が必要であると思われる。抗体を用いれば、蛋白自身の局在性の確認を行うことが可能であるばかりでなく、LinA, LinB のペリプラズムへの局在化機構の解析を進める上で強力な武器となると考えられる。

現在まで、ペリプラズムの存在とその意義についての研究は少なく、本研究においてシグナルを持たない難分解性物質分解関与酵素のいくつかがペリプラズムに局在することを現象面において、

ほぼ示すことができたことは興味深い。ペリプラズム空間は外界と生物を隔てる重要な空間であり、基質と最初に接触するこの空間について研究することは生命の本質を探るという意味でも、物質の流れと生物を考える意味でも重要であると考えられる。また、こうした観点からみれば LinA と LinB は比較的安定な基質と最初に接触する酵素 (LinB も haloalkane など、 γ -HCH 分解代謝系以外の基質に対しては比較的安定な基質に最初に接触する酵素であると考えられることができる) であるため、より外部に近い periplasm 空間に存在することは生物の合目的性から考えると理にかなったことであると思われる。

終章（総合考察）

本研究は γ -HCH 連用圃場から分離された、好氣的に γ -HCH を分解資化する *Sphingomonas paucimobilis* の γ -HCH 分解関与遺伝子群を単離、解析することにより、本菌の γ -HCH に対する適応機構を解明し、実際の環境浄化へ応用することを意図して行われたものである。本研究に先立つ研究において、分解の最初のステップを触媒する酵素遺伝子、*linA* の単離と解析を行っている。本研究では、まず、第1章で *S. paucimobilis* への Tn5 挿入変異導入系を確立し、*linA* の変異株、UT64 の分離に成功した。更に、UT64 の粗酵素抽出液と精製した LinA を用いた解析によって、LinA 活性が分解反応の第2ステップ (γ -PCCH から 2,5-DDOL を生じる反応) にも必要であることを示した。第2章では第1章の結果をふまえて、*linA* 遺伝子を補った *P. putida* PpY101LA 株（バックグラウンドとして LinA 活性を安定に発現する）を作製し、この株に UT26 の遺伝子ライブラリーを導入し、 γ -HCH から 2,5-DDOL を生じるクローンを GC (ECD) で選択する方法で *linB* 遺伝子のクローン化に成功した。*linB* 遺伝子の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、haloalkane dehalogenase (DhlA) をはじめとする加水分解酵素と有意な相同性を示し、活性中心と予想されるアミノ酸残基周辺では特に高い保存性を示した。LinB の基質特異性に興味を持たれたので、UT26 および LinB を高発現させた *E. coli* の休止菌体の様々なハロゲン化物に対する脱ハロゲン活性を検討した結果、DhlA に比べて、かなり基質特異性の広い酵素であることが示唆された。そこで、第3章では *E. coli* 中で高発現させた LinB について、硫酸分画、疎水クロマト、陰イオン交換クロマト、ゲルろ過の各ステップを経て SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製した。LinB は、至適 pH が 8.2 であること、単量体であることの特徴は DhlA と同じであったが、基質特異性は DhlA に比べてかなり広く、長鎖 monochloroalkane 類、炭素鎖内部の塩素置換体、dichloroalkane 類、塩素以外の halogenated alkane 類、chlorinated aliphatic alcohol 類についても基質とし得ることが明らかになった。第4章では 2,5-DDOL を 2,5-DCHQ に変換する活性を持つ脱水素酵素遺伝子 *linC* のクローン化とその性質の解析を行った。*linC* 遺伝子の推定アミノ酸配列は、生物界に広く拡がっている short-chain alcohol dehydrogenase family と呼ばれる一群の酵素と有意な相同性を示し、LinC もまた、その一員であることが明らかになった。また、*linA* の近傍に *P. putida*, *E. coli* 中で LinC 活性を示す *linC* とは異なる酵素遺伝子 *linX* が存在していたが、*linC* 遺伝子を失った mutant は、*linX* 遺伝子を保持しながら LinC 活性を示さず、 γ -HCH を唯一の炭素源として生育が出来なくなること、この mutant は *linC* 遺伝子をプラスミドで相補することで活性が復活すること、およびノーザン解析の結果 *linC* 遺伝子は構成的に発現しているが、*linX* 遺

伝子の発現は γ -HCH の有無に関わらず認められなかったことから、UT26 の γ -HCH 分解代謝においては *linC* 遺伝子は必須であるが *linX* 遺伝子は機能していない可能性が強く示唆された。 γ -HCH は LinA, LinB, LinC の作用で 1,2,4-TCB, 2,5-DCP, 2,5-DCHQ に変換されるが、1,2,4-TCB と 2,5-DCP は UT26 によってそれ以上分解されない dead-end 産物である。一方、2,5-DCHQ は UT26 によって無機化される。そこで第5章では 2,5-DCHQ 以降の分解について検討を加えた。残念ながら分解経路を明らかにし、分解反応に関与する酵素遺伝子を単離するまでには至らなかったが、2,5-DCHQ の分解活性は誘導的に発現することを示し、2,5-DCHQ 分解に欠陥を持つ3種類の mutant を単離することに成功した。第6章ではこれまでの研究で明らかにした γ -HCH 分解に関与する酵素活性が *Sphingomonas paucimobilis* の細胞内のどの部分に局在化しているかについての検討を行った。その結果、 γ -HCH の分解の最初のステップの反応を行う LinA, LinB 酵素活性の大部分がペリプラズム画分に存在することが明らかになった。更に、これらの酵素を大腸菌で高発現させた場合にもペリプラズム画分に高い酵素活性が認められた。塩基配列からは LinA, LinB 酵素遺伝子に分泌シグナルと思われる配列は存在しておらず、局在化機構は全く不明であるが、分解系酵素群の局在性についてはこれまでのところ以外と情報が少なく、興味深い知見を得ることが出来たと考えられる。

本研究以前の研究、本研究との共同研究から得られた知見も含めて UT26 における γ -HCH 分解代謝についてこれまでに明らかにしてきた知見をまとめると次の2点に要約される。

1) 複数の脱塩素ステップを含み、シクロヘキサン環からベンゼン核を形成するというこれまでに報告のないユニークな好氣的 γ -HCH の分解代謝経路を明らかにした (Fig. 7-1)。ただし、UT26 の γ -HCH 分解代謝経路は 1,2,4-TCB と 2,5-DCP という2つの dead-end 産物を生じるという、いわば不完全な経路であると考えられる。実際の環境浄化への応用を考える場合には、LinB 活性を強化してやる、1,2,4-TCB 分解菌に *linA* を導入してやる、等のより効率的な γ -HCH 分解経路を遺伝子操作を用いて創造してやる余地がありそうである。

2) UT26 の γ -HCH 分解に関与する3つの遺伝子 (*linX* は除く) の単離と解析を行った (Table 4-3)。*linA* は、G+C 含量が他の遺伝子、および *S. paucimobilis* の type strain の G+C 含量 (65%) に比べて異常に低く、相同配列も存在しないことから、かなり特殊な遺伝子であることが示唆される。また、*linA*, *linB*, *linC* の3つの遺伝子のうち、複数の遺伝子を含むコスミドクローンが得られていない事実より、これら3つの遺伝子は互いに離れて存在している、少なくともオペロンは形成していないことが明らかになった。

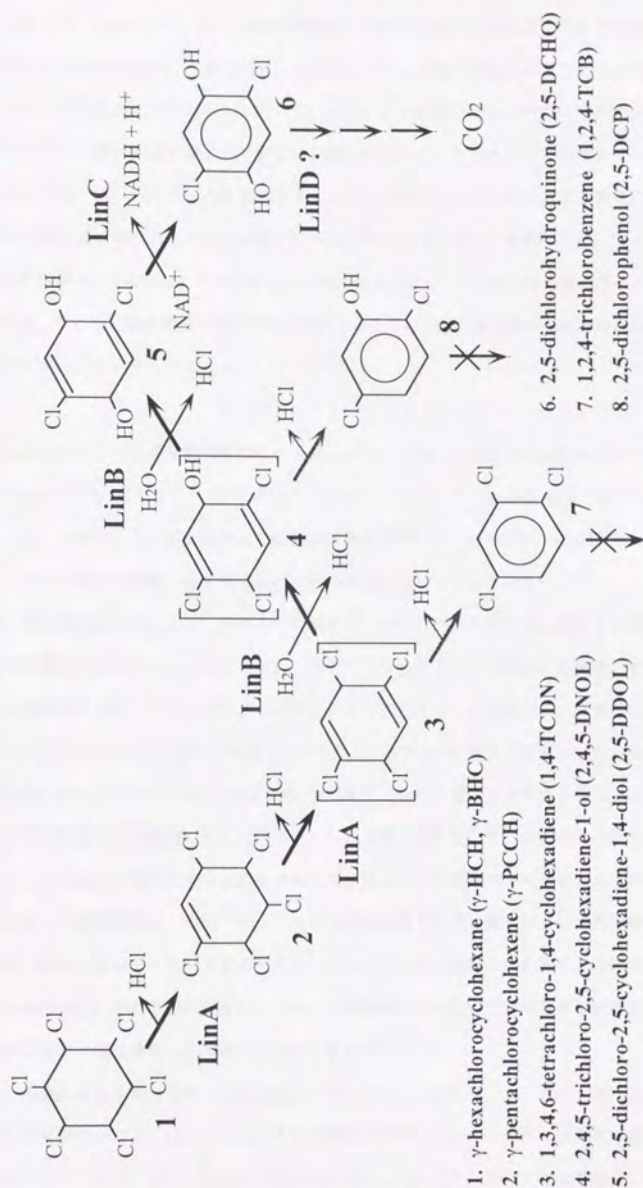


Fig. 7-1 Proposed assimilation pathway of γ -HCH by *Sphingomonas paucimobilis* UT26

以上の点より、UT26 の γ -HCH 分解代謝経路、分解関与遺伝子群は進化の歴史の浅いものであり、 γ -HCH の分解資化能という面に注目した場合、UT26 は進化の途上の菌であるとも考えることも可能であると思われる。すなわち、UT26 の γ -HCH の分解遺伝子についての解析データは細菌の難分解性物質への適応機構を探る上で貴重な中間的状況のデータであると思われる。これまでの知見からだけでも、Fig. 7-2 のような図式を考えることが出来る。すなわち、まず最初に基質と接触する酵素の遺伝子は外来の遺伝子を利用していると思われる。次に、最初の反応によって基礎代謝産物に近い物質へと変換されたものに対しては既に自分が持っていた遺伝子を発達させることによって対応する。そして、最終的には発現制御が存在するまでに十分に確立された既存の遺伝子系を使って代謝していく、というものである。

今回の研究においては基質特異性の広い dehalogenase である LinB や典型的な分泌シグナルを持たない LinA、LinB がペリプラズムに局在していることなどいくつかの興味深い材料の確保にも成功している。今後は、この点をふまえて研究を進展させていくことも可能であると考えられる。そこで、 γ -HCH の微生物分解に関する今後の研究の展開について考えてみたい。

まず、応用的な面を考えると、今回までの研究で γ -HCH の好氣的分解に関与する特殊性の高い遺伝子の確保はほぼ終了したと考えられる。そこで、今後はこれらの遺伝子を利用して実際に γ -HCH を高効率に分解することが可能な組換え体を作製していく必要がある。具体的には先にも述べたように、UT26 に *linB* 遺伝子を挿入してやることにより LinB 活性を強化し、dead-end 産物の蓄積を最小限に抑えるという方法、1,2,4-TCB 分解菌に *linA* を導入してやるという方法等が考えられる。いずれの方法も技術的には比較的容易であると考えられるので、作製した組換え体と野生株の UT26 の γ -HCH 分解資化能を実際に比較してやることは大変興味深く思われる。ただし、組換え菌を利用した環境浄化は、HCH のように比較的低濃度で広域に拡がっている汚染物質の除去に対しては、効果が微弱で一過的であると考えられる。そこで、植物、らん藻などの独立栄養生物に UT26 由来の HCH 分解遺伝子を導入し、HCH 分解酵素を安定に長期間発現する組換え生物を創製する方法も実際の環境浄化には有効であると思われる。

一方、基礎的な面を考えると dehalogenase である LinA、LinB についての生化学的解析を進めることにも興味を持たれる。LinA はこれまでに類似の酵素が見つかっておらず、その反応メカニズムは不明のままである。また、LinB に類似の dehalogenase である DhIA は立体構造、反応メカニズムについて詳細な研究がなされており、両者の基質特異性の違いがどのような構造の違いに起因するのかについて解析するために LinB の X 線結晶構造解析等を行うことも有意義な研究の一つで

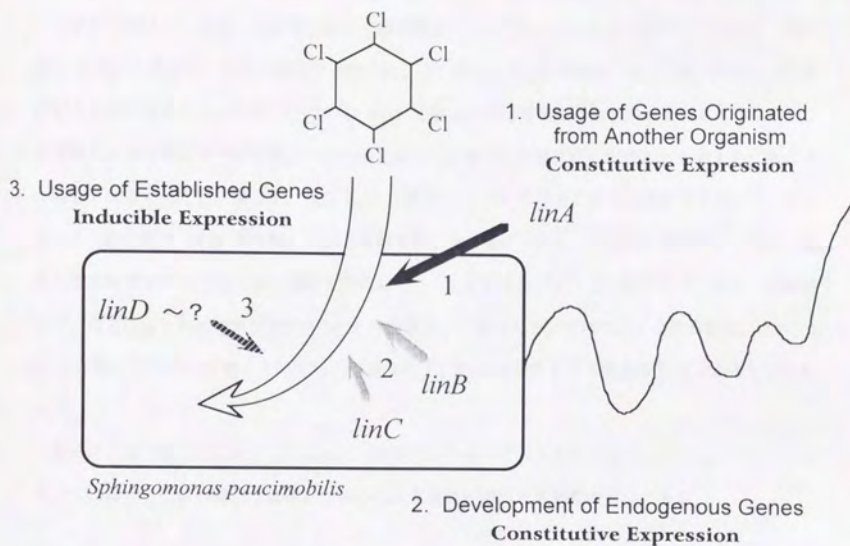


Fig. 7-2 Proposed mechanism of adaptive acquisition of assimilation ability for γ -HCH in *Sphingomonas paucimobilis*.

あると思われる。

また、UT26 による HCH の他の異性体の分解代謝系の検討も行いたい。UT26 は γ 体のみでなく α 、 δ 体についても初発分解は可能であり (β 体は不可能)、精製した LinA も同様であることがわかっているが、それ以降の分解代謝については不明のままである。 α 、 δ 体の UT26 による分解パターンと、クローン化した *linA* 遺伝子、ないし *linA* と *linB* 両遺伝子を持つ組換え体によるものを比べることによって、 γ 体の分解代謝経路との比較を行いたい。環境汚染を引き起こしているのは γ 体だけでなく α 、 β 、 δ 体もあることを考えると重要な研究テーマであると思われる。

自然界における HCH の分解代謝系の発達機構についてもう少し進んだ解釈を行うには、他の HCH 分解菌を獲得し、その分解関与遺伝子群と UT26 の γ -HCH 分解関与遺伝子群の構造との比較を行う必要があると思われる。UT26 の HCH 分解遺伝子は特殊な構造を持っていると考えられ、芳香族化合物分解遺伝子群の様に一つの祖先遺伝子が多くの細菌に広く伝播したと考えられるような構造とは考えにくい。従って、他の HCH 分解菌が UT26 とは全く異なる遺伝子を用いて、全く異なる代謝経路で HCH を分解している可能性も十分に考えられる。これらを比較することは、細菌の難分解性物質への適応進化機構を解明していく上で貴重なデータとなると考えられる。本研究で用いた方法論を利用すれば他の γ -HCH 分解遺伝子の獲得も十分可能であると思われる。また、 β 体を分解可能な菌の分離とその遺伝子構造解析も、応用面を考えると重要な課題であると思われる。

最後に、第 6 章で明らかにしたように、典型的な分泌シグナルを持たない LinA、LinB のペリプラズムへの局在化機構の解明も基礎的な面から大変興味を持たれる問題の一つである。

引用文献

- Agarwal, A. K., C. Monder, B. Eckstein and P. C. White. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 β -dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**: 18939-18943. (1989)
- Apajalahti, J. H. A. and M. S. Salkinoja-Salonen. Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *J. Bacteriol.* **169**: 675-681. (1987a)
- Apajalahti, J. H. A. and M. S. Salkinoja-Salonen. Complete dechlorination of tetrachlorohydroquinone by cell extracts of pentachlorophenol-induced *Rhodococcus chlorophenolicus*. *J. Bacteriol.* **169**: 5125-5130. (1987b)
- Asturias, J. A., L. D. Eltis, M. Prucha and K. N. Timmis. Analysis of Three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Biol. Chem.* **269**: 7807-7815. (1994)
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. In Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience (1987)
- Backmann, A., P. Walet, P. Wijnen, W. d. Bruin, J. L. M. Huntjens and W. Roelofs. Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 143-149. (1988a)
- Bachmann, A., W. d. Bruin, J. C. Jumelet, H. H. N. Tijnaarts and A. J. B. Zehnder. Aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 548-554. (1988b)
- Beetham, J. K., T. Tian and B. D. Hammock. cDNA cloning and expression of a soluble epoxide hydrolase from Human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 197-201. (1993)
- Bergler, H., G. Högenauer and F. Turnowsky. Sequences of the *envM* gene and of two mutated alleles in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2093-2100. (1992)
- Bhunya, S. P. and G. B. Jena. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (γ -BHC): an in vivo study in chicks. *Mutation Research* **272**: 175-181. (1992)
- Blight, M. A. and I. B. Holland. Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane. *Molecular Microbiology* **4**: 873-880. (1990)
- Chakrabarty, A. M. Environmental Control of Microbial Gene Expression and Evolution. In Biotechnology and Environmental Science: Molecular Approaches pp99-108. (1992)
- Churchill, P., J. Hempel, H. Romovacek, W.-W. Zhang, M. Brennan and S. Churchill. Primary structure of rat liver D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase from cDNA and protein analysis: a short-chain alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **31**: 3793-3799. (1992)
- Clarke, L. and J. Carbon. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*: specific complementation of argininosuccinate lyase (*argH*) mutations. *J. Mol. Biol.* **120**: 517-532. (1978)
- Darby, J. M., D. G. Taylor and D. J. Hopper. Hydroquinone as the ring-fission substrate in the catabolism of 4-ethylphenol and 4-hydroxyacetophenone by *Pseudomonas putida* JD1. *J. General Microbiol.* **133**: 2137-2146. (1987)
- Dassa, E., C. Tesu and P.-L. Boquet. Identification of the acid phosphatase(optimum pH 2.5) of *Escherichia coli*. *FEBS letters* **113**: 275-278. (1980)
- Daubaras, D. and A. M. Chakrabarty. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. *Biodegradation* **3**: 125-135. (1992)
- Daubaras, D. L., C. D. Hersherberger, K. Kitano and A. M. Chakrabarty. Sequence analysis of a gene cluster involved in metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1279-1289. (1995)
- Debellé F. and S. B. Sharma. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucleic Acid Res.* **14**: 7453-7472. (1986)
- de Bruijn, F. J. and J. R. Lupski. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids—a review. *Gene* **27**: 131-149. (1984)
- de Bruijn, F. J. Transposon Tn5 mutagenesis to map genes. *Methods Enzymol.* **154**: 175-196. (1987)
- de Jong, E., J. A. Field, H.-E. Spinnler, J. B. P. A. Wijnberg and J. A. M. d. Bont. Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 264-270. (1994)
- Delledonne, M., R. Porcari and C. Fogher. Nucleotide sequence of the *nodG* gene of *Azospirillum brasilense*. *Nucleic Acids Research* **18**: 6435-6435. (1990)
- Dinh, T., I. T. Paulsen and J. Milton H. Saier. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**: 3825-3831. (1994)
- Doige, C. A. and G. F.-L. Ames. ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 291-319. (1993)

- Duggleby, R. G. and D. T. Dennis. Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. *J. Biol. Chem.* **249**: 162-166. (1974)
- Ensor, C. M. and H.-H. Tai. Site-directed mutagenesis of the conserved tyrosine 151 of human placental NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase yields a catalytically inactive enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**: 840-845. (1991)
- Erickson, B. D. and F. J. Mondello. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* **174**: 2903-2912. (1992)
- Felmlee, T., S. Pellett, E.-Y. Lee and R. A. Welch. *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J. Bacteriol.* **163**: 88-93. (1985)
- Fetzner, S. and F. Lingens. Bacterial Dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58**: 641-685. (1994)
- Figurski, D. H. and D. R. Helinski. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1648-1652. (1979)
- Franken, S. M., H. J. Rozeboom, K. H. Kalk and B. W. Dijkstra. Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *The EMBO J.* **10**: 1297-1302. (1991)
- Friedemann, T. E. and G. E. Haugen. Pyruvic Acid II. The determination of keto acids in blood and urine. *J. Biol. Chem.* **47**: 415-442. (1943)
- Fukuda, M., Y. Yasukochi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi and K. Yano. Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 850-856. (1994)
- Furukawa, K. and T. Miyazaki. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398. (1986)
- Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira and N. Tomizuka. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* **171**: 5467-5472. (1989)
- Gallard, J.-L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin and P. Cossart. Entry of *L. monocytogenes* into Cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive Cocci. *Cell* **65**: 1127-1141. (1991)
- Gashwend, P. M., J. K. MacFarlane and K. A. Newman. Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae. *Science* **227**: 1033-1035. (1985)
- Gill, P. R. and N. Agabian. A comparative structural analysis of the flagellin monomers of *Caulobacter crescentus* indicates that these proteins are encoded by two genes. *J. Bacteriol.* **150**: 925-933. (1982)
- Gopal-Srivastava, R., D. H. Mallonee, W. B. White and P. B. Hylemon. Multiple copies of a bile acid-inducible gene in *Escherichia coli* sp. strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* **172**: 4420-4426. (1990)
- Grant, D. F., D. H. Storms and B. D. Hammock. Molecular Cloning and expression of Murine liver soluble epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **268**: 17628-17633. (1993)
- Guenzi, W. D., W. E. Beard and J. F. G. Viets. Influence of soil treatment on persistence of six chlorinated hydrocarbon insecticides in the field. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **35**: 910-913. (1971)
- Hallam, S. E., F. Malpartida and D. A. Hopwood. Nucleotide sequence, transcription and function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* **74**: 305-320. (1988)
- Harayama, S., M. Rekik, K.-L. Nagai and L. N. Ornston. Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via meta cleavage in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **171**: 6251-6258. (1989)
- Haugland, R. A., U. M. X. Sangodkar, P. R. Sferri and A. M. Chakrabarty. Cloning and characterization of a chromosomal DNA region required for growth on 2,4,5-T by *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Gene* **100**: 65-73. (1991)
- Hayakawa, T., M. Hirashima, S. Ide, M. Hamada, K. Okabe and M. Koike. Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.* **241**: 4694-4699. (1966)
- Heilmann, H. J., H. J. Mägert and H. G. Gassen. Identification and isolation of glucose dehydrogenase genes of *Bacillus megaterium* M1286 and their expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **174**: 485-490. (1988)
- Heritage, A. D. and I. C. MacRae. Degradation of lindane by cell-free preparation of *Clostridium sphenoides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 222-224. (1977a)
- Heritage, A. D. and I. C. MacRae. Identification of intermediates formed during the degradation of hexachlorocyclohexanes by *Clostridium sphenoides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1295-1297. (1977b)
- Heritage, A. D. and I. C. MacRae. Degradation of hexachlorocyclohexanes and structurally related substances by *Clostridium sphenoides*. *Aust. J. Biol. Sci.* **32**: 493-500. (1979)
- Higgins, D. G., A. J. Bleasby and R. Fuchs. Clustal V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* **8**: 189-191. (1992)

- Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward and H. Schrempf. In Genetic manipulation of *Streptomyces*; a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK. (1985)
- Horvath, B., E. Kondorosi, M. John, J. Schmidt, I. Török, Z. Györgypal, I. Barabas, U. Wieneke, J. Schell and A. Kondorosi. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for *Alfalfa*. *Cell* 46: 335-343. (1986)
- Imai, R., Y. Nagata, K. Senoo, H. Wada, M. Fukuda, M. Takagi and K. Yano. Dehydrochlorination of γ -hexachlorocyclohexane (γ -BHC) by γ -BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2015-2017. (1989)
- Imai, R., Y. Nagata, M. Fukuda, M. Takagi and K. Yano. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. *J. Bacteriol.* 173: 6811-6819. (1991)
- Imai, R., Y. Nagata, M. Fukuda, K. Yano and M. Takagi. Isolation and characterization of a dehydrochlorinase gene for the degradation of γ -Hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. In *Pseudomonas*; molecular biology and biotechnology Edited by E. Galli, S. Silver, and B. Witholt American Society for Microbiology, Washington, DC chapter 33: 292-300. (1992)
- Irie, S., S. Doi, T. Yorifuji, M. Takagi and K. Yano. Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 169: 5174-5179. (1987)
- Iwasaki, I., S. Utsumi and T. Ozawa. New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. *Bull. Chem. Soc. Japan* 25: 226. (1952)
- Iwata, H., S. Tanabe, N. Sakai and R. Tatsukawa. Distribution of persistent organochlorines in the Oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1080-1098. (1993)
- Iwata, H., S. Tanabe, N. Sakai, A. Nishimura and R. Tatsukawa. Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes. *Environmental Pollution* 85: 15-33. (1994)
- Jagnow, G., K. Haider and P. Ellwardt. Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 115: 285-292. (1977)
- Janssen, D. B., F. Pries, J. van der Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra and B. Witholt. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *J. Bacteriol.* 171: 6791-6799. (1989)
- Janssen, D. B., F. Pries and J. R. van der Ploeg. Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 163-191. (1994)
- Jany, K.-D., W. Ulmer, M. Fröschle and G. Pfeleiderer. Complete amino acid sequence of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *FEBS Lett.* 165: 6-10. (1984)
- Jörnvall, H., M. Persson and J. Jeffery. Alcohol and polyol dehydrogenase are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4226-4230. (1981)
- Ka, J. O., W. E. Holben and J. M. Tiedje. Use of gene probes to aid in recovery and identification of functionally dominant 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1116-1120. (1994)
- Kawasaki, H., K. Tsuda, I. Matsushita and K. Tonomura. Lack of homology between two haloacetate dehalogenase genes encoded on a plasmid from *Moraxella* sp. strain B. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1317-1323. (1992)
- Keuning, S., D. B. Janssen and B. Witholt. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J. Bacteriol.* 163: 635-639. (1985)
- Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi and K. Yano. Isolation and characterization of a mixed culture that degrades polychlorinated biphenyls. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2885-2891. (1988)
- Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi and K. Yano. Cloning of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 171: 2740-2747. (1989)
- Kinoshita, S., S. Kageyama, K. Iba, Y. Yamada and H. Okada. Utilization of a cyclic dimer and linear oligomers of ϵ -aminocaproic acid by *Achromobacter guttatus* K172. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1219-1223. (1975)
- Kinoshita, S., S. Negoro, M. Muramatsu, V. S. Bisaria, S. Sawada and H. Okada. 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase, a new cyclic amide hydrolase produced by *Achromobacter guttatus* K172. *Eur. J. Biochem.* 80: 489-495. (1977)
- Kinoshita, S., T. Terada, T. Taniguchi, Y. Takene, S. Masuda, N. Matsunaga and H. Okada. Purification

- and characterization of 6-aminohexanoic-acid-oligomer hydrolase of *Flavobacterium* sp. K172. *Eur. J. Biochem.* **116**: 547-551. (1981)
- Klein, B., K. Pawlowski, C. Hörnicke-Grandpierre, J. Schell and R. Töpfer. Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a β -ketoacyl-ACP reductase. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 122-128. (1992)
- Knehr, M., H. Thomas, M. Arand, T. Gebel, H.-D. Zeller and F. Oesch. Isolation and characterization of a cDNA encoding Rat liver cytosolic epoxide hydrolase and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 17623-17627. (1993)
- Krook, M., L. Marekov and H. Jörnvall. Purification and structural characterization of placental NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. The primary structure reveals the enzyme to belong to the short-chain alcohol dehydrogenase family. *Biochemistry* **29**: 738-743. (1990)
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685. (1970)
- Larway, P. and W. C. Evans. Metabolism of quinol and resorcinol by soil *Pseudomonads*. *Biochemical J.* **95**: 52P. (1965)
- Lederberg, J. The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J. Bacteriol.* **60**: 381-392 (1950)
- Liu, J., K. Duncan and C. T. Walsh. Nucleotide sequence of a cluster of *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis genes: identification of *entA* and purification of its product 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **171**: 791-798. (1989)
- Livingston, D. and P. Leder. Deformylation and protein biosynthesis. *Biochemistry* **8**: 435-443. (1969)
- Lorenz, W. W., R. O. McCann, M. Longiaru and M. J. Cormier. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4438-4442. (1991)
- MacRae, I. C., K. Raghu and T. F. Castro. Persistence and biodegradation of four common isomers of benzene hexachloride in submerged soils. *J. Agr. Food Chem.* **15**: 911-914. (1967)
- MacRae, I. C., K. Raghu and E. M. Bautista. Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp. *Nature* **221**: 859-860. (1969)
- Maeda, M., Y. Ohta, M. Roberts, M. Travisano, T. Kudo and K. Horikoshi. Isolation and characterization of diverse PCB (biphenyl) degradation gram-negative bacteria. *JRDC-MSU Joint Workshop on Microbial Evolution and Biodegradation* 137-147. (1994)
- Maeda, M., S.-Y. Chung, E. Song and T. Kudo. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 549-555. (1995)
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1982)
- Marekov, L., M. Krook and H. Jörnvall. Prokaryotic 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase is an enzyme of the 'short-chain, non-metalloenzyme' alcohol dehydrogenase type. *FEBS Lett.* **266**: 51-54. (1990)
- Marks, T. S., J. D. Allpress and A. Maule. Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1258-1261. (1989)
- Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218. (1961)
- Masai, E., Y. Katayama, S. Nishikawa, M. Yamasaki, N. Morohoshi and T. Haraguchi. Detection and localization of a new enzyme catalyzing the β -aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett.* **249**: 348-352. (1989)
- Masai, E., Y. Katayama, S. Kawai, S. Nishikawa, M. Yamasaki and N. Morohoshi. Cloning and sequencing of the gene for a *Pseudomonas paucimobilis* enzyme that cleaves β -aryl ether. *J. Bacteriol.* **173**: 7950-7955. (1991)
- Masai, E., S. Kubota, Y. Katayama, S. Kawai, M. Yamasaki and N. Morohoshi. Characterization of the α -dehydrogenase gene involved in the cleavage of β -aryl ether by *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1655-1659. (1993)
- Mastumura, F., H. J. Benzeat and K. C. Patil. Factors affecting microbial metabolism of γ -BHC. *J. Pesticide Sci.* **1**: 3-8. (1976)
- Mathur, S. P. and J. G. Saha. Microbial degradation of lindane-C¹⁴ in a flooded sandy loam soil. *Soil Science* **120**: 301-307. (1975)
- Menn, F.-M., G. J. Zylstra and D. T. Gibson. Location and sequence of the *tdx* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **104**: 91-94. (1991)
- Morris, H. R., D. H. Williams, G. G. Midwinter and B. S. Hartley. A mass-spectrometric sequence study of the enzyme ribitol dehydrogenase from *Klebsiella aerogenes*. *Biochem. J.* **141**: 701-713. (1974)
- Nagasawa, S., R. Kikuchi, Y. Nagata, M. Takagi and M. Matsuo. Stereochemical analysis of γ -HCH degradation by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere* **26**: 1187-1201. (1993a)
- Nagasawa, S., R. Kikuchi, Y. Nagata, M. Takagi and M. Matsuo. Aerobic mineralization of γ -HCH by

- Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere* 26: 1719-1728. (1993b)
- Nagata, Y., T. Hatta, R. Imai, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano and M. Takagi. Purification and characterization of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1582-1583. (1993)
- Nakazima, M., T. Okubo and Y. Katamura. The alkaline dehydrochlorination of the benzene hexachloride isomers. *Botyu-Kagaku* 14: 10-19. (1949)
- Navre, M. and G. M. Ringold. A growth factor-repressible gene associated with protein kinase C-mediated inhibition of adipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 107: 279-286. (1988)
- Neidle, E., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Reikik and S. Harayama. *Cis*-diol dehydrogenase encoded by the TOL pWW0 plasmid *xylL* gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the short-chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Eur. J. Biochem.* 204: 113-120. (1992)
- Nordlund, I. and V. Shingler. Nucleotide sequences of the *meta*-cleavage pathway enzymes 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600. *Biochimica et Biophysica Acta* 1049: 227-230. (1990)
- Nossal, N. and L. Heppel. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* 241: 3055-3062. (1966)
- Ohisa, N. and M. Yamaguchi. Gamma BHC degradation accompanied by the growth of *Clostridium rectum* isolated from paddy field soil. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1819-1823. (1978a)
- Ohisa, N. and M. Yamaguchi. Degradation of gamma-BHC in flooded soils enriched with peptone. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1983-1987. (1978b)
- Ohisa, N., M. Yamaguchi and N. Kurihara. Lindane degradation by cell-free extracts of *Clostridium rectum*. *Arch. Microbiol.* 125: 221-225. (1980)
- Ohisa, N., N. Kurihara and M. Nakajima. ATP synthesis associated with the conversion of hexachlorocyclohexane related compounds. *Arch. Microbiol.* 131: 330-333. (1982)
- Okada, H., S. Negoro, H. Kimura and S. Nakamura. Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degradation nylon oligomers. *Nature* 306: 203-206. (1983)
- Oliver, D. B. Periplasm and protein secretion. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*; Cellular and Molecular biology Edited by F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger American Society for Microbiology, Washington, DC chapter 6: 56-69 (1987)
- Orser, C. S., J. Dutton, C. Lange, P. Jablonski, L. Xun and M. Hargis. Characterization of a *Flavobacterium* glutathione S-transferase gene involved in reductive dechlorination. *J. Bacteriol.* 175: 2640-2644. (1993)
- Palleroni, N. J. Genus I *Pseudomonas*, p. 198. In N. R. Kreig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. (1984)
- Pathak, D., K. L. Ngai and D. Ollis. X-ray crystallographic structure of dienelactone hydrolase at 2.8 Å. *J. Mol. Biol.* 204: 435-445. (1988)
- Pathak, D. and D. Ollis. Refined structure of dienelactone hydrolase at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* 214: 497-525. (1990)
- Peoples, O. P. and A. J. Sinskey. Fine structural analysis of the *Zoogloea ramigera* *phbA-phbB* locus encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase: nucleotide sequence of *phbB*. *Molecular Microbiology* 3: 349-357. (1989a)
- Peoples, O. P. and A. J. Sinskey. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Biol. Chem.* 264: 15293-15297. (1989b)
- Persson, B., M. Krook and H. Jörnvall. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* 200: 537-543. (1991)
- Powlowski, J., L. Sahlman and V. Shingler. Purification and properties of the physically associated *meta*-cleavage pathway enzymes 4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase and aldehyde dehydrogenase (acylating) from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 175: 377-385. (1993)
- Pugsley, A. P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108. (1993)
- Raghu, K. and I. C. MacRae. Biodegradation of the gamma isomer of benzene hexachloride in submerged soils. *Science* 154: 263-264. (1966)
- Rawlings, M. and J. John E. Coronan. The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J. Biol. Chem.* 267: 5751-5754. (1992)
- Rossmann, M. G., A. Liljas, C.-I. Brändén and L. J. Banaszak. Evolutionary and Structural Relationship Among Dehydrogenases. In *The enzymes*, 3rd edn 11: pp. 61-102. (1975)
- Rozeboom, H. J., J. Kingma, D. B. Janssen and B. Dijkstra. Crystallization of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J. Mol. Biol.* 200: 611-612. (1988)
- Ruvkun, G. B. and F. M. Ausubel. A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* (London) 289: 85-88. (1981)

- Sahu, S. K., K. K. Patnaik, M. Sharmila and N. Sethunathan. Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3620-3622. (1990)
- Sangodkar, U. M. X., P. J. Chapman and A. M. Chakrabarty. Cloning, physical mapping and expression of chromosomal genes specifying degradation of the herbicide 2,4,5-T by *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Gene* 71: 267-277. (1988)
- Sargent, M. G. Rapid fixed-time assay for penicillinase. *J. Bacteriol.* 95: 1493-1494. (1968)
- Schenk, T., R. Müller, F. Mörsberger, M. K. Otto and F. Lingens. Enzymatic dehalogenation of pentachlorophenol by extracts from *Arthrobacter* sp. strain ATCC 33790. *J. Bacteriol.* 171: 5487-5491. (1989)
- Senoo, K. and H. Wada. Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35: 79-87. (1989)
- Sherman, D. H., F. Malpartida, M. J. Bibb and D. A. Hopwood. Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* T* 22. *The EMBO J.* 8: 2717-2725. (1989)
- Shine, J. and L. Dalgarno. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* (London) 254: 34-38. (1975)
- Spain, J. C. and D. T. Gibson. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 812-819. (1991)
- Sethunathan, N., E. M. Bautista and T. Yoshida. Degradation of benzene hexachloride by a soil bacterium. *Can. J. Microbiol.* 15: 1349-1354. (1969)
- Steiert, J. G. and R. L. Crawford. Catabolism of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 141: 825-830. (1986)
- Stewart, D. K. R. and D. Chisholm. Long-term persistence of BHC, DDT and chlordane in a sandy loam soil. *Can. J. Soil Sci.* 51: 379-383. (1971)
- Suen, W.-C. and J. C. Spain. Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. *J. Bacteriol.* 175: 1831-1837. (1993)
- Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida and K. Furukawa. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267: 4844-4853. (1992)
- Takeoka, H., A. Ramesh, H. Iwata, S. Tanabe, A. N. Subramanian, D. Mohan, A. Magendran and R. Tatsukawa. Fate of the insecticide HCH in the tropical coastal area of south India. *Marine Pollution Bulletin* 22: 290-297. (1991)
- Tardif, G., C. W. Greer, D. Labbe and P. C. K. Lau. Involvement of a large plasmid in the degradation of 1,2-dichloroethane by *Xanthobacter autotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1853-1857. (1991)
- Terada, I., S.-T. Kwon, Y. Miyata, H. Matsuzawa and T. Ohta. Unique precursor structure of an extracellular protease, Aqualysin I, with NH₂- and COOH-terminal pro sequences and processing in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 6576-6581. (1990)
- Thöny, B., H.-M. Fischer, D. Anthamatten, T. Bruderer and H. Hennecke. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* 15: 8479-8499. (1987)
- Tu, C. M. Interaction between lindane and microbes in soils. *Arch. Microbiol.* 105: 131-134. (1975)
- Tu, C. M. Utilization and degradation of lindane by soil microorganisms. *Arch. Microbiol.* 108: 259-263. (1976)
- Turnowsky, F., K. Fuchs, C. Jeschek and G. Högenauer. *envM* genes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 6555-6565. (1989)
- Uotila, J. S., V. H. Kitunen, T. Saastamoinen, T. Coote, M. M. Häggblom and M. S. Salkinoja-Salonen. Characterization of Aromatic Dehalogenases of *Mycobacterium fortuitum* CG-2. *J. Bacteriol.* 174: 5669-5675. (1992)
- Uotila, J. Dehalogenases for polyhalogenated aromatic compounds in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Mycobacterium fortuitum* CG-2. Ph. D. thesis. University of Helsinki, Finland (1993)
- van Beilen, J. B., G. Eggink, H. Enequist, R. Bos and B. Witholt. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alk/kl* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Molecular Microbiology* 6: 3121-3136. (1992)
- van der Meer, J. R., W. M. d. Vos, S. Harayama and A. J. B. Zehnder. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews* 56: 677-694. (1992)
- Vieira, J. and J. Messing. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153: 3-11. (1987)
- Vieira, J. and J. Messing. To be published in "Methods in Enzymology"
- Wada, H., K. Senoo and Y. Takai. Rapid degradation of γ -HCH in upland soil after multiple applications.

Witholt, B., J. Sijtsema, M. Kok and G. Eggink. Oxidation of alkanes by *Pseudomonas oleovorans*. *Pseudomonas*: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology, Edited by S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan chapter 15: 141-150. (1990)

Wolfe, P. B. and W. Wickner. Bacterial leader peptidase, a membrane protein without a leader peptidase, uses the same export pathway as pre-secretory proteins. *Cell* 36: 1067-1072. (1984)

Xun, L. and C. S. Orser. Purification of a *Flavobacterium* pentachlorophenol-induced periplasmic protein (PcpA) and nucleotide sequence of the corresponding gene (*pcpA*). *J. Bacteriol.* 173: 2920-2926. (1991)

Xun, L., E. Topp and C. S. Orser. Confirmation of oxidative dehalogenation of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* pentachlorophenol hydroxylase. *J. Bacteriol.* 174: 5745-5747. (1992)

Yabuuchi, E., I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T. Ezaki and H. Yamamoto. Proposed of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* 34: 99-119. (1990)

Yamada, M. and J. Milton H. Saier. Glucitol-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262: 5455-5463. (1987)

Yamamoto-Otake, H., Y. Koyama, T. Horiuchi and E. Nakano. Cloning, sequencing, and expression of the N-acetyl-D-Mannosamine dehydrogenase gene from *Flavobacterium* sp. strain 141-8 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1418-1422. (1991)

Yin, S.-J., N. Vagelopoulos, G. Lundquist and H. Jörnvall. *Pseudomonas* 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 197: 359-365. (1991)

Yoshida, T. and T. F. Castro. Degradation of gamma-BHC in rice soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 34: 440-442. (1970)

Yoshimoto, T., H. Higashi, A. Kanatani, X. S. Lin, H. Nagai, H. Oyama, K. Kurazono and D. Tsuru. Cloning and sequencing of the 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *J. Bacteriol.* 173: 2173-2179. (1991)

Yule, W. N., M. Chiba and H. V. Morley. Fate of insecticide residues. Decomposition of lindane in soil. *J. Agr. Food Chem.* 15: 1000-1004. (1967)

Zylstra, G. J. and D. T. Gibson. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* 264: 14940-14946. (1989)

今井亮三. *Pseudomonas paucimobilis* による γ -BHC 分解の遺伝学的・生化学的研究. 東京大学博士論文 (1990)

大久長範, 山口益郎. 湛水土壌における xenobiotics の分解—BHC の脱塩素反応を中心として. 微生物生態研究会編 「微生物の生態 12」 (学会出版センター)

澤井哲夫, 高橋郁子. β -ラクタマーゼ活性測定法とその応用. 蛋白質核酸酵素 23: 391-400. (1978)

立川涼, 阪本忠明, 小川恒彦. 農薬 BHC による自然環境汚染. 食衛誌 11: 1-8. (1970)

永田裕二. *Pseudomonas paucimobilis* の γ -BHC 分解遺伝子の単離と構造解析. 東京大学修士論文 (1991)

根来誠司. ナイロンオリゴマー分解酵素の性質とその遺伝子構造. 発酵工学会誌 70: 115-131. (1992)

根来誠司. ナイロンオリゴマー代謝系のプラスミドと進化. *Pseudomonas* 研究会会誌 2: 2-7. (1994)

福田雅夫. 広宿主域ベクターの開発および炭化水素代謝酵素系の解析. 東京大学博士論文 (1989)

山下恭平, 水谷純也, 藤田稔夫, 丸茂晋吾, 江藤守総, 高橋信孝 共著. 「農薬の科学」 (文永堂)

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御教示を賜り支えて下さった東京大学農学部農芸化学科細胞遺伝学研究室・高木正道教授に心から感謝いたします。また、数々の実験技法を御教示下さり、御助言を賜りました同研究室太田明徳助教授、並びに堀内裕之助手に深く感謝いたします。また、本研究の共同研究者であり、折に触れ有益な討論をして頂きました長岡技術科学大学助教授・福田雅夫先生に心から感謝いたします。

本研究で用いた *Sphingomonas paucimobilis* SS86 を提供くださり、多くの御助言を頂きました東京大学農学部農芸化学科土壌学研究室・元教授和田秀徳先生、現教授松本聰先生、並びに妹尾啓史助手に謝意を表します。脱ハログン酵素について御教示下さり試薬等を快く分与して下さいました東京大学教授・大森俊雄先生に深く感謝いたします。また、 γ -PCCH の合成を手伝って頂きました東京大学農学部農芸化学科有機化学研究室内の皆様、細胞内成分の分画を行う際に快く相談にのって下さった同学科微生物学研究室・門倉広助手、RNA の精製法を御教示下さった同大学分子細胞生物学研究所・田中寛助手に心から感謝いたします。

LinB の N 末配列を決定して下さいました星薬科大学教授・入江昌親先生、扇和子助教授はじめ研究室の方々、代謝産物のマススペクトルを測定して下さいました住友化学工業（株）菊地亮一氏、長沢悟氏に深く感謝します。

本研究の創始者であり、本研究を離れた後も常に暖かく研究を見守って下さり、有益なご意見を賜りました今井亮三氏に深く感謝いたします。本研究の共同研究者であり、精力的に実験をこなして下さいました酒井聰氏、大友量氏、成家知樹氏、宮内啓介氏、二村晶子氏に深く感謝いたします。

研究のみならず普段の生活においても様々な面でお世話になりました東京大学農学部農芸化学科細胞遺伝学研究室の皆様方に心から感謝いたします。

最後に、本研究の創始的存在であり、折に触れ有益な御助言、御指導を賜りました東京大学名誉教授・故矢野圭司先生に心から感謝し、本論文を御霊前に捧げたいと思います。

文献リスト

- (1) 1993年5月 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
57巻5号 703-709
[Isolation and characterization of Tn5-induced mutants of *Pseudomonas paucimobilis* UT26 defective in γ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (LinA)]
(今井亮三、酒井聰、福田雅夫、矢野圭司、高木正道 と共著)
- (2) 1993年10月 Journal of Bacteriology 175巻20号 6403-6410
[Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) in *Pseudomonas paucimobilis*]
(成家知樹、大友量、福田雅夫、矢野圭司、高木正道 と共著)
- (3) 1994年6月 Journal of Bacteriology 176巻11号 3117-3125
[Cloning and Sequencing of a 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase gene involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*]
(大友量、宮内啓介、福田雅夫、矢野圭司、高木正道 と共著)

論文の内容の要旨

論文題目 *Sphingomonas paucimobilis* の γ -HCH 分解関与
酵素群とそれらの遺伝子に関する研究

Studies on enzymes and genes for
 γ -HCH degradation in *Sphingomonas paucimobilis*

氏 名 永田 裕二

人類は、有機化学工業の発達に伴って様々な化合物を生み出してきたが、こうした人為起源物質のほとんどは環境中に放出されても自然界の物質循環に組み込まれにくく、環境汚染を引き起こしている。一方、細菌を中心とした微生物の中には、こうした非天然化合物に対しても分解資化能を発達させてきたものも存在する。 γ -hexachlorocyclohexane (HCH, BHC, lindane) は、代表的な人工の有機塩素系殺虫剤であるが、人体への有害性、環境中での残留性が指摘され、先進諸国では使用が禁止されている。しかし、過去に大量に使用した地域では残留汚染が存在し、発展途上地域では経済的な理由から現在も使用が続けられており、地球的規模の環境汚染が深刻な問題となっている。当研究室では、 γ -HCH 連用試験圃場から分離された γ -HCH を好氣的に分解資化できる *Sphingomonas paucimobilis* SS86 のナリジキシ酸耐性変異株、UT26 を材料として、本菌の γ -HCH 分解系の研究を開始した。当研究室の従来の研究で、UT26 の γ -HCH の初発分解反応が γ -pentachlorocyclohexene (PCCH) を生じる脱塩化水素反応であることが分かっており、また、その反応を触媒する酵素遺伝子、*linA* の単離と解析が行われていた。本研究では、UT26 による γ -PCCH 以降の分解代謝に関与する酵素遺伝子群の単離と解析、および遺伝子産物の生化学的解析を目的とした。

第1章 トランスポゾン Tn5 による γ -HCH dehydrochlorinase (LinA) 活性に

欠陥を持つ変異株の分離とその性質

Sphingomonas 中で複製できないプラスミド、pKTY320 に Tn5 を組み込み pKTY320::Tn5 を作製し、これを三親接合伝達で UT26 に導入することにより、*S. paucimobilis* への Tn5 挿入変異導入系を確立した。プレート上に生育させたコロニーに γ -HCH を噴霧し分解能を検討することによって、LinA 活性を失った変異株、UT64 の分離に成功した。更に、UT64 の粗酵素抽出液に精製した LinA を補うことによって、LinA 活性が γ -HCH から γ -PCCH を生じる反応だけでなく、 γ -PCCH から 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol (2,5-DDOL) を生じる反応にも必要であることを示した。

第2章 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene halidehydrolase (LinB) 遺伝子

のクローン化とその性質

第1章の結果をふまえて、*linA* 遺伝子を補った *P. putida* PpY101LA 株 (バックグラウンドとして LinA 活性を発現する) を作製し、この株に UT26 の遺伝子ライブラリーを導入し、 γ -HCH から 2,5-DDOL を生じるクローンを検出器に ECD を用いたガスクロマトグラフィーで選択する方法 (GC 法) で *linB* 遺伝子のクローン化に成功した。*linB* 遺伝子の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、haloalkane dehalogenase (DhlA) をはじめとする加水分解酵素と有意な相同性を示し、活性中心と予想されるアミノ酸残基周辺では特に高い保存性を示した。LinB の基質特異性に興味を持たれたので、UT26 および LinB を高発現させた *E. coli* の休止菌体の様々なハロゲン化合物に対する脱ハロゲン活性を検討した結果、LinB は、DhlA に比べて、かなり基質特異性の広い酵素であることが示唆された。

第3章 LinB の精製とその性質

E. coli 中で高発現させた LinB について、硫酸分画、疎水クロマト、2種類の陰イオン交換クロマト、ゲルろ過の各ステップを経て SDS-PAGE 上で単一のバンドになるまで精製した。至適 pH が 8.2 であること、単量体であること等の特徴は DhlA と同じであったが、基質特異性は DhlA に比べてかなり広く、長鎖 monochloroalkane 類、炭素鎖内部に塩素原子を持つ monochloroalkane 類、dichloroalkane 類、塩素以外の halogenated alkane 類、chlorinated aliphatic alcohol 類についても基質とし得ることが明らかになった。

第4章 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase (LinC) 遺伝子

のクローン化とその性質

GC 法で、2,5-DDOL を 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ) に変換する活性を持つ脱

水素酵素遺伝子 *linC* のクローン化に成功した。*linC* 遺伝子の推定アミノ酸配列は、生物界に広く存在する short-chain alcohol dehydrogenase family と呼ばれる一群の酵素と有意な相同性を示し、*LinC* もまた、その一員であることが明らかになった。また、*linA* の近傍に *P. putida*, *E. coli* 中で *LinC* 活性を示す *linC* とは異なる酵素遺伝子 *linX* が存在していた。しかし、*linC* 遺伝子を失った mutant は、*linX* 遺伝子を保持しながら *LinC* 活性を示さず、 γ -HCH を唯一の炭素源として生育が出来なくなること、*linC* 遺伝子をプラスミドで相補することで活性が復活すること、および UT26 の全 RNA に対するノーザン解析の結果、*linC* 遺伝子は構成的に発現しているが、*linX* 遺伝子の発現は認められなかったことから、UT26 の γ -HCH 分解代謝においては、*linC* 遺伝子は必須であるが *linX* 遺伝子は機能していない可能性が強く示唆された。

第5章 トランスポゾン Tn5 による 2,5-dichlorohydroquinone 分解能

に欠陥を持つ変異株の分離とその性質

γ -HCH は、*LinA*, *LinB*, *LinC* の作用で 1,2,4-TCB, 2,5-DCP, 2,5-DCHQ に変換されるが、1,2,4-TCB と 2,5-DCP は UT26 によってそれ以上分解されない dead-end 産物であった。一方、2,5-DCHQ は、UT26 によって無機化された。そこで、2,5-DCHQ 以降の分解について検討を加えた。休止菌体の分解活性を検討し、2,5-DCHQ の分解活性は誘導的に発現することを示した。また、 γ -HCH 曝露後のコロニーの色の変化を観察することにより、2,5-DCHQ 分解に欠陥を持つ3種類の Tn5 mutant の単離に成功した。このうち2種類の mutant の Tn5 挿入部位を UT26 ゲノムライブラリーからクローン化した。他の宿主 (*E. coli*, *P. putida*) 中での活性の発現、および mutant の相補は観察されず、クローン化した断片が実際に 2,5-DCHQ の分解に関与しているか否かは現在のところ不明である。

第6章 γ -HCH 分解代謝系酵素群の細胞内局在性の解析

これまでの研究で明らかにした γ -HCH 分解に関与する酵素活性が *S. paucimobilis* の細胞内のどの部分に局在化しているかについての検討を行った。その結果、 γ -HCH の分解の最初のステップの反応を行う *LinA*, *LinB* 酵素活性の多くがペリプラズム画分に、*LinC* 活性は膜画分に存在することが明らかになった。更に、*linA*, *linB* 遺伝子を大腸菌中で高発現させた場合にも酵素活性の多くがペリプラズム画分に存在していた。塩基配列からはこれらの酵素遺伝子に分泌シグナルと思われる配列は存在しておらず、局在化機構は全く不明であるが、難分解性物質の分解系酵素群の局在性についてはこれまでのところ情報が少なく、興味深い知見を得ることが出来た。

総合考察

本研究以前の研究、本研究との共同研究から得られた知見も含めて UT26 における γ -HCH 分解代謝についてこれまでに明らかにしてきた知見をまとめると次の 2 点に要約される。第 1 の点は、複数の脱塩素ステップを含み、シクロヘキサン環からベンゼン核を形成するというこれまでに報告のないユニークな好気的 γ -HCH の分解代謝経路 (Fig. 1) を明らかにした点である。この分解代謝経路は 1,2,4-TCB と 2,5-DCP という 2 つの dead-end 産物を生じるという、いわば不完全な経路であり、実際の環境浄化への応用を考える場合には、LinB 活性を強化してやる、1,2,4-TCB 分解菌に *linA* を導入してやる、等のより効率的な γ -HCH 分解経路を遺伝子操作を用いて創造してやる余地がある。第 2 の点は、UT26 の γ -HCH 分解に関する 3 つの遺伝子 (*linX* は除く) の単離に成功した点である (Table)。*linA* は、G+C 含量が他の遺伝子、および *S. paucimobilis* の type strain の G+C 含量 (65 %) に比べて異常に低く、相同配列も存在しないことから、他の生物由来の遺伝子であることが示唆される。また、*linA*、*linB*、*linC* の 3 つの遺伝子のうち、複数の遺伝子を含むコスミドクローニングが得られていないことから、これら 3 つの遺伝子はオペロンを形成しておらず、互いに離れて存在していると考えられる。以上、UT26 の γ -HCH の分解遺伝子についての解析データは、細菌の難分解性物質への適応機構を探る上で貴重なデータであると思われる。UT26 の γ -HCH への適応機構として、Fig. 2 のような図式を考えることが出来る。すなわち、まず最初に基質と接触する酵素の遺伝子は外来の遺伝子を利用していると思われる。次に、最初の反応によって基礎代謝産物に近い物質へと変換されたものに対しては既に自分が持っていた遺伝子を発達させることによって対応する。そして、最終的には発現制御が存在するまでに十分に確立された既存の遺伝子系を使って代謝していく、というものである。

Table Four genes for the early steps of γ -HCH degradation from *S. paucimobilis* UT26

	No. of Nucleotide (bp)	No. of Amino Acid Residue	Molecular Mass (kD)	G+C Content (%)	Function	Expression in UT26
<i>linA</i>	465	155	17.3	53.0	Dehydrochlorinase	Constitutive
<i>linB</i>	885	295	33.1	62.5	Chlorohydrolase	Constitutive
<i>linC</i>	750	250	25.6	64.3	Dehydrogenase	Constitutive
<i>linX</i>	750	250	25.5	59.3	Dehydrogenase	No expression

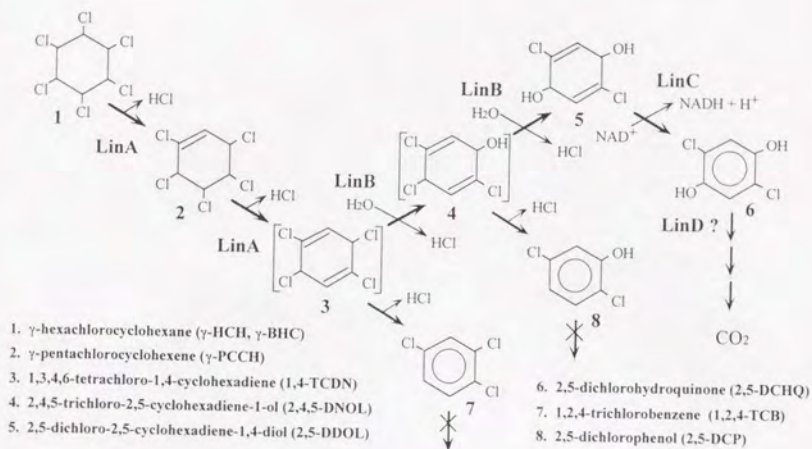


Fig. 1 Proposed assimilation pathway of γ -HCH by *Sphingomonas paucimobilis* UT26

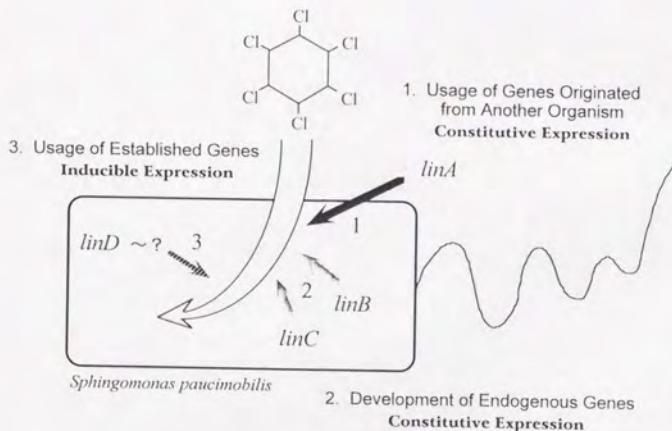
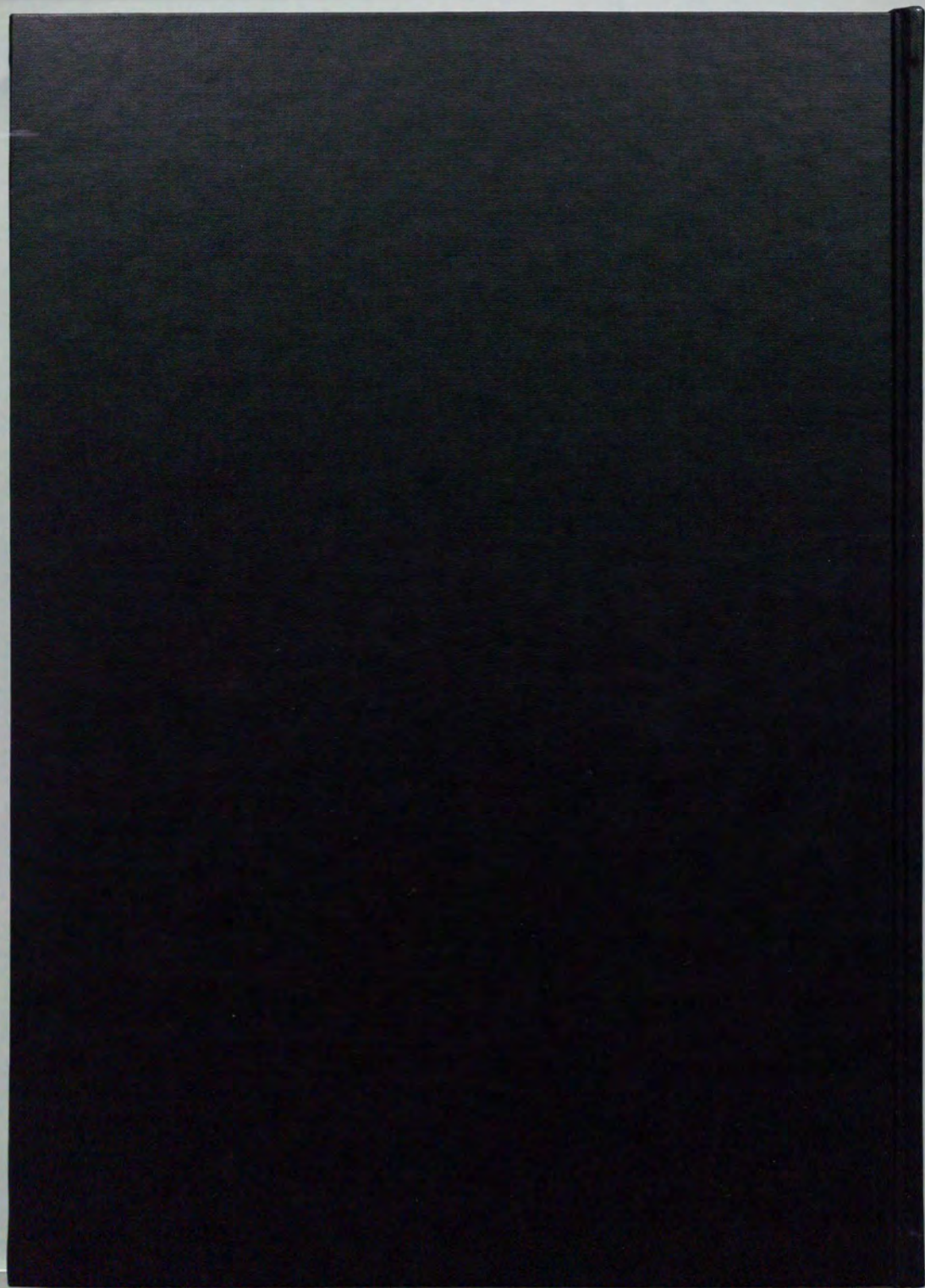


Fig. 2 Proposed mechanism of adaptive acquisition of assimilation ability for γ -HCH in *Sphingomonas paucimobilis*





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM, Kodak

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