

### 第3章 グラム陽性細菌 *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株の

#### **carbazole** 代謝系遺伝子群の解析

##### 3-1. 緒言

これまで、細菌による **carbazole** 代謝系の研究は全てグラム陰性細菌のものであった。今回新たに単離したグラム陽性の **carbazole** 資化菌 IC177 株から得られた *car* 遺伝子断片はグラム陰性細菌由来の **carbazole** 代謝系遺伝子と有意な相同性を有しており、現在までに明らかになっている *car* 遺伝子がクラスターをなしていることから、その断片近傍には **carbazole** 代謝に関わる遺伝子が存在することが予想された。

そこで、本章では、グラム陽性細菌による **carbazole** 代謝系の詳細を明らかにするべく、IC177 株の **carbazole** 代謝系遺伝子群の遺伝子構造を明らかにし、その転写と機能について解析を行った。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 菌株、プラスミド、及び培養液

本研究で使用した菌株及びプラスミドを Table M3-1 に示した。*E. coli* JM109 株、DH5 $\alpha$  株は遺伝子操作の宿主として用いた。*E. coli* 用の培地として LB broth [Sambrook and Russel, 2001]を用いた。培地には、必要に応じて ampicillin (Ap)、kanamycin (Km)、chloramphenicol (Cm)及び、X-Gal をそれぞれ終濃度 50  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ g/ml、30  $\mu$ g/ml、20  $\mu$ g/ml となるように添加した。IPTG は適当量加えた。プレート作製時には細菌培地用の寒天を終濃度 1.6% (wt/vol)になるように添加した。また、carbazole 資化菌を培養、選択する培地としては、2-2-2 に示した carbazole の重層プレートを用いた。NMM2 及び MM2 培地の組成は 2-2-2 に記した。

### 3-2-2. DNA を用いた実験

DNA を用いた基本的な実験(コロニーハイブリダイゼーションにより得られた IC177 株の *car* 遺伝子を含むコスミドクローン pSC1770033 のインサート部分断片のサブクローニング、発現用ベクターの構築など)は、前章の材料と方法 2-2-4~6、2-2-8~13 に従って行った。

### 3-2-3. コスミドライブラリーの構築

IC177 株の *car* 遺伝子群をクローニングするため IC177 株ゲノムからコスミドライブラリーを構築した。ライブラリー完成後、ポジティブクロンの制限酵素処理断片の泳動パターン比較を行う際には、*Bam*HI、*Not*I、*Sac*I、*Sca*I、*Sma*I、*Xho*I を用いた。

#### < Vector arm の調整 >

SuperCos1 Cosmid Vector Kit (STRATAGENE、North、U. S. A.) を用いて、添付の説明書に従って行った。

#### 試薬

- ・制限酵素 (*Xba*I、*Bam*HI)
- ・ Universal buffer (10 x BSA、10 x Triton、10 x L、10 x M、10 x H、10 x K、10 x T)
- ・ Calf intestine alkaline phosphate (CIAP)と CIAP buffer (Roche Diagnostics、Tokyo、Japan)
- ・ Proteinase K solution (10  $\mu$ l/ $\mu$ g)
- ・ 0.5 M EDTA
- ・ 10% (w/v) SDS
- ・ TE buffer
- ・ Ethachinmate (Nippon gene)
- ・ 70% Ethanol

#### 操作

①SuperCos 1 plasmid solution を以下の系で 37°C、4.5 h 処理した。

Plasmid solution	140 $\mu$ l
10 x BSA	20 $\mu$ l
10 x buffer M	20 $\mu$ l
<i>Xba</i> I	20 $\mu$ l

**Table M3-1.** 本章で用いた菌株およびプラスミド。

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, Δ(lac-proAB), gyrA96, relA1, thi, F'(traD36, proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>P</sup>, lacZ ΔM15)</i>	Sambrook and Russell (2001)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169 (φ80, lacZ ΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Toyobo
<i>Nocardioide</i> <i>aromaticivorans</i> IC177	Car <sup>+</sup> <sup>a</sup>	本論文第 2 章
<b>Plasmids</b>		
pBluescript II SK(-)	Ap <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	Stratagene
pB177101	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 12.2-kb <i>NotI</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177102	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 6.5-kb <i>NotI</i> - <i>EcoRV</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177103	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 3.0-kb <i>XhoI</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177104	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 5.5-kb <i>EcoRV</i> - <i>NotI</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177105	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 2.5-kb <i>SacI</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177106	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 3.7-kb <i>BamHI</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177107	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 1.2-kb <i>BamHI</i> insert of IC177 DNA	This study
pB177301	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 1.2-kb insert containing <i>carAa</i> gene of IC177	This study
pB177302	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 0.3-kb insert containing <i>carAc</i> genes of IC177	This study
pB177304	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 1.6-kb insert containing <i>carAaAc</i> genes of IC177	This study
pB177305	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 2.4-kb insert containing <i>carAaAd</i> genes of IC177	This study
pB177306	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 1.6-kb insert containing <i>carAcAd</i> genes of IC177	This study
pB177307	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 2.8-kb insert containing <i>carAaAcAd</i> genes of IC177	This study
pB177308	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 3.1-kb insert containing <i>carAaAcAdBa</i> genes of IC177	This study
pB177309	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 3.9-kb insert containing <i>carAaAcAdBaBb</i> genes of IC177	This study
pB177310	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 4.8-kb insert containing <i>carAaAcAdBaBbC</i> genes of IC177	This study
pT177001	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 991-bp degenerate PCR-amplified DNA fragment containing partial <i>carAaC</i> genes of IC177	本論文第 2 章
pT177201	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAa</i> gene of IC177	This study
pT177202	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 0.4-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAc</i> gene of IC177	This study
pT177203	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAd</i> gene of IC177	This study
pT177204	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 0.3-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carBa</i> gene of IC177	This study
pT177205	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 0.8-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carBb</i> gene of IC177	This study
pT177206	Ap <sup>r</sup> , pT7Blue(R) with 0.9-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carC</i> gene of IC177	This study
pT7Blue(R)	Ap <sup>r</sup> , <i>lacZ</i>	Novagen
pUCARA	Ap <sup>r</sup> , pUC119 with 5.6-kb <i>EcoRI</i> insert of CA10 DNA	Sato et al. (1997a)
SuperCos1	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , cos	Stratagene
<b>Cosmids</b>		
pSC1770033	Ap <sup>r</sup> , SuperCos1 with <i>Sau3AI</i> insert of IC177 DNA containing <i>car</i> gene cluster	This study

<sup>a</sup> Car<sup>+</sup> は carbazole を唯一の炭素源、窒素源、エネルギー源として生育可能であることをしめす。

②68℃で 10 min、incubate して酵素を失活させ、氷上に 5 min 静置した。

③以下の系で 37℃、1 h、CIAP 処理をした。

<i>Xba</i> I-digested plasmid solution	172 μl
10 x CIAP buffer	20 μl
CIAP	8 μl

④56℃で 20 min、incubate して酵素を失活させた。

⑤0.5 M の EDTA を 4 μl、10% (w/v) SDS を 6 μl、Proteinase K を 3 μl 加えて 37℃で 1 h incubate した。

⑥フェノール/クロロホルム抽出を 2 回行い、5 M NaCl を 20 μl、Ethachinmate を 2 μl 加え、ethanol 沈殿を行った。

⑦70% Ethanol でリンス、dry up し、20 μl の TE buffer に溶解した。

⑧*Xba*I 処理した SuperCos1 を、*Bam*HI で処理し、再度フェノール/クロロホルム抽出を行った後、ethanol 沈殿して 70% ethanol でリンス、dry up し、20 μl の TE buffer に溶解した。

#### <Partially *Sau*3AI -digested genomic DNA の調製>

あらかじめ細胞工学実験プロトコールの方法に基づいて予備実験を行い、今回用いた IC177 株の total DNA solution の濃度に適した partial digest に必要な制限酵素の量を決定した。

#### 試薬

- ・制限酵素 (*Sau*3AI)
- ・Universal buffer (10 x H)
- ・TE buffer

#### 操作

①抽出した total DNA solution 250 μl に 10 x H を 30 μl 加えて良く混合した。

②40 μl ずつ①を分注して (7 本のチューブ)、 $2^6 \sim 2^{12}$  倍に希釈した *Sau*3AI をそれぞれ 7 本のチューブに 20 μl 加え、37℃で 90 min、incubate した。

③65℃で 20 min、incubate して酵素を失活させた。

④7 本のチューブについてフェノール/クロロホルム処理をして ethanol 沈殿させた。

⑤リンス、dry up をした後、15 μl の TE buffer に溶解させた。

⑥各サンプルを 1μずつ泳動し、適当なサンプルを packaging に使用した。

#### <Ligation>

①SuperCos 1 (*Xba*I/CIAP/*Bam*HI) solution 1 μl と、取得した *Sau*3AI-partially digested genomic DNA 4 μl をよく混合した。

②Ligation Kit Ver. 2 solution 1 を 5 μl 加えて、16℃で over night incubate した。

#### <Packaging>

Cosmid の packaging には Gigapack III Gold Packaging Extract (STRATAGENE、USA.) を用いた。

#### 試薬

- ・SM buffer

NaCl	5.8 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0 g
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	50 ml
2% (w/v) gelatin	5.0 ml

蒸留水で 1 L に fill up して、オートクレーブした。

## 操作

- ①Packaging Extract の入ったチューブを氷上で溶解させて、溶解したら直ちに Ligation solution を 4  $\mu$ l (0.4 mg 相当) 加えた。
- ②ピペッティングで穏やかに攪拌した後、spin down した。
- ③22℃で 2 h incubate した。
- ④SM buffer を 500  $\mu$ l 加え、穏やかに攪拌した。

## <Packaging した cosmid library の大腸菌への感染>

### 試薬

- ・ LB 培地
- ・ 20% (w/v) マルトース
- ・ 1 M MgSO<sub>4</sub>
- ・ SM buffer

## 操作

- ①20% (w/v) マルトースを 50  $\mu$ l、1 M MgSO<sub>4</sub> を 50  $\mu$ l 加えた 5 ml の LB 培地に *E. coli* DH5 $\alpha$ 株の single colony を植菌して、18℃、300 stroke/min で over night の振盪培養した。
- ②遠心チューブに培養液を移して、3,000 rpm、RT で 5 min 遠心して、集菌した。
- ③10 mM MgSO<sub>4</sub> 300  $\mu$ l に懸濁して、OD<sub>550</sub> = 0.5 となるように 10 mM MgSO<sub>4</sub> で希釈した。
- ④phage solution を 10  $\mu$ l に対して大腸菌感染液 50  $\mu$ l、phage solution 20  $\mu$ l に対して大腸菌感染液 100  $\mu$ l を加えて RT で 30 min、incubate した。
- ⑤300  $\mu$ l の LB を加えて 37℃で 1 h incubate した。
- ⑥3,000 rpm、RT で 5 min 遠心して集菌した。
- ⑦感染液全量と LB で 10 倍に希釈したものを、Ap を加えた LB plate に spread して 37℃で培養した。

## 3-2-4. コロニーハイブリダイゼーション

### <フィルターの作成>

フィルターには PALL BYODYNE<sup>®</sup> B MENBLANE を用いた。

### 試薬

- ・ Denaturation buffer
- ・ Neutralization buffer
- ・ 20 x SSC

以上の試薬は、2-2-13 で示したものと同一ものを使用した。

- ・ Washing solution

50 mM  
0.1% (w/v)

NaOH  
SDS

## 操作

- ①Phage を感染させた大腸菌を植菌した LB plate で培養し、プレート上の colony をフィルター (13 cm x 9 cm) に transfer した。
- ②フィルター 1 枚あたり 2 ml の Denaturation buffer をしみこませて 5 min 静置した。

③30 ml の Neutralization buffer をしみこませた濾紙の上に載せて、5 min 静置した。

④2 x SSC で 5 min 洗浄した。

⑤風乾して、アルミホイルで包み、100℃で 30 min incubate した。

⑥Washing buffer で 15 min 洗浄した。

⑦風乾して、UV 照射し、DNA を架橋した。

⑧キムタオルに挟んで、ラップで包み、4℃で保存した。

#### <プレハイブリダイゼーション・ハイブリダイゼーション>

すべて 2-2-13 と同じ操作を行った。但し、プローブとして p T177001 のインサート 991-bp の DNA 断片(本論文 2-3-3)を用いた。

### 3-2-5. RNA の抽出

#### <RT-PCR に用いた菌体の調製>

IC177 株を 5 ml の NMM2 + carbazole (0.1% w/v)に植菌後、5 日間 30℃で培養し、集菌した。

#### <定量的 RT-PCR に用いた菌体の調製>

5 ml の NMM2 + succinate (0.1% w/v)を必要数用意し、それぞれに IC177 株を植菌後、4 日間 30℃で培養し、そこに succinate (0.1% w/v)、succinate (0.02% w/v) + anthranilate (0.08% w/v)、succinate (0.02% w/v) + carbazole (0.08% w/v)となるように添加した(括弧内は添加後の終濃度を示した)。succinate、anthranilate、carbazole はそれぞれ、10% (w/v)の高濃度ストックを加えることで上記の終濃度に調整した。30℃で 1、4、8 h 30℃で培養したサンプルそれぞれを以下に示す方法にて RNA 抽出を行った。

#### <RNA の抽出>

##### 試薬

- ・ lysozyme (SIGMA-ALDRICH、MO、USA)
- ・ Sepasol-RNA I Super (Nacalai Tesque、Kyoto)
- ・ クロロホルム
- ・ 2-propanol
- ・ 70% ethanol
- ・ RQ1 RNase-free DNase (Promega、WI、USA)
- ・ RNA secure (Ambion、Japan)

##### 操作

①菌体ペレットを 2 mg/ml の lysozyme 溶液に懸濁し、37℃で 1 h incubate した

②Sepasol-RNA I Super を 1 ml 加え、vortex mix し、室温で 10 min 静置した。

③200 µl のクロロホルムを加え、室温で 2 min 静置した。

④15,000 rpm、4℃で 5 min 遠心した。

⑤上清を完全に除き、RNA secure を適宜 20~50 µl 加え、60℃で 10 min incubate した。

⑥DNase 処理は RQ1 RNase-free DNase (Promega、WI、USA)添付のプロトコールに従い、以下の系にて行った。

RNA 溶液	適当量
DNase buffer	2 µl each
DNase	2 µl
RNA secure	適当量

系全体が 20  $\mu$ l になるように RNA 溶液、RNA secure の量を調整し、37°C で 30 min incubate した。  
 ⑦ Stop solution を 2  $\mu$ l 加え、65°C で 10 min incubate し、使用するまで -80°C で保存した。

### 3-2-6. RT-PCR

<反応系>

RT-PCR は OneStep RNA PCR kit (Takara, Tokyo, Japan) 添付のプロトコールに従い、25  $\mu$ l の系に対し 200 ng の total RNA と、各々 10 pmol の primer を用いて行った。反応系の詳細を以下に示した。

10 x One Step RNA PCR buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 $\mu$ l
Rnase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
AMV Rtase XL (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
AMV-Optimized Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Forward Primer (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Reverse Primer (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Total RNA (0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	11.5 $\mu$ l

プライマーの配列については Table M3-2 に示した。

<RT-PCR>

RT-PCR には Thermal Cycler Dice mini (Takara Shuzo Co., Japan) を用い、次の条件で行った。

60 °C	30 min	RTase の不活化
94 °C	2 min	RT 反応
96 °C	1 min	} 30 cycles
55 °C	30 s	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	
4 °C	Hold	

### 3-2-7. 定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR では QuantiTect SYBR green RT-PCR (QIAGEN) を用いて反応系の調製を行い、反応、及び DNA の定量は ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて行った。

<反応系>

2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 $\mu$ l
Forward Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Reverse Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
QuantiTect RT Mix	0.2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3.8 $\mu$ l
RNA	2 $\mu$ l

**Table M3-2.** 本章の RT-PCR、定量的 RT-PCR、及び PCR で用いたプライマーの配列。

Designation	Sequence (5'-3')
Primers used for RT-PCR analyses	
<i>carD-carF-f</i>	AGACAAGGGTGTGCCATGC
<i>carD-carF-r</i>	ACGATGTCGATGTCGTCGAA
<i>carF-f</i>	ATGATCGGGACGAAGACCAA
<i>carF-r</i>	GGTCGGCCTCAACAGGTA
<i>carF-carE-f</i>	ATATCGGCTCAAGCAGCAGGT
<i>carF-carE-r</i>	CGAACGTGAGTGCAGATGTC
<i>carAa-carC-f</i>	ATGAGCACCTCTCAGGAAATC
<i>carAa-carC-r</i>	TCACCGGTTTTCTCCTCAT
<i>carC-carBa-f</i>	ACCACCTGGCGGCATTCC
<i>carC-carBa-r</i>	TTTCCCTGGTCGACGAAGTA
<i>carC-carBb-f</i>	TCGTGAGGACCAGGTTCGTCC
<i>carC-carBb-r</i>	AGACTGCCGAGACGTTGAACT
<i>carBa-carAc-f</i>	GAAAGGACGCCAGCTGAT
<i>carBa-carAc-r</i>	TTCGGCGCCACGAGGATCT
<i>carBb-carAd-f</i>	CTCTTGGACCACCGACTACA
<i>carBb-carAd-r</i>	TATGCGATCAGCGACGTCA
Primers used for qRT-PCR analyses	
16S-f	ATGGCTCAGGACGAACGCT
16S-r	AGGGCAGATTACTCACGTGTT
<i>carAa-f</i>	CGTTCTCCAAGGAGCCTCT
<i>carAa-r</i>	GGTAGACCTTGATGCCGATCT
<i>carD-f</i>	CGAATTGGGACATCAGCTTC
<i>carD-r</i>	ATGGACATCTCCACCTCGAC
Primers used for amplification of gene-specific DNA fragments <sup>a</sup>	
XbaI-SD-carAa	<u>TCTAGAG</u> TAAGGAGGTGTTTCATATGAGCACCTCTCAGGAAAT
SpeI-carAa	<u>ACTAGT</u> TCACGACATTTCCACTCGGG
XbaI-SD-carAc	<u>TCTAGAG</u> TAAGGAGGTGTTTCATATGAACAGGCATTTCGGCGGG
SpeI-carAc	<u>ACTAGT</u> TCAGTCTGCCTCCTTCGGCG
XbaI-SD-carAd	<u>TCTAGAG</u> TAAGGAGGTGTTTCATATGCGCCGCCATTACGAGTA
SpeI-carAd	<u>ACTAGT</u> CTATGCGATCAGCGACGTCA
XbaI-SD-carBa	<u>TCTAGAG</u> TAAGGAGGTGTTTCATATGAGTGTGCCAGAACTGAA
SpeI-carBa	<u>ACTAGT</u> TCAGCTGGCGTCCTTTCCCT
XbaI-SD-carBb	<u>TCTAGAG</u> TAAGGAGGTGTTTCATATGGGCGCAATCGTCGGTGG
SpeI-carBb	<u>ACTAGT</u> TCAGACTGCCGAGACGTTGA
XbaI-SD-carC	<u>TCTAGAG</u> TAAGGAGGTGTTTCATATGACCGACGTCCGAGACCC
SpeI-carC	<u>ACTAGT</u> TCACCGTTTTCTCCTCAT

<sup>a</sup> 下線の配列は *XbaI* もしくは *SpeI* サイトを示す。



## <定量的 RT-PCR>

55°C	30 min	} 40 cycles
95°C	15 min	
96°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	30 s	
4°C	Hold	

ネガティブコントロールとして RNA 溶液の代わりに dH<sub>2</sub>O を用いたものと RTase を加えなかったものを用い、反応毎に同時に行った。また、反応毎に目的 DNA 断片を適宜希釈し、検量線を作成した。*carD* (内部の 121-bp)、*carAa* (内部の 150-bp) の mRNA 量は IC177 株の *rrn* 遺伝子 (内部の 113-bp) の mRNA 量を基準として比較した。各サンプルは 3 連で 2 回行った。

### 3-2-8. *car* 遺伝子発現用ベクターの構築

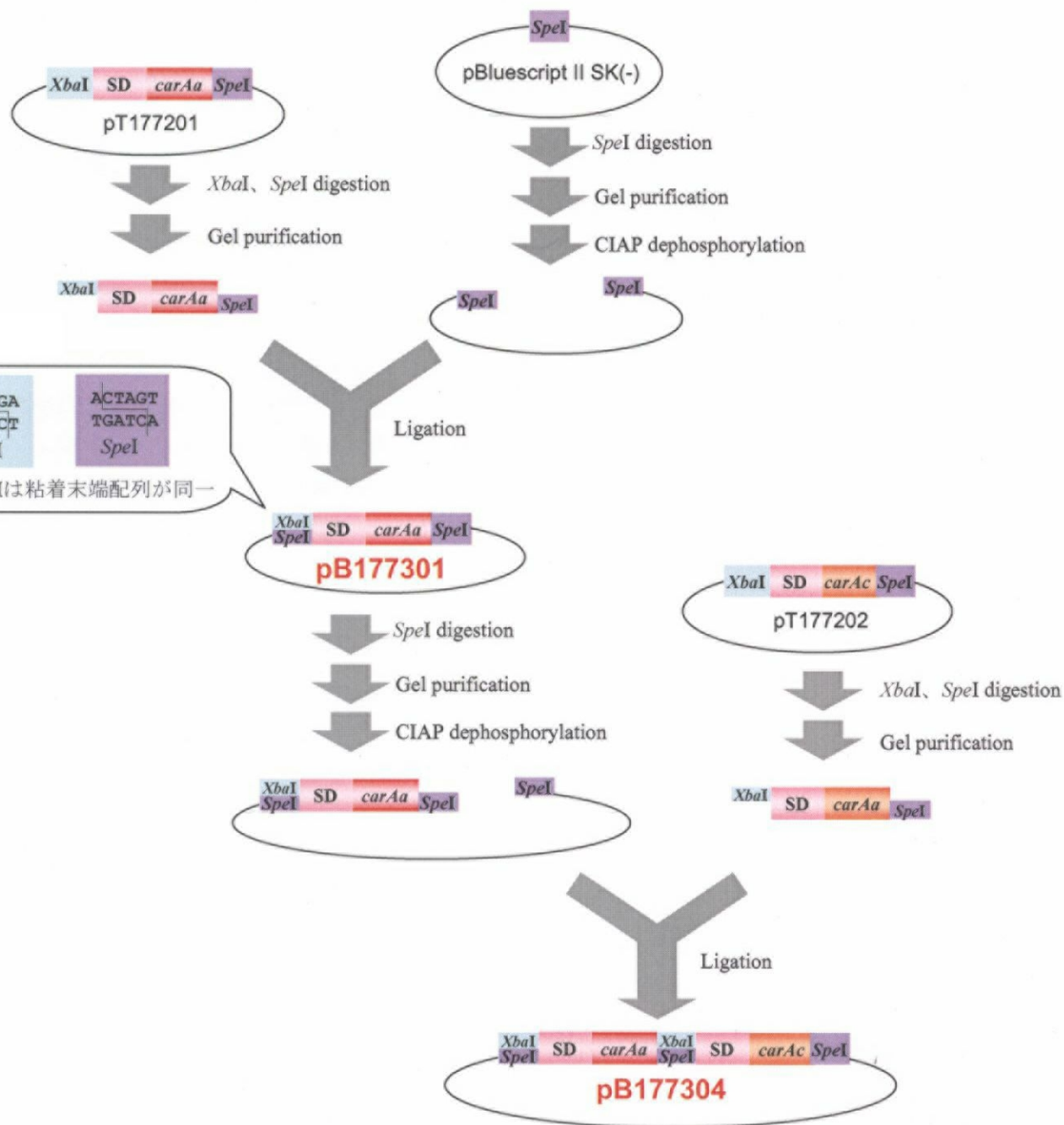
大腸菌体内にて *lac* プロモーター制御下で *car* 遺伝子を発現させるため、pBluescript II SK(-) を基本構造とした、pB177301 (*carAa* 発現用)、pB177302 (*carAc* 発現用)、pB177304 (*carAaAc* 発現用)、pB177305 (*carAaAd* 発現用)、pB177306 (*carAcAd* 発現用)、pB177307 (*carAaAcAd* 発現用)、pB177308 (*carAaAcAdBa* 発現用)、pB177309 (*carAaAcAdBaBb* 発現用)、pB177310 (*carAaAcAdBaBbC* 発現用) を構築した (Table M3-1)。各 *car* 遺伝子全長に Shine-Dalgarno (SD) 配列 [Shine and Dalgarno, 1975] が付加され、その上流に *Xba*I サイト、各 *car* 遺伝子終止コドンの直下流には *Spe*I サイトが付加されるように設計したプライマー (Table M3-2) を用いて適当なクローンもしくは pSC1770033 を鋳型とした PCR を行い、増幅断片を pT7Blue(R) ベクターに ligation することで、pT177201 (*carAa*)、pT177202 (*carAc*)、pT177203 (*carAd*)、pT177204 (*carBa*)、pT177205 (*carBb*)、pT177206 (*carC*) を作成した。各プラスミドのインサート配列はシーケンス解析により本来の塩基配列と一致することを確認した。pB177301 と pB177304 作成の概略図を Fig. M3-1 に示した。まず、pT177201 を *Xba*I と *Spe*I で処理し、SD 配列、*carAa* を含むインサートの 1.2-kb 断片をゲル電気泳動後、切り出して精製した。その 1.2-kb *Xba*I-*Spe*I 断片を pBluescript II SK(-) の *Spe*I サイト (*Spe*I 処理後、精製し、self ligation を避けるために CIAP で脱リン酸化処理を行った) に組み込み、できたプラスミドを pB177301 とした。ここでは、*Xba*I と *Spe*I の制限酵素処理後の末端配列が同一であることを利用して ligation した。pB177301 が *lac* プロモータにより、順向きに転写されるよう組み込まれているかを適当な制限酵素処理後の泳動パターンから判定した。次に、同様に pT177202 から SD 配列、*carAa* を含むインサートの 0.4-kb DNA 断片精製し、その断片を pB177301 の *carAa* 直下流にある *Spe*I サイトに挿入することで pB177304 を作成した。同様の方法により、pB177302、pB177305、pB177306、pB177307、pB177308、pB177309、pB177310 を構築した。

### 3-2-9. 休止菌体反応

pBluescript II SK(-) (ネガティブコントロール)、pB177301 (*carAa*)、pB177304 (*carAaAc*)、pB177305 (*carAaAd*)、pB177306 (*carAcAd*)、pB177307 (*carAaAcAd*)、pB177310 (*carAaAcAdBaBbC*)、pUCARA (ポジティブコントロール; CA10 株由来 *carAaAcAd* を発現) [Sato et al., 1997a] で大腸菌 JM109 株を形質転換した株をそれぞれ作成した。IC177 株の CARDO の基質嗜好性の解析には naphthalene、carbazole、dibenzo-*p*-dioxin、biphenyl、fluorene、9-fluorenone、dibenzothiophene sulfone を用いた。

#### 操作

①各株は Ap 入りの 5 ml LB 培地にて 8 h、37°C で培養した後、250 ml の LB 培地 (Ap 入り) に全量移した。



**Fig. M3-1.** pT177201、pT177202からIC177株の*carAa*、*carAaAc*発現用ベクターpB177301、pB177304を作成するまでの概略図。

- ②37℃で2 h 培養した時点で IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加することで発現誘導した。
- ③8 h 培養し、培養液を 3,000 rpm、4℃、10 min 遠心することで集菌した。
- ④集めた菌体を CNF buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2.2 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.8 g/l) で 2 回洗菌し、OD<sub>600</sub> = 20~30 になるよう懸濁した。
- ⑤休止菌体反応液は 3 ml の菌懸濁液に終濃度 0.01% (w/v) となるよう基質を添加したものとし、37℃で振とう培養した。
- ⑥24 h incubate し、等量の酢酸エチルで抽出した。但し、anthranilic acid の抽出を目的とした場合は、酢酸エチル抽出の直前に、1 N の HCl にて pH を約 3 にしてから抽出を行った。また、同時に内部標準として用いた xanthene (終濃度 0.01% w/v) も加えた。
- ⑦酢酸エチル抽出サンプルは無水硫酸ナトリウムで H<sub>2</sub>O を除いた。
- ⑧適当量のサンプルを 2-2-15 の方法に従い GC-MS に供した。基質と反応生成物の MS スペクトルは、Kasuga ら(1997)、Nojiri ら(1999)、Takagi ら(2002)、本論文 2-3-4 の MS スペクトル、保持時間のデータと比較した。
- 休止菌体反応の基質変換効率は、「反応生成物のピークエリア値/(基質のピークエリア値 + 全ての反応生成物のピークエリア値の総和)×100 (単位は%)」として算出した。
- pB177308 (*carAaAcAdBa*)、pB177309 (*carAaAcAdBaBb*) を保持する大腸菌 JM109 株は 1 mM IPTG を含む LB プレートに植菌し、30℃で 1 日培養して形成されたコロニーに対して 2,3-dihydroxybiphenyl (適当量を diethyl ether に溶解) を噴霧した。数分間室温で静置し、メタ開裂酵素 CarBaBb の活性により生成されるメタ開裂物質 (黄色) によるコロニーの変色を観察した。

### 3-2-10. 塩基配列の accession number

本研究で得られた IC177 株の *car* 遺伝子を含む *NotI*-*Bam*HI 17,582-bp 断片の塩基配列情報は accession number AB244528 として DDBJ、EMBL、GenBank nucleotide sequence databases に登録された。

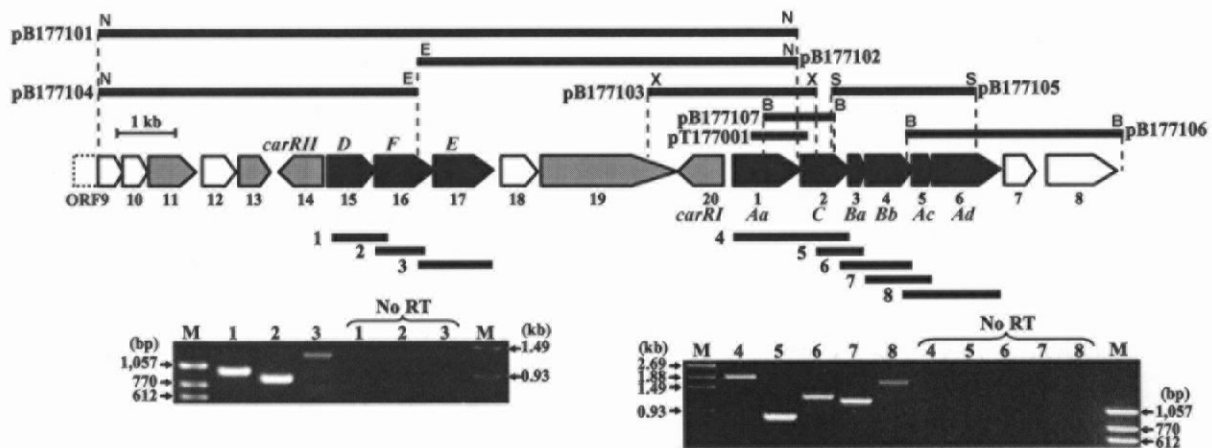
### 3-3. 結果

#### 3-3-1. IC177 株の *car* 遺伝子のクローニングとシーケンス解析

IC177 株が保持する *car* 遺伝子群の塩基配列を明らかにするため、コスミドライブラリー(2,973 クローン)を構築し、*carAaC* 遺伝子の一部(pT177001 のインサート; Fig. 2-3、3-1)をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果得られた 63 株のポジティブクローンのうちランダムに選んだ 12 クローンの制限酵素処理断片の泳動パターンを調べ、最もスタンダードな泳動パターンを示した pSC1770033 のインサートから Fig. 3-1 に示したデリーションプラスミド(pB177101~pB177107)を構築した(サザン解析により、これらプラスミドの insert と 1 つの同じ長さのハイブリダイズ断片が total DNA においても存在することを確認した)。各プラスミドの塩基配列を決定し、得られた 17,582-bp の塩基配列情報について ORF 検索を行った。見いだされた 1 個の不完全な ORF (ORF9)と 19 個の ORF (ORF1~8、10~20 と命名)を Fig. 3-1 に、各 ORF について相同性検索を行った結果を Table 3-1 に示した。得られた塩基配列全体の G+C 含量は 67.3%であった。

##### 3-3-1-1. IC177 株の *car* 遺伝子群

ORF1 の推定アミノ酸配列は KA1 株、CA10 株、J3 株の carbazole 1,9a-dioxygenase の terminal oxygenase component である CarAa とそれぞれ 49、45、45%の相同性を示した。当研究室では、J3 株の CarAa の立体構造が明らかとなっており[Nojiri et al., 2005]、ORF1 の推定アミノ酸配列と J3 株、CA10 株、KA1 株の CarAa についてアライメント解析を行ったところ、Rieske-type [2Fe-2S] cluster binding site [Nojiri et al., 2005]を構成するアミノ酸残基及び、活性中心を構成するアミノ酸残基と推定されている残基[Parales, 2003]が保存されていた(Fig. 3-2)。ORF2 の推定アミノ酸配列は KA1 株、J3 株、CA10 株の *meta*-cleavage compound hydrolase CarC とそれぞれ 45、43、42%の identity を示した。*meta*-Cleavage compound hydrolase の中でも立体構造が明らかになっている BphD<sub>RHA1</sub> [Nandhagopal et al., 2001]、CarC<sub>J3</sub> [Habe et al., 2003]のアミノ酸配列と ORF14 のアライメント解析を行ったところ、その加水分解活性に必須といわれるアミノ酸残基の保存が確認できた。ORF3 の推定アミノ酸配列は J3 株、CA10 株、KA1 株の CarBa とそれぞれ 29、25、19%の identity を示した。また、ORF4 の推定アミノ酸配列は KA1 株、CA10 株、J3 株の CarBb とそれぞれ 39、36、36%の identity を示した。Carbazole の初発酸化反応産物のメタ開裂酵素である CarB は 2 つのサブユニットα、β (それぞれ CarBa、CarBb)からなるが、活性中心は CarBb にあり CarBa はタンパク質の立体構造維持に必要であると考えられている。また、他のメタ開裂酵素とのアライメント解析の結果、その酵素活性に必須であると考えられているアミノ酸残基は保存されていた[Sugimoto et al., 1999、Iwata et al., 投稿中]。ORF5 の推定アミノ酸配列は CA10 株、J3 株の CarAc (Rieske-type ferredoxin)とそれぞれ 31、30%の identity を示し、[2Fe-2S] cluster binding site を構成するアミノ酸残基(CXHX<sub>16-17</sub>CXXH)も保存されていた(Fig. 3-3) [Rieske et al., 1964、Colbert et al., 2000、Nam et al., 2005]。CarAc は carbazole 1,9a-dioxygenase の ferredoxin component であり、terminal oxygenase component CarAa に電子を伝達する役割を担う酵素である(Fig. 1-4)。ORF6 の推定アミノ酸配列は *Sphingomonas* sp. P2 株由来の aromatic hydrocarbon compounds dioxygenase の ferredoxin reductase component AhdA4 [Pinyakong et al., 2003]、*Novosphingobium aromaticivorans* F199 の biphenyl dioxygenase ferredoxin reductase component BphA4 [Romine et al., 1999]とそれぞれ



**Figure 3-1.** IC177株の*car*遺伝子群とその周辺の遺伝子構造とRT-PCR増幅断片の電気泳動写真。五角形は遺伝子の長さ、位置、及び、転写の方向を示す。*car*遺伝子は黒の五角形で、示し、灰色の五角形は転写制御様遺伝子を示した。遺伝子構造の図の上にある黒の太線はサブクロニングしたDNA断片の位置を示し、また、下側はRT-PCRにおける予想増幅cDNA断片の位置を示した。サブクロニングで使用した制限酵素サイトのみを図に示した。Bは*Bam*HI、Eは*Eco*RV、Sは*Sac*I、Nは*Not*I、Xは*Xho*Iを示す。

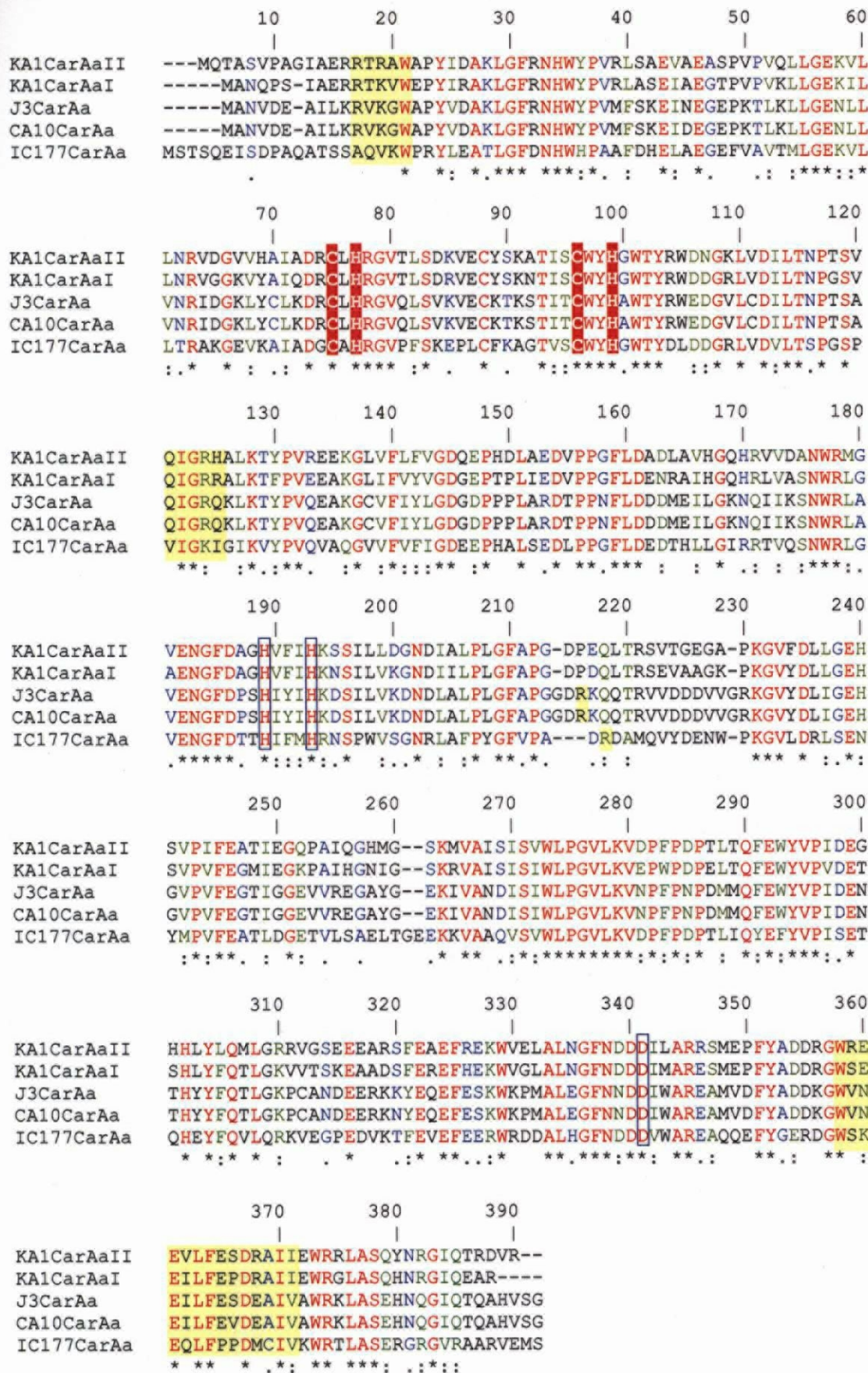
**Table 3-1.** コスミドクローン pSC1770033 インサートの 17,582-bp の DNA 領域に見いだされた ORF の相同性検索結果。

ORF	Positions <sup>a</sup>	Probable function	Homology			Accession no.
			Amino acid Identity (%)	Name of protein	Source	
ORF9	1-432	Oxidoreductase	59 <sup>b</sup>	Putative oxidoreductase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	CAC44594
ORF10	429-866	Thioesterase	26	Probable 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase	<i>Pirellula</i> sp. 1	CAD78650
ORF11	872-1,672	Transcriptional regulator	37	Putative regulator	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	BAC70019
ORF12	1,780-2,358	Unknown		Hypothetical protein		
ORF13	2,403-2,948	Transcriptional regulator	23	TetR family transcriptional regulatory protein	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	BAC88612
ORF14	3,085-3,849	Transcriptional regulator	36	CarRI	<i>N. aromaticivorans</i> IC177	This study
( <i>carRII</i> )						
ORF15	3,919-4,734	2-Hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase	49	Putative 2-keto-4-pentenoate hydratase	<i>Pseudomonas putida</i> RR21	CAE92879
( <i>carD</i> )						
ORF16	4,731-5741	Acetaldehyde dehydrogenase (acylating)	64	Acetaldehyde dehydrogenase	<i>Azotobacter minelandii</i>	ZP_00092919
( <i>carF</i> )						
ORF17	5,738-6,760	4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase	67	XylK	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> F199	AAD03993
( <i>carE</i> )						
ORF18	6,881-7,501	Unknown				
ORF19	7,568-9,910	Transcriptional regulator	36	Putative regulator	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	CAB93384
ORF20	9,917-10,705	Transcriptional regulator	36	CarRII	<i>N. aromaticivorans</i> IC177	This study
( <i>carRI</i> )						
ORF1	10,860-12,026	Terminal oxygenase component of carbazole 1,9a-dioxygenase	49	CarAa	<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	BAC56759
( <i>carAa</i> )						
ORF2	12,023-12,862	<i>meta</i> -Cleavage compound hydrolase	45	CarC	<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	BAC56762
( <i>carC</i> )						
ORF3	12,859-13,134	Subunit of <i>meta</i> -cleavage enzyme	29	CarBa	<i>Janthinobacterium</i> sp. J3	BAC56743
( <i>carBa</i> )						
ORF4	13,134-13,949	Subunit of <i>meta</i> -cleavage enzyme	39	CarBb	<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	BAC56761
( <i>carBb</i> )						
ORF5	13,949-14,296	Ferredoxin component of carbazole 1,9a-dioxygenase	36	Putative dioxygenase ferredoxin subunit	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	BAC74038
( <i>carAc</i> )						
ORF6	14,296-15,468	Ferredoxin reductase component of carbazole 1,9a-dioxygenase	38	Ferredoxin reductase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AAK44942
( <i>carAd</i> )						
ORF7	15,528-16,058	Unknown				
ORF8	16,253-17,461	Transposase	34	Putative transposase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	BAC68012

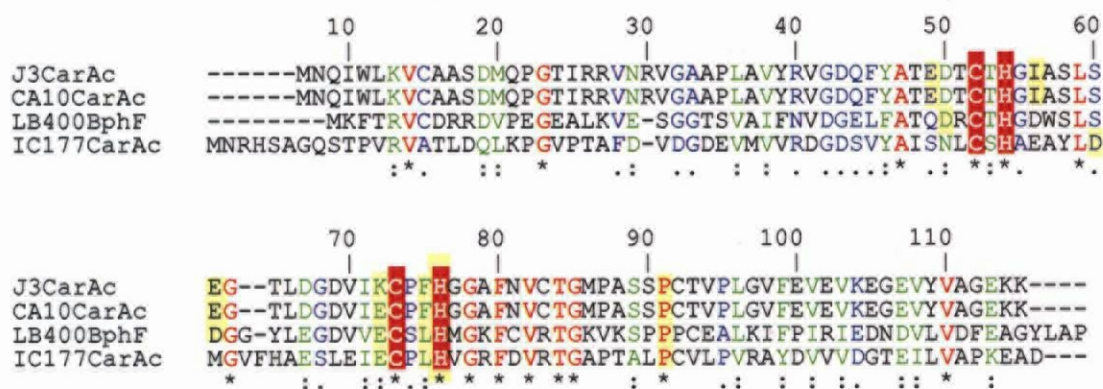
<sup>a</sup> Positions in 17,582 bp DNA region sequenced in this study (accession no. AB244528).

<sup>b</sup> Values were calculated only for the sequenced region.





**Figure 3-2.** CA10、J3、KA1、IC177株のCarAaのアミノ酸配列のアライメント解析。Identicalなアミノ酸残基は赤、高いsimilarityを示す残基は緑、弱いsimilarityを示す残基は青で示した。Rieske [2Fe-2S] clusterに配位するアミノ酸残基を赤の四角で、活性中心のFe<sup>2+</sup>に配位しているアミノ酸残基を青の四角で示した。背景が黄色いアミノ酸残基はCARD-Fとの(推定)相互作用領域を示した(本論文第5章、Ashikawa et al., 2006)。



**Figure 3-3.** J3、CA10、IC177株のCarAa、及び、*Burkholderia xenovorans* LB400株のBphFのアミノ酸配列のアライメント解析。Identicalなアミノ酸残基は赤、高いsimilarityを示す残基は緑、弱いsimilarityを示す残基は青で示した。Rieske [2Fe-2S] clusterに配位するアミノ酸残基を赤の四角で示した。背景が黄色いアミノ酸残基はCARD-O-Fとの(推定)相互作用領域を示した(本論文第5章、Ashikawa et al., 2006)。

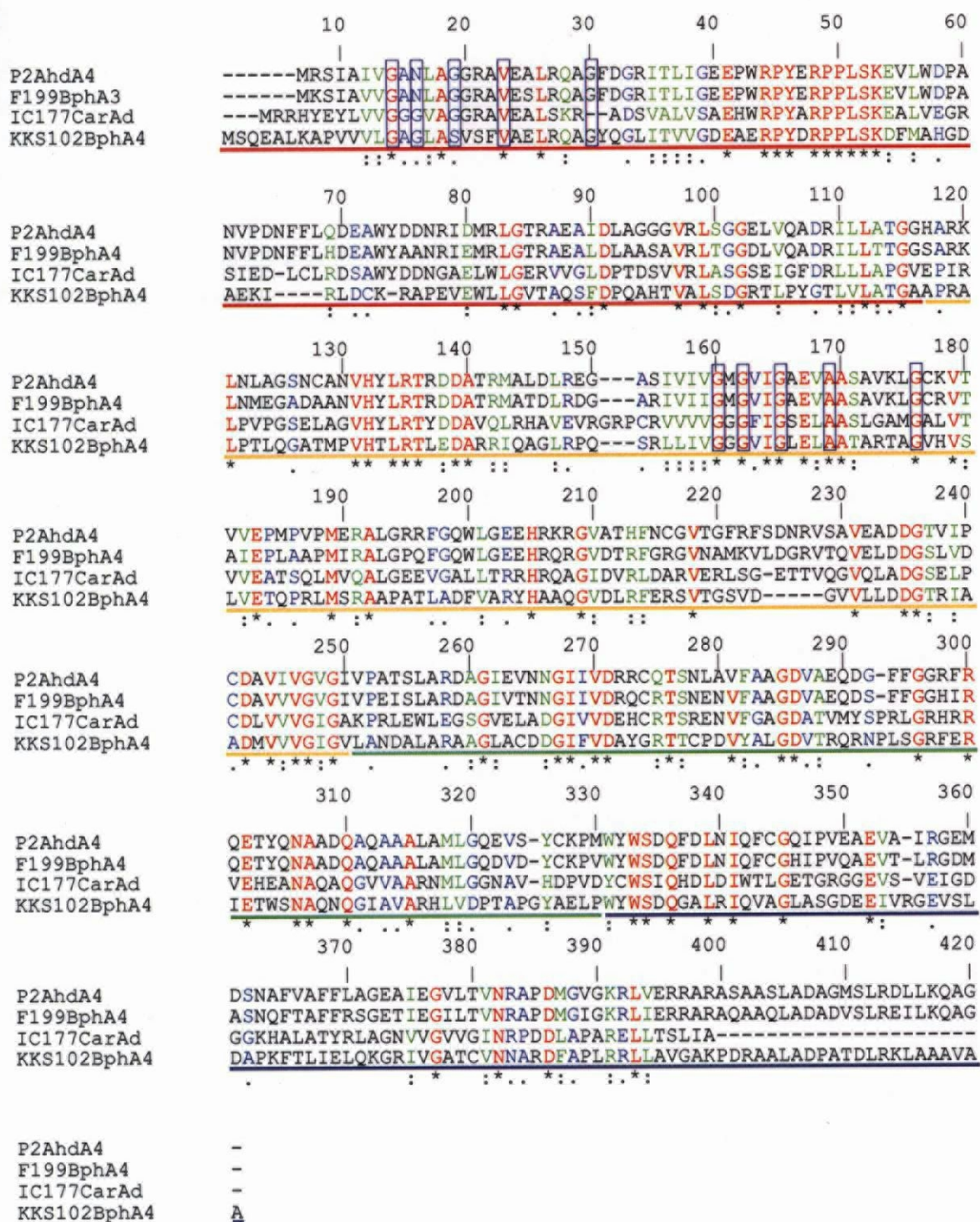


37、36%の identity を示したものの、CA10 株、J3 株の CarAd とはそれぞれ 16、15%であり、有意な相同性を示さなかった。P2 株の AhdA4、F199 株の BphA4、及び LB400 株の BphA4 と IC177 株の ORF6 の推定アミノ酸配列についてアライメント解析を行ったところ、ORF6 には FAD-binding domain、NADH-binding domain が共に保存されており (Fig. 3-4) [Senda et al., 2000]、IC177 株の carbazole 1,9a-dioxygenase の ferredoxin reductase component (Fig. 1-4)として機能している可能性が示唆された。以上の結果から CA10 株の *car* 遺伝子の命名に従い、ORF1~6 をそれぞれ *carAa*、*carC*、*carBa*、*carBb*、*carAc*、*carAd* と命名した。*carAa* 開始コドンの 6.9-kb 上流に見いだされた ORF15 の推定アミノ酸配列は CA10 株、J3 株の 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase CarD と共に 40%の identity を示した。CarD は、CarC の分解産物の 1 つである 2-hydroxypenta-2,4-dienoate に水分子を付加する酵素である (Fig. 1-1)。ORF15 の推定アミノ酸配列中には、他の 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase と同様に、その活性に必須であると考えられているアミノ酸残基の保存が見られた [Lau et al., 1994]。ORF15 の直下流に存在した ORF16、ORF17 の推定アミノ酸配列はそれぞれ *Pseudomonas* sp. CF600 株由来の acetaldehyde dehydrogenase (acylating) DmpF、4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase DmpG と 64、61%の identity を示した。ORF16 と DmpF 及び、ORF17 と DmpG のアライメント解析の結果、その活性部位を構成するアミノ酸残基の保存が観察された [Manjasetty et al., 2003]。これら *carDFE* 遺伝子群はメタ開裂経路と呼ばれる代謝経路に関わる酵素で、biphenyl 代謝系の *bphEGF* (*Acidovorax* sp. KKS102 株、*Rhodococcus* sp. RHA1 株) [Kikuchi et al., 1994、Masai et al., 1997]、toluene 代謝系の *todGIH* (*Pseudomonas putida* F1 株) [Lau et al., 1994]、phenol 代謝系の *dmpEFG* (CF600 株) [Shingler et al., 1992] など、芳香族化合物分解菌から多数報告例がある。以上より、IC177 株の ORF15~17 産物が carbazole 代謝におけるメタ開裂経路 (Fig. 1-1) を担うと考え、それぞれ *carD*、*carF*、*carE* と命名した。

*carAaCBaBbAcAd* と *carDFE* はそれぞれクラスターを成しており、その遺伝子の配置から、2 つの別オペロンに分かれていると考えられた (Fig. 3-1)。*carAa* 開始コドンから 154 bp 上流逆向きに見いだされた ORF20、*carD* 開始コドンから 69 bp 上流逆向きに見いだされた ORF14 (Fig. 3-1) の推定アミノ酸配列は、ともに IclR-family に属する転写制御タンパク質と有意な相同性を有していた。ORF14、ORF20 についてデータベース上で最も identity の高かったタンパク質は、それぞれ *Salmonella typhimurium* LT2 株由来の putative bacterial transcriptional regulator (accession no. AAL22393; 28% identity)、*Azotobacter vinelandii* 由来の transcriptional regulator (accession no. 00091164; 31% identity) であったが、ORF20 と ORF14 の推定アミノ酸配列同士の identity は 36% と、互いにデータベース上のどのタンパク質のアミノ酸配列よりも identity が高かった。ORF20、ORF14 は共に *carAaCBaBbAcAd*、*carDFE* の転写方向とは逆向きであるが (Fig. 3-1)、原核生物において、転写制御因子はその対象となるオペロンの直上流に逆向きの転写方向でコードされていることが多いので、これらの ORF を暫定的に *carRI*、*carRII* と命名した。IclR family の転写因子は一般的に repressor として働くが、今まで報告されている代謝経路の制御を行う IclR family の転写因子はすべて activator である [Tropel et al., 2004]。*carRI*、*carRII* の翻訳産物が実際にどのように機能するかは今後詳細な解析が必要である。

### 3-3-1-2. その他の遺伝子

ORF9、ORF10 の推定アミノ酸配列はそれぞれ oxidoreductase、thioesterase と相同性を示したが (Table 3-1)、これらの ORF 産物は何らかの代謝に関わる酵素である可能性があるものの、現段階



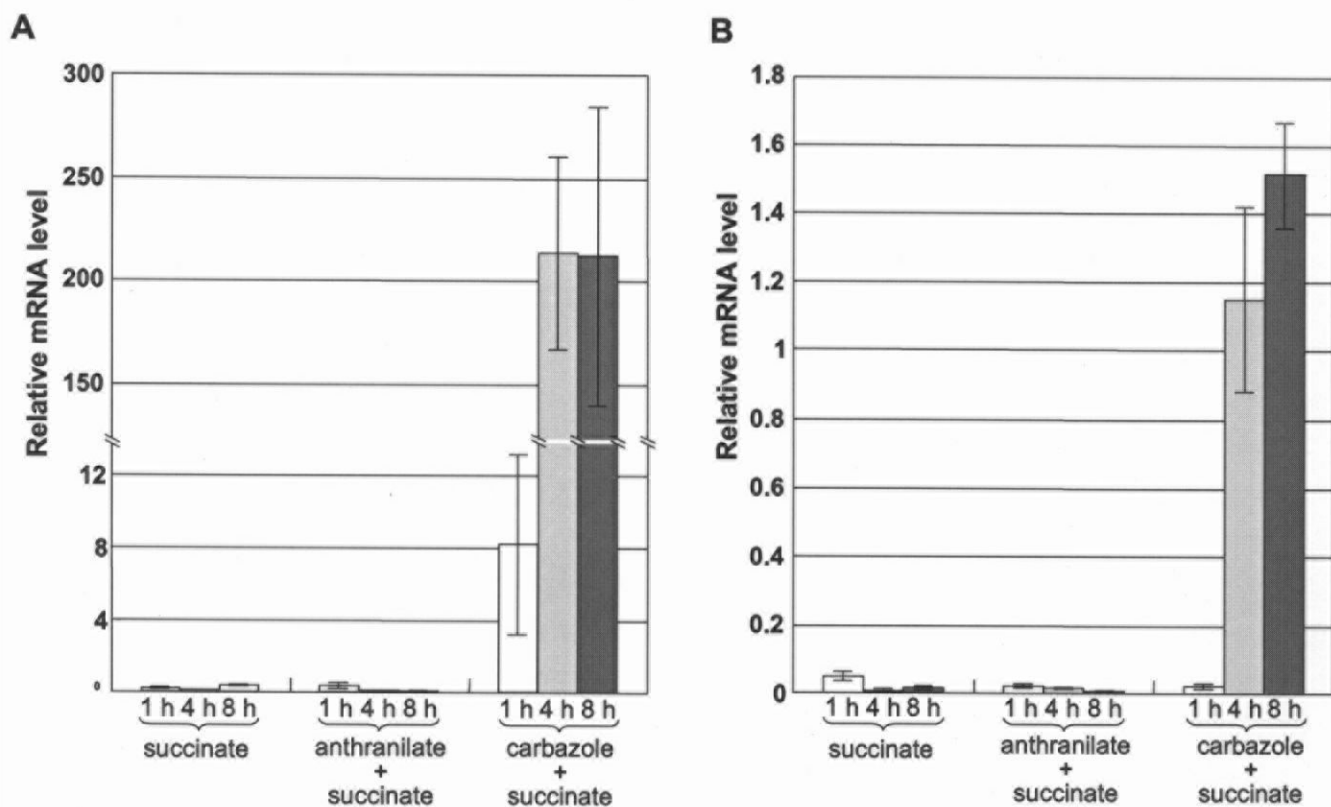
**Figure 3-4.** *Sphingomonas* sp. P2株のAhdA4、*Novosphingobium aromaticivorans* F199株のBphA4、IC177株のCarAd、*Acidovorax* sp. KKS102株のBphA4のアミノ酸配列のアライメント解析。Identicalなアミノ酸残基は赤、高いsimilarityを示す残基は緑、弱いsimilarityを示す残基は青で示した。Nucleotide-binding motifsと呼ばれるモチーフの保存配列を青の四角で示した。色のついた下線は、KKS102株のBphA4における、FAD-binding domain、NADH-binding domain、NAD-binding domain、C-terminal domainを示し [Senda et al., 2000]、それぞれ赤、黄、緑、青で示した。

では実際の機能は不明である。ORF11、ORF13、ORF19 の推定アミノ酸配列はそれぞれ ArsR-family、TetR-family、LuxR-family の転写制御タンパク質と有意な相同性があり、各タンパク質の DNA-binding motif の保存が確認できた。ORF8 は IS110 family に属する IS 内部にある transposase と相同性を有していた(Table 3-1)。ORF8 周辺について transposon の転移に伴って生じると考えられる inverted repeat 配列、direct repeat 配列の検索を行ったところ、確からしい配列は見出されなかった。ORF12、ORF18、ORF7 の推定アミノ酸配列と有意な identity を有するタンパク質をデータベースから得ることはできなかった。

### 3-3-2. IC177 株の *car* 遺伝子のオペロン構造と転写誘導性

遺伝子構造が明らかになった IC177 株の *carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群、*carDFE* 遺伝子群が、IC177 株が carbazole 生育時に転写されているのかどうか、また、それぞれの遺伝子群は同一のオペロンとして転写されているのかどうかを明らかにするため、RT-PCR を行った。*carDFE* 遺伝子群、及び、*carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群それぞれ、遺伝子間領域を包括する cDNA 断片(*carD* ~ *carE* は Fig. 3-1 の 1~3、*carAa* ~ *carC* は Fig. 3-1 の 4~8)が増幅するよう設計したプライマーセットを用いて RT-PCR を行ったところ、特異的な長さの増幅断片が確認でき、reverse transcriptase を系に加えない場合にはそれらの断片の増幅は確認されなかった(Fig. 3-1)。よって、IC177 株の *carDFE* は共転写されており、同様に *carAaCBaBbAcAd* 遺伝子も共転写され、それぞれが少なくとも一つのオペロンとして転写されていることが示唆された。

次に、これら *carAaCBaBbAcAd*、*carDFE* それぞれのオペロンの転写誘導性を明らかにするため、定量的 RT-PCR を行った。定量的 RT-PCR には、*carD* 遺伝子内部の 121-bp、*carAa* 遺伝子内部の 150-bp の DNA 断片が特異的に増幅するよう設計したプライマーセットを用い、*rrn* 遺伝子(16S rDNA)遺伝子の内部 113-bp の mRNA 量を基準として mRNA level を算出した。Succinate が唯一の炭素源となるよう生育させた IC177 株に対し、転写の誘導物質として succinate のみ、carbazole + succinate、及び、anthranilate + succinate を用いた。ここで anthranilate を用いた理由は、すでに明らかになっている CA10 株の *car* 遺伝子群の転写誘導物質が anthranilate であることが明らかになっていたからである[Urata et al., 2004、Miyakoshi et al., 2006]。各サンプルからの total RNA は 1、4、8 時間インキュベートしたものから抽出した。ネガティブコントロールとして、RNA の代わりに H<sub>2</sub>O を加えたもの、及び、RT を反応系に加えなかったものを用いた。定量的 RT-PCR の結果を Fig. 3-5 に示した。ネガティブコントロールのサンプルでは目的 cDNA 断片の増幅は全く検出できなかったのに比べ、succinate のみ、もしくは anthranilate + succinate を与えたどのサンプルにおいても微弱な発現が観察されたが、発現の誘導は観察されなかった。この結果より、anthranilate、及び、その代謝物は IC177 株の *car* 遺伝子群の転写誘導物質ではないことが示され、CA10 株とは転写様式が異なることが明らかとなった。*carAa* については、succinate もしくは anthranilate + succinate を与えたものに比べて carbazole + succinate ではインキュベーション時間 1 h のものでも明確な転写の誘導が確認された(Fig. 3-5A)。さらに 4 h のインキュベーション時間のものでは、遙かに mRNA level が上昇していた。一方、*carD* についても、carbazole + succinate を与えたサンプルで発現の誘導が観察されたが、*carAa* とは異なり、インキュベーション時間が 4 h のもので初めて発現の誘導が確認できた(Fig. 3-5B)。



**Figure 3-5.** *carAa* (A)、及び、*carD* (B) mRNAの定量的RT-PCR。縦軸のIC177株の*carAa*と*carD*のmRNA レベルは*rrn*遺伝子のmRNAの転写量により標準化した。横軸には Succinateで生育したIC177菌体に与えた基質とインキュベーション時間を示した。

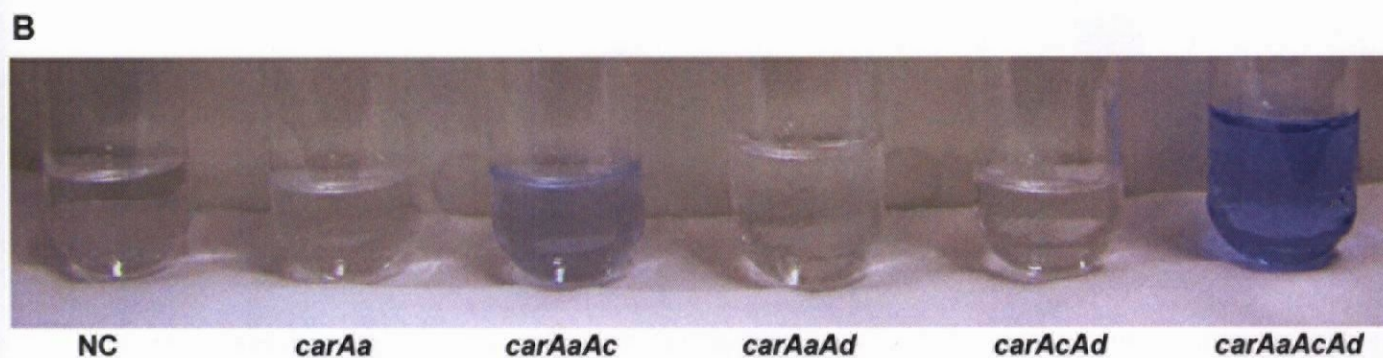
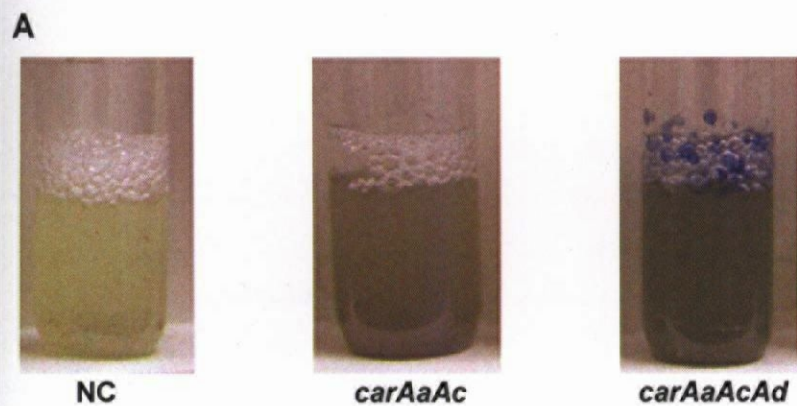
### 3-3-3. 大腸菌を用いた *car* 遺伝子の発現と機能解析

上記シーケンス解析と転写レベルでの発現解析から、IC177 株の *car* 遺伝子産物が carbazole での生育時に carbazole の代謝を担っている可能性が高いことが示された。実際にそれら *car* 遺伝子が予想された機能を持つのかどうかを検証するため、*carAa*、*carAc*、*carAd*、*carBa*、*carBb*、*carC* を大腸菌体内で発現させて機能の解析を行った。

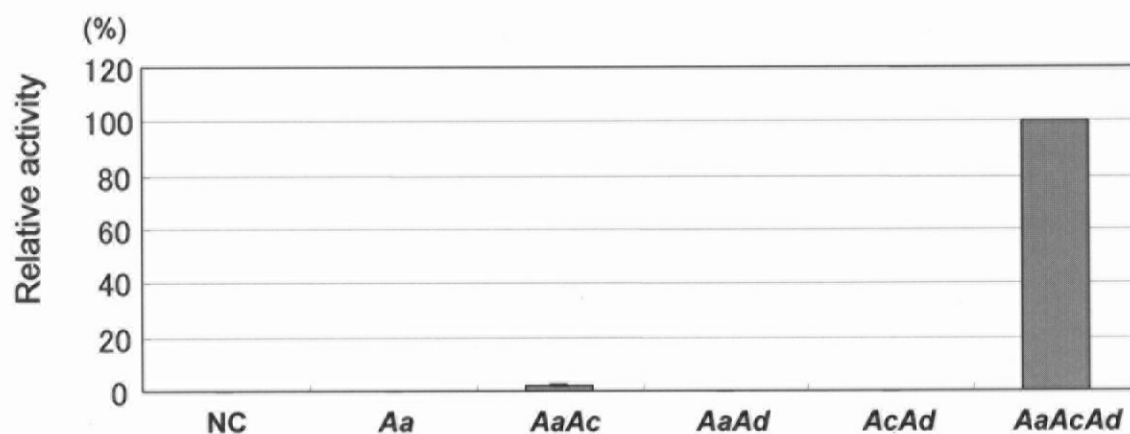
まずは carbazole 初発酸化酵素の 3 つのコンポーネント、terminal oxygenase CARDO-O をコードする *carAa*、CARDO-O に電子を伝達する ferredoxin CARDO-F をコードする *carAc*、NADH からの電子を CARDO-F に伝える ferredoxin reductase CARDO-R をコードする *carAd* の機能を解析するための発現ベクターを構築した。構築したプラスミドは、*carAa* (pB177301 と命名)、*carAaAc* (pB177304)、*carAaAd* (pB177305)、*carAcAd* (pB177306)、*carAaAcAd* (pB177307) が IPTG 誘導的に発現するよう pBluescript II SK(-) を基本構造とした。これらプラスミドで大腸菌 JM109 株を形質転換し、LB 培地で生育させた後、IPTG (終濃度 1 mM) を培地に添加することで誘導をかけた。IPTG 誘導後、引き続き 8 時間培養し、培養菌体を観察したところ、pB177304、及び、pB177307 を保持する大腸菌においては、培地中に青色の物質の生成が観察された (Fig. 3-6)。Ensley ら (1983) によると、CARDO と同じ ROS の一種である naphthalene dioxygenase の大腸菌体内での発現により indigo (青色を示す) が生成することが報告されており、本実験においても同様に CARDO 活性によって大腸菌由来のトリプトファン誘導体 (indole) が dioxgenation された化合物が重合して青色の indigo を形成したためと考えられた。調製した菌体を用いて carbazole を基質とした休止菌体反応を行い、carbazole 残存量と変換産物 2'-aminobiphenyl-2,3-diol を GC-MS により半定量することで活性の評価を行った。結果、pB177307 (*carAaAcAd* を発現) を保持する大腸菌でのみ顕著な CARDO 活性が確認できた (Fig. 3-7)。J3 株由来 CARDO-O の変異酵素 (I262V など) による carbazole を基質とした休止菌体反応では、反応産物として 1-hydroxycarbazole [Uchimura, Horisaki et al., unpublished data, 宇佐美, 本年度博士論文] が検出されているが、IC177 株の CARDO ではそのような反応産物は検出されなかった。また、pB177304 (*carAaAc* を発現) を保持する大腸菌でも低いながらも有意な CARDO 活性 (変換効率約 2.3%) が検出されたことから (Fig. 3-7)、IC177 株の CARDO-F は大腸菌が持つ何らかの電子伝達タンパク質から電子を受け取ることが示された。pB177301 (*carAa* のみを発現)、pB177305 (*carAaAd*)、pB177306 (*carAcAd*) を保持する大腸菌では反応産物は全く検出されなかった。以上の結果から *carAa*、*carAc*、*carAd* 産物がそれぞれ CARDO-O、-F、-R として機能し carbazole への angular dioxxygenation (本論文第 1 章参照) を触媒することが証明された。以上の結果と推定アミノ酸配列の情報から、IC177 株の CARDO は class IIB に分類される ROS であることが明らかとなった。

グラム陰性細菌による carbazole 代謝系においては、CARDO による初発酸化反応産物である 2'-aminobiphenyl-2,3-diol は extradiol dioxygenase CarBaBb により酸化され、メタ開裂反応が起こる。その反応後の化合物 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)-hexa-2,4-dienoic acid (メタ開裂物質) は CarC により加水分解される (Fig. 1-1)。IC177 株の *carBaBb*、及び、*carC* 産物がグラム陰性細菌同様このような機能を持つのかどうかを検証した。まず、pB177308 (*carAaAcAdBa* を発現)、pB177309 (*carAaAcAdBaBb*) を構築し、これらを保持する大腸菌 JM109 株を、1 mM の IPTG を含む LB プレートに植菌、培養して現れたコロニーに 2,3-dihydroxybiphenyl を噴霧した。ここで、2,3-dihydroxybiphenyl は carbazole 初発酸化生成物 2'-aminobiphenyl-2,3-diol のアナログとして用いたが、それは 2'-aminobiphenyl-2,3-diol が商品化されていないためである。2,3-Dihydroxybiphenyl





**Figure 3-6.** 大腸菌体内でのCARDOの発現によるindigoの生成。(A) 左からpBluscript II SK(-) (negative control, NC)、pB177304 (*carAaAc*発現) 及び、pB177307 (*carAaAcAd*発現)を保持する大腸菌培養液にIPTG誘導をかけ、さらに8時間培養したサンプル。培養液に青色の物質の蓄積が確認できる。(B) carbazoleを基質とした休止菌体反応後の酢酸エチル抽出液。左からpBluscript II SK(-) (negative control, NC)、pB177301 (*carAa*発現)、pB177304 (*carAaAc*発現)、pB177305 (*carAaAd*発現)、pB177306 (*carAcAd*発現)、pB177307 (*carAaAcAd*発現) を保持する大腸菌休止菌体反応後のサンプル。



**Figure 3-7.** 左からpBluscript II SK(-) (negative control, NC)、pB177301 (*carAa*発現)、pB177304 (*carAaAc*発現)、pB177305 (*carAaAd*発現)、pB177306 (*carAcAd*発現)、pB177307 (*carAaAcAd*発現) を保持する大腸菌を用いてcarbazoleを基質とした休止菌体反応のGC-MSによる活性測定。縦軸は基質変換効率(反応生成物のピークエリア値/[残存carbazoleのピークエリア値 + 反応生成物のピークエリア値]) × 100を示した。

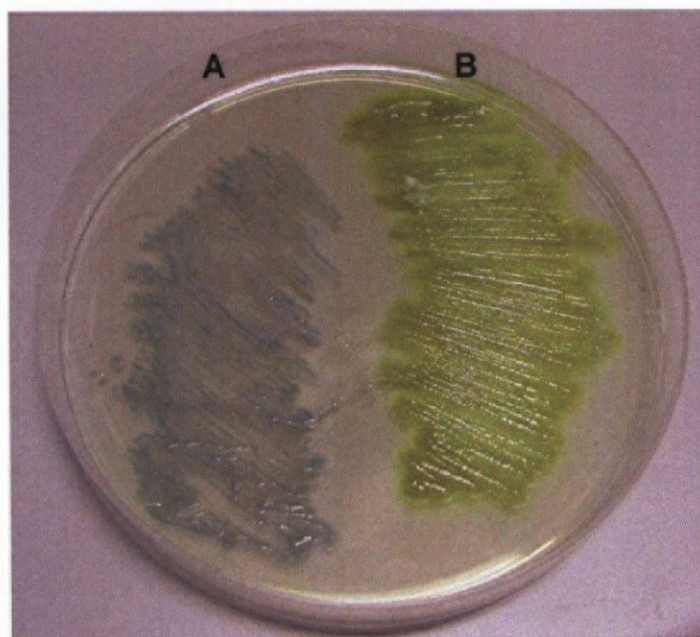
は CarBaBb などのメタ開裂酵素により酸化反応が起こると黄色の化合物、**2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid** が生成される。本実験では、この黄色の出現有無を調べることで *carBaBb* 産物がメタ開裂酵素としての活性を有するかどうかを調べた。Fig. 3-8 に示したように、pB177308 を保持する大腸菌では黄色物質の生成が確認できなかったものの、pB177309 ではコロニーに明確な色の変化が観察された。これにより、*carBaBb* 産物はメタ開裂酵素として機能することが示された。

上記の解析により *carAaAcAdBaBb* 遺伝子は **carbazole** の代謝系酵素として機能を有していたことが明らかとなったが、同様に、IC177 株の *carC* 遺伝子産物も **carbazole** 代謝系酵素として機能するかどうかを調べるため、pB177310 (*carAaAcAdBaBbC* を発現) を構築し、このプラスミドを保持する大腸菌を用いた休止菌体反応を行い、**carbazole** から **anthranilate** まで物質変換(Fig. 1-1)ができるかどうか解析した。pBluescript II SK(-) を保持する大腸菌を用いたネガティブコントロールでは、**anthranilate** の生成は全く検出できなかったのに対し、pB177319 を保持する大腸菌では少量ながらも明確な **anthranilate** の生成が確認出来た(**carbazole** から **anthranilate** への変換効率は約 2%)。このことから、IC177 株の *carC* 遺伝子産物も **carbazole** 代謝系酵素としてメタ開裂物質の加水分解反応(Fig. 1-1)を触媒することが示された。

### 3-3-4. IC177 株 CARDO の基質嗜好性

IC177 株由来 CARDO の基質嗜好性を明らかにするため、**carbazole** 以外の芳香族化合物、**naphthalene**、**dibenzo-*p*-dioxin**、**dibenzofuran**、**biphenyl**、**fluorene**、**9-fluorenone**、**dibenzothiophene sulfone** を基質として、上記 pB177307 (*carAaAcAd* 発現) を保持する大腸菌を用いた休止菌体反応を行った。結果を Table 3-2 に示した(化学構造は Fig. M2-1)。これらの化合物の中で最も基質変換効率が高かったのは、**naphthalene** であり、**lateral dioxygenation** 産物である、**cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene** とおそらくその脱水された化合物である **1-naphthol** が検出され、残存基質は検出されなかった(Table 3-2)。**Dibenzo-*p*-dioxin** についても顕著な分解活性(変換効率 69%)が確認され、**angular dioxygenation** 産物である **2,2',3-Trihydroxydiphenyl ether** のみが検出された。**Dibenzofuran** については、弱い活性(変換効率 8.8%)が認められ、**anglar dioxygenation** 産物である **2,2',3-Trihydroxybiphenyl** の生成が認められた。**Biphenyl**、**fluorene**、においては、2 水酸化化合物とその脱水された化合物と考えられる化合物が検出されたものの、微弱な活性しか観察できなかった。CA10 株と KA1 株由来 CARDO の基質嗜好性については、以前の研究で明らかになっており[Nojiri et al., 1999、Takagi et al., 2002、Urata et al., 2006]、両者はよく似た基質嗜好性を有する。CA10 株や KA1 株の CARDO は共に **Biphenyl** や **dibenzofuran** に対して高い活性を有していたことから、IC177 株とは基質嗜好性が異なることが示された。





**Figure 3-8.** *carAaAcAdBa* (A)、及び、*carAaAcAdBaBb* (B) が発現している大腸菌に2,3-dihydroxybiphenylを噴霧した。Bにおいてのみメタ開裂物質特有の黄色が観察できる。A、Bともにうっすら青いのは、*CarAaAcAd*によりトリプトファン誘導体のindoleがdioxygenationされ、その反応産物からindigoが形成されたためと考えられる。

**Table 3-2.** IC177 株由来 CARDO を発現する大腸菌を用いた様々な芳香族化合物の休止菌体反応。

Substrate	Detected compound <sup>a</sup>	Conversion ratio (%) <sup>b</sup>
Naphthalene	<i>cis</i> -1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene	47 (±4.8)
	1-Naphthol	53 (±4.8)
Carbazole	2'-Aminobiphenyl-2,3-diol	96 (±4.6)
Dibenzo- <i>p</i> -dioxin	2,2',3-Trihydroxydiphenyl ether	69 (±2.5)
Dibenzofuran	2,2',3-Trihydroxybiphenyl	8.8 (±0.75)
Biphenyl	<i>cis</i> -2,3-Dihydroxy-2,3-dihydroxybiphenyl	3.5 (±0.63)
	2-Hydroxybiphenyl	2.7 (±0.24)
	Biphenyl dihydrodiol	0.50 (±0.15)
	9-Hydroxyfluorene	1.6 (±0.25)
Fluorene	Dihydrodiol	1.9 (±0.51)
9-Fluorenone		ND <sup>c</sup>
Dibenzothiophene sulfone		ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 反応生成物の同定は、以前の GC-MS データ (Kasuga et al., 1997、Nojiri et al., 1990、Takagi et al., 2002) との比較で行った。これらの化合物には酵素によるものではない脱水反応により生成したものも含まれる。

<sup>b</sup> Conversion ratio (%) =  $100 \times [\text{peak areas for the total ion current (TIC) of the product}] \div [(\text{peak area for substrate TIC}) + (\text{peak area for the TIC of the all identified products})]$ 。標準偏差は少なくとも 3 連で行った結果により算出した。

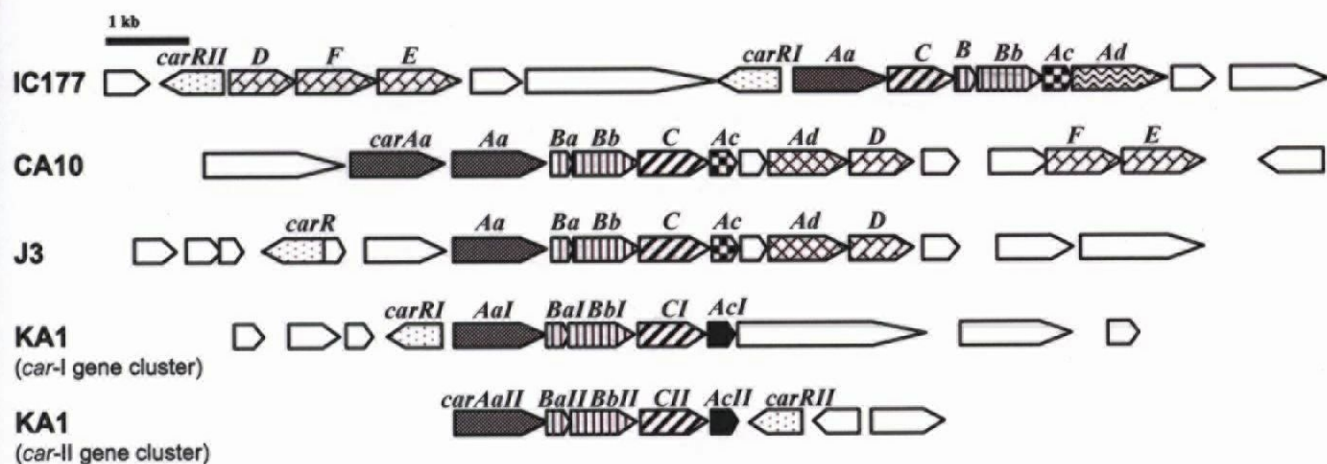
<sup>c</sup> この実験では生成物が検出されなかった。

### 3-4. 考察

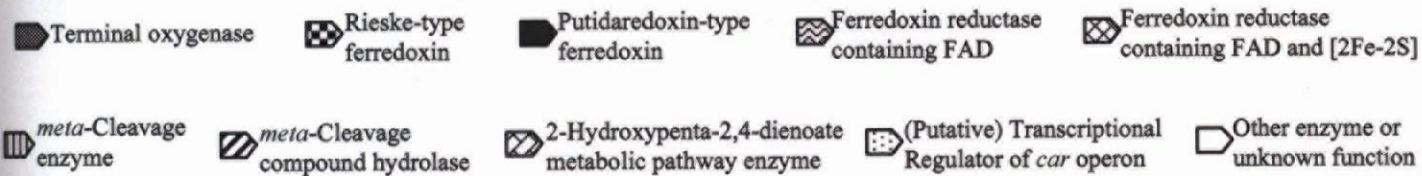
当研究室では、*car* 遺伝子群の多様性とその進化的な関係性について興味を持ち、多数の carbazole 資化菌を単離し、それらが持つ *car* 遺伝子とその周辺の遺伝子構造について解析を行ってきた[Nojiri et al., 2001, Inoue et al., 2004, 2005]。IC177 株の *car* 遺伝子群と *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*Janthinobacterium* sp. J3 株、*Sphingomonas* sp. KA1 株など既知のグラム陰性細菌由来のそれと比較すると、IC177 株では *carC* 遺伝子と *carBaBb* 遺伝子の位置が入れ替わった遺伝子構造をしていた(Fig. 3-9)。IC177 株の *carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群と *carDFE* 遺伝子群の各遺伝子間領域は全て 1 もしくは 4-bp 重複していたが、グラム陰性細菌のものでもそのような重複はあるが全ての *car* 遺伝子間ではない。また、IC177 株では *carAc* 遺伝子の直下流に *carAd* 遺伝子が位置していたのに対し、CA10、J3 株では、*carAc* と *carAd* は機能未知の ORF により隔てられている(Fig. 3-9)。KA1 株の 2 つの *car* 遺伝子群においては、その *car* 遺伝子群近辺には *carAd* に相当する遺伝子すら見いだされない(Fig. 3-9)。CA10 株では *carD*、*carF*、*carE* 遺伝子は *carAaBaBbCAcAd* 遺伝子群の下流側に位置し、*carD* 遺伝子は *carFE* 遺伝子とは 2 つの未知の ORF で隔離されており、進化的に後から *car* 遺伝子群に集結してきた可能性を示唆していた。一方、IC177 株の *carDFE* 遺伝子は上記のように 1 もしくは 4-bp 重複し、密に集結していた。これらの結果は IC177 株の *car* 遺伝子群がグラム陰性細菌のそれとは異なるユニークな進化的歴史を歩んできたことを示している。芳香族化合物分解に関わる一連の遺伝子群は連結した遺伝子構造をとり、オペロンを形成することで 1 つの機能単位として存在する例が多い[van der Meer et al., 1992]。そのような観点からすると、IC177 株の *car* 遺伝子群は CA10 株や KA1 株のものよりも整然とした遺伝子構造をとり、1 つのまとまった機能単位として存在しているといえる。

これまでに、CARDO をコードする遺伝子の塩基配列情報が公開され、その機能が確認されているもので class III に分類される CARDO をもつものは、CA10 株[Sato et al., 1997a]、J3 株[Inoue et al., 2004]、*Pseudomonas* sp. XLDN4-9 株[Yu et al., 2006]があり、class IIA に分類されるのは、KA1 株[Habe et al., 2002, Inoue et al., 2004]がある(これらに加え、*Sphingomonas* sp. CB3 株も carbazole 代謝系遺伝子を持つが、その遺伝子の機能解析が行われた報告がないため[本論文第 2 章、Shepherd and Lloyd-Jones, 1998]、以下の議論からは除くこととする)。IC177 株の各コンポーネントの分子系統学位置を把握するため、幾つかの ROS について分子系統樹を作成した(Fig. 3-10)。IC177 株の terminal oxygenase CarAa はグラム陰性細菌 CA10 株、J3 株、KA1 株のそれと近縁であった(Fig. 3-10A)。しかし、IC177 株の ferredoxin CarAc は他の class IIB の ferredoxin と class III の ferredoxin と同程度の近縁性があるという変わった特徴を有する ferredoxin であることが明らかになった(Fig. 3-10B)。IC177 株の ferredoxin reductase CarAd は class IIB、IIA に分類される ROS の ferredoxin reductase と近縁であった(Fig. 3-10C)。CA10/J3 株の CarAd は plant-type [2Fe-2S] cluster binding domain を持つが、IC177 株の CarAd にはそれがいないため、3 つのコンポーネント全体として class IIB の ROS に分類される。総合して、CA10 株、J3 株、KA1 株、IC177 株由来 CARDO のそれぞれの terminal oxygenase は互いに近縁で、identity も高い(>45%)がその電子伝達コンポーネントには多様性が存在した。このような terminal oxygenase の近縁性と電子伝達コンポーネントの多様性を併せ持つ特徴は ROS の中でも珍しく、この特徴から CARDO が ROS の電子伝達メカニズム解明に向けた格好の研究材料であることが考えられた。

IC177 株 CARDO の基質嗜好性は CA10 株や KA1 株のそれとは異なっていた。CA10 株と KA1

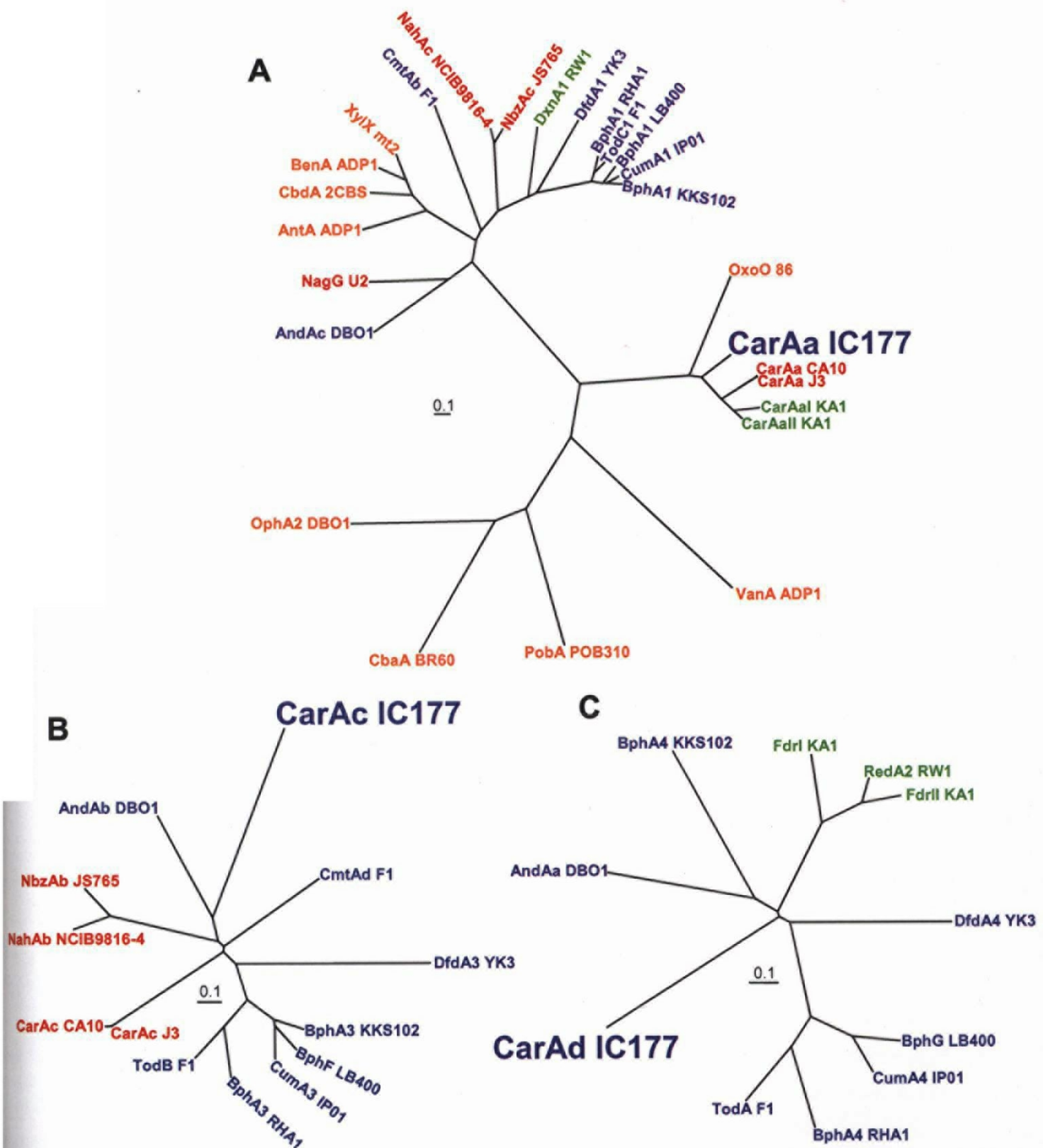


#### Gene product or putative gene product



**Figure 3-9.** IC177株、CA10株、J3株、KA1株由来*car*遺伝子群の遺伝子構造の比較。





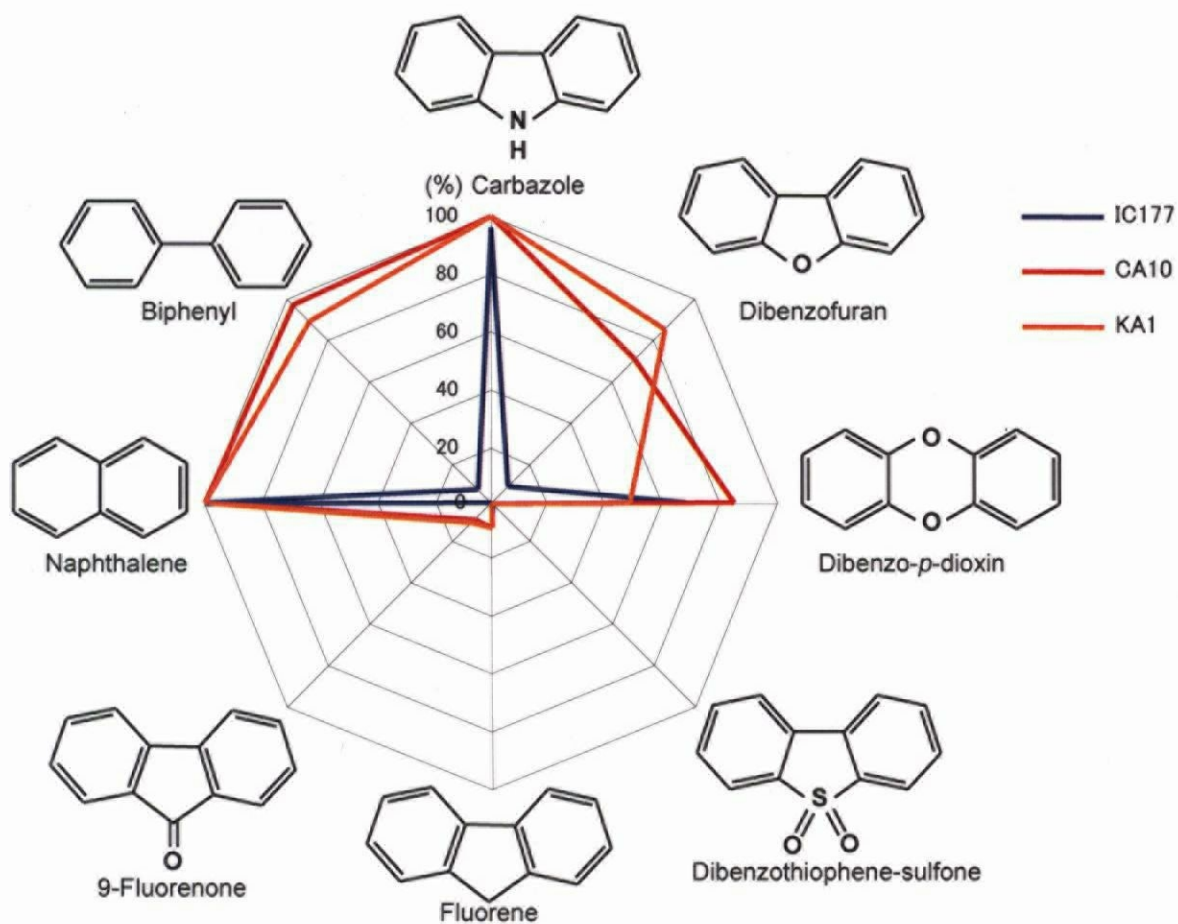
**Fig. 3-10.** Terminal oxygenase large subunit (A)、ferredoxin (B)、と reductase (C) の無根系統樹。Batie らによる分類で、Class IA、IB は橙、IIA は緑、IIB は青、III は赤で示した。タンパク質名、由来菌株名、accession no. を以下に記した; (A) AndAc of *Burkholderia cepacia* DBO1, AAO83639; AntA of *Acinetobacter* sp. ADP1, AAC34813; BenA of *Acinetobacter* sp. ADP1, AAC46436; BphA1 of *B. xenovorans* LB400, AAB63425; BphA1 of *Acidovorax* sp. KKS102, Q52438; BphA1 of *Rhodococcus* sp. RHA1, BAA06868; CarAa of *Janthinobacterium* sp. J3, BAC56742; CarAa of *Nocardioideis aromaticivorans* IC177, BAE79497; CarAa of *P. resinovorans* CA10, NP\_758566; CarAal of *Sphingomonas* sp. KA1, BAC56759; CarAall of *Sphingomonas* sp. KA1, BAE75864; CbaA of *Comamonas testosteroni* BR60, Q44256; CbdA of *Burkholderia* sp. 2CBS, Q51601; CmtAb of *P. putida* F1, AAB62285; CumA1 of *P. fluorescens* IP01, BAA07074; DfdA1 of *Terrabacter* sp. YK3, BAC06602; DxnA1 of *Sphingomonas* sp. RW1, CAA51365; NagG of *Ralstonia* sp. U2, AAD12607; NahAc of *P. putida* NCIB 9816-4, P0A110; NbzAc of *Comamonas* sp. JS765, AAL76202; OphA2 of *B. cepacia* DBO1, AAD03558; OxoO of *P. putida* 86, CAA73203; PobA of *P. pseudoalcaligenes* POB310, TodC1 of *P. putida* F1, AAA26005; VanA of *Acinetobacter* sp. ADP1, AAC27107; XylX of *P. putida* mt-2, AAA26047. (B) AndAb of *B. cepacia* DBO1, AAO83641; BphA3 of *Acidovorax* sp. KKS102, BAA04139; BphA3 of *Rhodococcus* sp. RHA1, BAA06870; BphF of *B. xenovorans* LB400, AAB63428; CarAc of *Janthinobacterium* sp. J3, BAC56746; CarAc of *N. aromaticivorans* IC177, BAE79502; CarAc of *P. resinovorans* CA10, NP\_758571; CmtAd of *P. putida* F1, AAB62289; CumA3 of *P. fluorescens* IP01, BAA07077; DfdA3 of *Terrabacter* sp. YK3, BAC06604; NahAb of *P. putida* NCIB 9816-4, AAA25905; NbzAb of *Comamonas* sp. JS765, AAL76201; TodB of *P. putida* F1, AAA26007. (C) AndAa of *B. cepacia* DBO1, AAO83642; BphA4 of *Rhodococcus* sp. RHA1, BAA06871; BphG of *B. xenovorans* LB400, AAB63429; BphA4 of *Acidovorax* sp. KKS102, BAA04112; CarAd of *N. aromaticivorans* IC177, BAE79503; CumA4 of *P. fluorescens* IP01, BAA07078; DfdA4 of *Terrabacter* sp. YK3, BAC06605; Fdrl of *Sphingomonas* sp. KA1, BAE75874; FdrlI of *Sphingomonas* sp. KA1, BAE75877; RedA2 of *Sphingomonas* sp. RW1, CAA05635; TodA of *P. putida* F1, AAA26008.

株の基質嗜好性は非常に似ており、共に **biphenyl** や **dibenzofuran** に高い活性を有する(Fig. 3-11、[Nojiri et al., 1999、Takagi et al., 2002、Urata et al., 2006])。一方、IC177 株 **CARDO** はそれらに対して低い活性しか有しておらず、**carbazole** や **naphthalene** に対して特に強い基質嗜好性を示した(Fig. 3-11)。基質の嗜好性を決定するのは、基質と直接相互作用する **CARDO-O** であることがこれまでの研究で明らかになっており、また、J3 株由来の **CARDO-O** においてはその立体構造が明らかになっている[Nojiri et al., 2005]。それによると、J3 株 **CARDO** において Ile184、Ile186、Leu270、Val272、Phe275、Phe329、及び Ile334 といった疎水性アミノ酸残基が基質ポケットを構成していた。IC177 株 **CARDO** では、J3 株の Ile186 と Ile334 に相当する残基が Met192、Val338 であった(Fig. 3-2)。また、基質と **CARDO-O** の構造を用いたシミュレーションから、基質特異性に影響を与えると考えられた残基の候補として Ile262、Phe275、Gln282、Phe329 (J3 株 **CARDO-O**) が挙げられ、その残基の変異酵素の解析が行われている[Uchimura, Horisaki et al., unpublished]。その結果によると、Ile262 を Val に置換した変異酵素(I262V)では **carbazole** に対する酸素添加位置が異なる可能性を示唆する結果が得られており、酸素添加反応産物として、野生型では 2'-aminobiphenyl-2,3-diol のみ生成するが、I262V では何らかの異なる反応機構により、**carbazole** の 1 位の炭素に水酸基が 1 つだけ付加された 1-hydroxycarbazole が生成することが明らかになっている。興味深いことに、IC177 株の **CARDO-O** では J3 株の I262 に相当するアミノ酸残基は Val であるにも関わらず(Fig. 3-2)、本研究で行った IC177 株 **CARDO** の基質嗜好性の解析結果では、**carbazole** を基質とした場合に反応生成物として 1-hydroxycarbazole は見出されなかった(Table 3-2)。これら、基質ポケット付近に位置する J3 株とは異なる残基が IC177 株と CA10/KA1 株との基質嗜好性の違いを生んでいる可能性が考えられるが、正確な議論をするには今後さらなる詳細な解析が必要である。前章にて、IC177 株の生育基質の解析を行った結果、**dibenzothiophene sulfone** を唯一の炭素源として生育することができることが明らかになった(2-3-5)。

**Dibenzothiophene sulfone** や **9-fluorenone** については分解菌の報告があり、それによると、分解時にこれらの化合物の **angular dioxygenation** 産物が検出されている[Bressler et al., 2000、Nojiri et al., 2001]。しかし、IC177 株の **CARDO** を用いてこれらの化合物を基質とした休止菌体反応では **angular dioxygenation** 産物と思われる化合物は検出できなかった。このことから、IC177 株ゲノム中には **dibenzothiophene sulfone** を分解する一連の遺伝子群が別の位置に存在し、それらがこれらの化合物の代謝を行っている可能性が考えられた。

IC177、CA10、J3、KA1 株の *car* 遺伝子群周辺には、*car* 遺伝子群の転写制御因子(IC177 株、KA1 株については推定)が存在していたが、これら 4 株すべてにおいてその位置は異なっていた(Fig. 3-9)。しかも、IC177 株の CarRI は IclR family の転写制御因子と相同性を示したが、CA10 株、J3 株の *car* 遺伝子群の転写制御因子はそれぞれ AraC/XylS family の AntR、GntR family の CarR であり[Miyakoshi et al., 2006]、大きな違いが見られた。この違いから各 *car* 遺伝子群の転写様式が異なることは明らかであるが、その一方で、代謝系遺伝子群(*car* 遺伝子群)には遺伝子の機能という点で非常に保存性が高い。他の多くの代謝系遺伝子群においても、類似の代謝系遺伝子群に対して異なるタイプの転写制御因子が関与している例が多く、このことから、“代謝系遺伝子群とそれを制御するシステムは必ずしも共通した進化の過程を経るわけではない”という仮説が提唱されている[Cases and Lorenzo, 2001, 2005、Tropel and van der Meer, 2004]。本研究における CA10、J3、IC177 株の *car* 遺伝子群もこの仮説を支持する 1 つの例である。

定量的 RT-PCR の結果、*carAa* 遺伝子は **carbazole** 添加後 1 時間で発現の誘導が観察されたが、



**Figure 3-11.** CA10株、KA1株、IC177株由来CARDOの基質嗜好性の比較。赤、橙、青はそれぞれCA10株、KA1株、IC177株を示す。目盛りは基質変換効率を示した。

*carD* 遺伝子では 4 時間かかった。これは、*carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群と *carDFE* 遺伝子群の転写誘導物質の違いによるものと考えられた。Carbazole 代謝系において、*carAaCBaBbAcAd* 遺伝子産物は上流の代謝系を担い、*carDFE* 遺伝子産物は下流側の代謝系を担う (Fig. 1-1)。したがって、*carDFE* 遺伝子群よりも先に *carAaCBaBbAcAd* 遺伝子群が転写されてくることは合理的といえる。

(本章の内容は 2006 年 5 月に学術雑誌 *Applied and Environmental Microbiology* にて発表した [Inoue et al., 2006b])