

微生物によるジメチルスルフィドの酸化

堀之内 正 校

微生物によるジメチルスルフィドの酸化

1999年 1月

東京大学大学院農学生命科学系研究科

応用生命工学専攻

平成8年度進学

指導教官

堀之内 正枝

大森 俊雄

目次

第1章 序論	1
第2章 インドール酸化能を有するDMS資化菌 <i>Acinetobacter</i> 属細菌20B株の単離	11
2-1 緒言	11
2-2 材料及び方法	13
2-2-1 試薬、培地	13
2-2-2 DMS資化菌のスクリーニング方法	15
2-2-3 硫黄化合物分析の際のサンプル調製、ガスクロマトグラフィー(GC)の分析条件、 ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GC-MS)の分析条件	16
2-2-4 菌株の同定	16
2-2-5 取得されたDMS資化菌の生育基質特異性の検討	17
2-3 結果	18
2-3-1 インドール酸化能を有するDMS資化菌の取得	18
2-3-2 取得されたDMS資化菌20B株の同定	19
2-3-3 20B株の有機硫黄化合物に対する生育基質特異性	20
2-3-4 GC-MSによる20B株培養液中のDMSO、DMSO ₂ の同定	21
2-4 考察	24
第3章 DMS酸化活性を有する酵素遺伝子群(<i>dsoABCDEF</i> 遺伝子群)の単離と解析	25
3-1 緒言	25
3-2 材料及び方法	26
3-2-1 試薬、培地	26
3-2-2 遺伝子操作	26
3-2-2-1 細菌からのtotal DNAの抽出	27
3-2-2-2 大腸菌からのプラスミドの調製	28
3-2-2-3 制限酵素による切断 (10 µl系)	29
3-2-2-4 脱リン酸化反応	29
3-2-2-5 ligation反応	30
3-2-2-6 末端平滑化反応	30
3-2-2-7 核酸の電気泳動と電気泳動ゲルからのDNAの回収	31
3-2-2-8 大腸菌の形質転換	32
3-2-2-9 大腸菌コンピテント細胞の調製法 (塩化ルビジウム法)	32
3-2-2-10 遺伝子解析に用いるデリベーションプラスミドの作製	33
3-2-2-11 塩基配列の決定	34
3-2-3 相補実験	36
3-2-4 タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE)	41
3-2-5 <i>DsoABCDEF</i> のフェノール類に対する酸化活性の検討	42
3-2-6 <i>DsoABCDEF</i> の各種硫黄化合物に対する基質特異性の検討	43

3-3 結果	44
3-3-1 20B株のゲノミックライブラリーの構築とインジゴ生成クローンの取得	44
3-3-2 取得したインジゴ発色を示すクローンのDMS酸化活性	45
3-3-3 DMS酸化酵素遺伝子の制限酵素地図とデリベーションミュータントの酸化活性	46
3-3-4 DMS酸化酵素遺伝子の塩基配列の決定と解析	47
①DsoD	54
②DsoB, E	55
③DsoF	56
④DsoC	59
⑤DsoA	60
3-3-5 DsoABCDEFの各タンパク質の欠失がDMS酸化活性に与える影響	61
3-3-6 DsoABCDEFの各タンパク質を用いた相補実験	64
3-3-7 DmpKLMNOPの各タンパク質を用いた相補実験	67
3-3-8 DsoABCDEFのフェノール類への酸化活性	71
3-3-9 DsoABCDEFの各種有機硫黄化合物に対する反応基質特異性	73
3-4 考察	78
4章 各種酸化酵素のDMS酸化活性	82
4-1 緒言	82
4-2 材料、方法	83
4-2-1 培地、反応buffer	83
4-2-2 プラスミド、大腸菌	83
4-2-3 休止菌体反応の手順	83
4-3 結果	85
4-3-1 休止菌体反応の条件検討	85
①反応bufferの検討	85
②添加するDMSの濃度の検討	86
③大腸菌の培養時間の検討	87
4-3-2 各種酸化酵素のDMS酸化活性	89
①マルチコンポーネントモノオキシゲナーゼ (DmpKLMNOP, AphKLMNOP, TbmKLMNOP)	89
②その他のモノオキシゲナーゼ (TbdB, XylMA)	91
③マルチコンポーネントジオキシゲナーゼ (CumA1A2A3A4, PahAaAbAcAd)	93
④硫黄原子に対する酸化活性が報告されている酸化酵素 (CarAaAcAd, SoxC)	95
4-4 考察	97
総括と展望	99
引用文献	103
謝辞	107

第1章 序論

人類によって排出された二酸化炭素やフロン等が地球環境に深刻な影響を与えていることは周知の事実であるが、様々な硫黄化合物もまた地球環境に大きな影響を与えていることが明らかになってきている。大気へ放出される硫黄化合物で最も多いのは、化石燃料の燃焼による人為起源の二酸化硫黄であり (Table 1-1) (Lelieveld et al., 1997)、放出された二酸化硫黄は酸性雨の原因になると同時にエアロゾル形成の核ともなっていると考えられている。一方で、海洋の生物由来の硫黄化合物もかなりの量を占め (Table 1-1)、特に大陸沿岸の工業化地域から離れた海洋上においては、海洋からの生物由来のものが大気へ放出される硫黄化合物の主要な部分を占めっていると推測されている。

海洋から大気へと最も多量に放出される揮発性硫黄化合物はかつては硫化水素と考えられていたが、1972年になって海水から相当量のジメチルスルフィド (DMS) が検出されて海洋から放出される主要な硫黄化合物はDMSと考えられるようになった (Lovelock and Maggs, 1972)。現在では、海洋由来の硫黄化合物の大半はDMSであることが明らかにされ、DMSは地球規模での硫黄の循環において特に重要な役割を果たしているものと考えられている。

Table 1-1 大気への硫黄の推定放出量 (メガトン・硫黄換算 / 年)
(Lelieveld et al., 1997)

発生源	文献	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)		
総計		86	154	125.5	104	-	102	98	153	93.7	
自然由来合計		15	65	30.1	25	30	72	22	25.5	50	24.4
火山活動		3	20	9.2	9.3	7.4	9.3	9	8.5	7	7.8
陸地		0.1	5	1.2	0.3	3.8	4.3	1	1	7	1.1
海洋*		12	40	19.7	15.4	119	58	12	16	36	15.5
人間活動合計		71	89	95.4	79	-	-	80	72.5	103	69.3
バイオマスの燃焼		1	4	3	2.2	2.8	-	2	2.5	-	2.3
化石燃料の燃焼		70	85	92.4	76.8	-	-	78	70	103	67

* 波等に直接吸収される分は除いた量

- (1) Penner et al., 1994; (2) Pham et al., 1995; (3) Bates et al., 1992; (4) Andreae and Jaeschke, 1992; (5) Spiro et al., 1992; (6) Langner and Rodhe, 1991; (7) Warneck, 1988; (8) Lelieveld et al., 1997

地球規模でのDMS循環に関しては最近知見が集積されつつある。しかしながら、地球全体の循環を推測するには多くの地域的データを収集、解析する必要があり、いまだ不明な点が数多く残されている。現在までに得られた知見から推測されるDMSを中心とした地球規模での硫黄循環のモデルをFig. 1-1に示す。

DMSの主要前駆体は主に植物プランクトンにより生成されるジメチルスルホニオプロピオン酸(DMSP)と考えられている(Fig. 1-2)。植物プランクトンがDMSPを生成する理由は、主に浸透圧調節のためと考えられており、生成されたDMSPは植物プランクトンの浸透圧調節の際や植物プランクトンが捕食された際に植物プランクトンの体外に放出される(Hatton et al., 1996)。この放出されたDMSPが細菌等によって分解されてDMSが生じると考えられている。DMSの生成が植物プランクトンのDMSP生産量にほぼ依存することから海水中のDMS濃度は季節によって大きく変動し、一般に夏に高く冬に低く、また、植物プランクトンの大量に発生する春先に特に高くなっている(Davison et al., 1996)。DMSの生成量には鉄イオンの濃度が関係しており、鉄イオンの増加によって植物プランクトンの発生量が増加し、DMSの生成量も増加することが最近報告された(Turner et al., 1996)。

海水中でDMSPが分解されて生成したDMSは海水中から大気中へと放出され、大気中で太陽光線によって生じたOHラジカル、 NO_3 ラジカル等によって酸化される。OHラジカルは昼に量が多く夜にはほぼゼロになるのに対して、太陽光線によって速やかに分解される NO_3 ラジカルは夜の濃度が高い。そのためDMSは、主に昼はOHラジカル、夜は NO_3 ラジカルによって酸化されると考えられてきた。しかしDMS量はOHラジカル濃度がピークになる時刻あたりから急激に減少して夜間は増加傾向にあることが明らかとされ、このDMS量の増減がOHラジカルの量の変動と相関していることからOHラジカルの方がDMSの酸化に重要な役割を果たしていると考えられてきている(Ravishankara et al., 1997; Hewitt and Davison, 1997)。酸化されたDMSは最終的には主に二酸化硫黄や硫酸イオンになるが、その変換の全容はまだ解明されていない。硫酸などのエアロゾルは直接的にはそれ自体による太陽光線の吸収や散乱によって、間接的には雲の生成核となって地球全体の太陽光線の反射率をあげることににより、温暖化を抑制する効果があることが知られている。化石燃料の燃焼などによって生じる二酸化硫黄は、量が多いが生成が局所的であること、放出される高度が低いこと等から、放出された周辺には酸性雨等として多大な影響を与えるものの、気候へ与える影響としてはDMSの方が大きいものと考えられている。



Fig. 1-1 DMSを中心とした硫黄循環のモデル

DMS: ジメチルスルフィド, DMSP: ジメチルスルホニオプロピオン酸, MM: メチルメルカプタン, MSA: メチルスルホン酸, DMSO: ジメチルスルホキシド, DMSO₂: ジメチルスルホキシド。矢印で示された反応について、破線は確認はされていないが推定される反応、? 付きの破線は存在するかどうか不明とされる反応、生成量が多いと推測されるものは太い矢印で示している。

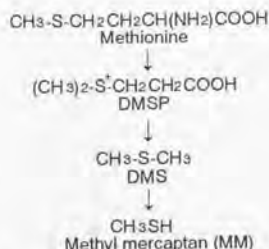


Fig. 1-2 海洋におけるDMSの推定生成・分解反応

一般的に海水中でDMSPより生成したDMSの一部は大気中に放出される前に微生物などによって分解されると考えられているが、発生するDMSの90%が海中で微生物により変換され、大気に放出されるのは10%にすぎないとの報告もされている(Kiene and Bates, 1990)。DMS変換能を有する微生物は、メチルメルカプタン(MM)を中間体としてDMSを代謝する菌株、ジメチルスルホキシド(DMSO)を中間体としてDMSを代謝する菌株、およびDMSのDMSOへの酸化のみ行う菌株とが報告されている。海水中ではDMSOがDMSPと同程度かそれ以上の濃度で存在することがいくつかの報告で示されており(Hatton et al., 1996)、表面近くの海水に存在する高濃度のDMSOは微生物の関与により生成したものと推測されている。しかし、化学的酸化と比較すると微生物変換に関する知見は少なく、まだ未知の部分が多く残されている。大腸菌などDMSOをDMSへと還元する細菌も存在することから、DMSとDMSOの間の微生物変換は、酸化、還元とも様々な微生物が関わり、空気中での化学的なDMS変換より更に複雑である可能性が考えられる。

陸上に関してはDMS循環に関する知見はさらに少ない。陸上でDMSは、酸性紙の製紙工程でリグニンの分解産物であるメトキシ基をもつ芳香族化合物より生じるため、製紙工場では悪臭の原因となっているが、その量は海洋で生物によって生産される量と比較すると微量である。さらに、酸性紙は劣化しやすいことから中性紙の開発が進んで1982年頃からは中性紙の生産が増加しており、人為起源のDMSの生成は減少しているものと推測される。一方、環境中では、DMSは腐敗物等様々なものから生じていることが報告されているが、その量に関してははっきりしていない。土壌中には海洋中よりはるかに高い密度で微生物が存在しているので、海洋より更に多くの微生物がDMS変換に関わっている可能性も考えられる。

DMS変換を行うことが報告されている細菌をTable1-2に示した。以下、これらについて現在までに報告されている知見を簡単に述べる。

Table 1-2 DMS変換能を有する細菌

分類, 性質等	DMSの利用形態*	リファレンス
<i>Hyphomicrobium</i> sp. S	エネルギー源, 炭素源	De Bont <i>et al.</i> , 1981
<i>Hyphomicrobium</i> sp. EG	エネルギー源, 炭素源	Suylen, and Kuenen, 1986; Suylen <i>et al.</i> , 1986;
		Suylen <i>et al.</i> , 1987
<i>Hyphomicrobium</i> sp. I55	エネルギー源, 炭素源	Zhang <i>et al.</i> , 1992
<i>Hyphomicrobium</i> sp. VS	エネルギー源, 炭素源	Pol <i>et al.</i> , 1994
<i>Hyphomicrobium</i> sp. MS3	エネルギー源, 炭素源	Smet <i>et al.</i> , 1997
<i>Thiobacillus type bacteria</i> MS1	エネルギー源, 炭素源	Sivels and Sundman, 1975
<i>Thiobacillus thioaratus</i> E6	エネルギー源, 炭素源	Smith and Kelly, 1988a; Smith and Kelly, 1988b
<i>Thiobacillus thioaratus</i> TK-m	エネルギー源, 炭素源	Kanagawa <i>et al.</i> , 1982; Kanagawa and Kelly, 1986;
		Gould and Kanagawa, 1992
<i>Thiobacillus</i> sp. T5	エネルギー源, 炭素源	Visscher <i>et al.</i> , 1991
<i>Thiobacillus</i> sp. ASN-1	エネルギー源, 炭素源	Visscher and Taylor, 1993
<i>Thiobacillus thioaratus</i> DW44	エネルギー源, 炭素源	Cho <i>et al.</i> , 1992; Park <i>et al.</i> , 1993
<i>Methylophaga sulfivorans</i> RB-1	エネルギー源, 炭素源	De-Zwart <i>et al.</i> , 1996; De-Zwart and Kuenen, 1997
<i>Desulfotomaculum</i> (推定)	エネルギー源	Tanimoto and Bak, 1994
<i>Methanosarcina siciliae</i> H1350	エネルギー源, 炭素源	Ni and Boone, 1991
<i>Methanosarcina barkeri</i> MS1	CoMメチル化による分解	Tallant and Krzycki, 1997
<i>Thiocystis</i> sp.	電子供与体(DMSOを酸化)	Zeyer <i>et al.</i> , 1987
<i>Thiobacillus roseopersicina</i> M1	電子供与体(DMSOを酸化)	Visscher and Van Gemerden, 1991
<i>Rhodobacter sulfidophilus</i> SH1	電子供与体(DMSOを酸化)	Hanlon <i>et al.</i> , 1994
<i>Nitrosomonas europaea</i>	アンモニアモノオキシゲナーゼによるメチル基の転移	Juliette <i>et al.</i> , 1993
<i>Comamonas acidovorans</i> DMR-11	(硫酸化)(DMSOのみ蓄積)	Zhang <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhodococcus</i> sp. SY1	硫酸源	Omori <i>et al.</i> , 1992; Omori <i>et al.</i> , 1995
<i>Alcaligenes</i> sp. E1	硫酸源	Omori <i>et al.</i> , 1995
<i>Acinetobacter</i> sp. 205	硫酸源	this work

*炭素源としても利用できると推測される場合を含む。

DMS資化菌として最も研究が進んでいるのは、C1化合物資化性菌の *Hyphomicrobium* 属細菌及び *Thiobacillus* 属細菌である。

DMSOを炭素源、エネルギー源として生育する。DMSOに生育させたS株の菌体、細胞抽出液からDMSOレダクターゼ、MMオキシダーゼ、カタラーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ等の酵素活性が確認されたこと、及び中間代謝物と考えられる化合物の代謝実験によってFig. 1-3に示すDMS(O)分解経路が推定された(De Bont et al., 1981)。DMSに由来する炭素はホルムアルデヒドの形でセリン経路によって同化される。

*Hyphomicrobium*属細菌EG株はS株と同様の経路でDMS(O)を資化すると考えられており、この菌株からはC1化合物資化性菌のDMS代謝において重要なMMオキシダーゼの精製が行われた(Suylen et al., 1987)。精製された酵素はモノマーで、MMと酸素から定量的にホルムアルデヒド、スルフィド、過酸化水素を生成することが確認された。

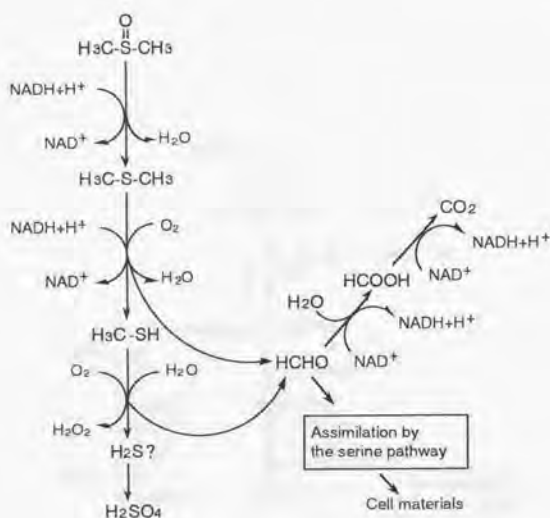


Fig. 1-3 *Hyphomicrobium* sp. S株におけるDMSO推定分解経路
(De Bont et al., 1981)

また、*Thiobacillus*属細菌では、*T. thioparus* E6株でDMDSの分解経路が推定されている (Fig. 1-4) (Smith and Kelly, 1988a, b)。DMSはDMDS分解の中間代謝物ではないが、E6株はDMDSと同様にDMSをエネルギー源として生育することができ、MM以降の代謝は共通であることが示唆されている。*Thiobacillus*属細菌は、DMDSに由来する炭素を二酸化炭素にまで酸化してからカルビンサイクルによって固定する。

T. thioparus TK-m株はE6株と同様の経路でDMSを資化すると考えられており、DMSに生育させたTK-m株からMMオキシダーゼが精製された (Gould and Kanagawa, 1992)。取得されたMMオキシダーゼは*Hyphomicrobium*属細菌EG株のものと同様にモノマーで、MMホルムアルデヒド、 H_2S 、過酸化水素に変換した。また、EG株のMMオキシダーゼとは異なり H_2S の酸化能がなく H_2S を定量的に蓄積し、 H_2S による阻害も受けなかった。

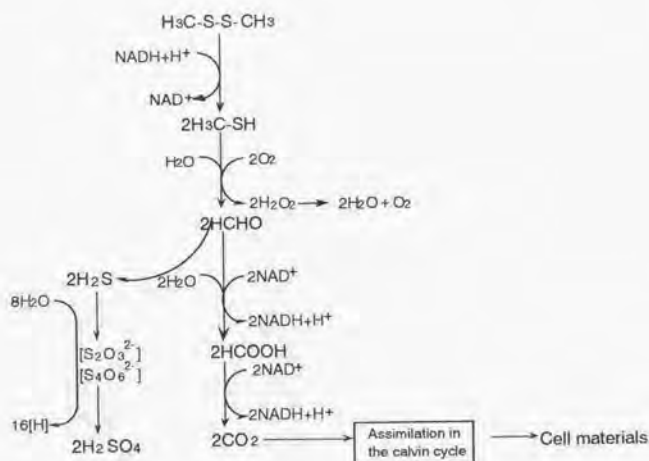


Fig. 1-4 *Thiobacillus thioparus* E6株におけるDMDS推定分解経路 (Smith and Kelly, 1988a; Smith and Kelly, 1988b)

その他にDMSをMMを経由して分解し、炭素源、エネルギー源として資化する菌株として、*Methylophaga sulfivorans* RB-1株 (De-Zwart et al., 1996; De-Zwart and Kuenen, 1997)、*Methanosarcina siciliae* HI350株 (Ni and Boone, 1991)、*Methanosarcina barkeri* MS1株 (Tallant and Krzycki, 1997)が報告されている。*Desulfotomaculum*属細菌(推定)TDS2株、SDN4株 (Tanimoto and Bak, 1994)は、硫黄還元細菌で、DMSを二酸化炭素と硫酸にまで分解する。硝化細菌*Nitrosomonas europaea*においてはアンモニウムモノオキシゲナーゼによってDMSの酸化が触媒されていると推測されている。

また、DMSをDMSOへと変換する細菌も数種が報告されている。DMSを電子供与体として利用する紅色細菌として*Thiocystis*属細菌 (Zeyer et al., 1987)、*Thiocapsa roseopersicina* M1株 (Visscher and Van Gemerden, 1991)、*Rhodobacter sulfidophilus* SH1 (Hanlon et al., 1994)が報告されている。*Pseudomonas*属細菌DMR-11株では有機化合物の代謝の際にDMSがDMSOへと共酸化される (Zhang et al., 1991)。これら菌株はDMSO以降の代謝は行わず、DMSOを定量的に蓄積する。

一方、我々の研究室では、DMSを唯一硫黄源として資化する*Alcaligenes*属細菌E1株(Omori et al., 1995)、*Rhodococcus* sp. SY1株(Omori et al., 1992)等の土壌細菌を多数単離、解析してきた。SY1株はジベンゾチオフェンを硫黄源とした集積培養によって単離された菌株であるが、DMS等のアルキルスルフィドも唯一硫黄源として生育することが見いだされたものである(Omori et al., 1995)。SY1株、E1株はDMSをエネルギー源、炭素源として生育するC1化合物資化性のDMS資化菌とは異なり、最初にDMSの硫黄原子に対する酸化を行う。DMSの酸化の結果生成するDMSOはさらに代謝されるため、検出はされるが定量的な蓄積はしない。SY1株、E1株のDMS推定分解経路をFig. 1-5に示す。この2株以外にこれまで単離された多数のDMSを唯一硫黄源として資化する土壌細菌も、DMSのDMSOへの酸化能、DMSOの資化能が認められることから、これと類似の経路でDMSを硫黄源として資化するものと推測された。

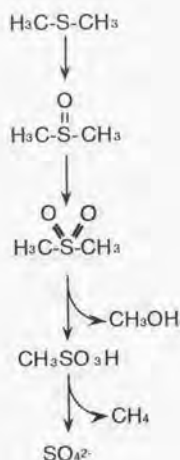


Fig. 1-5 *Alcaligenes*属細菌E1株、及び*Rhodococcus*属細菌SY1株におけるDMS推定代謝経路 (Omori et al., 1995)

E1株の単離を行った際、また、その後のスクリーニングによっても、DMSを硫黄源として生育できる菌株は土壌より多数単離されたことから(unpublished data)、DMSをDMSOへと酸化した後、さらに代謝してDMSを硫黄源として生育できる菌株は土壌に広く分布しているものと考えられる。さらに最近、海洋からもDMSをDMSOを経由して硫黄源として生育すると考えられる細菌が単離された(Fuse, 1998)。

これまで報告されたDMS変換能を有する微生物が非常に広範囲、多種にわたっていることから、DMS変換に関与する微生物の役割は大きいものと推測される。しかしまだ未解明の部分が多く、DMSの微生物変換に関する知見は不十分であると言わざるを得ない。特に遺伝子に関する報告はほとんどないことから、本研究ではDMSを硫黄源として生育できる土壌細菌を研究対象とし、これらのDMS酸化酵素遺伝子の取得、解析を行い、DMS循環に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

第2章 インドール酸化能を有するDMS資化菌*Acinetobacter*属細菌20B株の 単離

2-1. 緒言

序章で述べたようにDMS変換能を有する菌株として多様な細菌が報告されており、DMSを炭素源、エネルギー源として生育する*Hyphomicrobium*属細菌、*Thiobacillus*属細菌に関しては比較的研究が進んでいる。我々の研究グループでは、これまでにDMSを最初にDMSOへと酸化し硫黄源として利用可能なDMS資化菌を土壌より多数取得している。以上のような細菌におけるDMS代謝では、最初のDMSのDMSOへの酸化がキーとなると考えられることから、この反応を触媒する酵素に関して興味を持たれる。そこで、DMSのDMSOへの酸化と触媒する酵素遺伝子の取得を目指すこととし、既に単離されていたグラム陰性DMS資化菌である*Alcaligenes*属細菌E1株より、大腸菌をホストにしたショットガンクローニングによるDMS酸化酵素遺伝子の取得を試みてきた。しかし、これまでに試みた方法は酸化生成物の検出にガスクロマトグラフィー(GC)を用いるものであり、手順の煩雑さもあってDMS酸化酵素遺伝子の取得には到っていない。

一方、酸化酵素が本来の基質の他にインドールの酸化も触媒可能な場合には、当該酵素活性の検出にインジゴ発色を利用する方法がある。この場合、インドールが酸化されると最終的に濃紺色のインジゴが生成するため、プレート上でインジゴ発色による目的遺伝子を有するクローンの検出が考えられる。栄養培地で培養した大腸菌をホストに用いると、大腸菌がインドールを生産するため、インドール酸化の可能な酵素遺伝子が導入されればその大腸菌コロニーはインジゴによる濃紺色を呈する(Fig. 2-1)。

今回この方法をDMS酸化遺伝子のクローニングに利用することを考え、E1株、SY1株、及び既に単離されていたその他数株のDMS資化菌のインドール酸化能の有無を調べたが、いずれの菌株にもインドール酸化能は確認されなかった。そこで、まずはDMS資化能、DMSのDMSOへの酸化能、インドール酸化能を併わせ持つ菌株の単離を試みることにした。

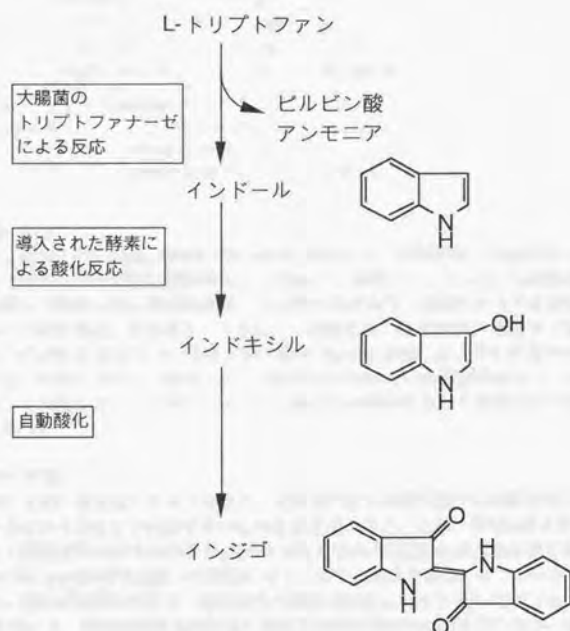


Fig. 2-1 インドール酸化活性を有する酵素をコードする
遺伝子が導入された大腸菌内でのインジゴ生成

2-2 材料及び方法

2-2-1 試薬、培地

試薬は市販されているもので、最も純度の高いものを用いた。

本研究を通して使用した硫黄源を含まない無機培地であるSFMM(Sulfur Free Mineral Medium)の組成をTable 2-1に示す。

Table 2-1 SFMMの組成

コハク酸Na	10.0	g	
Na ₂ HPO ₄	2.2	g	
KH ₂ PO ₄	0.8	g	
NH ₄ NO ₃	3.0	g	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	10	mg	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	mg	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10	mg	/1L dH ₂ O

オートクレーブ滅菌の後、

必要なら ペニシリン 50 mg / L

vitamin mixture 0.1%

mineral base 1% を加える。

2-2-1-1 培地への硫黄源の添加

特に断っていない場合、液体0.1% (v/v)、固体0.1% (w/v)を添加した。液体培地への硫黄源の添加方法は、DMSOはフィルター滅菌して接種時に直接添加し、DMSO₂、硫酸ナトリウムなどの固体はdH₂Oに溶解の後フィルター滅菌して添加した。揮発性の高いDMS等の化合物は、滅菌を行わず直接培地に添加した。寒天培地へは、DMSO等は、培地のオートクレーブ滅菌の後、温度が60℃程度まで低下してからフィルター滅菌済みの硫黄化合物0.1% [液体 (v/v)、固体 (w/v)]を添加した。寒天培地でDMSを硫黄源とする場合には揮発が問題になるが、直接シャーレのふたにDMSを10 µl程度添加してシャーレをテープでなるべく密閉して培養した。この場合、シャーレのふたがDMSによって腐食されてDMSがしみこんだような状態になった。

2-2-1-2 SFMM寒天培地の作製

硫黄源は微量でも細菌の生育に充分量となりうるので、硫黄源の混入を極力避ける必要がある。寒天は硫酸エステルに由来する硫黄を含むため純度が高いものを少量用いることとし、SFMM寒天培地には通常の細菌用寒天ではなく核酸電気泳動用の寒天 (agarose ME, 岩井化学薬品) を必要最小量である0.5% (w/v)用いた。この0.5% (w/v)の寒天濃度では菌株によっては多少生育するが、スプレッダーが使用可能な最小量であった。寒天の種類を変える、寒天以外の固形で担体となりうるもの(フィルターペーパー、ゲランガム等)を用いる、寒天の濃度を崩れない程度まで下げる等の検討を行ったが、菌の生育を完全に抑制するSFMM固形培地は作製できなかった。

2-2-1-3 ビタミン、微量元素

培地に添加したvitamin mixture (v. m.)の組成をTable 2-2に、微量金属混合液であるmineral base (m. b.)をTable 2-3に示す。このmineral baseはHutner's vitamin-free mineral base (Manual of Methods for General Bacteriology p97, American Society for Microbiology)のなかで硫酸塩となっている微量金属を金属が等モルとなるよう塩化物で置き換えたものである。

2-2-1-4 栄養培地

単離の確認に用いたバイオン寒天培地はバイオン(栄研)を用い、細菌用寒天1.6%を添加して作製した。

Table 2-2 Vitamin mixture の組成

Vitamin B ₁	0.001	mg	
Vitamin B ₂	0.5	mg	
Vitamin B ₆	0.1	mg	
Vitamin B ₁₂	0.001	mg	
ニコチン酸	0.1	mg	
パントテン酸	0.1	mg	
葉酸	0.01	mg	
イノシット	1	mg	
ビオチン	0.001	mg	/ 1 ml dH ₂ O

濾過滅菌の後、-20 °C保存

Table 2-3 Mineral baseの組成

ニトリロ 3 酢酸*	10.0	g	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	16.0	g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.33	g	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·24H ₂ O	9.25	mg	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	102	mg	
SF Metals44**	50	ml	/ 1 L dH ₂ O

*はじめにニトリロ 3 酢酸を水にとかしKOHでpH7に調整してから金属塩を順次加えていく。

作製したら、pH 6.6~6.8にHClで調整した後、オートクレーブ滅菌して保存する。

**SF Metals44

EDTA	250	mg	
ZnCl ₂	517	mg	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	485	mg	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	202	mg	
CuCl ₂ ·2H ₂ O	26.7	mg	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	24.8	mg	
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	17.7	mg	
6 N HCl	数滴		/ 100 ml dH ₂ O

滅菌は不要。オートクレーブ滅菌は禁止。

(オートクレーブ滅菌すると金属が沈殿して使用できなくなる。)

2-2-2 DMSO資化菌のスクリーニング方法

DMSが非常に揮発性の高い悪臭物質であり、また、DMSをDMSOへ酸化した後に硫黄源として分解資化する菌株を取得する必要があるため、最初にDMSO資化菌を取得するためのスクリーニングを行い、得られたDMSO資化菌についてDMSの資化能を確認することとした。硫黄源は微量の混入も細菌の生育に充分量となりうることから資化能の確認は寒天培地上ではできないので、液体培養で確認を行った。もとの培地からの硫黄源の持ち込みの影響の可能性を削除するため、2~3回の植え継ぎを行って継続して生育することを基準に資化能を確認した。

(操作)

- ① 土壌サンプルを約10 mlの生理食塩水に懸濁して静置し、上清を濾紙(Filter Paper 5B, ADVANTEC)で濾過して土壌粒子を除去する。
- ② 濾液をメンブレンフィルター(pore size 0.2 μ m, ADVANTEC)に通してフィルター上に集菌する。
- ③ 10 mlのSFMM試験管培地(DMSO 10 μ l, m. b., v. m., ペニシリン添加)に菌の付着したメンブレンフィルターをいれ、30 °C, 300 strokes / minuteで振とう培養する。
- ④ 菌の生育が認められた培養液100 μ lを新しい10 mlのSFMM試験管培地 (DMSO 10 μ l, m. b., v. m., ペニシリン添加)に添加、30 °C、300 strokes / minuteで振とう培養する。
- ⑤ 硫黄源の場合は微量の混入でも細菌は生育可能なので、この手順を2~3回くり返す。継続して菌の生育の確認された培養液を適宜希釈し、SFMMプレート (DMSO, m. b., v. m., ペニシリン添加)に塗布して30 °Cで培養し、生育したコロニーを上記と同じ条件で液体培養する。
- ⑥ 以上の手順を単一コロニーとなるまで継続する。
- ⑦ 単一と考えられる培養液をさらにブイヨンプレートに塗布して単一であることを確認した後、再度その単一コロニーを上記と同じ条件で液体培養してDMSO資化能を確認する。
- ⑧ 上記と同じ条件でDMSOの代わりにDMSを唯一硫黄源として液体培養し、DMS資化能を確認する。菌の生育した培養液を適宜希釈してSFMMプレート(DMS, m.b., v. m.)に塗布し、30 °Cで培養する。コロニー形成するまで培養後、ミクロスパーテル半分程度のインドールの結晶をシャーレの蓋に置いてペーパーで与え、インジゴによる呈色の有無を観察する。
- ⑨ 取得された菌株を10 ml SFMM (DMS 10 μ l, m. b., v. m., 添加)で培養し、培養液1 mlを遠心(15000 rpm、室温、10分)して菌体を除去し、上清2 μ lを直接GCを用いて分析する。

2-2-3 硫黄化合物分析の際のサンプル調製、ガスクロマトグラフィー(GC)の分析条件、
ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GC-MS)の分析条件

2-2-3-1 20B株培養液サンプルの調製

- ①10 mlのSFMM試験管培地 (DMS 10 μ l, m. b., v. m.添加)で30 °C、300 strokes / minute、2日間培養する。
- ②培養液1 mlを1.5 mlチューブにとり、15000 rpm、10分間遠心する。
- ③上清1 μ lを直接GC、あるいはGC-MSを用いて分析する。

2-2-3-2 ガスクロマトグラフィー(GC)の分析条件

Chromatograph	: G-5000 gas chromatograph (Hitachi, Tokyo, Japan)
Column	: Gaskuropack 54 (80 / 100 mesh; a glass column I. D. 3 mm ϕ x 2 m, GL Science, Tokyo, Japan)
Column temperature	: 230 °C
Injection temperature	: 230 °C
Detection temperature	: 230 °C
Flow rate of the N ₂ carrier gas	: 15 ml / min (100 kPa)
検出	: hydrogen-flame ionization detector

2-2-3-3 ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GC-MS)の分析条件

Instrument	: JMS-Automat 150 GC-MS system
Column	: Fused-silica capillary column DB-5 (0.253 mm i. d. x 30 m, 1 μ m film thickness, J&W Scientific)
Column temperature	: 40 °C 20 min. (isothermal hold) 16 °C / min. (increment) 280 °C 10 min. (isothermal hold)
Injection temperature	: 230 °C
Head pressure of He carrier gas	: 65 kPa
Interface temperature	: 250 °C
Injection mode	: Split less mode (1.0 min.)
イオン化法	: EI法

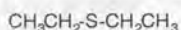
2-2-4 菌株の同定

取得された菌株の同定は、NCIMB (National Collection of Industrial and Marine Bacteria)に依頼した。

2-2-5 取得されたDMS資化菌の生育基質特異性の検討

(基質として用いた硫黄化合物)

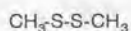
- ① DMS及びその類似化合物として、diethyl sulfide (DES)、dimethyl disulfide (DMDS)、diethyl disulfide (DEDS)を用いた。MMIについては常温では気体であるため、ナトリウム塩の15%水溶液 (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd)を用いた。



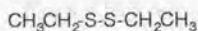
Diethyl sulfide
(DES)



Methyl mercaptan
(MM)

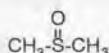


Dimethyl disulfide
(DMDS)

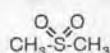


Diethyl disulfide
(DEDS)

- ② DMSの代謝中間体と推測される化合物として、DMSO、DMSO₂を用いた。



Dimethyl sulfoxide
(DMSO)



Dimethyl sulfone
(DMSO₂)

(操作)

- ① 5 ml SFMM液体培養 (DMS 5 µl, m. b.添加)でDMS資化菌を一晩培養する。
- ② 遠心 (3000 rpm, 室温, 10分間)により集菌、5 mlの0.8%食塩水で2回洗浄する。
- ③ 5 mlの0.8%食塩水に懸濁させて菌体懸濁液を調製する。
- ④ 5 mlのSFMM試験管培地 [各々の硫黄化合物を液体の場合0.05 % (v/v)、固体の場合0.05 % (w/v)、m. b. 添加]に菌体懸濁液50 µlを添加し、30 °C、300 strokes / minuteで2日間培養する。
- ⑤ OD₅₅₀を測定する。菌体培養液濁度の測定には、UV160A UV-visible recording spectrophotometer (Shimadzu)を用いた。

2-3 結果

2-3-1 インドール酸化能を有するDMS資化菌の取得

緒言でも述べたように酸化酵素が本来の基質の他にインドールの酸化も触媒可能な場合には、インドールが酸化されて生じたインジゴ発色によって目的遺伝子を有するクローンの検出がプレート上で可能となる。そこで、DMSとインドールの双方の酸化活性を有する酸化酵素を有するDMS資化菌の取得を試みることにした。酸化酵素遺伝子のクローニングには大腸菌をホストに用いる予定であり、大腸菌がホストの場合には同じグラム陰性菌の方が酵素遺伝子の発現する可能性が高いと考えられた。そこで、スクリーニングの際の培地にはグラム陰性菌を選択するペニシリンを添加した。ペニシリンは硫黄原子を含み菌の生育の際の硫黄源となり得るため、菌株の単離の確認後はペニシリンを添加しなかった。DMSが非常に揮発性の高い悪臭物質であり、また、DMSをDMSOへ酸化した後に硫黄源として分解資化する菌株を取得する必要もあるため、まず最初にDMSOを硫黄源としてスクリーニングを行い、そのなかからDMS資化菌を選抜することにした。DMSOを用いた集積培養では、スクリーニングに供した土壌サンプル(東京大学園場より収集した約30サンプル)全てで菌の生育が認められ、さらに各々から複数のDMS資化菌が単離された。しかし、インドールの酸化能を有する菌株は20B株と命名された1株のみであった。20B株に関しては、DMSを硫黄源として良好な生育が認められ、さらに、DMSを唯一硫黄源としたときの培養液上清をGCを用いて分析したところ、DMSOの生成が確認された(Fig. 2-2)。



Fig. 2-2 20B株によるDMSのDMSOへの変換

2-3-2 取得されたDMS資化菌20B株の同定

20B株はグラム陰性桿菌、オキシダーゼ陰性、非運動性等、Table 2-4に示す特徴、及びFig. 2-3に示す形状を有し、*Acinetobacter*属細菌と同定された。

*Acinetobacter*属細菌は*Pseudomonas*属細菌同様に様々な物質を炭素源として生育できる従属栄養細菌であり、両者は類似の集積培養条件で集積される。両者はG+C含量に大きな違いがあり、*Pseudomonas*属細菌の平均的G+C含量が58~70%と高いのに対し、*Acinetobacter*属細菌は39~47%と低いことが知られている。また、20B株のビタミン要求性について調べた結果、20B株はビタミン要求性を示さなかったため、以降の培養にはビタミンの添加は行わないこととした。

Table 2-4 20B株の菌学的特徴

Motility	-
Gram stain	-
Spores	-
Catalase	+
Oxidase	-

Colony morphology :

Circular, regular, entire, punctiform, raised,
semi-translucent, smooth, and white

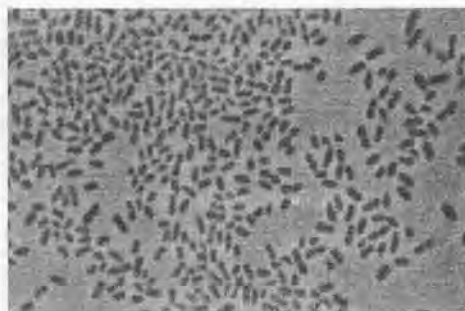


Fig. 2-3 20B株の形状

2-3-3 20B株の有機硫黄化合物に対する生育基質特異性

唯一硫黄源としてDMSO、DMSO₂、diethyl sulfide (DES)、MM、dimethyl disulfide (DMDS)、diethyl disulfide (DEDS)をそれぞれ添加したSFMM液体培地で20B株を2日間培養して培養後のOD₅₆₀を測定したところ、20B株はDMS、DES、DMDS、DEDSに良好に生育したことから、低分子の硫黄化合物に対しては、広い生育基質特異性を示すものと考えられた(Table 2-5)。また、20B株は*Alcaligenes*属細菌E1株のDMS推定代謝経路の中間体と考えられるDMSO、DMSO₂に良好に生育する一方、*Hyphomicrobium*属細菌や*Thiobacillus*属細菌におけるDMS分解の中間代謝産物であるMMにおける生育は認められなかった。以上の結果からも20B株がE1株と類似のDMS代謝経路によりDMSを分解資化することが推測された。

Table 2-5 各硫黄化合物に対する20B株の生育基質特異性

Substrate	OD ₅₆₀
DMS	1.24
DMSO	1.91
DMSO ₂	1.86
DES	1.87
MM	0.31
DMDS	1.86
DEDS	1.15
Na ₂ SO ₄ (positive control)	1.94
No sulfur source (negative control)	0.30

2-3-4 GC-MSによる20B株培養液中のDMSO、DMSO₂の同定

20B株のスクリーニングの際には、DMSを硫黄源として培養した際に生成するDMSOのGCを用いた保持時間による同定のみしか行っていなかったため、GC-MSを用いて20B株培養液の分析を行った。結果をFig. 2-4-A、Bに示す。Fig. 2-4-AはDMSを硫黄源として用いた培養液の分析結果であり、Fig. 2-4-BはDMSOを硫黄源として用いた培養液の分析結果である。検出されたピークの保持時間、及びそのマススペクトルはそれぞれ標品と良く一致しており、DMSからのDMSO、及びDMSOからのDMSO₂の生成が確認された。

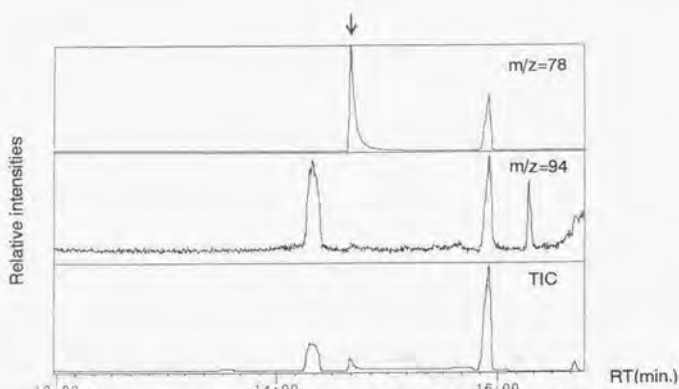


Fig. 2-4-A-① DMSを基質とした20B株培養液上清の分析のマスクロマトグラム

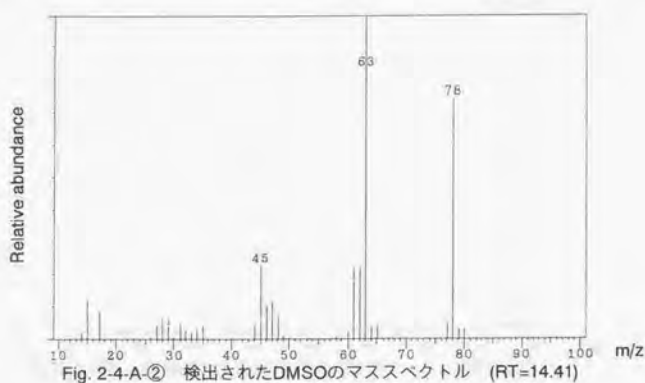


Fig. 2-4-A-② 検出されたDMSOのマススペクトル (RT=14.41)

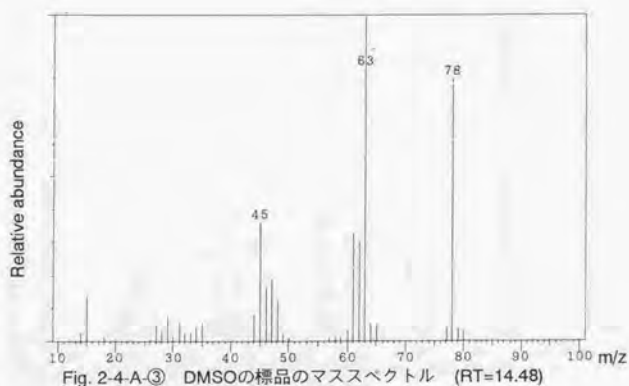


Fig. 2-4-A-③ DMSOの標品のマススペクトル (RT=14.48)

Fig. 2-4-A DMSを硫黄源とした20B株培養液からのDMSOの検出

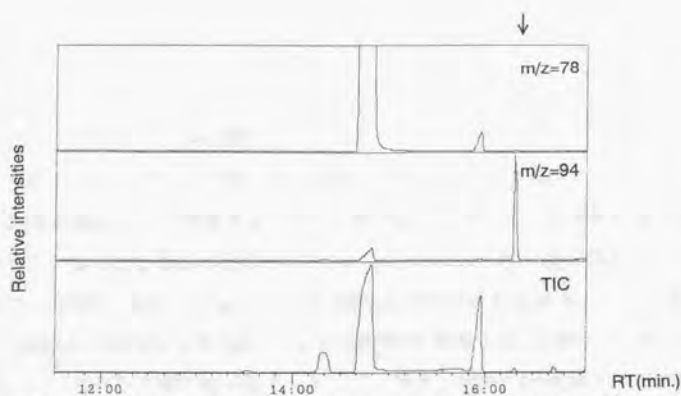


Fig. 2-4-B-① DMSOを基質とした20B株培養液上清の分析のマスクロマトグラム

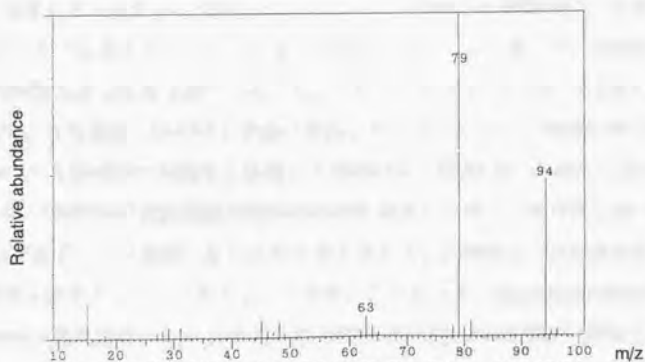


Fig. 2-4-B-② 検出されたDMSO₂のマスペクトル (RT=16.21)

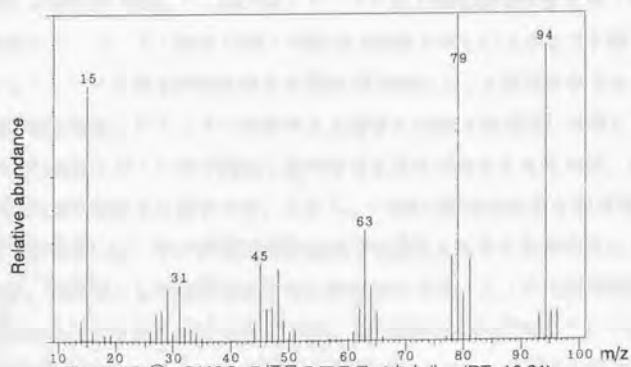


Fig. 2-4-B-③ DMSO₂の標品のマスペクトル (RT=16.21)

Fig. 2-4-B DMSOを硫黄源とした20B株培養液からのDMSO₂の検出

考察

今回新たに土壌からのDMS資化菌のスクリーニングを行ったが、スクリーニングに供した約30の土壌サンプル全てから複数のDMS資化菌が単離された。このことは、DMSを硫黄源として生育することが可能な菌株は土壌中に普遍的に存在することを示しているものと考えられる。しかし、インドールの酸化能が認められたDMS資化菌は、20B株一株だけであった。20B株は*Acinetobacter*属細菌と同定され、DMS、DMSO、DMSO₂の資化能、DMSのDMSOへの酸化能、DMSOのDMSO₂への酸化能、インドールの酸化能が認められたことから、既得のDMS資化菌*Alcaligenes*属細菌E1株等と同様、DMSをDMSO、DMSO₂へと酸化し、さらに代謝して硫黄源として生育しているものと推測された。しかし、DMSからのDMSOへの変換についてはGCでも十分検出されるほどの量のDMSOが生成している一方、DMSOを与えた場合のDMSO₂の生成量は微少であった。このような傾向はE1株にも認められ、また、このとき培養液にDMSOが多量に残存していることから、20B株やE1株においてはDMSからDMSOへの酸化と比較してDMSOからDMSO₂への酸化は反応速度が遅く、また、DMSO₂の変換速度がDMSOの酸化速度と比較して相対的に速いため、DMSO₂がわずかししか蓄積しないものと考えられた。20B株は、DMS以外にもDES、DMDS等を硫黄源として生育することが見いだされたが、*Hyphomicrobium*属細菌、*Thiobacillus*属細菌等のC1化合物資化性のDMS資化菌のDMS代謝中間体であるMMIにおける生育は認められなかった。

20B株はDMSのDMSOへの酸化能とインドールの酸化能の両方を有していたものの、DMSとインドールの酸化が同一の酵素で触媒されているかどうかは不明である。もしインドール酸化活性を有する酵素がDMSによって誘導されるなら、硫酸塩等を硫黄源に培養してインドールを与えた場合とDMSを硫黄源に培養してインドールを与えた場合とでインジゴ発色に差が生じる可能性があると考えたが、実験の結果、有意な差は認められなかった。しかし、一般にxenobiotics等を炭素源として細菌が利用する場合には、その分解系酵素遺伝子は基質となる化合物自身によって誘導されるが、硫黄源として利用する場合には硫黄の欠乏によって代謝系酵素が誘導されるといわれており(Kertesz et al., 1994)、DMS酸化酵素がDMSによって誘導されない可能性も考えられるので、DMS酸化酵素がインドールの酸化も触媒するとの仮定のもと以降の実験を行うこととした。

第3章 DMS酸化活性を有する酵素遺伝子群(*dsoABCDEF*遺伝子群)の単離と解析

3-1 緒言

前章までにも述べたように、現在までのところDMS資化菌のDMS酸化活性を有する酵素遺伝子に関する知見は、比較的研究の進んでいるC1資化性菌(*Thiobacillus*属細菌、*Hyphomicrobium*属細菌)についても報告されていない。第2章では、このDMS酸化活性の検出方法にインドール酸化を利用することを考え、新たにDMS資化能、DMSのDMSOへの酸化能、およびインドール酸化能を有する*Acinetobacter*属細菌20B株の取得を行ったことを述べた。引き続き本章では、20B株のDMS酸化酵素がインドール酸化活性をも有するとの仮定のもと、20B株よりインドール酸化活性を有する酵素遺伝子の取得を試みることにした。

3-2 材料及び方法

3-2-1 試薬、培地

試薬は市販されているもので、最も純度の高いものを用いた。制限酵素等、酵素類は主に宝酒造、他に東洋紡、ニッポンジーン、ペーリンガー・マンハイムから購入して使用した。

大腸菌の培養には2xYT培地 (yeast extract 10 g, tripton 16 g, NaCl 5 g / dH₂O) (Sambrook et al., 1989) を用いた。必要があれば以下の抗生物質等を添加した。添加量は特に断っていない場合は、下記の stock solution を培地に 0.1% (v/v) 添加した。

(x1000 stock solution)	
アンピシリン	: アンピシリン Na 50 mg / ml dH ₂ O (濾過滅菌) (-20 °C 保存)
クロラムフェニコール	: クロラムフェニコール 34 mg / ml ethanol (-20 °C 保存)
IPTG	: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 23.8 mg / ml dH ₂ O (100 mM) (濾過滅菌) (-20 °C 保存)
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) 20 mg / ml N, N-dimethylformamide (-20 °C 保存)

3-2-2 遺伝子操作

基本的には細胞工学実験プロトコール(秀潤社)、及び酵素、キット類付属のプロトコールに従った。

3-2-2-1 細菌からのtotal DNAの抽出

(試薬)

1 M Tris-HCl (pH8.0)	: Tris (hydroxylmethyl) aminomethane (Tris) 12.11 g. HClでpH8.0に調整する。 / 100 ml dH ₂ O [オートクレーブ(AC)滅菌]
0.5 M EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA·2H ₂ O) 9.305 g 5 N NaOHでpH8.0に調整する。 / 50 ml dH ₂ O (AC滅菌)
TE buffer	: 1 M Tris-HCl (pH8.0) 1 ml 0.5 M EDTA 0.2 ml / 100 ml dH ₂ O (AC滅菌)
10% SDS	: Sodium dodecyl sulfate (SDS) 100 g / L dH ₂ O
プロテアーゼK	: プロテアーゼK 20 mg / 1 ml dH ₂ O (濾過滅菌) (-20°C保存)
5 M NaCl	: NaCl 5.8 g / 100 ml dH ₂ O (AC滅菌)
CTAB / NaCl solution	: hexadecylmethyl ammonium bromide (CTAB) 10 g NaCl 4.1 g / 100 ml dH ₂ O, 65°Cに温めて溶解させる。
フェノール/クロロホルム溶液	: TE 飽和phenol 100 ml chloroform 100 ml
70% エタノール溶液	: ethanol 700 ml dH ₂ O 300 ml
3 M 酢酸ナトリウム溶液	: CH ₃ COONa·3H ₂ O 21.6 g / 20 ml dH ₂ O (AC滅菌)
RNaseA溶液 (x1000 stock)	: RNaseA 10 mg / ml dH ₂ O (-20 °C保存)

(操作)

- ① 適当な栄養培地で定常期に達する直前まで菌を培養する。
- ② 培養液15 mlを50 mlテフロンチューブに移して遠心 (3000 rpm、室温、ペレットになるまで)する。
- ③ 菌体を5.67 mlのTEバッファーに懸濁する。
10% SDS 300 µl (終濃度 0.5%)
プロテアーゼK 30 µl (終濃度 100 µg / ml) を加え混合、37 °C、1時間反応させる。
- ④ 1 mlの5 M NaClを加え混合した後、800 µlのCTAB / NaCl solutionを加え、65 °C、10分間処理する。
- ⑤ 7~8 mlのクロロホルムを加え、ボルテックスで混合する。遠心 (3000 rpm、室温、充分に蛋白が沈殿するまで)して、水相を新しい50 mlテフロンチューブに移す。同体積のフェノール/クロロホルムを加え、ボルテックスで混合し、遠心 (3000 rpm、室温、充分に蛋白が沈殿するまで)する。
- ⑥ 水相を新しい50 mlディスポーザブルチューブに移す。
水相の体積の60%のイソプロパノールを加え、滅菌したガラス棒(先端を細くしたもの、あるいは先端を窪いたバスターピペット)で十分に攪拌する。(この操作で、ガラス棒にDNAがまきつく。)
- ⑦ 10 mlディスポーザブルチューブに1 mlのTE buffer を用意し、これに⑥のガラス棒を差し込みチューブの口をパラフィルムで覆う。チューブを斜めにしてTE bufferにガラス棒をひたし、4 °C、一晩静置してDNAを溶解させる。
- ⑧ 1 µlのRNaseA溶液を加え、37 °C、1時間反応させる。
- ⑨ 250 µlずつ1.5 mlチューブに分注する。フェノール/クロロホルム溶液 250 µlを加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。
- ⑩ 上清を新しい1.5 mlチューブに移す。
25 µlの3 M 酢酸ナトリウム溶液、600 µlのエタノールを加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、15分)する。ペレットを500 µlの70% エタノール溶液 でリンスする。
- ⑪ 200 µl (状況に応じて増減)のTE buffer に溶解させる。

3-2-2-2 大腸菌からのプラスミドの調製

(試薬)

solution1	: glucose	0.9 g
	Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 ml
	0.5 M EDTA	2.0 ml
	/ 100ml dH ₂ O (110°C, 20分 AC滅菌) (4 °C保存)	
10 N NaOH aq.	: NaOH 20 g / 50 ml dH ₂ O (AC滅菌)	
solution2	: 10% SDS	10 ml
	10 N NaOH aq.	2.0 ml
	/ 100 ml dH ₂ O	
solution3	: 酢酸カリウム	29.4 g
	氷酢酸	11.5 ml
	/ 100 ml dH ₂ O (AC滅菌) (4 °C保存)	
12.5 M LiCl	: LiCl	53 g
	1 M Tris-HCl (pH8.0)	2.5 ml
	0.5 M EDTA	2 ml
	/ 100 ml dH ₂ O メンブレンフィルターで濾過した後、(AC滅菌)	

(操作)

- ① 目的のプラスミドを持つ大腸菌を、抗生物質を加えた10 mlまたは5 mlの2xYT試験管培地で37 °C、8時間〜16時間培養する。
- ② 培養液2 mlを2 mlチューブに移し、遠心 (12000 rpm、室温、2〜3 分)により集菌する。上清を捨て、残った上清をさらにピペットで除去する。
- ③ 200 µlのsolution1 を加えボルテックスで菌体を懸濁、常温5分静置する。300 µlのsolution2 を加え緩やかに混合、氷上5分静置する。300 µlのsolution3 を加え緩やかに混合、氷上15分静置の後、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。
- ④ 上清を1.5 mlチューブに移し、700 µlのフェノール/クロロホルム溶液を加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。
- ⑤ 約800 µlの上清を2 mlチューブに移す。800 µlの2-プロパノールを加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、15分)する。ペレットを500 µlの70% エタノール溶液でリンス、フラッシングの後、上清をピペットで除く。
- ⑥ ペレットを100 µlのTE bufferに溶解させる。25 µlの12.5 M LiCl溶液を加えボルテックスで混合、氷上15分静置の後、遠心 (15000 rpm、4 °C、10分)する。
- ⑦ 上清を1.5 mlチューブに移す。300 µlの滅菌水と1 mlのエタノールを加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、15 分)する。ペレットを500 µlの70% エタノール 溶液でリンスする。
- ⑧ ペレットを100 µlのTE buffer に溶解し、RNaseA溶液0.1 µlを加えて37 °C、1時間以上処理する。
- ⑨ 上清に100 µlのフェノール/クロロホルム溶液を加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。
- ⑩ 上清を新しい1.5 mlチューブに移す。10 µlの3M 酢酸ナトリウム溶液、250 µlのエタノールを加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、15分)する。
ペレットを500 µlの70% エタノール溶液 でリンスし、100 µl (状況によって量を増減)のTE buffer に溶解しプラスミド溶液とする。(シーケンス反応のサンプルとするときは33.6 µlの滅菌水に溶解する。)

3-2-2-3 制限酵素による切断 (10 μ l系)

DNA	a μ l	
buffer (x10)*	1 μ l	
滅菌水	b μ l	
制限酵素	c μ l	を混合、それぞれの制限酵素に応じた温度で1時間以上処理する。

a: プラスミドなら2 μ l, total DNAなら8 μ lを目安に状況に応じて増減する。

b: 総量が10 μ lになるように加える

c: 通常10 U / μ lの酵素なら0.5 μ l、他、制限酵素のユニットやDNA量に応じて増減する。

*: それぞれの酵素の付属buffer

制限酵素処理後、必要に応じてフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い精製する。

3-2-2-4 脱リン酸化反応

(試薬)

Alkaline phosphatase, shrimp (ペーリンガー・マンハイム株式会社) [AP, shrimpは細菌由来のAP (BAP) や子牛小腸由来のAP (CIAP) と異なり、65 $^{\circ}$ C、20分間の熱処理によって完全に不可逆的に失活する。]

(操作)

- ① DNA溶液 : 95 μ l
Alkaline phosphatase (AP), shrimp buffer (x10) : 10 μ l を混合する。
- ② AP, shrimp 2 μ lを加えて37 $^{\circ}$ C、30分反応させる。
- ③ 再びAP, shrimp 2 μ lを加えて37 $^{\circ}$ C、30分反応させる。
- ④ 65 $^{\circ}$ C、20分間、熱処理を行う。この熱処理によってAP, shrimpは失活するが、必要に応じフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って精製する。

3-2-2-5 Ligation反応

(試薬)

DNA ligation kit ver.2 (宝酒造)

DNA ligation kit ver.1 (宝酒造)

(操作)

DNA溶液* : 10 μ l (状況により増減)
solution I (Takara DNA Ligation Kit ver.2) : 10 μ l (DNA溶液量と同量)

を混合し、16 °C、30分以上反応させる。反応液は直接大腸菌の形質転換に用いる。

*挿入する遺伝子断片の溶液とベクターの溶液の総液量、self ligationの場合はベクターを含む遺伝子断片のみの液量

ただし、末端平滑化反応後のDNA溶液を処理する場合には、末端平滑化反応のbufferの影響を少なくするため、最終的に容量が多くなるTakara DNA ligation kit ver.1を用いる。

DNA溶液* : 10 μ l (状況により増減)
solution A (Takara DNA ligation kit ver.1) : 50 μ l (DNA溶液量の5倍)
solution B (Takara DNA ligation kit ver.1) : 10 μ l (DNA溶液量と同量)

を混合し、16 °C、30分以上反応させる。反応液は直接大腸菌の形質転換に用いる。

3-2-2-6 末端平滑化反応

(試薬)

DNA blunting kit (宝酒造)

(操作)

- ① DNA溶液 (0.1 pM~10 pMになるようdH₂Oで調節) : 8 μ l
10 x buffer (Takara DNA blunting kit 付属buffer)* : 1 μ l
- ② 上記9 μ lの混合液を70 °C、5分間熱処理した後、37 °Cに保温しておく。
- ③ 1 μ lのT4 DNA polymeraseを加え穏やかに混合、37 °C、5分反応させる。
- ④ ボルテックスを用いて攪拌して酵素を失活させた後、氷上に置いてすぐにligation反応にうつる。

*T4 DNA polymerase付属10 x bufferを用いる場合にはBSAとdNTP (0.3 mM程度)を添加する。

3-2-2-7 核酸の電気泳動と電気泳動ゲルからのDNAの回収

(試薬)

TAE buffer (x50)	: Tris	242 g
	氷酢酸	57.1 ml
	0.5 M EDTA	100 ml
	/ L dH ₂ O	

Agarose ME (岩井化学薬品)

Gene clean II kit (フナコシ)

Ethachin mate (ニッポンジーン)

電気泳動 (Mupid) 用ゲルの調製

(操作)

- ① Agarose ME 2.7 g*を290 mlのdH₂Oに沸騰させて完全に溶かす。
 - ② スターラーで攪拌しながら放冷する。
 - ③ 50 °C程度に温度が下がったら6 mlのTAE buffer (x50)を加える。
 - ④ スターラーで攪拌の後、ゲルメーカーに流し込み固める。
- * 0.9 % ゲルの場合、分離したいDNAの長さが短い場合は0.9 % 以上、長い場合は0.9 % 以下にする。

Gene clean II kitを用いたゲルからのDNAの精製

(操作)

- ① 電気泳動を行ってDNAを分離し、目的の長さのDNAを含むゲルを切り出す。
- ② 切り出したゲルを1.5 mlチューブに約0.4 gずつ分け、1 mlのNaI液を加え55 °Cで5~10分温め、ボルテックスで混合してゲルを溶解する。ゲルが完全に溶解するまでこの操作を繰り返す。
- ③ Glass milk 5 µlを加えて混合、氷上20分以上40分以下、静置する。
- ④ 遠心 (15000 rpm、4 °C、20秒)によってglass milkを沈殿させ、上清をピペットで除去する。
- ⑤ 100 µlのNew Washを加え、ボルテックスで混合する**。遠心 (15000 rpm、4 °C、20秒)によってglass milkを沈殿させ、上清を捨てる。
- ⑥ ④⑤の洗浄を計3回行う。
- ⑦ 最後に上清を捨てた後にフラッシングを行い、ピペットで上清を完全に除く。
- ⑧ Glass milkに400 µlのTE bufferを加えボルテックスで混合後、55 °C、5分保温し、DNAを溶出させる。
- ⑨ 遠心 (12000 rpm、室温、5分)によりglass milkを沈殿させる。上清を別のチューブに移し、glass milkに新しい200 µlのTE bufferを加えてボルテックスで混合後、55 °C、5分保温する。
- ⑩ 遠心 (12000 rpm、室温、5分)によりglass milkを沈殿させる。上清を先の400µlとあわせる。
- ⑪ 合計600 µlの上清を遠心 (12000 rpm、室温、5分)し、混入しているglass milkを沈殿させる。
- ⑫ 上清を新しいチューブに移し60 µlの3M 酢酸ナトリウム、1 µlのethachin mateを加えボルテックスで混合、700 µlのイソプロパノールを加え遠心(15000 rpm、4 °C、15分)する。沈殿を500 µlの70% エタノールでリンスする。

**目的のDNA断片が長い場合などは、ボルテックスを用いず指ではじいて丁寧に溶解させる。

3-2-2-8 大腸菌の形質転換

(試薬)

SOB培地	: Trypton	20 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	0.5 g
	250 mM KCl aq.	10 ml
	5 N NaOH	~0.2 ml
	/ 1 L dH ₂ O (AC滅菌) (4 °C保存)	
SOC培地	: 2 M MgCl ₂	0.5 ml (AC滅菌)
	1 M glucose	2 ml (濾過滅菌)
	/ SOB培地100 ml (4 °C保存)	

(操作)

- ①コンピテント細胞を氷上で溶解する。
- ②大腸菌より調製したプラスミド溶液はコンピテント細胞溶液に対し1~2%、ligation反応後の溶液は同10~20%を目安に最大20%を加え、緩やかに混合して氷上20~30分静置する。
- ③42 °Cの湯浴で90~120秒保温する。
- ④氷上2分静置の後、SOC培地または2xYT培地1 mlを加えて37 °C、1時間培養する。
- ⑤培養液を適当量、適当な抗生物質等を添加した2xYT寒天培地に塗布。37 °C、8時間以上培養する。

3-2-2-9 大腸菌コンピテント細胞の調製法 (塩化ルビジウム法)

(試薬)

ψb培地	: Yeast Extract	5 g
	Trypton	20 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
	/ 1 L dH ₂ O (AC滅菌) (4 °C保存)	
ψaプレート	: ψb培地に細菌培養用寒天1.4%を加えてプレートにする。(AC滅菌)	
Tfb I	: 酢酸カリウム	0.295 g
	RbCl	1.21 g
	CaCl ₂	0.147 g
	MnCl ₂	0.99 g
	glycerol	15 ml
	/ 100 ml dH ₂ O. 0.2 M 酢酸溶液でpHを5.8に合わせる。(濾過滅菌) (4 °C保存)	
Tfb II	: MOPS	0.209 g
	CaCl ₂	1.103 g
	RbCl	0.121 g
	glycerol	15 ml
	/ 100 ml dH ₂ O. 0.2~1 N KOH溶液でpHを5.8に合わせる。(濾過滅菌) (4 °C保存)	

(操作)

- ①大腸菌をψaプレート上に線引きし、37 °C、一晚培養する。
- ②プレート上に生育した大腸菌より単一のコロニーを拾い、5 ml ψb試験管培地に植え継ぐ。
OD₅₆₀≒0.3まで37 °C、300 strokes / minuteで培養する。
- ③大腸菌の生育したψb培地5 ml全量を500 mlへそ付き三角フラスコの100 ml ψb培地に移す。
- ④OD₅₆₀≒0.48まで37 °C、120 rpmで培養し、氷上に5分静置する。
- ⑤培養液を50 mlの滅菌済みディスポーザブルチューブ2本に50 mlずつ移し、遠心 (3000 rpm、4 °C、5分)により集菌する。
- ⑥上清を捨て菌体を各々20 mlのTfb IIに緩やかに懸濁し、遠心 (3000 rpm、4 °C、5分)により集菌する。
- ⑦上清を捨て菌体を各々2 mlのTfb IIに緩やかに懸濁、懸濁液を100 μlずつ1.5 mlチューブに分注する。分注したチューブはすぐにドライアイス上(が望ましいが、やむを得なければ氷上)に移す。
分注後はなるべく早く-80 °Cで凍結、保存する。
- ⑧⑦の作業は4 °C以下で行うのが望ましいので、低温室で作業を行うか、常温の室内であればできる限り手早く作業を行うと共に使用するチューブ、チップ類は使用する直前まで-20 °Cに保冷しておく。

3-2-2-10 遺伝子解析に用いるデリーションプラスミドの作製

(試薬)

Kilo-sequence用 Deletion Kit (宝酒造)

制限酵素A: 切断面の3' 末端が突出末端となる制限酵素

制限酵素B: 切断面の5' 末端が突出、または平滑末端となる制限酵素

(操作)

- ① デリーション処理を行うプラスミドを総液量200 μ lの系で制限酵素Aを用いて処理する。
(酵素は2 μ l加えて1時間反応させ、再び2 μ lを加えて1時間反応させる。)
- ② 反応液全量を電気泳動して切断された断片を精製する。(未切断のものを除去するため。)
- ③ 精製したDNAを総液量200 μ lで制限酵素Bを用いて処理する。制限酵素Aの時と同様酵素は2 μ lずつ添加し、2度に分けて反応させる。
- ④ 200 μ lのフェノール/クロロホルム溶液を加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。
- ⑤ 上清を新しいチューブに移し20 μ lの3 M 酢酸ナトリウムを加えボルテックスで混合、500 μ lのエタノールを加えボルテックスで混合する。-20 $^{\circ}$ C、15分間静置した後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分)する。
- ⑥ ベレットを200 μ lの冷却70% エタノールでリンス、上清をピペットで完全に除いて吸引乾燥する。
- ⑦ ベレットをExonuclease III buffer 50 μ lに溶かす。
- ⑧ 1.5 mlチューブ4本に12 μ lずつのMung Bean Nuclease (MBN) bufferを用意し65 $^{\circ}$ Cに保温する。
- ⑨ DNA溶液に0.5 μ lのExonuclease IIIを加えて37 $^{\circ}$ Cで反応させる。
適当な間隔を置いて反応液6 μ lずつを取り、用意していたMBN bufferに加えボルテックスで混合してすぐに65 $^{\circ}$ Cで処理する。65 $^{\circ}$ Cには5分程度置いて酵素を失活させ、その後氷上に置く。
反応のサンプリングの間隔は後ほど長く、30秒、1分、2分、4分、6分、9分...など、DNAの長さ、量、G+C含量などによって調節しこれを反応液がなくなるまで繰り返すが、2回ずつを1つのチューブに入れる。(上記の場合30秒と1分、2分と4分、...を1つのチューブに加える。)
- ⑩ 1 μ lのMBNを3 μ lのMBN bufferで希釈する。
これを各々1 μ lずつ⑨の4本のチューブに加えて37 $^{\circ}$ C、1時間反応させる。
- ⑪ サンプルを氷上静置、その間サンプルの1 μ lを電気泳動してDNAが削られていること、それによって4つに分けたサンプル間でExonuclease III処理の時間が長かったものほどDNAが短くなっていることを確認する。
- ⑫ 85 μ lのTE bufferと100 μ lのフェノール/クロロホルム溶液を加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。上清を新しいチューブに移して再度100 μ lのフェノール/クロロホルム溶液を加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、10分)する。
上清を新しいチューブに移し70 $^{\circ}$ C、5分保温してMBNを失活させる。10 μ lの3M酢酸ナトリウム、1 μ lのethachinmate、260 μ lのエタノールを加えてボルテックスで混合、-20 $^{\circ}$ Cに15分以上静置した後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分)する。沈殿を100 μ lの冷却70% エタノールでリンスする。
- ⑬ 各々に5 μ lのklenow bufferを加え、DNAを溶解させる。
- ⑭ Klenow bufferでklenow fragmentを10倍に希釈する。1 μ lずつを緩やかに⑬のDNA溶液に加え、37 $^{\circ}$ C、15分反応させる。
- ⑮ 0.6 μ lの3M 酢酸ナトリウムを加えボルテックスで混合、16 μ lのエタノールを加えボルテックスで混合し、-20 $^{\circ}$ C、15分以上静置した後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分)する。
- ⑯ 沈殿を100 μ lの70% 冷却エタノールでリンスする。
- ⑰ 沈殿を2 μ lのTE bufferで溶解し、ligation反応を行う。ここでDNA量が充分なら以下の⑱に示す制限酵素処理を行うのが理想だが、十分でなければ 直接大腸菌の形質転換に用いる。
- ⑱ 2 μ lの5 M NaClを加えボルテックスで混合、66 μ lのエタノールを加えボルテックスで混合し、-20 $^{\circ}$ C、15分以上静置した後、遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分)する。沈殿を100 μ lの冷却70% エタノールでリンスする。
- ⑲ 沈殿を17.5 μ lのdH₂Oに溶解、2 μ lの制限酵素B用bufferを加えボルテックスで混合、0.5 μ lの制限酵素Bを加え制限酵素Bに最適な温度で1時間反応させる。反応液5 μ lを用いて大腸菌に形質転換する。

3-2-2-11 塩基配列の決定

PEG沈殿によるDNAの精製

(試薬)

PEG solution : polyethyleneglycol 8000 13 g / 100 ml dH₂O (AC滅菌)

(操作)

- ① 3-2-2-2の操作に従って調製したプラスミド溶液を33.6 μ lの滅菌蒸留水に溶解する。
- ② 6.4 μ lの5 M NaCl、40 μ lのPEG solutionを加えボルテックスで混合し、氷上30~40分静置する。
- ③ 遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分)し、上清をピペットを用いて除去する。
- ④ 200 μ lの冷却70%エタノール溶液でリンスして遠心 (15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分)し、上清をピペットを用いて除去する。さらにフラッシングし、再び上清をピペットで完全に除去する。
- ⑤ 20 μ lのdH₂Oに溶解する。A₂₆₀及びA₂₈₀を測定し、A₂₆₀ / A₂₈₀が1.8以上、A₂₆₀が0.01以上のサンプルを以降のシーケンス反応に用いる。

シーケンス反応

(試薬)

PRISM ready reaction terminator cycle sequencing kit (ABI)

ミネラルオイル : mineral oil (SIGMA)

フェノール/水/クロロホルム溶液 : フェノール/水/クロロホルム (68:18:14) (ABI)

(操作)

- ①

DNA	1 μ g
プライマー (3.2 pM)	1 μ l
PRISM ready mix	9.5 μ l
滅菌水	(合計の液量が20 μ lになるように加える)

 上記を0.5 mlチューブで緩やかに混合し、蒸発防止にミネラルオイル一滴を落とす。
- ② あらかじめ96 $^{\circ}$ Cに温めておいたサーマルサイクラー (PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700, ASTEC)に間隙を埋めるミネラルオイルを一滴落としてチューブをセット、以下の条件で反応を行う。

25サイクル	96 $^{\circ}$ C	30秒
	50 $^{\circ}$ C	15秒
	60 $^{\circ}$ C	4分
1サイクル	4 $^{\circ}$ C	∞

その後、-20 $^{\circ}$ C、遮光保存する。

- ③ サンプルに100 μ lのクロロホルム、100 μ lのフェノール/水/クロロホルム、80 μ lの滅菌水をこの順に加え、ボルテックスで充分に混合し遠心 (12000 rpm、室温、5分)する。
- ④ 上清を新しい0.5 mlチューブに移す。再度、100 μ lのフェノール/水/クロロホルム溶液を加えボルテックスで充分に混合し、遠心 (12000 rpm、室温、5分)する。
- ⑤ 上清がほぼ無色になっていること (PRISM ready mix由来の赤紫色がほとんどなくなっていること)を確認し、上清を角底の1.5 mlチューブに移す。(PRISM ready mixの色が残っていたら、④の操作を繰り返す。)
- 10 μ lの3 M 酢酸ナトリウム溶液、250 μ lのエタノールを加えてボルテックスで混合し、遠心 (12000 rpm、室温、15分)する。
- ⑥ 上清をピペットで除き、300 μ lの70% エタノール溶液でリンスし、-20 $^{\circ}$ Cで遮光保存する。

シーケンス用アクリルアミドゲルの作製

(試薬)

TBE buffer (x10 stock) : Tris	108.0 g
ホウ酸	55.0 g
EDTA-Na ₂	8.3 g
/ L dH ₂ O 孔径0.2 μ mのフィルターで濾過を行って保存し、 使用時にdH ₂ Oで10倍に希釈する。	

(操作)

- ① 尿素 35 g
Acrylamide / Bis (19 : 1) 4.2 g
を32 mlのdH₂Oに30 °C程度に温めて十分に溶解する。
- ② ①の溶液を孔径0.2 μ mのフィルターを用い吸引濾過する。
- ③ 7 mlの10 x TBE bufferを加え12分間吸引脱気を行った後、しばらく冷蔵庫に置いて冷却する。
- ④ 100 mg / 1 ml dH₂Oの過硫酸アンモニウム溶液を600 μ l程度調製する。
- ⑤ ③の溶液を200 mlのビーカーに移し、④の過硫酸アンモニウム溶液を350 μ l加え、スターラーを用いて緩やかに混合する。
- ⑥ 36 μ lのN, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)を⑤の溶液に加え、緩やかに混合して組み立てたゲル板に流し込み、3時間以上静置する。

電気泳動、解析

電気泳動及びデータ解析には373A DNA Sequencing System ver. 1. 2.1 (ABI)を用い、一連の操作は同社のプロトコールに従った。また、決定された塩基配列の解析には、DNASIS Mac version 3.7 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)を用い、ホモロジー検索は、NCBI BLAST Search を使用し、GenBank DNA database、SWISS PROT protein databaseより検索した。また、アミノ酸のアラインメントには Clustal W software (Thompson et al., 1994)を用いた。

3-2-3 相補実験

(プラスミド、菌株)

本章で相補実験に用いたプラスミドをTable 3-1に示す。

DsoABCDEFの各タンパク質を欠失させたプラスミドpASAD~pASFΔの挿入断片をFig. 3-1に示す。ORF内を切断する適当な制限酵素サイトが付着末端を生じる場合 [Fig. 3-1中(blunting)と表示しているもの]は該当する制限酵素で切断した後にT4ポリメラーゼを用いて平滑化、ライゲーションを行い2または4塩基を欠損させた。また、ORF内を切断する適当な制限酵素サイトが平滑末端を生じる場合 [Fig. 3-1中(linker ligation)と表示しているもの]は該当する制限酵素で切断し、間にPstIリンカー(配列GCTGCAGC, 宝酒造)を挿入し、8塩基を増加させた。これら操作により減少、または増加する塩基数は3の倍数ではないことから、mRNAの読み枠がずれてこれら制限酵素サイト以降の同じORF内の遺伝子情報は無効になる。また、pASFΔはSmaIサイト以降を切断して作製した。pASDΔとpASEΔの場合には、pSTV28を最初にKpnIとXbaI処理して末端平滑化、ライゲーションを行うことでpSTV28のマルチクローニングサイトのBamHI、EcoRIサイトを削ったプラスミドを作成し、それにDsoABCDEFをコードする遺伝子断片を挿入して各々の欠失プラスミドを作成した。

DsoABCDEFの各タンパク質ひとつずつをコードするプラスミドpAUA~pAUFの挿入断片をFig. 3-2に示す。

DmpKLMNOPの各タンパク質ひとつずつをコードするプラスミドpAUK~pAUPの挿入断片をFig. 3-3に示す。

ホストには大腸菌MV1184株 (ara, Δ(lac-proAB), rpsL, thi (e80lacZΔM15), Δ(srl-recA) 306::Tn10(tetr)^r/F' [traD36, proAB⁺, lacIq, lacZΔM15]) を用いた。

(操作)

- ① 目的のプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、各々のプラスミドに適当な抗生物質、及びIPTGを加えた2xYT寒天培地に塗布する。この寒天培地からの培養は形質転換より2日以内とし、それ以上経過した菌体は使用せず、新たに形質転換を行う。(活性が低下する場合があるため)
- ② 上記寒天培地より、各々の保持するプラスミドに適当な10 μlの抗生物質stock solutionを添加した5 mlの2xYT液体培地に大腸菌コロニーを植菌し、37 °C、300 strokes / minuteで培養する。
- ③ OD₅₆₀=1 ± 0.2まで培養して(5時間~11時間程度、サンプルごとに異なる)。終濃度1 mMのIPTG (IPTG solution 50 μl) を添加し、3時間、37 °C、300 strokes / minuteで培養する。
- ④ 10 ml分の培養液を遠心 (3000 rpm、常温、10 分)により集菌、1 ml SFMMで2回洗浄、最終的に1 ml SFMMに懸濁する。OD₅₆₀を測定し、OD₅₆₀=20となるよう菌体懸濁液を調整する。
- ⑤ 調整した菌体懸濁液1 mlをバイアル瓶 (14-ml crimp-seal glass vial)に移し、teflon-coated rubber septum及びaluminium crimp sealで密栓する。Septumを通して2 μl [0.2 % (v/v)]のDMSを添加する。バイアル瓶を試験管振盪機に固定し、30 °C、300 strokes / minuteで10時間以上振盪する。
- ⑥ バイアル瓶をそのまま50 ml容のディスポーザブルの遠沈管にいれ、遠心 (4000 rpm、常温、10分)して菌体を沈殿させる。
上清2 μlを直接GC (分析条件は第2章2-2-3に示す)を用いて分析する。

Table 3-1 相補実験で用いたプラスミド

Plasmid	Characteristics or feature	Gene encoded	Source or reference
pUC118	Ap ^r , lacZ ⁺		Vieira and Messing, 1987
pSTV28	Cm ^r , lacZ ⁺		宝海通
pSTV29	Cm ^r , lacZ ⁺ , polylinker of pSTV28 inverted		宝海通
pAU96	Ap ^r , pUC118 with XbaI-SalI insert of <i>Acinetobacter</i> sp. 20B DNA	dsoABCDEF	Honinouchi et al., 1997
pAS96	Cm ^r , pSTV28 with the same insert of pAU96	dsoABCDEF	this work
pAS99	Cm ^r , pSTV29 with XbaI-SalI insert of <i>Acinetobacter</i> sp. 20B DNA	dso BCDEF	this work
pASΔ	Cm ^r , pAS99 recombinant with deletion in <i>BsmI</i> site in <i>dsoA</i>	dsoA CDEF	this work
pASΔ	Cm ^r , pAS99 recombinant with <i>PstI</i> linker in <i>SnaBI</i> site in <i>dsoB</i>	dsoAB DEF	this work
pASΔ	Cm ^r , pAS96 recombinant with deletion in <i>EcoRV</i> site in <i>dsoC</i>	dsoABC EF	this work
pASΔ	Cm ^r , pAS96 recombinant with deletion in <i>BamHI</i> site in <i>dsoD</i>	dsoABCD F	this work
pASΔ	Cm ^r , pSTV28 with XbaI-SalI insert from pAS96 insert	dsoABCDE	this work
pAUΔ	Ap ^r , pUC119 with XbaI-SnaBI insert of pAU96 insert		
pAUB	Ap ^r , pUC119 with XbaI-EcoEV insert of pAU96 insert		
	with deletion in <i>BsmI</i> site in <i>dsoA</i>	dsoB	this work
pAUC	Ap ^r , pUC119 with <i>BglII</i> - <i>BamHI</i> insert of pAU96 insert	dsoC	this work
pAUD	Ap ^r , pUC119 with <i>EcoRV</i> - <i>EcoRI</i> insert of pAU96 insert	dsoD	this work
pAUE	Ap ^r , pUC119 with <i>BamHI</i> - <i>SnaI</i> insert of pAU96 insert	dsoE	this work
pAUF	Ap ^r , pUC118 with <i>EcoRI</i> - <i>SalI</i> insert of pAU96 insert	dsoF	this work
pV261Δ	Ap ^r , pMMB66-based plasmid with <i>BglII</i> - <i>NruI</i> insert of <i>Pseudomonas</i> sp. CF600 DNA	dmpKLMNOP	Nordlund et al., 1990
pUCV261	Ap ^r , pUC118 with pV261Δ insert	dmpKLMNOP	this work
pUCK	Ap ^r , pUC118 with pV281Δ insert	dmpK	this work
pUCL	Ap ^r , pUC118 with pV284Δ insert	dmpL	this work
pUCM	Ap ^r , pUC119 with pV285Δ insert	dmpM	this work
pUCN	Ap ^r , pUC119 with pV287Δ insert	dmpN	this work
pUCO	Ap ^r , pUC119 with pV288Δ insert	dmpO	this work
pUCP	Ap ^r , pUC118 with pV221Δ insert	dmpP	this work

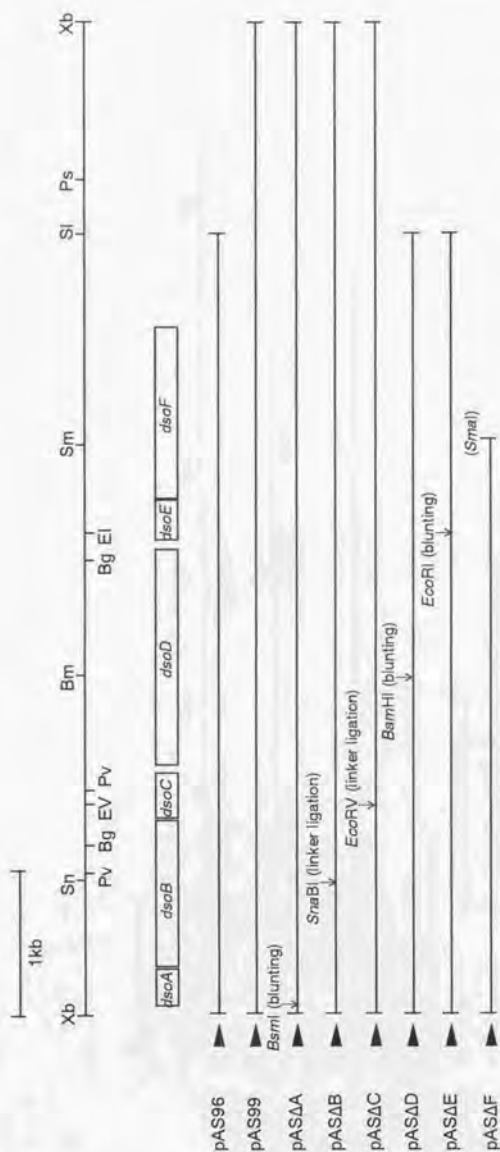


Fig. 3-1 各タンパク質をコードするORFをひとつずつ破壊したプラスミドのコードする領域と破壊した部位

各遺伝子はその中に存在する制限酵素サイトを利用して読み枠をずらして破壊した。

▲はベクターのlacプロモーターの向きを示す。

ORF内を切断する適当な制限酵素サイトが付着末端を生じる場合 [Fig. 3-1中 (blunting) と表示しているもの]

: 該当する制限酵素で切断した後14ポリメラーゼを用いて平滑化、ライゲーションを行い2または4塩基を欠損させた。

ORF内を切断する適当な制限酵素サイトが平滑末端を生じる場合 [Fig. 3-1中 (linker ligation) と表示しているもの]

: 該当する制限酵素で切断してPstIリンカー (配列GCTGCAGC, 宝酒造) を挿入することで8塩基を増加させた。

pASΔFはSmaIサイトを以降を切断して作製した。

Bgl, BglII, Bm, BamHI, Ecl, EcoRI, EV, EcoRV, PstI, PstII, Pv, PvuII, Sli, Sall, Sm, SmaI, SnaBI, Xba, XbaI

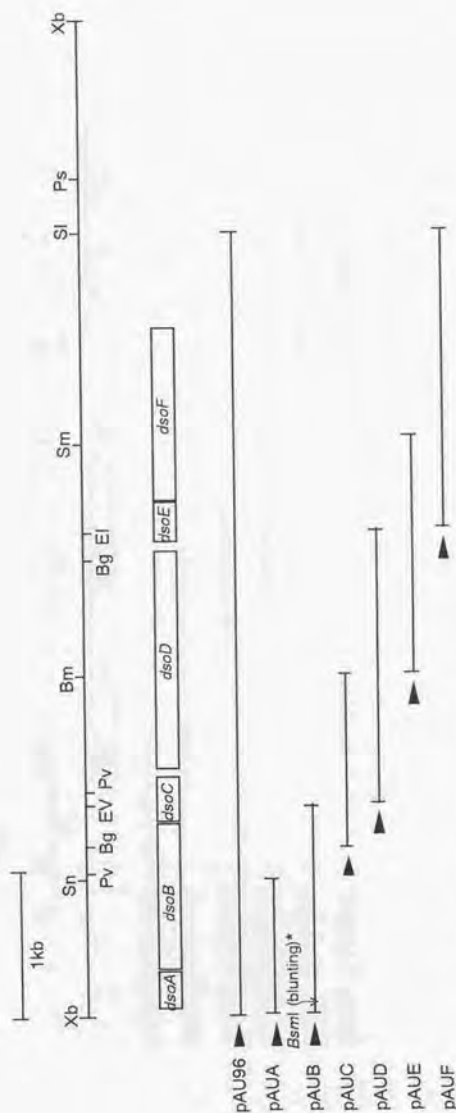


Fig. 3-2 DsoABCDEFの各タンパク質をそれぞれコードするプラスミドの挿入断片

▲はベクターの*lac*プロモーターの向きを示す。

*DsoBをコードするpAUBのみ、DsoABをコードするプラスミドからDsoAをpASAD作製時と同様の方法で欠失させて作成した。
Bg: BglII, Bm: BamHI, EI: EcoRI, EV: EcoRV, Ps: PstI, Pv: PvuII, Sm: SmaI, SI: SnaBI, Xb: XbaI

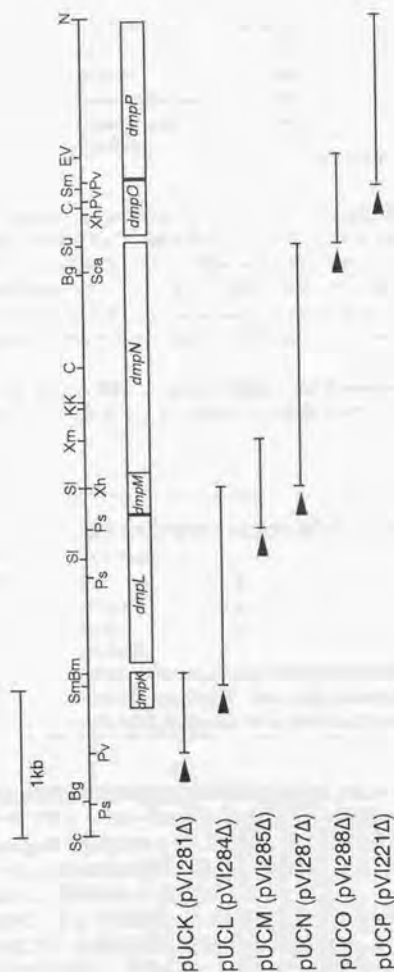


Fig. 3-3 DmpKLMNOPの各タンパク質をそれぞれコードするプラスミドの挿入断片

かっこ内は各々のプラスミドを作製する際に用いた分譲いただいたベクター(広宿主域ベクターpMMB66EH/HE由来のベクター)を示す。これらベクターのマルチクロニングサイトのEcoRI、HindIIIサイトを利用してpUC118/119に組み換えたので、対応するベクターは全く同じ挿入断片を含んでいる。

▲はpUC118/119のlacプロモーターの向きを表す。

Bg: BglII, Bm: BamHI, C: ClaI, EcoRV: EcoRV, K: KpnI, N: NruI, Pst: PstI, Pvu: PvuII, Sc: SacI, Sma: SmaI, Sfi: SfiI, Su: SmaI, Xho: XhoI, Xma: XmaI

3-2-4 タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE)

大腸菌からのタンパク質の調製、泳動用サンプルの調製

(試薬)

Protein assay kit (Bio-Rad)

2×SDS sample buffer : 0.125 M Tris-HCl (pH6.8)

SDS	1.6 g
glycerol	8 ml
2-mercaptoethanol	0.8 ml
bromophenol blue	4 mg
/ 40 ml (dH ₂ O)	

(操作)

- ① 大腸菌をSFMMに懸濁し、sonicationにより破碎する。Sonicationは、BRANSON社のsonicatorを用い、プログラムM1、目盛り3.5で、菌体懸濁液が30℃以上にならないように行った。
- ② 遠心(15000 rpm、4℃、30分以上)により細胞残さを除去する。
- ③ 上清の可溶性画分を新しいチューブに移し、適当に希釈の後、protein assay kitを用いてタンパク質を定量する。[サンプル800 µlに対し、protein assay kit 200 µlを加えてボルテックスで良く混合し、1時間以内にOD₅₉₅を測定し、同様の手順で測定した標準(bovine serum albumin, BSA)のOD₅₉₅との比較で定量する。]
- ④ タンパク質溶液を2 µg / µlに調製し、液量と同量の2×SDS sample bufferを加えて5分間煮沸処理して、電気泳動用のサンプルとする。すぐ使用しない場合は-20℃で保存する。

SDS-PAGE

(試薬)

ゲル : MINI-PROTEAN II READY GELS J (stacking gel 4%, resolving gel 10-20%) (Bio-Rad)

電気泳動用 buffer : Tris 3 g
glycine 14.4 g
SDS 1 g
/ L dH₂O

染色液 : 0.25% (w/v) coomassie brilliant blue R250,
30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid

脱色液 : 30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid

(操作)

タンパク質の電気泳動にはBio-Rad社のミニSDS-PAGEシステム(泳動槽: MINI-PROTEAN II

1-Dセル、パワーサプライ: パワーバック300、ゲルエアードライヤー)を用いた。

- ① 10-20%のgradient gelを泳動槽にセットして1ウェルあたり20 µlのサンプル(含まれるタンパク質は20 µg)をチャージし、200 Vの定電圧で45分間電気泳動を行う。
- ② ゲルを染色液に浸し、1時間ゆっくり振盪する。
- ③ ゲルを脱色液に移し、ゆっくり振盪する。脱色液の色素の濃度がゲルの色素の濃度と同じくらいになったら脱色液を交換して、背景がほぼ透明になるまで脱色する。
- ④ セロファンの間にゲルを挟み、ゲルエアードライヤーで乾燥させる。

3-2-5 DsoABCDEFのフェノール類に対する酸化活性の検討

(試薬)

Methaneboronic acid / ビリジン溶液 : Methaneboronic acid 50 μ g / 25 μ l ビリジン
基質として用いたフェノール類の構造をFig. 3-4に示す。

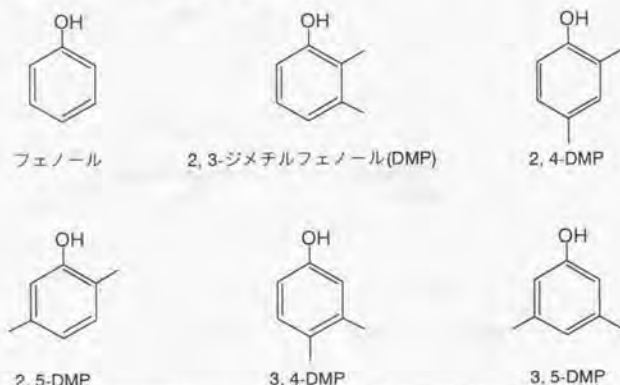


Fig.3-4 DsoABCDEFのフェノール類に対する酸化活性の検討に用いたフェノール類

(操作)

- ① アンピシリン (100 mg / l) 、 IPTG (200 mM) を添加した100 mlの2xYT坂口フラスコ培地で、各々のプラスミドを保持する大腸菌MV1184株を37 °C、120 strokes / minuteの条件でOD₅₆₀=2±0.2まで培養する。
- ② 50 mlチューブ2本に菌体进行し、遠心(3000 rpm、4 °C、10分)により集菌、25 mlリン酸bufferで2回洗浄して培養液100 ml分を50 mlのSFMMに懸濁する。(後に基質溶液と等量混合したときOD₅₆₀≒2となる。)
- ③ 基質溶液はエーテル溶液5 mg / 100 μ lを作製し、フィルター濾過により滅菌する。2.5 mlの滅菌済みSFMMをガラスチューブにいれ、100 μ lの基質溶液を添加したのち60 °C、20分のオートクレーブ処理によりエーテルを除去する。これに菌体懸濁液2.5 mlを加えてシリコン栓で密閉し、30 °C、300 strokes / minuteの条件で10時間以上振盪する。[基質濃度は終濃度5 mg / 5 ml 反応液 (0.1% w/v)]
- ④ 反応液に塩酸約2滴を添加して酸性とし、5 mlの酢酸エチルを用いてボルテックスにより抽出する。遠心エバポレーターを用いて酢酸エチル相を回収する。
- ⑤ 分析に供するサンプルは以下のいずれかの処理を行った。
 1. 無処理
 2. トリメチルシリル(TMS)化 : *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamideを用いて70 °Cで30分処理する。
 3. メタンボロネート化 : 蒸発乾固したサンプルをmethaneboronic acid / ビリジン溶液に溶解して65 °Cで30分処理する。

- ⑥ GC-MSにより分析する。

(GC-MS分析条件)

Column : Fused silica capillary column DB-5 (0.253 mm i.d.x15 m, 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific)
Column temperature : 60 °C 2 min. (isothermal hold)
4 °C / min. (increase) to 72 °C
16 °C / min. (increase) to 280 °C
280 °C 2 min. (isothermal hold)

ここに書いていない条件は2章 2-2-3、硫黄化合物の分析条件と同様である。

3-2-6 DsoABCDEFの各種硫黄化合物に対する基質特異性の検討

(試薬)

リン酸buffer : 50 mMリン酸buffer, pH7

基質として用いた硫黄化合物の構造をFig. 3-5に示す。

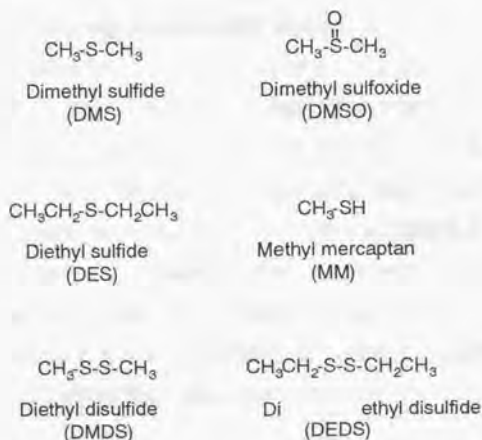


Fig.3-5 DsoABCDEFの基質特異性の検討に用いた硫黄化合物

(操作)

- ① アンピシリン (終濃度100 mg / l) 、 IPTG (終濃度200 mM) を添加した10 mlの2xYT試験管培地で各々のプラスミドを保持する大腸菌JM109 株を37 °C、300 strokes / minuteの条件で培養する。
- ② OD₅₆₀=2±0.2まで培養後、培養液5 mlを気密性の高いプラスチックチューブ(丸底スピッツ、岩城硝子株式会社)に移し、遠心 (3000 rpm、室温、10分)により集菌する。
- ③ 5 mlのリン酸bufferで2回洗浄し、5 mlのSFMMに懸濁する。
- ④ 菌体懸濁液に10 μl [0.2% (v/v)]の基質とする硫黄化合物を加え、30 °C、300 strokes / minuteの条件で10時間以上反応させる。
- ⑤ 反応液1 mlを1.5 mlチューブに移し、遠心 (15000 rpm、4 °C、10分)して菌体を除去する。
- ⑥ 上清1 μlを直接GC-MS、及びGC (いずれも分析条件は2章 2-2-3に示す)で分析する。

3-3 結果

3-3-1 20B株のゲノミックライブラリーの構築とインジゴ生成クローンの取得

第2章において取得したDMS資化菌*Acinetobacter*属細菌20B株のDMS酸化酵素が、インドールの酸化も触媒するとの仮定のもとに、20B株のゲノミックDNAライブラリーからインジゴ発色を有する大腸菌形質転換株の取得を試みた。

20B株のtotal DNAをpUC119のマルチクローニングサイトを切断する10種の制限酵素をそれぞれ別個に用いて切断し、断片のサイズ確認のための電気泳動を行った。酸化酵素をコードする遺伝子は3 kb以上の長さのものが多くことから、電気泳動の結果より3~10 kbに切断された断片の最も多く得られるEcoRI、PstI、XbaIを選択し、これらをそれぞれ用いて20B株のtotal DNAを処理した。得られた制限酵素処理済みDNAをpUC119の各サイトにligationし、大腸菌JM109株を形質転換後、2xYT寒天培地(アンピシリン、IPTG、X-gal添加)に塗布した。その結果、XbaI処理を行ったライブラリーから、2個のインジゴ色を呈するクローンを取得できた。便宜上、この2個をA、Bとする。各コロニーのインジゴ発色は強く、Fig. 3-6に示すようにプレート上で容易に判別できた。

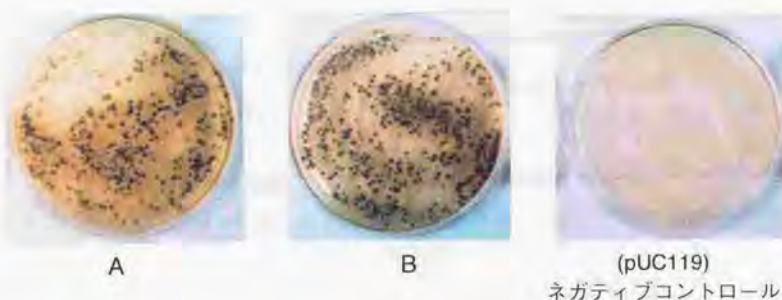


Fig. 3-6 取得されたインジゴ発色を示す大腸菌形質転換株

3-3-2 取得したインジゴ発色を示すクローンのDMS酸化活性

得られた2個のインジゴ生産大腸菌形質転換株A、Bと、ネガティブコントロールとしてpUC119を保持する大腸菌JM109株を、アンピシリンとIPTGを加えた2xYT培地で培養してDMSを基質に休止菌体反応を行った。反応液をGCを用いて分析した結果、多量のDMSOの生成が認められたことから(Fig. 3-7)、取得された酵素遺伝子のコードする酸化酵素はインドールと共にDMSの酸化も触媒することが明らかとなった。

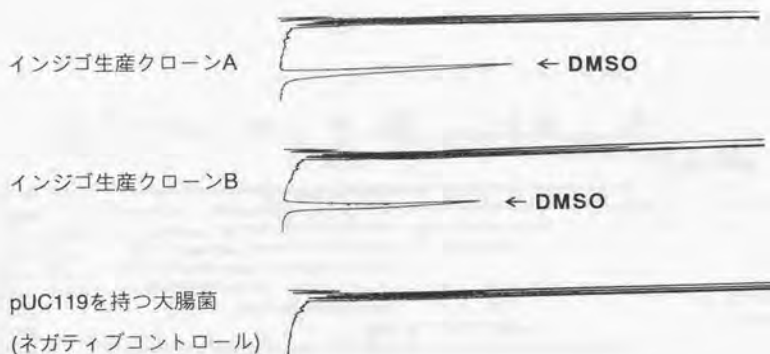


Fig. 3-7 DMSを基質とした休止菌体反応液の分析結果

3-3-3 DMS酸化酵素遺伝子の制限酵素地図とデリージョンミュータントの酸化活性

取得された遺伝子の以降の解析のため、制限酵素地図の作成を行ったところ、取得されたDMS酸化能を有する2個のクローンA、Bの保持するプラスミドには同一の断片が同じ向きで含まれていることが明らかとなったので、このプラスミドをpAU99と命名した。挿入断片の全長は約6.8 kbであり、この断片がpUC119の*lac*プロモーターと逆向きに挿入されているプラスミドpAU99R (Fig. 3-8)の場合にはごくわずかなインジゴ生成、DMS酸化活性しか確認されなかったことから、この酵素遺伝子の転写はpUC119の*lac*プロモーターに依存しているものと推測された。制限酵素による切断パターンから推測されたpAU99挿入断片の制限酵素地図と作製したデリージョンプラスミドのコードする遺伝子の範囲、及びそれらを保持する大腸菌のインジゴ発色及び休止菌体反応によって確認されたDMS酸化活性をFig.3-8にまとめた。インドール酸化活性及びDMS酸化活性を有していたのは約5.3 kb *Xba*I ~ *Sal*I断片を持つpAU96、及びpAU96の挿入断片を含む約6.0 kb *Xba*I ~ *Pst*I断片を持つpAU94を保持する大腸菌のみであり、インドール酸化活性と、DMS酸化活性は相関していた。

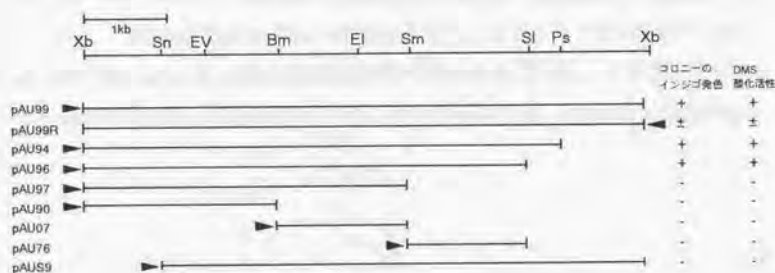


Fig. 3-8 取得された遺伝子断片の制限酵素地図、作製した各デリージョンミュータントとそのDMS酸化活性、インドール酸化活性
 Bm: *Bam*HI, El: *Eco*RI, EV: *Eco*RV, Ps: *Pst*I, Sl: *Sal*I, Sma: *Sma*I, Sna: *Sna*BI, Xb: *Xba*I
 ▶ はpUC118 / 119の*lac*プロモーターの向きを表す。

3-3-4 DMS酸化酵素遺伝子の塩基配列の決定と解析

活性に必須であることが明らかとなった約5.3 kbのXbaI~SalI断片(pAU96インサート)を分割してpAU90、pAU07、pAU76の3種のデリーションプラスミドを構築し(Fig. 3-8)、この領域の塩基配列の決定を行った。3つの挿入断片それぞれについて両鎖を各々2回以上シーケンスし、3つの断片の接続点については付近の配列をもとに作製した20 bp程度の合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて配列を決定し(Fig. 3-9中、下線で示した2箇所に相補的なプライマーを用いて矢印の示す方向へ配列を決定した)、デリーションプラスミド作製の際に用いた制限酵素のサイトが近接していないことを確認した。決定したDMS酸化酵素遺伝子の全塩基配列をFig. 3-9に示す。解析の結果、6個のORFと思われる領域が見出された。これらORFの推定アミノ酸配列について、SWISS PROT protein databaseから相同性を示す配列の検索を行ったところ、MopKLMNOP、DmpKLMNOPをはじめとするマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼとの高い相同性が見出されたので(推定アミノ酸配列のidentityを、Fig. 3-10中の遺伝子構造の下に示す)、ORF1, 2, 3, 4, 5, 6をそれぞれ*dsoA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*と命名した。*dsoABCDEF*はフェノールヒドロキシラーゼをコードする*mopKLMNOP* (Ehrt et al., 1995)、*dmpKLMNOP* (Nordlund et al., 1990)、トルエンモノオキシゲナーゼをコードする*tbmABCDEF* (Johnson and Olsen, 1995)等とは遺伝子構造も非常に類似しており、オキシゲナーゼ遺伝子全体の遺伝子構造は異なるトルエンモノオキシゲナーゼ*tbuA1UBVA2C* (Byrne et al., 1995)、*tmoABCDEF* (Yen et al., 1991)、メタンモノオキシゲナーゼ*mmoXYZorfyC* (Stainthorpe et al., 1990; Cardy et al., 1991)等とも相同性を示した。

1 TCTAGAGCAAACCTAGTACATGAGCATGAAGCTCTACATCGAAATGTTTTGATGTTGAT 60
 61 AAAAGGATAAGCACATGATTGACGCTAAACAGCCTACCGCATTGGTCAAATATATCCGTA 120
 (DsoA) M I D A K Q P T A L V K Y I R 15
 121 TTAAGGGTGAAGCGAATGCCAAATTTGTCGAGTTCGATTTTGCCATTCAAGACCCCTACGC 180
 16 I T G E R N A K F V E F D F A I Q D P T 35
 181 TTTTGTGAACTGATTCTCCCCCAACAAGCTTCCAGCATTGTTGAAATTAATCATG 240
 36 L F V E L I L P Q Q A F Q H F C E I N H 55
 241 TCATTGAAATGACCGCAGAACACAAGCTTGGACGATGCGCAGGAAGATAAATGGCGTT 300
 56 V I E M T A E Q Q A W N D A Q E D K W R 75
 301 ATGGCATTGAACCGACTGTTTTAAATCATGCTCGCCAACATTCTGATCAAGACGATCAGG 360
 76 Y G I E P T V L N H A R Q H S D Q D D Q 95
 361 CTTAATTCTACAAGGAGAAGCTAATGACTTTAGAAATTAACATCCAATTTGGAAACCGA 420
 96 A * (DsoB) M T L E I K T S N L E P 12
 421 TTCGTGAGACTTATGCGTATATCGAACGCCGTTTTGGAGCCCAAGCCGCAACACGCTACC 480
 13 I R Q T Y A Y I E R R F G A K P A T R Y 32
 481 AAGAAGTCAGCTTTGATATTCAAGCTTCGACAACTTCACTATCGCCCTTGTGGAAGC 540
 33 Q E V S F D I Q A S T N F H Y R P L W K 52
 541 CAGACAAAACCTTAAATGATAAAACCCATACGGCTTTGCAAAATGCAAGATTGGTATGCAT 600
 53 P D K T L N D K T H T A L Q M Q D W Y A 72
 601 TTAAGACCCCTCGCCAATTTTATTACGGTGCTTATGTGCAACATCGTGCACGCTGCAAG 660
 73 F K D P R Q F Y Y G A Y V Q H R A R L Q 92
 661 ATACCGCTGAAAGTCATTATGCTTTTTTGAACAACTGTCAGTTGGTCAATAATCTCAGTG 720
 93 D T A E S H Y A F F E K R Q L V N N L S 112
 721 ATGAAGTGAACAAAAATCATCCAGCGTTTATTACCTTTTCGCTATGTGCAACAAACAG 780
 113 D E V K Q K I I Q R L L P F R Y V E Q T 132
 781 CCAACTTACATATGATGTCAGGCAAGTGCCTATGGTTATGGCACTGTCTACCCCAAGCAT 840
 133 A N L H M M S G S A Y G Y G T V I T Q A 152
 841 GTATTTTTCAGCAATGGATCGTCTCGGTATGGCGCAATACATTTACGTATTGGCTTAA 900
 153 C I F A A M D R L G M A Q Y I S R I G L 172
 901 TCCTCGATGGCAATACAGGTGAATCATTACAGCAAGCCAAACAGCTTGGCTAAATGATG 960
 173 I L D G N T G E S L Q Q A K H A W L N D 192
 961 AAACCTGGCAACCTTACGTAAACTTTGTGAACAAAGCCTAACCGAACAAGACTGGTTCA 1020
 193 E T W Q P L R K L C E Q S L T E Q D W F 212
 1021 AACCTTACATTCTGCAAAATCTGTTGATTGACAGCATGTTACAAGAGCTGGTTTTGGAC 1080
 213 K L Y I L Q N L L I D S M L Q E L V F G 232
 1081 AGCTGGATGAATGGCTGGTTGAAATGGCGGGCGTGATATTGCCATTCTTACTGAATTTA 1140
 233 Q L D E W L V E N G G R D I A I L T E F 252
 1141 TGAAGGACTGTTTAACTGATTAGCGAAGTGGTCAGACAGTGTGTTTAAACATGCGATTT 1200
 253 M K D C L T D L A K W S D S V L K T A I 272
 1201 CAGAATCTGAAGACAATAAACCCCTGATTCAATCATGGATCAGGAATTACTACCCCAAG 1260
 273 S E S E D N K T L I Q S W I T E L L P Q 292
 1261 TTAACAAGCATTAGTCTTGGGCACAAACCGCACTGACGGATTGAGGATGATTTCAG 1320
 293 V K Q A F S A W A Q T A L T D S G I D S 312

Fig. 3-9 → Continued

1321 GTCTAAATAAGATCTCTGAACGTAGCAAAAAAGCCGGCACCATTCTTACTCGATTAGCAG 1380
 313 G L N K I S E R S K K A G T I L L D L A 332
 1381 CATAAGGATTGCGCATCATGACCTCTAAAGTTTATTTAGCATTGCAAGCAATGACACTT 1440
 333 A * (DsoC) M T S K V Y L A L Q D N D T 14
 1441 CACGCTACATCATTTGAAGCGATTGAACAGGACAATCCTCAAGCAACAATTCAATATCTTC 1500
 15 S R Y I I E A I E Q D N P Q A T I Q Y L 34
 1501 CCGCGATGATTCCGGGTCGAAAGCACTGGCGAGCTGGTGGTACGTGCAGAAACAGTATCAG 1560
 35 P A M I R V E S T G E L V V R A E T V S 54
 1561 AAAAAGCTGGGCAAACTGGGATATCCAAGAACTACAACCTCAACATGATTACCTGGGGT 1620
 55 E K L G Q N W D I Q E L Q L N M I T L G 74
 1621 GCAATGTTGATGAAGATGATGACAGTTTACCTTGAAGTGAAGTAAGCCGTACTTCCCC 1680
 75 G N V D E D D D S F T L K W N * 89
 1681 TAGATTAAAGCATAAATAGCAGGCGAGCTGCATGTAAGTTAAAGGATGATCAAAATGAAT 1740
 561 (DsoD) M N 2
 1741 AGCCAAGCCAAAGTAAACAATAAAAAAGCTCAATGCCAAAGAACGTTATCGGATACTCACC 1800
 3 S Q A K V N N K K L N A K E R Y I L T 22
 1801 CGTGATCTAGATTGGGACTTTTCTATGCAGATCGTAAAGATGCCTTTCCGTATGAAGAG 1860
 23 R D L D W D F S Y A D R K D A F P Y E E 42
 1861 TTTGAAGGCATCAAAATTACCGACTGGTCGAAATGGGAAGATCCTTTCCGTTAACCATG 1920
 43 F E G I K I T D W S K W E D P F R L T M 62
 1921 GATAACTATTGGAAATACCAAGCAGAAAAAGAAAAGAGCTATATGCCATTTTGTATGCT 1980
 63 D N Y W K Y Q A E K E K K L Y A I F D A 82
 1981 TTTGCACAAAACATGGGCAATGAATGTTTCAACGAACTTATGTCAATGCGATTAAA 2040
 83 F A Q N N G Q M N V S N E R Y V N A I K 102
 2041 TTATTTTAAACGGCAGTAACCTCGCTTGAGTATCAAGCTTACCAAGGCTATGCCCATGTT 2100
 103 L F L T A V T P L E Y Q A Y Q G Y A H V 122
 2101 GGGCGTCAGTTCACTGGCATTGGTGCAGTATCGCCTCGCAATGCAATCCATTGATGAA 2160
 123 G R Q P S G I G A R I A S Q M Q S I D E 142
 2161 TTACGTCATGTACAAACCCAGATTTCATGCGATGAGCCATTACAACAAGTTCTTTGATGGC 2220
 143 L R H V Q T Q I H A M S H Y N K F F D G 162
 2221 TTCCAAGACTGGGCACATATGCATGACCGTGTCTGGTACTTGTCTGTACCTAAATCATTC 2280
 163 F Q D W A H M H D R V W Y L S V P K S F 182
 2281 TTTGAAGATGCACGTTTCAGCGGGGCTTTTGTAGTTTATTTAGCAATCAGCTTTGCCCTT 2340
 183 F E D A R S A G P F E F L L A I S F A F 202
 2341 GAATATGCTCACTAACTTATTGTTTCGTTCTTTCATGTCGGGAGCAGCTTACAACGGT 2400
 203 E Y V L T N L L F V P P M S G A A Y N G 222
 2401 GATATGCAACCGTAACATTGGCTTTAGTGCACAATCAGACGAAGCAGCCACATGACG 2460
 223 D M A T V T F G F S A Q S D E A R H M T 242
 2461 CTAGGACTGGAATCGTAAATTTCTTACTGGAACAGCAGCAAGATAATGTGCCAATCGTA 2520
 243 L G L E I V K F L L E Q H E D N V P I V 262
 2521 CAAGAATGGATTGATAAATGGTTCTGGCGAGGAAGTGCCTGCTGTCATTGTCGGTATG 2580
 263 Q E W I D K W F W R G T R L L S I V G M 282

2581 ATGATGGATTACATGTTGCCAAATAAAGTCATGTCATGGAAGAAGCTTGGGAACTTAT 2640
 283 M M D Y M L P N K V M S W K E A W E T Y 302
 2641 TTTGAAGAAGCAGGTGGTGCTTTGTTTAAAGACTTAAGTCGCTACGGGATCCGTATGCGG 2700
 303 F E E A G G A L F K D L S R Y G I R M P 322
 2701 AAATATAGTGAAGTGATTAGCAAAGAGAAACATGTTTCGCATCAAGCATGGTGGATT 2760
 323 K Y S E V I S K E K E H V S H Q A W W I 342
 2761 TTCTATAACTTCGGTTCATGAGCAGGCTTCCATACGTGGATTCCAACAGATGAGGAAATG 2820
 343 F Y N F G H A A G F H T W I P T D E E M 362
 2821 GATTGGCTCTCAGAAAAATACCCGTGACACGTTTGATAAATACTACCGCCACGTTGGGAA 2880
 363 D W L S E K Y P D T F D K Y Y R P R W E 382
 2881 CTTGCTCGAAAAATGGAAGCTGAAGGTAAACGCTTCTATAGCGCGGGTTTACCTCAATTG 2940
 383 L A R K M E A E G K R F Y S A G L P Q L 402
 2941 TGCCAAGTATGCCAAATTCCAATGACCTTTACAGAAATGGATGGCGACCAACACTATT 3000
 403 C Q V C Q I P M T F T E M D G D P T L F 422
 3001 AGCTATCGTGATTCAATTTACAAAGATGAGCGTTATCACACTTGCTCTGATGGTTGTCAT 3060
 423 S Y R D S I Y K D E R Y B T C S D G C H 442
 3061 GACATTTTTGAACGCGAACCTGAGAAATACATCCAAGCGTGGTTGCCTGTACATCAAAT 3120
 443 D I F E R E P E K Y I Q A W L P V H Q I 462
 3121 TTGCAGGGTAACGTGGTGGTCCAGATTAGAAAGTATTTAAAGGATTACTACAACCTT 3180
 463 L Q G N C G G P D L E S I L R D Y Y N F 482
 3181 AATGTCGGTGCAGACAATCTCGATATTGAAGGTTTACCTGACCAACAGCGCTGGAAAAA 3240
 483 N V G A D N L D I E G S P D Q R W K K 502
 3241 TGGAAAGGCAACGCGAGCTTAAACCTCATCCAAAAATTA AAAAATAAGCAATGGATGTTG 3300
 503 W K G N A A * 508
 3301 TCTAATTCGACAGCATCCGCTCAAGGATTATTCAAAGTTTAAAGGAAATACACCATGAC 3360
 (DsoE) M T 2
 3361 TGTACAAGCGATTGTTGAAAAATATCAATTTGAACCACTAGATCTACAACAAAAATTACGG 3420
 3 V Q A I V E K Y Q F E P L D L Q R N Y G 22
 3421 CGAAACATGTTGTTGTTTATTGGTTGGGATCATCACCCCTATTTTGTTCGGCACATGC 3480
 23 E N M L L F I G W D H H T L F C S A H A 42
 3481 TTTTGTGGTTTCACCAAAACAAAGCTTACAAGCCTTGATCGATGGACAAATTCAGCGGG 3540
 43 F V V S P K Q S L Q A L I D G Q I Q A G 62
 3541 TTTTGTAGCAACATCCCGATTTTAAACATATTGATTGGTCTAAAGTTGAATTCGGTTTAA 3600
 63 F E Q H P D F K H I D W S K V E F R L N 82
 3601 CCGCAAGCTTTTACAGGCTGATTTTCTAAGTCCCTAGAAGATTGGGTTTGTATCATA 3660
 83 R K L L Q A D F S K S L E D L G F D H K 102
 3661 ATCTCTCCTCGCGCTTTGTAAACGCTGATCTAACGGGTACCAAGGCACACATGTTTAAAG 3720
 103 S L L R F V T P D L T G Y Q G T H V * 120
 3721 AGAACACAGATGAGCTCAAGTCACGATTGAACAGCAGGAACCATCATCAAGTTGAA 3780
 1 (DsoF) M S Y Q V T I E P A G T I I Q V E 17
 3781 GAAGATCAAACCTTTTATAGTCAGCATTCGCTCAAGGTGTTTGGTTGCCCTTTGCTTGC 3840
 18 E D Q T I L D A A L R Q G V W L P F A C 37
 3841 GGACATGGCACTTGTGGTACATGTAAAGTTCAAGTCACAGACGGTTTTATGATGTTGGT 3900
 38 G H G T C G T C K V Q V T D G F Y D V G 57

```

3901 GAAGCCTCACCTTTTGGCGCTTATGGACATTGAACGTGAAGAAAATAAAGTGTGGCTTGT 3960
58 E A S P F A L M D I E R E E N R V L A C 77

3961 TGTTCGAAGCCGAATCTGACATGGTCATCGAAGCTGATGTGGATGAAGACGAGGATTTC 4020
78 C C K P E S D M V I E A D V D E D E D F 97

4021 TTAGGCTATTAGTCCAAAGACTACCAAGCCAAAGTCATTGAAAATAACGGATTATCGCCG 4080
98 L G Y L V Q D Y Q A K V I E I T D L S P 117

4081 ACGATTAAAGGTGTTTCGACTTCAACTTGATCGACCAATGCAATTTCAAGCAGGCCAATAC 4140
118 T I K G V R L Q L D R P M Q P Q A G Q Y 137

4141 ATCAATATCCAACCTCCCAATATTGAAGGAACCCGGGCATTTTCAATCGCCAATACACCG 4200
138 I N I Q L P N I E G T R A F S I A N T P 157

4201 AGCGAAGCAAATCTGATCGAATTACATATTCTGTAAGTGAAGGGGGTCTGCAACACGC 4260
158 S E A N L I E L H I R K V Q G G A A T R 177

4261 TATGTGCATGATGAAGTGTGAGTGTGGTGAAGAAATGGCGCTTTCAGGACCTTATGGACAA 4320
178 Y V H D E L S V G E E M A L S G P Y G Q 197

4321 TTTTTTGGCGTAAGTCTGATCAGCAAAATGTCTTTTTCATTGCAAGGTGGTTCAGGTCCT 4380
198 F F V R K S D Q Q N V I F I A G G S G L 217

4381 TCAAGCCCTCAATCGATGATTCTGGATCTTTTAGAACAAGGTGACACCCGTATCATTAT 4440
218 S S P Q S M I L D L L E Q G D T R I I Y 237

4441 TTGTTCCAAAGGTGCACGGGATGTTGCTGAATTATATAACCGTGAAAAATTCGAACAGCTT 4500
238 L F Q G A R D V A E L Y N R E K F E Q L 257

4501 GTCAAAGAATATCCAAATTTTCAGATACATCCCTGCTTTAAATGCGCCTAAGCCAGAAGAC 4560
258 V K E Y P N F R Y I P A L N A P K P E D 277

4561 CAATGGACAGGGTTTACAGGCTATGTACATGAAGCGGTGCGCAATTATTTTGAATAAAA 4620
278 Q W T G F T G Y V H E A V A N Y F E N K 297

4621 TGCAGTGGGCACAAAGCATATTTATGTGGCCCGCCACCGATGATGATGCCGCCATCTCC 4680
298 C S G H K A Y L C G P P P M I D A A I S 317

4681 ACCTTGATGCAAGCCGCTTTATTTGAAAAAGACATCCATACCGAACGCTTTTAAAGTGGC 4740
318 T L M R S L P E R D I H T E R F L S G A 337

4741 GCAGATGGTGCAATGGGCAATCACGTTCCGGCACTTTTAGACACATCTAAAGTTGAGTG 4800
338 A D G A N G Q S R S A L F R H I * 353

4801 GTTGAACCTTAAATTATCCAATATACCAACACCAGCGTGAGTGATCTGCACCGATTCCA 4860
4861 GATCGCTCTCAAGATACTCATGCGCAATATCATATCAATCAAAGGAAGATGATGATGAA 4920
4921 TAGACAACAAATCGATAGCCTCGTTCAGCAATGAATGTCGCGACAGCAACAGGTGAAGT 4980
4981 CAATCTGCGTGTTCAGCAAAATCGTTGTTCTGTTTACTTGGTGATTTATTCGAAGCCATTGA 5040
5041 AGACTAGATATGCTCTAAACCGAGCTTTGGAAAGGCTTAGAATATTTGACAGATGCAAG 5100
5101 TCAAGCCAAATGAAGTGGGACTTTTGGCAGCAGGTCTCGGGCTAGAACATTACTTAGATT 5160
5161 ACGTGCAATGAAGCAGATACTAAAGCCGGTATTACAGGTGGGAACACCACGAACATTTGA 5220
5221 AGGACCGCTTTATGTTGCAAGTGCAGCTGAGTCCGTTGGCTTTGCTCGTATGGATGATGG 5280
5281 CTCTGAATCTACGCACGTCGATGCCCTTAATCATTGAAGGCATTGTACAGACACTGCTGG 5340
5341 ACAGATTATCCCAATCCAAAGTAGAAATCTGGCAGCGCAACAGTTTAGGCAACTATTC 5400
5401 ATCTTTGATAAATCTCAGTCTGCATTAAATTTACGCCGCAGTATTTTACCAGTACACA 5460
5461 AGGTCAATATATCGCTCAAACCCACCATGCGTGTGCGTTATGGCTGTCCACCTGAAGGTAC 5520
5521 AACACAAGCTTTACTCAATTTGTTGGGTCGAC 5552

```

Fig. 3-9 pAU96インサートの全塩基配列と*dso*ABCDEFの推定アミノ酸配列

下線はSD配列(Shine and Dalgarno, 1975)と推定される配列を示す。二重下線は塩基配列決定の際にプライマーとして用いた配列を、矢印はそのプライマーを用いた塩基配列決定の際の伸長反応の向きを示している。

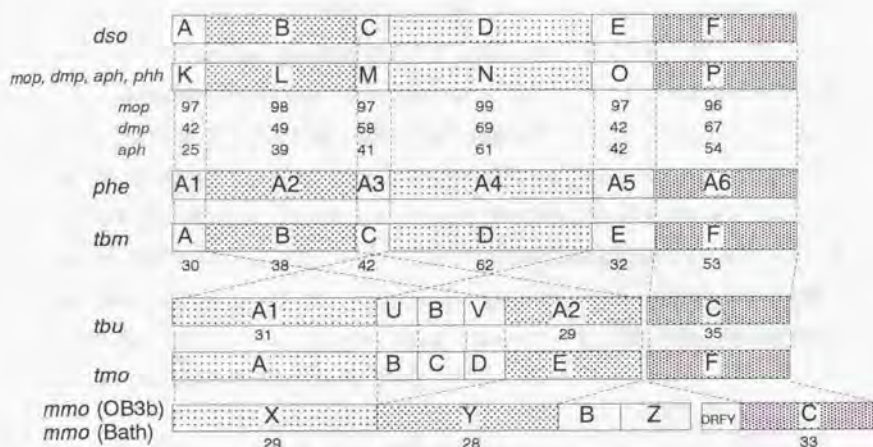


Fig. 3-10 *dsoABCDEF*遺伝子群と相同性を有するmulticomponent monooxygenase 遺伝子群の遺伝子構造とアミノ酸レベルの相同性 (identity)

各遺伝子の下の数字は対応するDsoABCDEFコンポーネントとのアミノ酸レベルの相同性(identity, %)を示す。

- MopKLMNOP : phenol hydroxylase (*A. calcoaceticus* NCIB8250) (Ehrt et al., 1995) (accession: Z36909)
DmpKLMNOP : phenol hydroxylase (*Pseudomonas* sp. CF600) (Nordlund et al., 1990) (X80765)
AphKLMNOP : phenol hydroxylase (*Comamonas testosteroni* TA441) (Arai et al., 1998) (AB006479)
PhhKLMNOP : phenol hydroxylase (*P. putida* P35X) (Phhet al., 1994) (X79063)
PheA1A2A3A4A5A6 : phenol hydroxylase (*P. putida* BH) (Takeo et al., 1995) (D28864)
TbmABCDEF : toluene-2-monooxygenase (*Pseudomonas* sp. JS150) (Johnson and Olsen, 1995) (L40033)
TbuA1UBVA2C : toluene-3-monooxygenase (*P. pickettii* PKO1) (Byrne et al., 1995) (U04052)
TmoABCDEF : toluene-4-monooxygenase (*P. mendocina* KR1) (Yen et al., 1991) (M65106)
MmoXYBZorYC : soluble methane monooxygenase [*Methylobacter capsulatus* (Bath)] (Stainthorpe et al., 1990) (M58498, M58499)
MmoXYBZorYC : soluble methane monooxygenase (*Methylosinus trichosporium* OB3b) (Cardy et al., 1991) (X55394, S81887)
PhhKLMNOP, PheA1A2A3A4A5A6はDmpKLMNOPと、TmoABCDEFはTbuA1UBVA2Cと、MmoXYBZorYC (Bath)はMmoXYBZorYC (OB3b)と類似しているので相同性は省略した。

また、*dsoABCDEF*から生成すると推定されるタンパク質の分子量等をTable3-2に、*dsoABCDEF*と*dmpKLMNOP*のG+C含量、アミノ酸レベルの相同性(identity)をTable3-3に示す。*dmpKLMNOP*のG+C含量は、6個のORF全てについて59~65%であり、これは*Pseudomonas*属細菌のゲノムDNAにおける平均値と良く一致していた。一方*dsoABCDEF*のG+C含量は38~42%であり、これも*Acinetobacter*属細菌のゲノムDNAにおける平均値、39~47%とほぼ一致していた。この約20%のGC含量の差にも関わらず、両者の間には高いアミノ酸レベルの相同性が見いだされた。その相同性は6個のタンパク質によって大きく異なり、DsoDと対応するDmpN、DsoFと対応するDmpPでアミノ酸レベルの相同性(identity)が約70%と他のタンパク質に比較して高くなっていた。この傾向は*dmpKLMNOP*と*tbmABCDEF*等との間にも見られ、やはりTbmDとDmpN、TbmFとDmpPでアミノ酸レベルの相同性が高くなっている (Johnson and Olsen, 1995)。

Table 3-2 *dsoABCDEF*遺伝子群にコードされると考えられるタンパク質のアミノ酸残基数と推定分子量

Gene	Coordinates (bp)	No. of amino acid residues	Predicted molecular mass (kDa)
<i>dsoA</i>	75-365	97	11.2
<i>dsoB</i>	384-1385	334	38.4
<i>dsoC</i>	1398-1667	90	10.1
<i>dsoD</i>	1735-3261	509	60.0
<i>dsoE</i>	3356-3718	121	13.9
<i>dsoF</i>	3730-4791	354	39.3

Table 3-3 *dsoABCDEF*と*dmpKLMNOP*のG+C含量の比較、推定アミノ酸配列の相同性 (identity)

% G+C in ORF				Identity (amino acid) (%)
<i>dsoA</i>	41.4	<i>dmpK</i>	59.4	42
<i>dsoB</i>	40.6	<i>dmpL</i>	63.4	49
<i>dsoC</i>	41.2	<i>dmpM</i>	60.7	58
<i>dsoD</i>	41.4	<i>dmpN</i>	59.4	69
<i>dsoE</i>	38.0	<i>dmpO</i>	61.8	42
<i>dsoF</i>	42.3	<i>dmpP</i>	65.6	67

以下、各タンパク質毎の解析結果を簡単に述べる。

①DsoD

DsoDはDmpKLMNOPのオキシゲナーゼコンポーネントを構成する3個のタンパク質DmpLNOのうち最も分子量の大きいDmpNとアミノ酸レベルで約70%の相同性(identity)を示した。このタンパク質はDmpKLMNOP等マルチコンポーネントモノオキシゲナーゼ間で最も保存されているタンパク質のひとつであり、特に活性中心とされる鉄硫黄クラスターを構成するモチーフ(DEXaaRH...DEXaaRH)は、遺伝子構造の異なるトルエンモノオキシゲナーゼTbuA1、TmoA、メタンモノオキシゲナーゼMmoX等でも保存されている(Fig. 3-11) (5)。このモチーフ部分はヒスチジンや酸性アミノ酸のアスパラギン酸、グルタミン酸がリガンドとなって2個の鉄原子を結合し、活性中心を形成していると考えられている(5)。

DsoD	137	MQSIDSLRBYVQTQIBAMSHYNKFFDGFQD-----WAMHEDRVWYLSVPKSFEDDA-RS
MopN	140	MQSIDSLRBYVQTQIBAMSHYNKFFDGFQD-----WAMHEDRVWYLSVPKSFEDDA-RS
DmpN	134	MQAIDSLRBYVQTQVHAMSHYNKFFDGLHD-----FAHMYDRVWYLSVPKSYMDDA-RT
AphN	134	MQSIDSLRBYVQTETHALSNYNKYFNGMHS-----SSHWFDRVWFLSVPKSFEDDA-LS
TbmD	135	MQSIDSLRBYVQTETHAISHYNKYFNGMHS-----PNEWFDRVWYLSVPKSFEDDA-CT
PhhN	133	MQAIDSLRBYVQTQVHAMSHYNKFFDGLHD-----FAHMYDRVWFLSVPKSFMDDA-RT
PheA4	134	MQAIDSLRBYVQTQVHAMSHYNKFFDGLHD-----FAHMYDRVWYLSVPKSYMDDA-RT
TbuA1	131	M---LDSNRBQ---LQLYFPDYCAKDRQFDWABKAYHTNEWGAIAARSTFDDLFMS
TmoA	132	M---DELDRBQ---LQLFFPHEYCKDRQFDWAWRAYHSNEWAAIAAKHFFDDIITG
MmoXc	142	---LDSNRBQTHQCAVYVNYFAKNGQDPAGHNDARRTRTIGELWKG---KRVFSDGFIS
MmoXt	142	---LDSNRBQTHQCAFINHYYSKHYHDPAGHNDARRTRAIGELWKG---KRVFADGFI

DsoD	AGPFEFLLAISFAFEYVLTNLLFVPPMSGAAAYNGDMATVTFGFSAQSD	241
MopN	AGPFEFLLAISFAFEYVLTNLLFVPPMSGAAAYNGDMATVTFGFSAQSD	244
DmpN	AGPFEFLTAVSFSFEYVLTNLLFVPPMSGAAAYNGDMATVTFGFSAQSD	239
AphN	AGPFEFLTAVSFSFEYVLTNLLFVPPMSGAAHNGDLSTVTFGFSAQSD	240
TbmD	AGPFEFLTAVSFSFEYVLTNLLFVPPMSGAPHNGDMSTVTFGFSAQSD	240
PhhN	AGPFEFLTAVSFSFEYVLTNLLFVPPMSGAAAYNGDMATVTFGFSAQSD	238
PheA4	AGPFEFLTAVSFSFEYVLTNLLFVPPMSGAAAYNGDMATVTFGFSAQSD	239
TbuA1	RSAIDIAIMLTFAFETGFTNMQLGLAADAAGDFTFASLISSIQTDES	236
TmoA	RDAISVAIMLTFSFETGFTNMQLGLAADAAGDYTFANLISSIQTDES	237
MmoXc	GDAVECSNLQLVGECACFTNPLIVAVTEWAAANGDEITPTVFLSVET	248
MmoXt	RDAVECSVNLQLVGDTCTNPLIVAVTEWAIANGDEITPTVFLSVET	248

Fig. 3-11 DsoABCDEFと相同性を示すマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼにおいてDsoDに対応するタンパク質の活性中心とされるモチーフ部分周辺のアラインメント

*:アラインメントされた配列においてidenticalなアミノ酸

.:アラインメントされた配列においてsimilarなアミノ酸

白抜き、及び網掛け部分:鉄硫黄クラスターのモチーフ(本文参照)

②DsoB, E

DsoB, Eと対応するDmpL, Oは、DmpNと3個でオキシゲナーゼコンポーネントを構成している。DsoBとDmpLのアミノ酸レベルの相同性は約50%でDsoDとDmpNの場合よりかなり低く、さらに特に分子量の小さいDsoEとDmpOの場合には約40%となっている。現在のところ、これらには特に高度に保存された領域は報告されていない。

③DsoF

DsoFは、DmpKLMNOPのレダクターゼコンポーネントのDmpPとアミノ酸レベルで約70%の相同性を有していた。DsoABCDEFと類似の遺伝子構造のマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼ間で、前述のDsoDの場合と同程度の高い相同性を示すと同時に、それ以外のオキシゲナーゼのレダクターゼコンポーネントとも相同性を有していた(Fig. 3-12)。これらオキシゲナーゼのレダクターゼ全てに以下に述べる3つ部分のモチーフが保存されている。各々のモチーフはFig. 3-12、14、15において白抜き、及び網掛けで示した。

1) プラントタイプ鉄硫黄クラスター部分のモチーフ：CxxxxCxxCx₂₅C

(Fig. 3-12):このモチーフを有する代表的なタンパク質がレダクターゼであり、class I、class IIIに分類されるジオキシゲナーゼのレダクターゼもこのモチーフを有している(Otaka and Ooi, 1989)。マルチコンポーネントフェノールヒドロキシラーゼのレダクターゼは、class Iのジオキシゲナーゼのレダクターゼと類似している(Fig. 3-13)。

DsoF	35	FAAGHGTCSTC	XVQVTDGFYDVGEASPFALMDIER-EENKVLACCKPE	82
MopP	35	FAAGHGTCSTC	XVQVTDGFYDVGEASPFALMDIER-EENKVLACCKPE	82
DmpP	35	FAAGHGTCATC	XVQVVEGEVDIGEASPFALMDIER-DERRVLACAIPL	82
AphP	35	HAAGHGLCSTC	XIQVCDGDVDHGAANPFALMDMER-EDGMTLACAT-L	81
TbmF	35	HAAGHGLCSTC	XVQVTSGEVDHGAANPLRRSWISSGEEKTLACATAL	83
PheA6	35	FAAGHGTCATC	XVQVVEGEVDIGEASPFALMDIER-DERRVLACAIPL	82
FhhP	35	FPAGHGTCATC	XVQVVEGEADHGAASPFALMDMER-DEGKVLACAIPL	82
TbuC	35	HEAGVGGSAC	RFDLLSGLVESIWPEAPGLSERDR-KRGKHLACQSRPL	82
TmoF	34	YEAGSGGSGAC	XIELLEGEVSNLWPDAPGLAAREL-RKNRFLACCKPL	81
MmoCc	40	SSAREGGATC	XALCSEGDYDL-KGCSVQALPPEEEEGVLVLCRTYPR	87
MmoCt	35	ASGRAGCATC	XADCTDGDYEL-IDVKVQAVPPDEEEDGKVLCTTFPR	81
XylA	50	HDKXVGSCTC	KYKLISGRVNELTSSAMGLSGDLY-QSGYRLGCOCIPK	97
PahAa	33	YSMSGRCSTC	RCRVTDGSGVIDSGTGS---GLPHLVDEHYVLACRSVLT	78
NahAa (G7)	33	YSMSGRCSTC	RCRVTDGSGVIDSGAGS---GLPLNVDEHYVLACRSVLT	78
NahAa (NCIB)	33	YSMSGRCSTC	RCRVTDGSGVIDSGAEN---GQSNLTDKQYVLACRSVLT	78
AscD	35	YSKDGTESSC	XAILISGEV-DS-AENTFLTEED-VAKGAILTECSKAK	80

* * * . * . *

* *

Fig. 3-12 各モノオキシゲナーゼにおいてDsoFと相同性を示すタンパク質のプラントタイプ鉄硫黄クラスター部分周辺のアラインメント

*:アラインメントされた配列においてidenticalなアミノ酸

:アラインメントされた配列においてsimilarなアミノ酸

白抜き部分 :クロロプラストタイプフェレドキシンのモチーフ(本文参照)

XylMA: toluene / xylene oxygenase (*P. putida* mt-2) (Suzuki et al., 1991).

PahAaAbAcAd: naphthalene / phenanthrene dioxygenase (*Pseudomonas* sp. OUS82) (Takizawa et al., 1994).

NahAaAbAcAd: naphthalene dioxygenase (*P. putida* G7, NCIB 9816-4) (Simon et al., 1993).

これら以外のリファレンスはFig. 3-10参照。

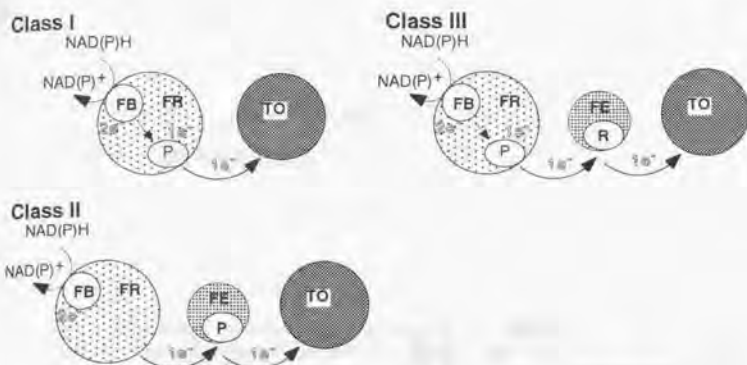


Fig. 3-13 Class I~IIIの各ジオキシゲナーゼにおける電子伝達

P : Plant type 鉄硫黄クラスター TO : Terminal oxygenase
R : Rieske type 鉄硫黄クラスター FR : Ferredoxin reductase
FB : FAD (FMN)-binding region FE : Ferredoxin

2) FAD / FMN結合領域のモチーフ : RxY(F)S

(Fig. 3-14) : DsoABCDEと遺伝子構造が非常に類似しているオキシゲナーゼのレダクターゼではRxFSであり、その他のオキシゲナーゼのレダクターゼ、TbuC、PahAa、AscD、MmoC等ではRxYSとなっている。

DsoF	129	PMQFQAGQYINIQI-PNI--E--GTRAFSLANTPSEA---NLIELHIRKVVQGGAAATRYVHDELSV
MopP	129	PMQFQAGQYINIQI-PNI--E--GTRAFSLANTPSEDK---NLIELHIRKVVQGGAAATRYVHDELSV
DmpP	129	PMFQAGQYVNLAL-PGI--D--GTRAFSLANPPSRN---DEVELHVRVLEGGAAATGFIHQQLKV
AphP	129	PMRYQAGQYVQLRI-PGLSEEQGGSRAFSIANAPGADGCAQEIELNVRLVLGGEGTGWLHKKHLSLSE
TbmP	133	--DQAGQYVMVEI-PGL--G--QRFAESMPMPSDGGPC-GEIELQVRRVPGAAGTGVLHEQLAV
PheA6	129	PMFQAGQYVNLAL-PGI--D--GTRAFSLANPPSRN---DEVELHVRVLEGGAAATGFIHQQLKV
PhhP	129	PMTFQAGQYINLTL-PGV--E--GSRAESLANPPSQA---DEVELHVRVLEGGAAATGFIHQQLKV
TbuC	128	PAEFRPGQYALL-YPPHA--P--GATAYSMWLPNAD---GIWQFVIRRVPPGAGSNALPDQVEI
TmoF	127	KVVFPSPGQYFMVDVPEL-----GTRAFSAANPVDGNT---LTLIVKAVPNGKVSALANETI-
XylA	141	QIAFYPGQYADVEC-AEC--S--AVRSYSPSAPPQPD---GSLSPHVRVLPVGGVFSGLWLFPGDRT
PahAa	123	PFEFSPGQYATLQFSPEH-----ARPASMAGLPDDQ---EM-EFHIRKVPGGRVTEYVFEHVRE
NahAaG123		PFEFSPGQYATLQFSPEH-----ARPASMAGLPDDQ---EM-EFHIRKVPGGRVTEYVFEHVRE
NahAaN123		PFEFSPGQYATLQFSPEH-----ARPASMAGLPDDQ---EM-EFHIRKVPGGRVTEYVFEHVRE
MmoC	139	GVKFEPPGQYFMDLTI-PGT--D--VSRSSPANLPNPE---GRLEFLIRVLPPEGRFSDYLNRNDARV
MmoCt	134	SLNFVPGQYFVDIEI-PGT--H--TRSSSMASVAE-D---GQLEFPIIRLLPDGAFSKFLOTEAKV
AscD	127	KIQYLAGQYIDLIIINGQ-----RSTSIANAPGGN---GNIELHVRKVVNGVFSNIIFNELKL

Fig. 3-14 各モノオキシゲナーゼにおいてDsoFと相同性を示すタンパク質のFAD / FMN結合領域と考えられるモチーフ部分周辺のアラインメント

*:アラインメントされた配列においてidenticalなアミノ酸
.:アラインメントされた配列においてsimilarなアミノ酸
白抜き、網掛け部分 :FAD / FMN 結合領域のモチーフ(本文参照)

3) NAD(P)リボース結合領域のモチーフ :C末側のG rich領域

(Fig. 3-15) : 酸化に必要な電子はNAD(P)Hより受け渡されるが、この部分がNAD(P)Hとの結合部と考えられている。

DsoF	GEEMALSGPYGQFFVRKSDQQNVIFIAAGSGGLSSPQSMILDLLLEQGDTRIYLFQ	241
HopP	GEEMALSGPYGQFFVRKSDQQNVIFIAAGSGGLSSPQSMILDLLLEHGDTRIYLFQ	241
DmpP	GDAVELSGPYGQFFVRDSQAGDLIFIAAGSGGLSSPQSMILDLLERGDTRRITLFQ	241
AphP	GDSLQLAGPYGRFFVRRESARQPMVFMAAGSGGLSSPRAMILELLANGCEQPITLVY	247
TbmF	GDTELVTPGYGRFFVRQSAKPMFLFVAGSGGLSSPRSMILDLLLEQGCTLPITLVN	245
PheA6	GDAVELSGPYGQFFVRDSQAGDLIFIAAGSGGLSSPQSMILNLLERGDTRRITLFQ	241
PhhP	GDAVELSGPYGQFFVRDSQAGDLIFIAAGSGGLSSPQSMIFDLFERGDTRQITLVFQ	241
TbuC	GQTVTLDPGYGHAHLRDDNARDIVCIAAGSGGLAPMLSVARGALAEQAQRVHFFY	240
TmoF	-ETLQLDGPYGLSVLKTADETQSVFIAAGSGGIAPHVSMVNTLIAQGYEKPIVTFY	235
XylA	GATLTLRAPYGFGLHESNA-TMVCVAGGTGLAPIKCVLQSMNTQAQRERDVLLFF	252
PahAa	GTSIKLSGPIGTAYLRQNETGPMLCVGGTGLAPVLSIIRGALKLGMTNPILLYF	233
NahAaG	GTSIKLSGPIGTAYLRQNETGPMLCVGGTGLAPVLSIVRGALKLGMTNPILLYF	233
NahAaN	GTSIKLSGPIGTAYLRQNETGPMLCVGGTGLAPVLSIVRGALKSGMTNPILLYF	233
MmoCc	GQVLSVKGPIDGVFGLKERGMAPRYFVAGGTGLAPVVSVMVRQMGEWTAPNETRIYF	251
MmoCt	GMRVDLGPAGSFLLBDHGGRSRVFVAGGTGLSPVLSMIRQLGKASDFSPATLLF	246
AscD	QQLLRISGPQSTFFVREDNL-PIVFLAEGTGFAPVKSMVEALINKNDQRQVHIYW	236

Fig. 3-15 各モノオキシゲナーゼにおいてDsoFと相同性を示すタンパク質のNAD(P)リボース結合領域と考えられるモチーフ部分周辺のアラインメント

*:アラインメントされた配列においてidenticalなアミノ酸

:アラインメントされた配列においてsimilarなアミノ酸

白抜き :NAD(P)リボース結合領域のモチーフ(本文参照)

これらのモチーフはDsoFにも全て保存されていることから、DsoFはDmpP同様、classIのジオキシゲナーゼのレダクターゼに類似の構造を有するレダクターゼと考えられた。

④DsoC

DsoCと対応するDmpMは、最近タンパク質の立体構造が明らかにされた。このタンパク質はFig. 3-16に示すように、穴の空いた構造をとっており、この穴の周辺の構造は立体的にflexibilityを有し構造が変化すると考えられている(Qian et al., 1997)。同じように穴の空いた構造を持つmyb proteinが、穴の周辺でDNAとの結合に必要な構造変化を起こすことが報告されており(Ogata et al., 1996)、DmpMも同様に活性に必要な構造の変化がこの部位で起こるものと考えられる。機能的には、DmpMは酸化酵素の効率的なturn overに必須な補助的タンパク質と考えられているが、詳細はまだ報告されていない。



Fig. 3-12 DmpMの立体構造 [リファレンス(Qian et al., 1997)より]

⑤DsoA

DsoAはDmpKと相同性を示すが、その値はアミノ酸レベルの相同性(identity)が約40%と6個のタンパク質の中で最も低くなっている。DmpKは*in vitro*でのフェノールヒドロキシラーゼ活性には不要な一方で菌の生育には必須であると以前よりいわれていたが(Powlowski and Shingler, 1990)、最近になってアポ酵素に鉄イオンを結合させる活性を持つことが明らかとなった(Powlowski et al., 1997)。DmpKを発現ベクターなどに組み換えて過剰発現させると酸化酵素の活性を抑制するが、6個のORFがオペロンとして転写、翻訳されている場合には発現量が他の5個のタンパク質と比較して低くなっていることから、*in vivo*では活性抑制は起こっていないと考えられている。この活性抑制はDmpKがDmpL, Nに強く結合し、DmpMの酸化酵素への結合を妨げることで引き起こされていると考えられている(Powlowski et al., 1997)。

これら相同性検索及びモチーフ部分の解析結果から、DsoABCDEFの各タンパク質の機能はDmpKLMNOPの対応するタンパク質と同様であることが推測されたが、モチーフの存在しないタンパク質もあり、これらの機能も同様であることを確認するために、相補実験を行うこととした。

3-3-5 DsoABCDEFの各タンパク質の欠失がDMS酸化活性に与える影響

アミノ酸レベルの相同性、遺伝子構造の類似性、モチーフ配列の保存性から、DsoABCDEFの各タンパク質の機能は対応するDmpKLMNOPの各タンパク質の機能と同様であることが推測されたが、タンパク質によっては40%程度の相同性しか示さず、また、フェノールとDMSの化学構造は異なることから活性に必須なタンパク質が違ふ可能性も否定できない。そこで、DsoABCDEFの各タンパク質がDMS酸化活性に必須であるかを検討することとした。

後に行う相補実験のことを考えると、相補実験に用いる2種のプラスミド(タンパク質のひとつが欠失したプラスミドとそのタンパク質のみコードするプラスミド)は大腸菌内で共存可能(compatible)である必要がある。DsoABCDEFをコードするpAU96はpUC118に由来するアンピシリン耐性の多コピープラスミドである。そこで、pUC118/pUC119とoriが異なっていて、クロラムフェニコール耐性のプラスミドpSTV28/pSTV29(宝酒造)を用いることとした。pSTV28/pSTV29はマルチクローニングサイトがpUC118/pUC119とほぼ同一であり(ベクター内にサイトのあるXbaIのみ使用できない)、プロモーターもpUC118/119と同じlacプロモーターであるので、IPTGの添加でマルチクローニングサイトに挿入された遺伝子が誘導されることから、相補実験には適当と考えられた。しかし、pSTV28/29は大腸菌内でのコピー数がpUC118/119よりはるかに少ないとされており(宝酒造)、これが活性に影響する可能性が考えられる。そこで最初にdsoABCDEFをpSTV29に組み換えたプラスミドpAS99を作製して大腸菌MV1184株を形質転換し、DMSを基質に休止菌体反応を行った。その結果、添加したDMSが100%変換された場合のDMSO量を収率100%とすると、pAU96を保持する大腸菌の場合は収率約85%のDMSOの生成が認められたのに対し、pAS99の場合には約45%のDMSOが生成されるにとどまった(Fig. 3-17)。また、休止菌体反応と並行して、休止菌体反応に用いた大腸菌の一部を破碎しSDS-PAGEによりタンパク質の発現を調べたところ、約60 kDaのDsoD、および約38 kDaのDsoBまたは約39 kDaのDsoFと考えられるバンドが検出された(Fig. 3-17)。また、約10 kDaのDsoCと推測されるバンドも認められた。pAU96の場合にはpAS99の場合と比較してDsoDとDsoBまたはDsoFのバンドが濃いことから、これらの大腸菌での発現量が大きいものと考えられた。他のタンパク質は検出できなかったが6個のORFはオペロン構造をとっていると推測されており、pAU96を用いた場合にDsoABCDEF各タンパク質がpAS99の場合よりも多く発現しているものと考えられた。

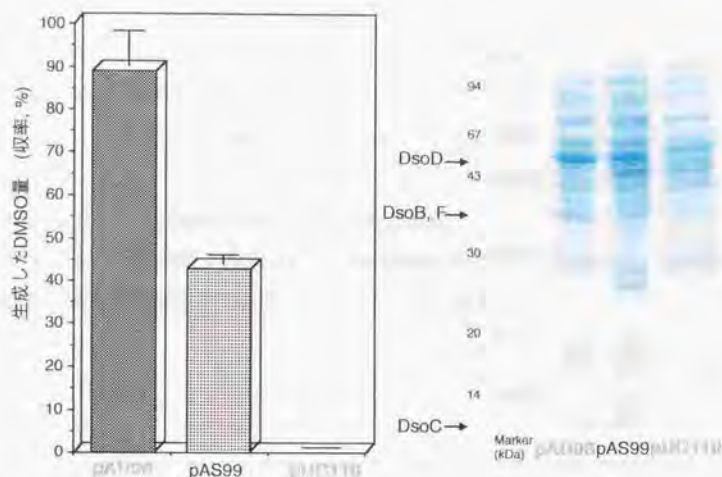


Fig. 3-17 ベクターの違いによるDMS酸化活性及びタンパク質の発現量の差

袋文字はpUC系ベクター由来、標準文字はpSTV系ベクター由来であることを示す。
エラーバーはstandard deviation、サンプル数pAU96:6, pAS99:3

この結果から、pUC系ベクターにコードされたタンパク質の方が、pSTV系ベクターにコードされたタンパク質よりもかなり多く発現し、タンパク質の発現量によって活性も大きく影響されることがわかった。

タンパク質の発現量はプロモーターからの位置によって変わる可能性がある。この発現量による活性への影響を小さくするため、相補実験の際には、実験の対象とするタンパク質をpUC系ベクターから発現させて他の5個をpSTV系ベクターから発現させた。これにより、対象とするタンパク質以外の5個の発現量が対象とするタンパク質より少なくなると予想されることから、対象とするタンパク質の発現量が多少変動した場合もその影響を受けにくくと考えられた。作製したプラスミド、pASAD~pASFΔの挿入断片をFig. 3-1に示す。また、本章で相補実験に用いたプラスミドはTable 3-1に一覧にして示した。最初に、これらを用いてDsoABCDEFの各タンパク質の欠失がDMS酸化活性に与える影響を調べた。

各々のタンパク質をコードするORFをひとつずつ破壊したプラスミドを用いて大腸菌MV1184株を形質転換し休止菌体反応を行ったところ、DsoB, C, D, E, Fのいずれが欠失した場合もDMS酸化活性は失われた(Fig. 3-18)。一方で、DsoAは欠失によりわずかに活性の下がっている可能性はあるが、活性自体は失われなかった。DmpKLMNOPではDsoAに対応するDmpKが欠失してもフェノールヒドロキシラーゼ活性を示すことが報告されているが(Powlowski and Shingler, 1990)、この実験からDsoAもDMS酸化活性には必要でないことが示された。

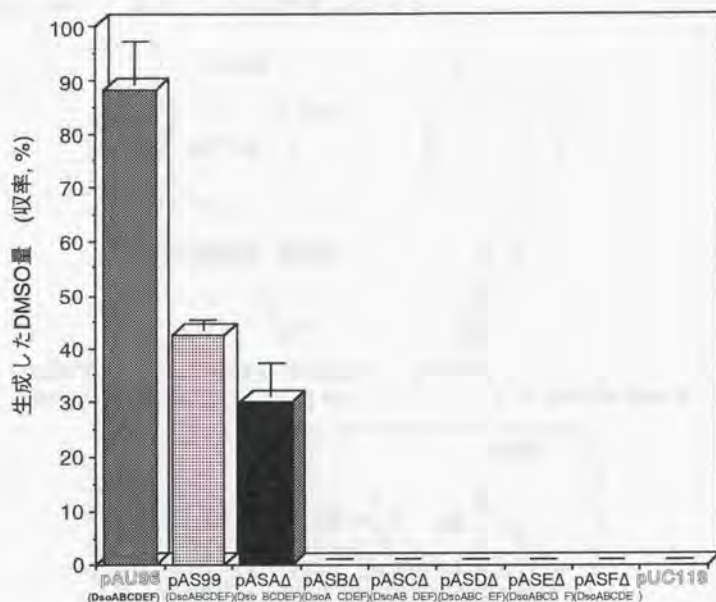


Fig. 3-18 DsoABCDEFの各タンパク質の欠失がDMS酸化活性に与える影響
袋文字はpUC系ベクター由来、標準文字はpSTV系ベクター由来であることを示す。
かっこ内は生成するタンパク質を示す。
エラーバーはstandard deviation、サンプル数pAU96:6, pAS99:3, pASAΔ:4,
pASBΔ:3, pASCΔ:3, pASDΔ:3, pASEΔ:3, pASFΔ:3

3-3-6 DsoABCDEFの各タンパク質を用いた相補実験

DsoABCDEFの各々のタンパク質を対応するDmpKLMNOPのタンパク質で置き換える相補実験の前に、DsoA以外の各タンパク質の欠失による活性の消失が、pUC系ベクターにコードされる対応するDsoABCDEFのタンパク質で相補可能であることを確認しておく必要がある。そこで、DsoABCDEF各々のタンパク質をひとつずつコードするpUC118/119由来のプラスミドpAUA~pAUFを構築した(Fig. 3-2)。このpAUA~pAUFと、それぞれ対応するタンパク質が欠失したプラスミドpASAΔ~pASFΔとを同時に用いて大腸菌MV1184株を形質転換し、両方のプラスミドが菌体内で共存する大腸菌形質転換体を得た。これらを用いてDMSを基質に休止菌体反応を行った。DsoAの場合の手順をFig. 3-19に簡単に図示する。

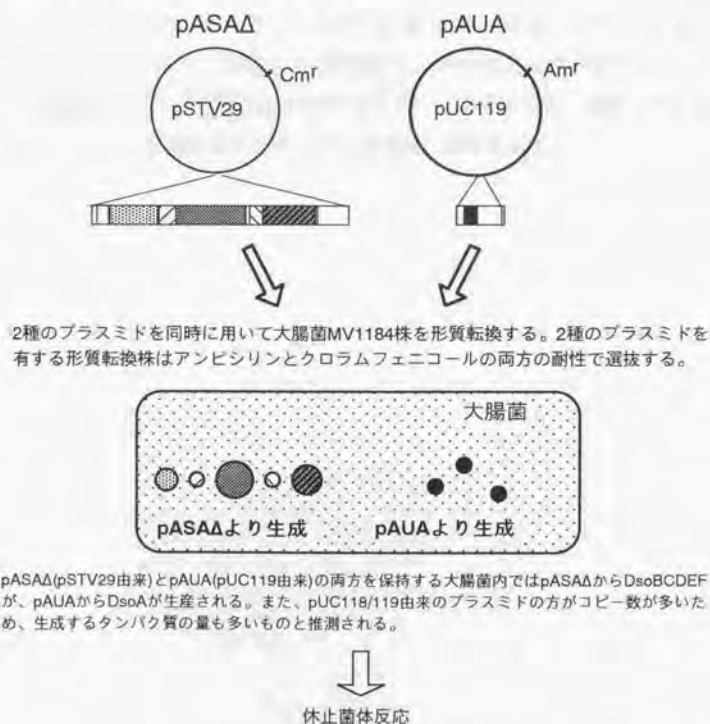


Fig. 3-19 相補実験の模式図 (DsoAの相補実験の場合)

休止菌体反応の結果、各タンパク質の欠失によるDMS酸化活性の消失は、それぞれの対応するDsoABCDEFタンパク質で相補されたが、生成したDMSO量はタンパク質によって異なっていた(Fig. 3-20)。また、休止菌体反応に用いた大腸菌内のタンパク質の発現をFig. 3-21に示した。

DsoC、Eの相補の場合には生成するDMSO量の変動が大きかったが、pAS99と同程度からやや多い程度と考えられた(Fig. 3-20)。DsoA、B、Dの場合はpAS99よりもDMS酸化活性は低下した一方、DsoFの場合には逆に活性が大幅に上昇した。DsoFの場合は検出されたDMSO量は収率約80%で、多コピーのpAU96(pUC118由来)の約85%に近い値となった。

SDS-PAGEの結果、DsoCによる相補の場合のサンプルで約10kDaのタンパクが他のサンプルより多く発現していることが認められた(Fig. 3-21)。これは、pSTV系ベクターを用いた場合よりもpUC系ベクターを用いた場合の方が多量のDsoCが発現していることを示している。バンドが認められるDsoDと、DsoBあるいはDsoFのいずれかに関しては、pUC系ベクターの場合にpSTV系ベクターの場合より多く発現しているかどうか判断できないが、相補の全てのサンプルで発現が認められた。

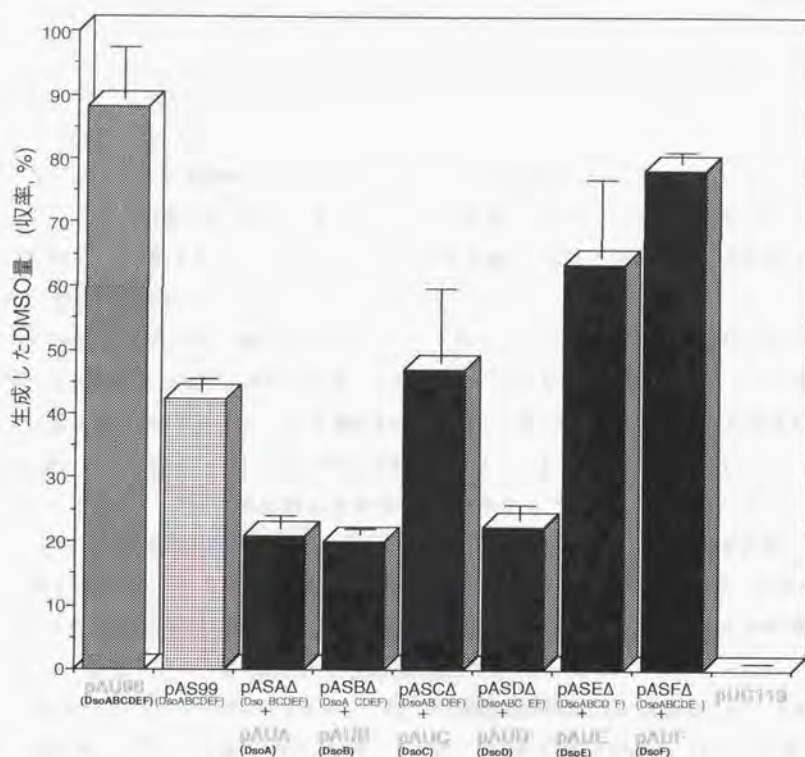


Fig. 3-20 DsoABCDEFでの相補実験

袋文字はpUC系ベクター由来、標準文字はpSTV系ベクター由来であることを示す。かっこ内は生成するタンパク質を示す。

エラーバーはstandard deviation、サンプル数pAU96:6, pAS99:3, pASAA+pAUA:6, pASBA+pAUB:5, pASCA+pAUC:6, pASDA+pAUD:5, pASEA+pAUE:6, pASF A+pAUF:4 (活性の不安定なものはサンプル数を多くした。)

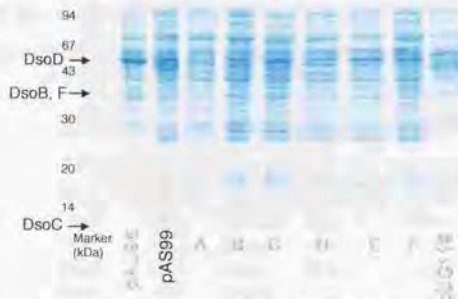


Fig. 3-21 DsoABCDEFでの相補実験の際のタンパク質の発現

3-3-7 DmpKLMNOPの各タンパク質を用いた相補実験

DmpKLMNOP全てをコードするプラスミド、pVI261Δ、及び各タンパク質をコードするプラスミド、pVI281Δ、pVI284Δ、pVI286Δ、pVI287Δ、pVI288Δ、pVI221Δは全て広宿主域ベクターpMMB66EH / HE由来であった(Powlowski and Shingler, 1990)。そこで、ベクターの違いから活性に違いが生じるかを調べるため、pVI261Δの挿入断片をpUC119に組み換えたプラスミド、pUCVI261を作製してpVI261Δの場合とDMS酸化活性の比較を試みた。

その結果、pVI261Δの場合はDMSOの収率は約40%であったのに対し、pUCVI261の場合はpAU96とほぼ同じ約90%であった(Fig. 3-22)。この活性の違いはベクターの違いによるものと考えられたため、pVI281Δ～pVI221Δの挿入断片をそれぞれpUC118またはpUC119に組換えた(Fig. 3-3)。組み換えたプラスミドをそれぞれpUCK～pUCPと命名し、これらと、それぞれに対応するDsoA～Fの各タンパク質を欠失させたプラスミドのpASΔ～pASFΔを同時に用いて大腸菌MV1184株を形質転換してDMSを基質に休止菌体反応を行った。また、DsoABCDEFの場合と同様、休止菌体反応に用いる菌体の一部をSDS-PAGEに供した。休止菌体反応の結果をFig. 3-22に、SDS-PAGEの結果をFig. 3-23、各タンパク質の推定分子量をTable 3-4に示す。

DsoAの代わりにDmpKが、DsoCの代わりにDmpMが発現している場合には、それぞれpAS99の場合と同程度のDMSOが検出された。また、DsoFの代わりにDmpPが発現している場合には、pAU96の場合と同程度の高いDMS酸化活性が認められた。一方で、DsoEの代わりにDmpOが発現している場合には活性が低下し、DsoBの代わりにDmpLが、DsoDの代わりにDmpNが発現している場合にはDMSOは検出されなかった。また、SDS-PAGEにおいて、DmpLの相補の場合にpUC系ベクターから発現したと考えられるDmpLと予想される38 kDa程度の太いバンドが検出された。DmpNの相補の場合も、DmpNと予想される約60 kDaのバンドが、非常に薄かったが検出できた。

Table 3-4 DsoABCDEFの推定分子量、DmpKLMNOPの推定分子量及び実測分子量

	predicted (kDa)		predicted (kDa)	estimated (kDa)
DsoA	11.2	DmpK	10.6	12.5
DsoB	38.4	DmpL	38.2	34.0
DsoC	10.1	DmpM	10.5	10.0
DsoD	60.0	DmpN	60.5	58.0
DsoE	13.9	DmpO	13.2	13.0
DsoF	39.3	DmpP	38.5	39.0

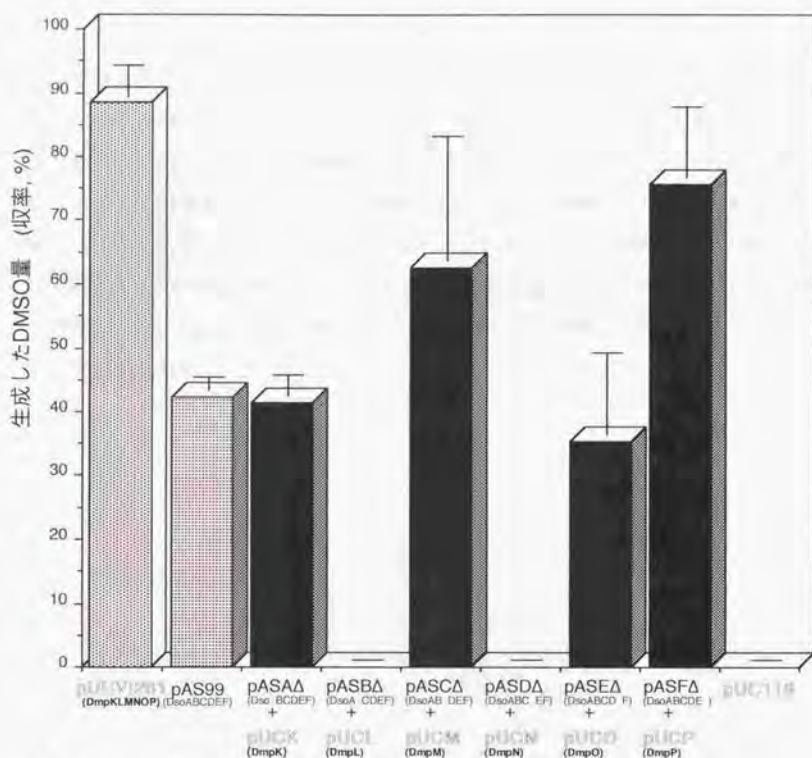


Fig. 3-22 DmpKLMNOPでの相補実験

袋文字はpUC系ベクター由来、標準文字はpSTV系ベクター由来であることを示す。かっこ内は生成するタンパク質を示す。

エラーバーはstandard deviation、サンプル数pAU96:6, pAS99:3, pASAA+pUCK:4, pASBA+pUCL:4, pASCA+pUCM:6, pASDA+pUCN:6, pASEA+pUCO:6, pASFΔ+pUCP:6 (活性の不安定なものはサンプル数を多くした。)



Fig. 3-23 DmpKLMNOPでの相補実験の際のタンパク質の発現

Fig. 3-18に示したDsoABCDEFの欠失実験の結果、Fig. 3-20に示したDsoABCDEFでの相補実験の結果、及びFig. 3-22に示したDmpKLMNOPでの相補実験の結果を、各タンパク質毎にまとめ直したグラフをFig. 3-24に示す。Fig. 3-24を見ると、DmpMでの相補とDmpPでの相補の場合は、それぞれDsoC、DsoFとの相補の場合とほぼ同程度の活性を示していることがわかる。また、DmpKでの相補はDsoAでの相補より活性が上昇している。オキシゲナーゼコンポーネントを構成するDmpL、N、Oの相補では、DmpL、Nは活性が消失していることから活性が低下しているのは明らかであるが、Fig. 3-24からはDmpOの場合もDsoEの相補より活性が低下していることが認められた。

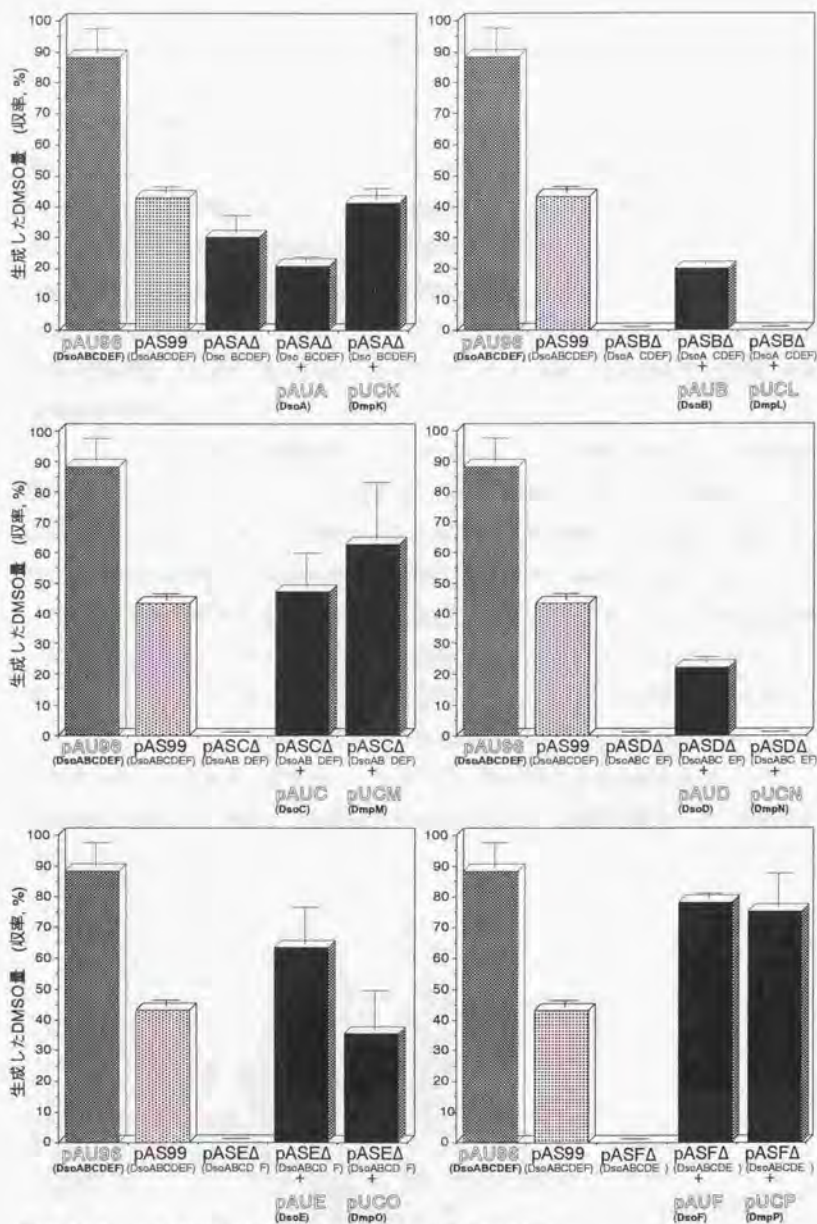


Fig. 3-24 相補実験の結果、各タンパク質ごとの比較

袋文字はpUC系ベクター由来、標準文字はpSTV系ベクター由来であることを示す。

カッコ内は生成するタンパク質を示す。

エラーバーはstandard deviation、サンプル数はFig. 3-17, 3-19, 3-21参照。

3-3-8 DsoABCDEFのフェノール類に対する酸化活性

DsoABCDEFはフェノールヒドロキシラーゼと高い相同性を示すことから、DsoABCDEFにもフェノールの酸化活性が存在するものと推測される。DmpKLMNOPIは各種ジメチルフェノール(DMP)への酸化活性も有することから、DsoABCDEFにもDMPへの酸化活性が存在することが考えられ、また、DmpKLMNOPとは基質特異性が異なる可能性も期待される。そこで、pAU96(DsoABCDEFをコード)を保持する大腸菌形質転換体を用いて、フェノール及び各種DMP(2, 3-DMP、2, 4-DMP、2, 5-DMP、3, 4-DMP、3, 5-DMP)を基質に休止菌体反応を行った。

フェノールを基質にした場合にはカテコールの生成が予想されるが、反応液抽出物から極めて微量のカテコールと考えられる物質が検出されたにすぎなかった(Fig. 3-25)。また、2, 3-DMP、2, 4-DMP、2, 5-DMP、3, 4-DMP、3, 5-DMPを基質にした場合は対応するカテコール類の生成は検出できなかった(data not shown)。

Buffer等の培養条件を変えて実験を繰り返したが、同じ菌体を用いてDMSを基質に休止菌体反応を行った場合にはDMSの酸化活性は検出されているにもかかわらず、フェノール類に対する酸化活性はいずれの場合でもほとんど検出されなかった。また、カテコールの検出感度を上げるため、分析の際の条件検討も行い、①TMS化を行う、②メタンボロネート化を行う、といった方法も試みたが、DsoABCDEFによりフェノール類から生成したカテコール類を検出することはできなかった。

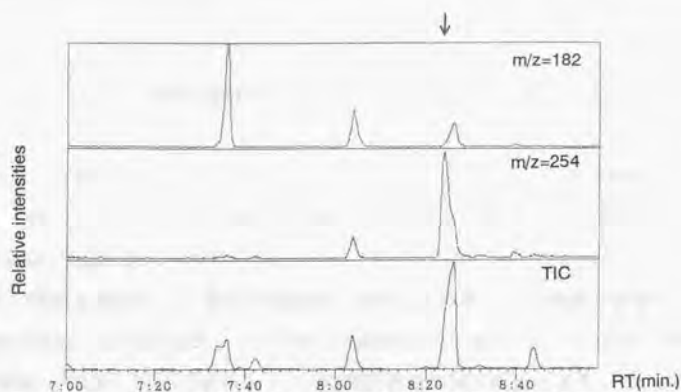


Fig. 3-25-① フェノールを基質とした反応液を分析した場合のマスクロマトグラム

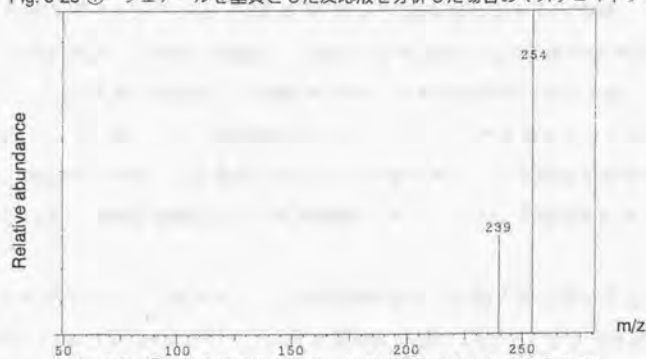


Fig. 3-25-② 検出されたカテコールのマススペクトル (RT=8.25)

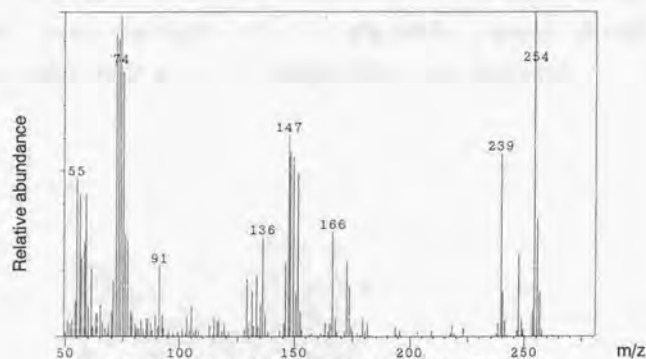


Fig. 3-25-③ カテコール標品のマススペクトル (RT=8.25)

Fig. 3-25 pAU96(DsoABCDEFをコード)を保持する大腸菌のフェノールを基質とした休止菌体反応液のGC-MS分析結果サンプルはTMSi化を行ったものである。隣接するピークが近接しているため、完全なカテコールのマススペクトルは得られなかった。

3-3-9 DsoABCDEFの各種有機硫黄化合物に対する基質特異性

pAU96 (DsoABCDEFをコード)を保持する大腸菌JM109株を用いて各種有機硫黄化合物[DMS、DMSO、DES、MM、DMDS、DEDS (Fig. 3-4)]を基質に休止菌体反応を行い、反応液をGC-MSを用いて分析した。

その結果、DMSを基質とした場合はDMSO、DMSOを基質とした場合は微量のDMSO₂が検出され、DESを基質とした場合はdiethyl sulfoxide [$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{SO}$: DMSに対するDMSOと同様にDESの硫黄原子に1酸素原子が付加された化合物]と考えられる物質がそれぞれ検出された (Fig. 3-26-A, B, C)。DMSを硫黄源として培養した20B株の培養液の分析結果 (Fig. 2-5-A)と同様に、DMSの酸化産物であるDMSOは多量に検出された。また、DESを酸化基質とした場合も同様に多量のDESOが検出され、DsoABCDEFはエチル基のついた硫黄原子に対しても酸化活性を有することが示された。DMDS、DEDSを基質とした場合には反応生成物と考えられる物質を検出することはできなかった。同様にMMについても生成物と考えられる化合物は検出されなかった。

DEDSについてはバイアル瓶を用いたより密閉性の高い状態で休止菌体反応を行い、GCを用いてDEDSの減少を調べた。休止菌体反応後、DEDSの量は大腸菌を加えない標品と比較して減少していたが、ネガティブコントロールのpUC119を保持する大腸菌を用いた場合とは差が認められなかった (Fig. 3-27)。このため、DsoABCDEFはDEDSに対する酸化活性は有していない可能性が高いものと考えられた。

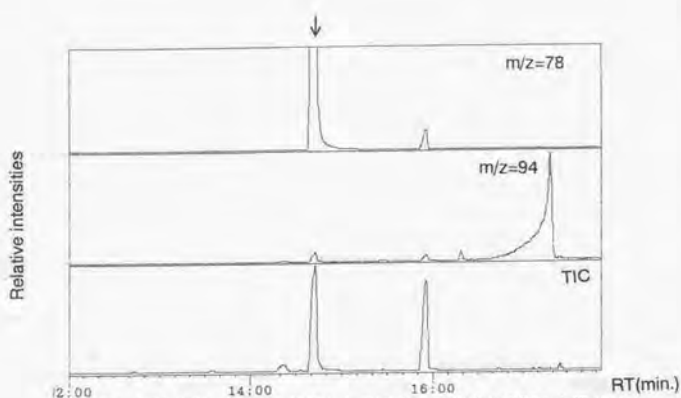


Fig. 3-26-A-① DMSを基質とした場合の反応液を分析した場合のマスクロマトグラム

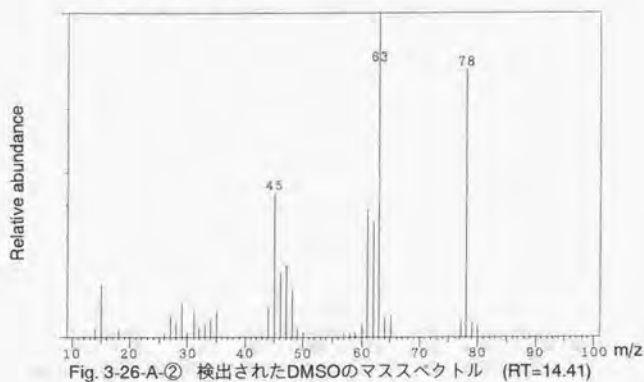


Fig. 3-26-A-② 検出されたDMSOのマススペクトル (RT=14.41)

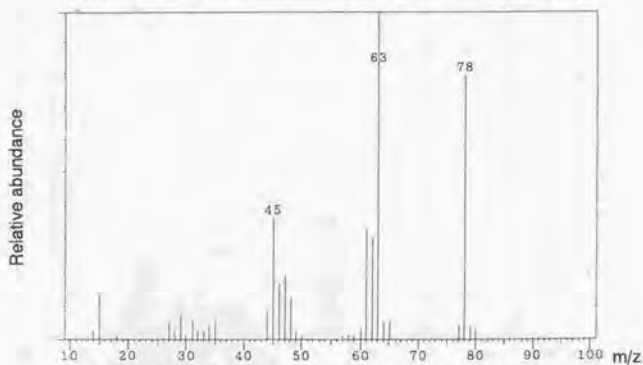


Fig. 3-26-A-③ DMSOの標品のマススペクトル (RT=14.48)

Fig. 3-26-A DsoABCDEFによるDMSからのDMSOの生成

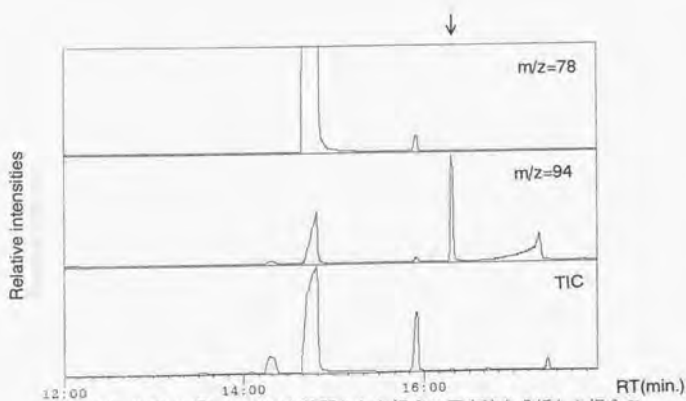


Fig. 3-26-B-① DMSOを基質とした場合の反応液を分析した場合のマスクロマトグラム

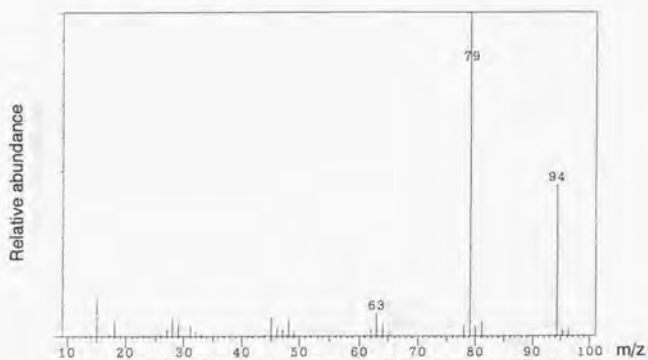


Fig. 3-26-B-② 検出されたDMSO₂のマスペクトル (RT=16.21)

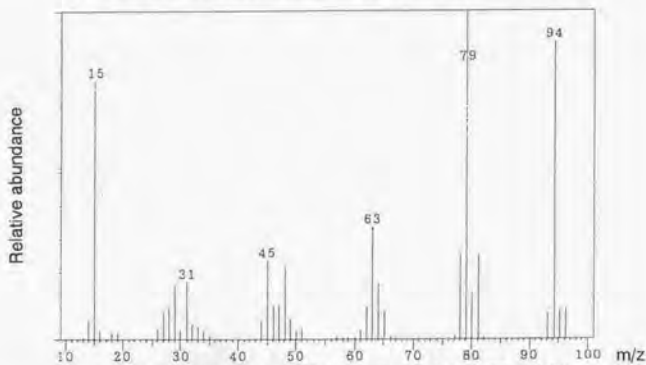


Fig. 3-26-B-③ DMSO₂の標品のマスペクトル (RT=16.21)

Fig. 3-26-B DsoABCDEFによるDMSOからのDMSO₂の生成

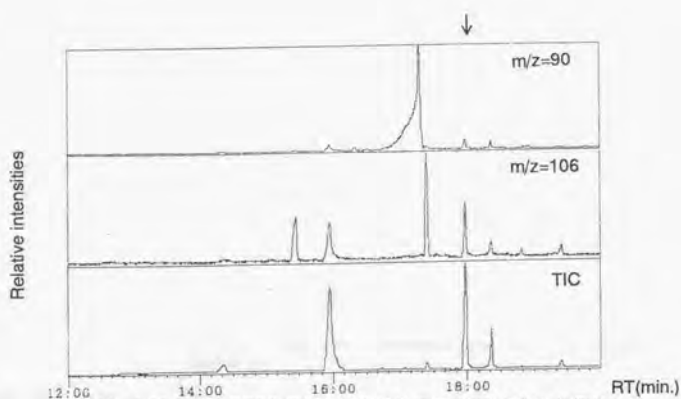


Fig. 3-26-C-① DESを基質とした場合の反応液を分析した場合のマス
スクロマトグラム

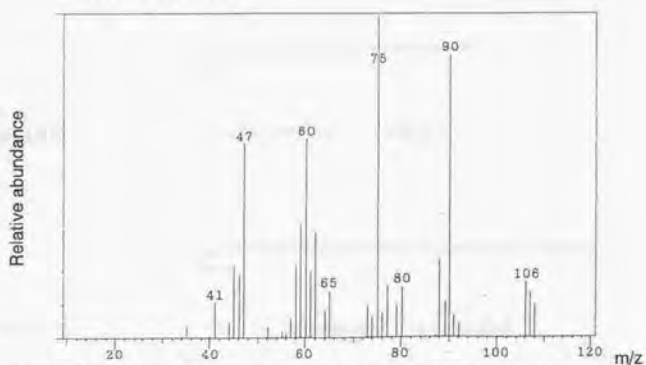
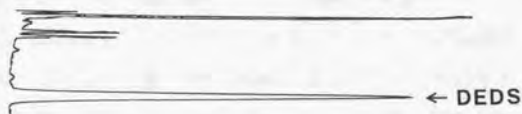


Fig. 3-26-C-② 検出されたDESOと考えられる物質のマススペクトル (RT=18.03)

Fig. 3-26-C DsoABCDEFによるDESからのDESOと考えられる物質の生成

標品
(DEDS 2 μ l / 1 ml H₂O)



pAU96
(DsoABCDEF)
サンプル1



pAU96
(DsoABCDEF)
サンプル2



pUC119
(ネガティブコントロール)

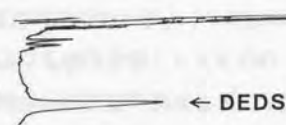


Fig. 3-27 DsoABCDEFのDEDSを基質にした休止菌体反応液のGC分析の結果

3-4 考察

本研究で、インドールの酸化を指標にすることでDMS酸化活性を有する酵素遺伝子を単離することに初めて成功した。単離されたDsoABCDEFは、*Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250株のMopKLMNOP、*Pseudomonas*属細菌CF600株のDmpKLMNOP等のマルチコンポーネントフェノールヒドロキシラーゼと非常に類似した遺伝子構造、高い推定アミノ酸配列の相同性(identity)を有していた。これらマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子群の中ではdmpKLMNOPが最も解析が進んでいることから、dmpKLMNOPとの比較検討、相補実験を行ってdsoABCDEFの各タンパク質のDMS酸化における機能を推定した。

推定アミノ酸配列の比較から、DsoD内にオキシゲナーゼコンポーネントの活性中心と考えられる鉄硫黄クラスターのモチーフ配列が、DsoFにはレダクターゼのモチーフ配列が保存されていることが見いだされた。それ以外のタンパク質には特に保存されている配列は報告されていない。

また、DsoABCDEFのタンパク質をひとつずつ欠失させてみたところ、DsoABCDEFの大腸菌内でのDMS酸化活性には、DsoAは必要でないことが示唆された。この結果は、DmpKLMNOPにおいて*in vitro*でのフェノール酸化活性にDmpKが不要であることと合致していた。DmpKLMNOPを用いる相補実験の前に、DsoABCDEFの各タンパク質の欠失を、別のベクターから発現したDsoABCDEFの各タンパク質で相補する実験を行ったところ、DsoB～Fの欠失で消失した活性は対応するDsoB～Fの各タンパク質で相補されることが確認された。

DmpKLMNOPの個々のタンパク質を用いた相補実験では、DsoAをDmpKに、DsoCをDmpMに、DsoFをDmpPに置き換えた場合は、対応するDsoABCDEFの各タンパク質での相補の場合と同程度のDMSOが検出された。DsoEをDmpOに置き換えた場合はDsoEでの相補の場合よりも活性が低下したものの、活性は相補された。しかし、DsoBをDmpLに、DsoDをDmpNに置き換えた場合は、活性は相補されなかった。DsoDの場合にはDmpNと70%の相同性を示しDmpNに認められる鉄硫黄クラスターのモチーフ配列と同じ配列が存在することから、DsoDはDmpNと同様の機能を持つタンパク質であると推測される。残るDsoBであるが、DsoB以外は対応するDmpKLMNOPのタンパク質と同様の機能を有することが強く示唆されていることから、DsoBの機能のみがDmpLと異なる可能性は考えにくい。活性の相補されなかったDmpL、DmpN、及び活性の低下したDmpOはオキシゲナーゼコンポーネントを構成していると考えられている(Powlowski and Shingler, 1994)。そのため、

3個のタンパク質はサブユニットとして他のタンパク質より強く結合していると推測され、お互いを厳密に認識していることから、これら3個の入れ換えの場合は活性が低下したものと考えられた。3個の中では最も相同性の低いDsoEのDmpOでの置き換えの場合のみ、低いながらもDMS酸化活性を示したことから、このタンパク質の認識は他の2個に比べ厳密性が低い可能性が考えられる。

以上の遺伝子解析及び相補実験により、DsoABCDEFの各タンパク質の機能をFig. 3-28に示すように推定した。

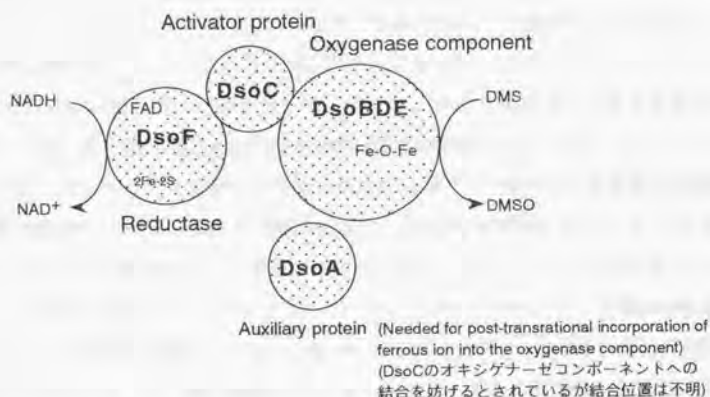


Fig. 3-28 DsoABCDEFの各コンポーネントの推定機能

今回の相補実験では、ベクターのコピー数に起因する発現量の差、及び各タンパク質の機能に由来すると考えられる活性の強弱が認められた。DsoABCDEFの各タンパク質による相補では、DsoA、B、Dの相補の場合にpSTV系ベクターにDsoABCDEF全長のコードされたpAS99の場合よりもDMS酸化活性が低下した。このうちDsoAについては、DmpKLMNOPにおいてDsoAに対応するDmpKは過剰発現するとフェノール酸化活性を阻害することが知られている (Powlowski et al., 1997)。この阻害は、DmpKがDmpL、DmpNへ結合することによってDmpM(酸化酵素の効率的なturnover

に必要な補助的タンパク質)のオキシゲナーゼコンポーネントDmpLNOへの結合が妨げられて起こると考えられている。このことから、DsoAを多コピーのpUC119由来のプラスミドから、他の5個をpSTV29由来のプラスミドから発現させた今回の実験の場合も、DsoAが相対的に過剰となってDmpKと同様の機構により活性の阻害が起こったものと考えられた。それに対し、DmpKで相補した場合には活性の低下は認められなかった。これは、DsoAとDmpKの相同性(identity)は42%であることから、このアミノ酸配列の違いによりDmpKはDsoBDEへは強く結合せず、DmpKの過剰発現はDsoAの過剰発現の場合ほど活性阻害が起こらなかったためと考えられる。

DsoDに関しては、MopKLMNOPにおいて、機構は不明だがDsoDに対応するMopNの過剰発現によって宿主菌の生育が阻害されることが報告されており(Schirmer et al., 1997)、DsoDの場合も大腸菌に何らかの阻害を与えた可能性が考えられる。

DsoBの相補での活性低下の理由は現在不明である。

DsoFの相補の場合には活性が大幅に上昇した。検出されたDMSO量は変換率で約80%で、多コピーのpUC118由来のpAU96の場合の約90%に近い値となった。このことから、少なくとも大腸菌内で発現させている場合にはDsoFの発現量がDMS酸化活性の律速となっていることが推測された。DmpKLMNOPにおいても、DsoFに対応するDmpPの大腸菌内での発現量はオキシゲナーゼユニットのDmpLNOより低いことが報告されており、DmpPの量がフェノールヒドロキシラーゼ活性の律速となっている可能性が推測されている(Nordlund et al., 1990)。大腸菌内では大腸菌の発現系によってタンパク質が発現していることから、本来の20B株内とは各タンパク質の相対的発現量が異なる可能性があるのに対し、20B株内においては各タンパク質が活性に適切な相対量で発現しているものと想像される。また、DsoFをDmpPに置き換えた場合は、DsoFの相補と同様にpAU96と同程度の高いDMS酸化活性が認められた。これについては、レダクターゼは、本来のレダクターゼと相同性の低い他の酸化酵素のレダクターゼでもオキシゲナーゼに電子伝達可能な例が知られており(Fuenmayor et al., 1998)、厳密に構造が同じでなくてもオキシゲナーゼコンポーネントに電子伝達できるためと考えられた。

DsoABCDEFがフェノールヒドロキシラーゼと高い相同性を示すことから、DsoABCDEFのフェノール類に対する活性を調べたが、大腸菌をホストに用いた場合には生成物であるカテコールはほとんど検出されなかった。この結果と同様に、DsoABCDEFと遺伝子構造の類似したフェノールヒドロキシラーゼである *Pseudomonas putida* BH株のPheA1A2A3A4A5A6は、大腸菌をホストとした場合にトリクロロエチレンに対して高い酸化活性を示すが、フェノールを基質とするとカテコールはほとんど検出されないことが報告されている (Fujita et al., 1995)。この様に、大腸菌をホストとした場合にフェノールからのカテコールの生成が検出しにくい例は他にも報告されていることから、20B株がフェノールを唯一炭素源として良好に生育すること (data not shown) も考え合わせて、カテコールの確認されない原因はホストに用いた大腸菌にあるものと推測した。

DsoABCDEFは、硫黄化合物に対してはDMS、DMSO、DESへの酸化活性を示すことが明らかとなった。C1化合物資化性のDMS資化菌、*Thiobacillus*属細菌及び*Hyphomicrobium*属細菌は最初の酸化反応としてDMSをMMとホルムアミドに分解するが、*Thiobacillus*属細菌でメチルエチルスルフィドを基質とするとエタンチオールを蓄積する例が報告されており (Visscher and Taylor, 1993)、C1化合物資化菌ではDMSのメチル基がエチル基に置換されたDESは分解できないものと考えられる。このことから各種スルフィドに対しては、20B株のようにDMSをDMSOを代謝中間体として分解するDMS資化菌の方が基質特異性が広いものと推測された。

DMSOを基質とした場合、DMSO₂の生成量が著しく低かった理由としては、基質としたDMSOがほとんど減少していなかったことから、DsoABCDEFのDMSO酸化活性そのものが低いものと考えられた。菌の生育にとって硫黄分は微量でも十分量となりうるので、活性が低くても20B株の生育に十分な量のDMSO₂が生成するものと推測される。また、DsoABCDEFの他にDMSOからDMSO₂への酸化を触媒する別の酵素が存在する可能性も考えられる。

第4章 各種酸化酵素のDMS酸化活性

4-1 緒言

3章でDMS資化菌の*Acinetobacter*属細菌20B株からのDMS酸化活性を有する酸化酵素遺伝子*dsoABCDEF*の単離と解析について述べたが、その結果、*DsoABCDEF*は*Pseudomonas*属細菌の*DmpKLMNOP*をはじめとするフェノールヒドロキシラーゼと高い相同性を有しており、*DmpKLMNOP*にもDMS酸化活性が存在することが見出された。

一方、土壌より多数のDMS資化菌が単離され、これらの菌には*DsoABCDEF*とは異なるタイプの酸化酵素が存在する可能性が考えられる。そこで、*DmpKLMNOP*等の*DsoABCDEF*と遺伝子構造の類似したマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼ、及びその他のいくつかの酸化酵素のDMS酸化活性について検討を行った。

4-2 材料、方法

4-2-1 培地、反応buffer

培地、試薬は2章、3章で述べられたものと同様のものを用いた。

4-2-2 プラスミド、大腸菌

本章で用いたプラスミドをTable 4-1に示す。ホストには大腸菌MV1184株を用いた。

4-2-3 休止菌体反応の手順

① 大腸菌の培養

大腸菌を各々のプラスミドを用いて形質転換し、形質転換後2日以内のプレート上のコロニーからアンピシリン (100 mg / l)、IPTG (200 mM) を添加した10 mlの2xYT試験管培地にうえついで、37 °C、300 strokes / minuteで培養する*。

*特に断っていない場合は、培養時間は15時間とした。(ただし、明らかにインジゴが蓄積してきた場合はその時点で培養終了した。)

② 菌体懸濁液の調製

遠心 (3000 rpm、常温、10 分) により集菌、1 ml のbuffer**で2回洗浄の後、OD₅₅₀=20となるようbufferに懸濁して菌体懸濁液を調製する。

**特に断っていない場合は、SFMMを使用した。

③ 休止菌体反応

菌体懸濁液1 mlをバイアル瓶 (14-ml crimp-seal glass vial) に移し、teflon-coated rubber septum及びaluminium crimp sealで密栓する。DMSを添加し***、30 °C、300 strokes / minuteの条件で10時間以上反応する。

***特に断っていない場合は、DMSは2 μl添加した。

④ 分析

バイアル瓶を50 ml容遠心チューブにいれ、遠心 (4000 rpm、常温、10分) して菌体を沈殿させる。上清2 μlを直接GCを用いて分析する。

実験は各々のサンプルについて3連以上で行った。

酸化酵素	由来となった菌株	実験に用いたプラスミド
DsoABCDEF	(<i>Acinetobacter</i> sp. 20B)	pAU96 (recombinant of pUC118)
DmpKLMNOP	(<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)	pUCV1261 (5.2 kb <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pV1261Δ in <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> site of pUC119)
AphKLMNOP	(<i>Comamonas testosteroni</i> TA441)	P/EE81-pUC18 (recombinant of pUC18)
TbmABCDEF	(<i>Pseudomonas</i> sp. JS150)	pUCTBM (4.8 kb <i>XhoI</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pRO2016 in <i>Sall</i> - <i>EcoRI</i> site of pUC119)
TtdB	(<i>Pseudomonas putida</i> EST4011)	pUCTFD (3.3 kb <i>Sall</i> - <i>SmaI</i> fragment of pEST4014 in <i>Sall</i> - <i>SmaI</i> site of pUC119)
XylMA	(<i>Pseudomonas putida</i> mt-2)	pUCXYL (2.0 kb <i>Sall</i> - <i>HindIII</i> fragment of pGSH2848 in <i>Sall</i> - <i>HindIII</i> site of pUC118)
CumA1 A2A3A4	(<i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01)	pIP107 (recombinant of pUC118)
PahAaAbAcAd	(<i>Pseudomonas putida</i> OUS82)	pUCPAH (5.6 kb <i>HpaI</i> - <i>SacI</i> fragment of pDI1 in <i>SmaI</i> - <i>SacI</i> site of pUC119)
CarAaAcAd	(<i>Pseudomonas</i> sp. CA10)	pUCARA (recombinant of pUC119)
SoxC	(<i>Rhodococcus</i> sp. IGTS8)	pSAD225-32 (recombinant of pBluscript KS-1)*

Table 4-1 各種酸化酵素のDMS酸化活性の検討に用いたプラスミド

pUC18/19、またはpUC118/119由来のプラスミドはそのまま、それ以外のプラスミドはpUC118/119に組み換えて実験に供した。

*大腸菌内で発現すると報告されているpSAD225-32を用いて休止菌体反応を行ったところ、まったくDMS酸化活性が認められなかったため、組み換えを行っていない。

4-3 結果

4-3-1 休止菌体反応の条件検討

実験の過程で、培養の最初からIPTGを添加する方が、培養の途中でIPTGを添加するより活性が安定することが示唆されたので、本章での休止菌体反応では培養の最初にIPTGを添加することとした。培養の最初にIPTGを添加する方法で、なるべく高い、安定した活性を示す条件の検討を行った。検討した条件は、反応buffer、基質として添加するDMS濃度、大腸菌の培養時間で、以下に順に述べる。

①反応bufferの検討

第3章の休止菌体反応では反応bufferとして20B株の培養に用いていた無機培地SFMMを使用した。休止菌体反応の反応bufferとしては一般的にリン酸bufferが用いられている。そこで、リン酸buffer (50mM, pH7)を用いて休止菌体反応を行ったが、DsoABCDEFの場合には活性の低下と共に活性の不安定化が認められた(Fig. 4-1)。塩濃度などの影響か、あるいは、DsoABCDEFは活性中心に鉄原子を含んでいることから、SFMMに微量元素として添加されている鉄イオンがSFMMでの活性の上昇と安定化をもたらしているものと考えられた。以上の結果より、休止菌体反応bufferはSFMMを用いることとした。

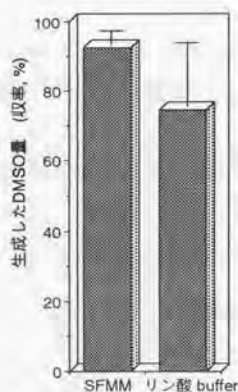


Fig. 4-1 反応bufferがDsoABCDEFのDMS酸化活性に与える影響

②添加するDMSの濃度の検討

基質としてそれぞれ1, 2, 4, 8, 10 $\mu\text{l/ml}$ (菌体懸濁液)のDMSを添加して休止菌体反応を行い、生成するDMSO量を定量した(Fig. 4-2)。実線が実際に生成したDMSO量、破線は100%変換された場合の理論値(モル数で換算)を示している。その結果、DMS添加量2 μl まではDMSはほぼ定量的にDMSOに変換されるが、それ以上は添加するDMS量を増加しても生成するDMSO量はほぼ一定であることが明らかとなった。この結果より、基質として添加するDMS量は2 μl が適当と考えられた。

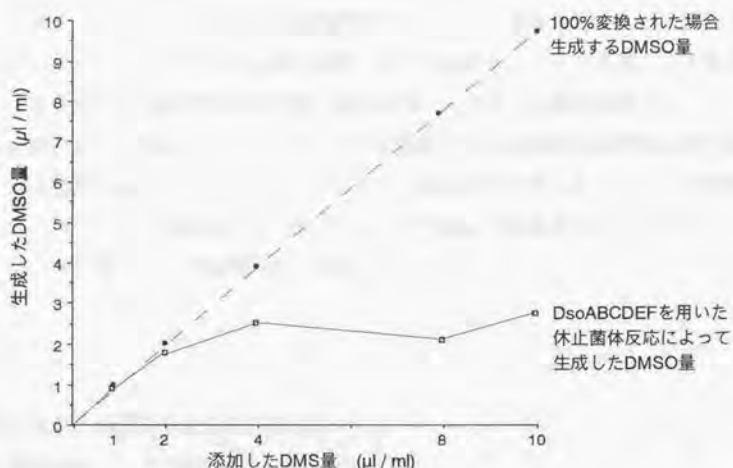


Fig. 4-2 添加するDMSの濃度がDsoABCDEFのDMS酸化活性に与える影響

③大腸菌の培養時間の検討

Fig. 4-3に大腸菌の培養時間を変化させた場合の活性の変化と集菌前的大腸菌のインジゴ呈色の様子を示す。インジゴによる呈色は培養時間10時間を過ぎた頃から始まり次第に濃紺色が濃くなっていくが、20時間あたりからは薄くなった。色が濃紺色から褐色へと変化していることから、何らかの反応が起こっているものと考えられる。活性に関しては、培養時間15時間位まではほぼ定量的なDMSOの生成が認められたが、20時間以上になると極端に低下した。DMS酸化活性とインジゴによる呈色との間に相関が認められたことから、これまでプレート上の培養などでも示唆されていたとおり、インジゴが大腸菌になんからの生育阻害を及ぼしているものと推測された。

この結果より休止菌体反応には培養時間15時間までの菌体を使うことが適当と考えられ、さらに、10時間以前は菌体濃度が薄く多数のサンプルの処理には不都合であることから10～15時間のものが最も適当と考えられた。以降の実験では、インジゴ生成がわずかに始まることで活性の存在が確認できる培養時間15時間の菌体を用いて休止菌体反応を行うこととした。ただし、培養条件の変化などにより15時間以前にインジゴの呈色が認められた場合には、その時点で集菌を行うこととした。このため、早い場合には13時間程度で集菌となった。

以上より、以降の休止菌体反応には

- ・ 反応buffer : SFMM
- ・ DMS添加量 : 2 μ l
- ・ 培養時間 : 15時間

(ただし、15時間以前にインジゴの呈色が認められた場合はその時間に集菌)

の条件を用いることとした。

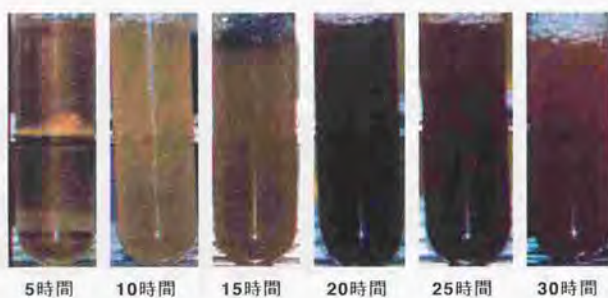
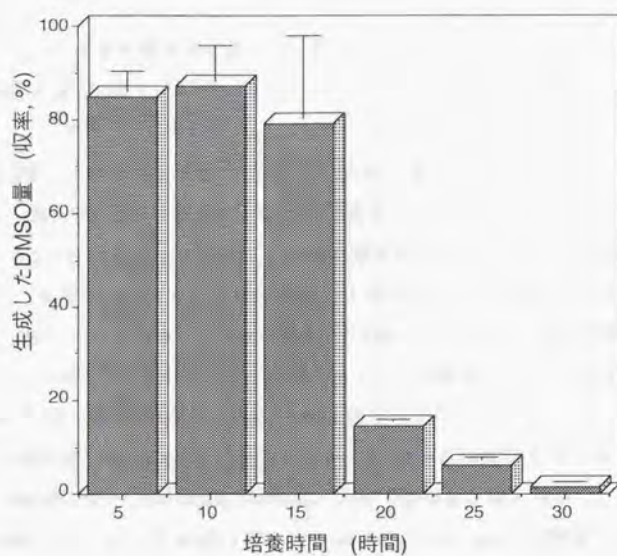


Fig. 4-3 大腸菌の培養時間による生成するDMSO量の変化、及び培養液のインジゴ発色の変化

4-3-2 各種酸化酵素のDMS酸化活性

4-3-1で決定した休止菌体反応の条件で各種酸化酵素を用いて休止菌体反応を行い、DMS酸化活性を測定した。

① マルチコンポーネントモノオキシゲナーゼ (Fig. 4-4)

報告のあるDsoABCDEと類似の遺伝子構造をもつマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼのなかにはお互いに90%以上の相同性を持つものがあるが、本実験ではある程度異なる*Pseudomonas* sp. CF600のDmpKLMNOP (Nordlund et al., 1990)、*Comamonas testosteroni* TA441のAphKLMNOP (Arai et al., 1998)、及び*Pseudomonas* sp. JS150のTbmABCDE (Johnson and Olsen, 1995)を選んだ。また、DsoABCDEと遺伝子構造は異なるが相同性を示す*P. pickettii* PKO1のトルエン-3-モノオキシゲナーゼ TbuA1UBVA2C (Byrne et al., 1995)、*P. mendocina* KR1のトルエン-4-モノオキシゲナーゼ TmoABCDE (Yen et al., 1991)は、入手できなかった。同じく、*Methylobacter capsulatus* (Bath)及び*Methylosinus trichosporium* OB3bのメタンモノオキシゲナーゼ MmoXYZorfYC (Stainthorpe et al., 1990; Cardy et al., 1991)は大腸菌内で発現せず、活性を示さないため(Murell 私信)、実験に用いなかった。

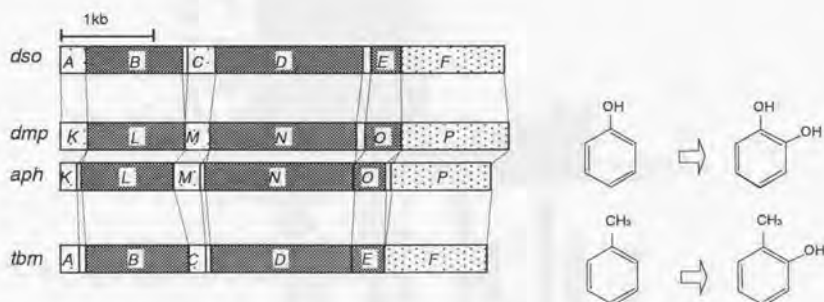


Fig. 4-4 DMSを基質とした休止菌体反応に用いたマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼの遺伝子構造と酵素本来の活性として触媒する反応

これらマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼをコードするプラスミドを用いて大腸菌MV1184を形質転換すると、すべての大腸菌形質転換体がIPTGを添加した2xYT寒天培地上でインジゴ発色を示した。これら大腸菌形質転換体を用いて休止菌体反応を行った結果、相補実験でも用いたDmpKLMNOPからはDsoABCDEFと同程度の、DMSO収率で80-90%の高いDMS酸化活性が認められた(Fig. 4-5)。一方、類似の遺伝子構造を有するにも関わらずAphKLMNOP、TbmABCDEFからのDMSOの収率は20%以下であった。DsoABCDEFと類似の遺伝子構造を有するマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼにはトリクロロエチレンの酸化活性もあることが知られているが、AphKLMNOPに関してはこのトリクロロエチレン酸化活性も他の類似のマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼと比較して低いとのことであり(新井私信)、プレート上のインジゴ発色も他の3種と比較すると薄く、DMSに対する酸化活性が低いというよりは酵素のoxygenaseとしての活性自体が低い可能性が高いと考えられる。

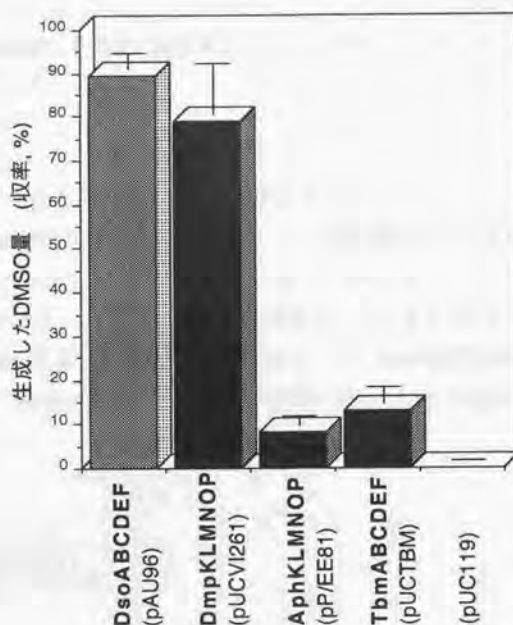


Fig. 4-5 マルチコンポーネントモノオキシゲナーゼのDMS酸化活性

②その他のモノオキシゲナーゼ

・シングルコンポーネントフェノールヒドロキシラーゼ (Fig. 4-6)

Pseudomonas putida EST4011の2, 4-ジクロロフェノールヒドロキシラーゼ TfdBはシングルコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼとして知られている(Koiv et al., 1996)。大腸菌内でもオキシゲナーゼコンポーネントのみで活性を示す酵素で、マルチコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼとの有意な相同性は見いだされない。

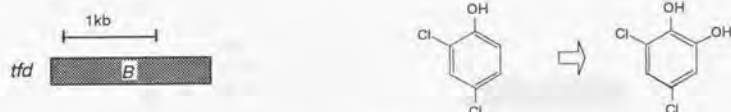


Fig. 4-6 シングルコンポーネントフェノールヒドロキシラーゼをコードする *tfdB* の遺伝子構造と触媒する2, 4-ジクロロフェノールヒドロキシラーゼ酸化反応

・2コンポーネントのモノオキシゲナーゼ (Fig. 4-7)

Pseudomonas putida mt-2のトルエン、キシレン代謝経路は115kbの巨大プラスミドTOLプラスミドpWWOに全てコードされている。XylMAはオキシゲナーゼコンポーネントとレダクターゼコンポーネントのみで活性を示すモノオキシゲナーゼで、芳香環に対する酸化を触媒するトルエンモノオキシゲナーゼ、TmoABCDEF、TbuA1UBVA2C、TbmABCDEFとは異なり、側鎖に対する酸化を触媒する(Suzuki et al., 1991)。



Fig. 4-7 トルエン/キシレンオキシゲナーゼをコードする *xylMA* の遺伝子構造と触媒するトルエン酸化反応

TfdB は、分譲されたままのプラスミドpEST4014(Fig. 4-8, *tfdRCORftfdB*をコード)を保持する大腸菌ではインジゴ発色が認められなかったが、実験に用いたpUCTFD (Fig. 4-8中の*Sall*サイト以降をpUC119に組み込んだプラスミド、*tfdC*の一部とORF、*tfdB*をコード)を保持する大腸菌では弱いながらインジゴ発色が認められた。しかし、休止菌体反応の結果、DMS酸化活性はごくわずかしが認められなかった(Fig. 4-9)。同様に、XylMAからもDMS酸化活性は認められたが、微弱であった。XylMAのインジゴ発色も、はっきり認められるがDsoABCDEF等より薄かった。

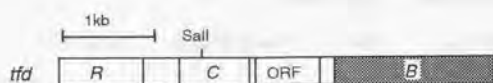


Fig. 4-8 pEST4014のコードする領域

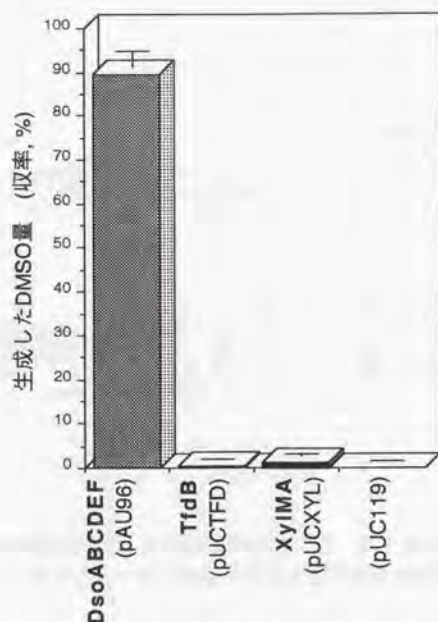


Fig. 4-9 シングルコンポーネントフェノールヒドロキシラーゼTfdB及び2コンポーネントのモノオキシゲナーゼXylMAのDMS酸化活性

③ マルチコンポーネントジオキシゲナーゼ (Fig. 4-10)

Pseudomonas fluorescens IP01のクメンジオキシゲナーゼ CumA1A2A3A4は、ビフェニルジオキシゲナーゼと類似の遺伝子構造を持つ酵素で、芳香環がひとつの化合物やビフェニル骨格を有する芳香族化合物等の一方の芳香環に対する2水酸化を触媒し、ナフタレンなど複数の芳香環が連続している化合物に対する酸化は触媒しない(Aoki et al., 1996)。

Pseudomonas putida OUS82のナフタレン、フェナントレンジオキシゲナーゼ PahAaAbAcAdはナフタレンジオキシゲナーゼと類似の遺伝子構造を持つ酵素で、ナフタレンのように2~3環が連続した芳香環を有する化合物に対し2水酸化を行う(Takizawa et al., 1994)。

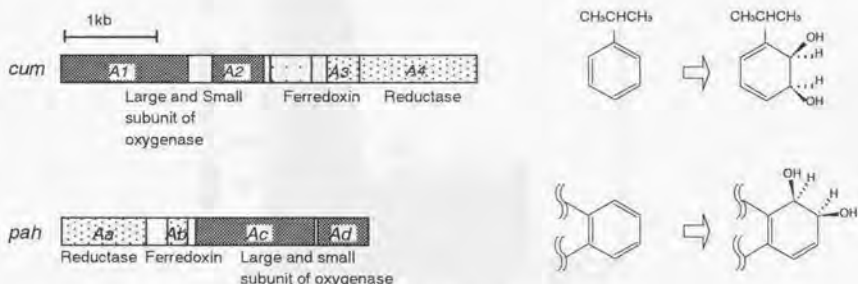


Fig. 4-10 DMSを基質とした休止菌体反応に用いたマルチコンポーネントジオキシゲナーゼの遺伝子構造と酵素本来の活性として触媒する反応

CumA1A2A3A4とPahAaAbAcAdを発現している大腸菌形質転換体も寒天培地上でインジゴ発色を示した。DMSO収率はCumA1A2A3A4、PahAaAbAcAdとも、約20%であり(Fig. 4-11)、DsoABCDEFと類似のモノオキシゲナーゼであるAphKLMNOP及びTbmABCDEFよりも高かった。

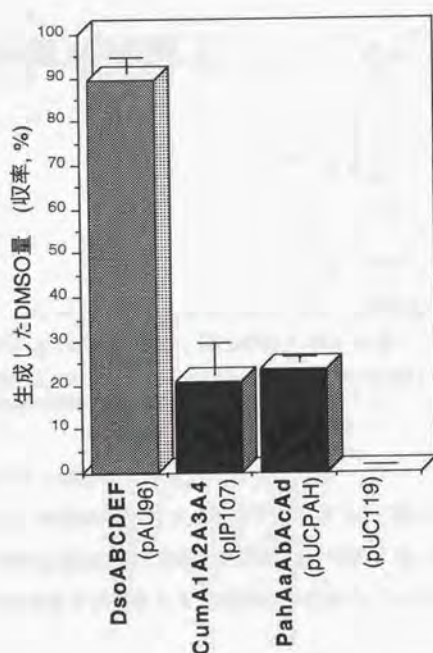


Fig. 4-11 マルチコンポーネントジオキシゲナーゼのDMS酸化活性

④ 硫黄原子に対する酸化活性が報告されている酸化酵素

これまで述べた分類とは異なるが、原油などに含まれる含硫芳香族化合物のモデル基質として生分解の研究に使用される、ジベンゾチオフェン(DBT)の酸化活性を示す酵素遺伝子が報告されている。DBTの硫黄原子はDMS同様、2個の炭素原子に結合していることから、これら酵素のDMS酸化活性の検討を行うこととした。

・カルバゾールジオキシゲナーゼ (Fig. 4-12)

Pseudomonas sp. CA10のカルバゾールジオキシゲナーゼ CarAaAbAcはカルバゾール、ジベンゾフラン等、2つの芳香環の間に窒素原子、酸素原子を含むヘテロ環を化合物に対し2水酸化を行うが、この際、酸素原子は核間に導入される (Fig. 4-12) (Sato et al., 1997)。しかし、ヘテロ原子が硫黄原子のDBTの場合には DsoABCDEFのDMS酸化と同様に硫黄原子に酸素が導入される (Nojiri et al., submitted) (Fig. 4-12)。

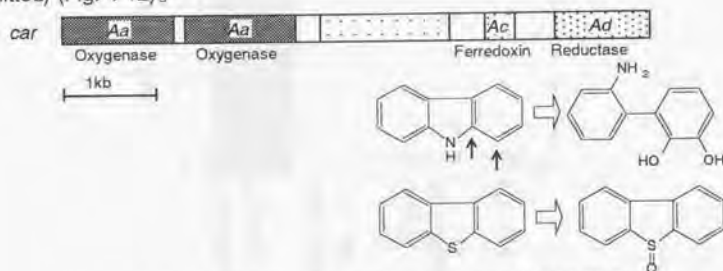


Fig. 4-12 カルバゾールジオキシゲナーゼCarAaAcAdの遺伝子構造と触媒するカルバゾール、及びDBTの酸化反応

カルバゾールの酸化では分子の図中矢印で示した部位に酸素原子が導入される。生成する化合物は非常に不安定なため、すぐにspontaneousな環開裂が起こり、図に示す化合物が生成する。

・DBTジオキシゲナーゼ (Fig. 4-13)

Rhodococcus sp. IGTS8のDBTジオキシゲナーゼ SoxCはシングルコンポーネントで活性を持ち、DBTの硫黄原子に2個の酸素原子を添加する。CarAaAcAdの場合と異なり、酸素原子1個のみが添加された化合物は検出されていない (Denome et al., 1994)。

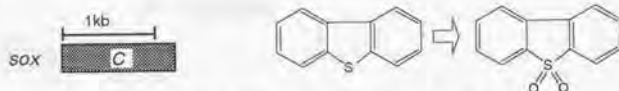


Fig. 4-13 DBTジオキシゲナーゼSoxCの遺伝子構造と触媒するDBT酸化反応

CarAaAcAdを発現している大腸菌形質転換体は極めて微弱なインジゴ発色しか示さず、SoxC場合にはインジゴ発色は認められなかった。DBTへの酸化活性からDMSへの酸化活性も期待された両酵素だが、どちらもDMS酸化活性は認められなかった(Fig. 4-13)。SoxCはDMSO₂の生成する可能性もあるが、GC分析の結果、DMSO₂も検出されなかった(Fig4-14)。

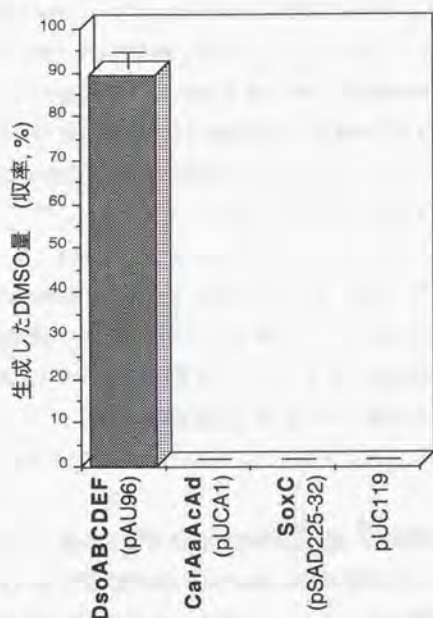


Fig. 4-14 CarAaAcAd及びSoxCのDMS酸化活性

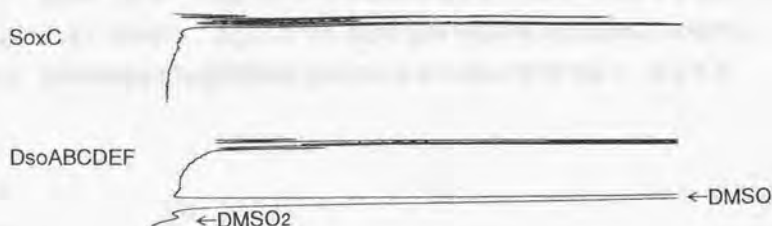


Fig. 4-15 SoxCを用いてDMSを基質とした休止菌体反応反応液のGC分析の結果

4-4 考察

本章の研究により、多種類の酸化酵素がDMS酸化活性を有することが見いだされた。この結果から、多くの芳香族化合物酸化酵素にDMS酸化活性が存在することが示された。しかしながら、大腸菌を宿主に用いた今回の条件ではDsoABCDEFと同程度の高いDMS酸化活性が検出されたのはDmpKLMNOPだけであり、類似の遺伝子構造を有するAphKLMNOP、TbmABCDEFのDMSOの収率は20%以下であった。これらの遺伝子構造が類似の4種の酸化酵素について、各コンポーネントごとの相同性を調べたところ、DsoABCDEFとDmpKLMNOP間、AphKLMNOPとTbmABCDEF間で他より高い傾向が認められている (Table 4-2、DsoABCDEFとDmpKLMNOP間、AphKLMNOPとTbmABCDEF間はbold体で示す)。

シングルコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼTfdBは微弱なDMS酸化活性しか示さなかった。XylIMAも同様であったが、ジオキシゲナーゼのCumA1A2A3A4、PahAaAbAcAdは、DsoABCDEFのオキシゲナーゼコンポーネントとは特に有意な相同性が見出されないにも関わらず、いずれもAphKLMNOP、TbmABCDEFより高いDMS酸化活性を示した。また、DBTの硫黄原子に対する酸化活性が存在することからDMSの酸化活性もあるものと期待された、カルバゾールジオキシゲナーゼCarAaAcAd、DBTジオキシゲナーゼSoxCにはDMSの酸化活性は認められなかった。

今回の結果により、様々な芳香族化合物酸化酵素にDMS酸化活性があることが示された。これらのDMS酸化活性は、CarAaAcAdが微弱なインジゴ発色を示しながらもDMS酸化活性は見いだされなかった以外、インドールの酸化活性とほぼ相関していた。土壌から単離したDMS酸化菌の多くはインドールの酸化活性を示さないことから、自然界では多くの菌が様々なDMS酸化活性を有する酵素を持っているものと推測される。今後は、これらインドール酸化活性を示さない酵素遺伝子の取得と解析が、DMSを経由する硫黄循環を解明するために極めて重要であると考えられる。

	DsoA	DmpK	AphK	TbmA
DsoA		42	25	30
DmpK			34	33
AphK				45
TbmA				

	DsoB	DmpL	AphL	TbmB
DsoB		49	39	38
DmpL			45	46
AphL				61
TbmB				

	DsoC	DmpM	AphM	TbmC
DsoC		58	41	42
DmpM			46	50
AphM				64
TbmC				

	DsoD	DmpN	AphN	TbmD
DsoD		69	61	62
DmpN			62	62
AphN				80
TbmD				

	DsoE	DmpO	AphO	TbmE
DsoE		42	42	32
DmpO			49	39
AphO				62
TbmE				

	DsoF	DmpP	AphP	TbmF
DsoF		67	54	53
DmpP			58	57
AphP				64
TbmF				

Table 4-2 実験に用いたマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼの
コンポーネント間のアミノ酸レベルの相同性 (identity)
表中、DsoABCDEFとDmpKLMNOP間、
AphKLMNOPとTbmABCDEF間は太字で示した。

人為起源の二酸化硫黄について大気への放出量が多いDMSは、地球規模での硫黄循環において重要な役割を果たすことが示唆されつつも、ほとんどが自然界由来であることもあってその変換については充分解明されていない。特に微生物の関与については、DMSの生成、変換において微生物の果たす役割が大きいことが示唆されはじめたのもごく最近のことである。当研究室では土壌中にDMSをDMSOへと変換した後、更に代謝を行って硫黄源として利用可能な菌株が多数存在していることを見いだしており、このような菌株が硫黄循環において果たす役割を解明するための研究を進めてきた。特にこれまでDMS酸化菌からのDMS酸化活性を有する酵素遺伝子の取得はなされていなかったことから、本研究ではインジゴ発色を利用してDMS酸化活性を有する酵素遺伝子*dsoABCDEF*の単離を行った。

DsoABCDEFはフェノールヒドロキシラーゼである*Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250株のMopKLMNOP (Ehrt et al., 1995)、*Pseudomonas*属細菌CF600株のDmpKLMNOP (Nordlund et al., 1990)等のマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼと高い相同性(identity)を示した。遺伝子解析を行うとともに、最も解析が進んでいるDmpKLMNOPとの相補実験を行ってDsoABCDEFの各タンパク質の機能は対応するDmpKLMNOPのタンパク質と同様であることを確認し、DsoBDEをオキシゲナーゼコンポーネント、DsoFをレダクターゼと推定した。また、DsoAはオキシゲナーゼに鉄イオンを挿入するタンパク質、DsoCはオキシゲナーゼの活性化に関与する補助タンパク質と推測された。

この相補実験の際に、DsoDとDmpN、DsoBとDmpLの間で、相補による活性の回復が起こらず、DsoEの代わりにDmpOを発現させた場合も活性が低下することが見いだされた。これら3個のタンパク質は、オキシゲナーゼコンポーネントを構成するサブユニットと考えられており、これらタンパク質間での相互認識は他より厳密なために活性が低下したものと推測された。現在のところ、DsoABCDEFと同じ遺伝子構造を有するマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼでは、オキシゲナーゼコンポーネントの立体構造は報告されていない。オキシゲナーゼコンポーネントの構造解析を行うことで、この活性の低下の原因となったアミノ酸の相違も解明できるものと考えられる。

DsoABCDEFは*Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250株のMopKLMNOPと非常に類似しており、*mopKLMNOP*上流にはフェノール誘導性の制御系タンパク質MopRがコードされていることが報告されている(Schirmer et al., 1997)。また、フェノールを与えて寒天培地上に生育させた20B株コロニーにインドールを与えると強いインジゴ発色を示すことから、DsoABCDEFはフェノールで強く誘導される酵素であるものと推測される。そこで、フェノールを培地に添加してDMSを基質に20B株の生育菌体反応を行ったところ、フェノールを添加しない場合と比較して10倍以上のDMSOの生成が認められた。この結果によりDsoABCDEFがフェノールで強く誘導されること、また、発現したDsoABCDEFは20B株に高いDMS酸化活性を付与することが示された。しかし、フェノールを添加していない場合にもDMSOは検出されることから、微量のDsoABCDEFが構成的に発現している可能性と、DsoABCDEF以外にDMS酸化活性を有する酵素が存在する可能性とが考えられる。この確認を行うためには、薬剤耐性遺伝子を*dsoBCDEF*中に組み込んで破壊した変異*dsoABCDEF*を相同組換えによって20B株内に導入し、この20B株変異株のDMS酸化活性を親株の20B株と比較する方法が考えられる。これまでに、ストレプトマイシン耐性遺伝子を挿入して破壊した組みかえ*dsoABCDEF*を作製し、electroporationによる遺伝子導入及び相同組換えの条件検討を行って遺伝子破壊の条件を決定した。実験によりこの条件で相同組換えが可能であることが確認されたが、20B株は様々な抗生物質に耐性を示し、感受性のストレプトマイシンに対しても耐性変異株が高い頻度で出現することも明らかとなった。そのため、ストレプトマイシン選択培地上に生育した変異株から遺伝子導入された変異株を選抜するのにサザンハイブリダイゼーションによる確認を行う必要があり、手順の煩雑さから現在のところ*dsoABCDEF*の破壊された20B変異株の取得には至っていない。サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子導入の確認の際、*dsoABCDEF*の2.5 kb *Xba*I-*Bam*HI断片(*dsoABC*及び*D*の一部を含む)をプローブに用いると、強くハイブリダイズする*dsoABCDEF*のバンドと共に、それとは別の薄いバンドが検出された。この薄いバンドは遺伝子導入していない20B株でも確認されたことから、20B株内に*dsoABCDEF*と相同性を有する別の酸化酵素が存在する可能性が示唆された。この酸化酵素にDMS酸化活性が存在する可能性が考えられることから、*dsoABCDEF*の遺伝子破壊実験と並行して、この酸化酵素をコードする遺伝子の取得を試みている。

また、DsoABCDEFはフェノールヒドロキシラーゼと高い相同性を示したので、様々な芳香族化合物酸化酵素のDMS酸化活性を調べ、多くの酸化酵素がDMS酸化活性を有することを見いだした。このことは、様々な酵素がDMSをDMSOへと酸化可能であることを示唆していると考えられる。土壌からDMSを硫黄源として生育することが可能な菌株が多数取得されることから、微生物によるDMSのDMSOへの酸化は土壌中で普遍的に起こっているものと推測される。今回DMS酸化活性を調べた酸化酵素に関しては、DMSの酸化活性とインドールの酸化活性には相関が認められたが、20B株の単離の際、土壌から単離したDMS酸化菌の多くはインドールの酸化活性を示さなかった。これは、自然界では多くの菌がDMS酸化活性を有しているが、そのDMS酸化酵素は多様であることを示唆している。今後、微生物によるDMS変換の全容を解明していくためには、インドール酸化活性を示さないDMS酵素遺伝子の単離及び解析もきわめて重要であると考えられる。

*dsoABCDEF*の取得に至るまでDMS酸化活性を有する酸化酵素遺伝子の取得が困難であったのは、酸化活性の適当な検出方法が見いだせなかったからであった。DMSの変換物としてDMSOをGC等で検出する方法が最も直接的で確実であるが、非常に手間がかかることから、多数のクローンのDMS酸化活性を調べるのには適していない。そのため、一度に40 kb程度の遺伝子断片をクローン化できるコスミドを用い、このコスミドを保持する大腸菌形質転換体のDMS酸化活性を検出することを考えた。そこで、新たにDMS酸化能の強い菌株を土壌より単離し、数株についてコスミドを用いたDMS酸化酵素遺伝子のクローン化を試み、各々2000~3000株の変異株について検討を行ったが、現在までのところ取得には至っていない。最も問題となったのは、用いたコスミドではクローン化された遺伝子に発現誘導がかけられなかった点、及び多くの形質転換体に微弱なDMS酸化活性が検出されてしまった点である。そのため活性の有無の判別が難しく、大腸菌内でDMS酸化酵素が活性を示していても検出に至らなかった可能性が考えられる。また、実験に供した細菌のDMS酸化酵素が大腸菌内では活性を示さなかった可能性も充分考えられる。

コスミドを用いて直接DMS酸化酵素遺伝子のクローニングを試みる以外の方法としては、DMS酸化菌内のDMS酸化酵素遺伝子のトランスポゾン等を用いた破壊が考えられる。遺伝子破壊の場合はDMS酸化活性の消失を検出する必要があるが、DMS残存量を測定するのはDMSOの検出よりはるかに手順が煩雑で事実上不可能であることから、DMSへの生育が不可能となることを指標とする方が望ましい。しか

し、硫黄源は微量でも細菌の生育に十分となりうること、硫黄源が完全に除去された固形培地は現在のところ作製できていないことから、DMS酸化酵素遺伝子が破壊されても用いた固形培地上で細菌がある程度生育する可能性が大きい。DMSへの生育が非常に良好な菌株であれば、遺伝子破壊によって生育が遅滞することを指標にできる可能はあるものと考えられる。そこで、DMSを硫黄源とした生育が非常に良好な菌株の取得を行うと共に、メンブレンフィルター等を用いて硫黄源を含まない固形培地の作成を試みている。微生物によるDMS変換の解明のためには、インドール酸化活性を有する酵素とは異なるDMS酸化酵素に関する知見は必須であり、今後、このような酸化酵素遺伝子の取得が必要と考えられる。

- Andreae, M. O., and W. Jaeschke. 1992. Exchange of sulfur between biosphere and atmosphere over temperate and tropical regions. In *Sulfur cycling and continents* (ed. R. W. Howarth, J. W. B. Stewart & M. V. Ivanov), pp. 27-61. Chichester: John Wiley and Sons.
- Aoki, H., T. Kimura, H. Habe, H. Yamane, T. Kodama, and T. Omori. 1996. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of the genes encoding enzymes involved in the degradation of cumene to 2-hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid in *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J. Ferment. Bioeng.* 81:187-196
- Arai, H., S. Akahira, T. Ohishi, M. Maeda, T. Kudo. 1998. Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology* 144: 2895-2903
- Bates, T. S., B. K. Lamb, A. Guenther, J. Dignon, and R. E. Stoiber. 1992. Sulfur emissions to the atmosphere from natural sources. *J. Atmos. Chem.* 14: 315-337
- Byrne, A. M., J. J. Kukor, and R. H. Olsen. 1995. Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *Gene* 154: 65-70
- Cardy, D. L., V. Laidler, G. P. Salmond, and J. C. Murrell. 1991. Molecular analysis of the methane monooxygenase MMO_o gene cluster of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Mol. Microbiol.* 5: 335-342
- Cho, K. S., M. Hirai, and M. Shoda. 1991. Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* 71:384-389.
- Davison, B., C. O'Dowd, C. N. Hewitt, M. H. Smith, R. M. Harrison, D. A. Peel, E. Wolf, Y. R. Mulvan, M. Schwikowski, and U. Baltensperger. 1996. Dimethyl sulfide and its oxidation products in the atmosphere of the Atlantic and southern oceans. *Atmospheric Environment* 30: 1895-1906
- de Bont, J. A. M., J. P. Van Dijken, and W. Harder. 1981. Dimethyl sulphoxide and dimethyl sulphide as a carbon, sulphur and energy source for growth of *Hyphomicrobium* S. *J. Gen. Microbiol.* 127: 315-323
- Denome, S. A., C. Oldfield, L. Nash, and K. D. Young. 1994. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J. Bacteriol.* 176, 6707-6716
- De-Zwart, M. M. J., P. N. Nelisse, and J. G. Kuenen. 1996. Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethyl sulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 261-270
- De-Zwart, M. M. J. and J. G. Kuenen. 1997. Aerobic conversion of dimethyl sulfide and hydrogen sulfide by *Methylophaga sulfidovorans*: Implications for modeling DMS conversion in a microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 155-165
- Ehr, S., F. Schirmer, and W. Hillen. 1995. Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol. Microbiol.* 18:13-20
- Fuenmayor, S. L., M. Wild, A. L. Boyes, and P. A. Williams. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.* 180: 2522-30
- Fürste, J. P., W. Pansegrau, R. Frank, H. Bloecker, P. Scholz, M. Bagdasarjan, and E. Lanka. 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* 48: 119-132
- Fujita, M., M. Ike, J. I. Hioki, K. Kataoka, and M. Takeo. 1995. Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. *Journal of Ferment. Bioeng.* 79: 100-106
- Fuse, H. 1998. Transformation and degradation of dimethyl sulfide by marine microorganisms or by their products. *Microbes and Environments* 13: 115-121
- Gould, W. D., and T. Kanagawa. 1992. Purification and properties of methyl mercaptan oxidase from *Thiobacillus thioparus* TK-m. *J. Gen. Microbiol.* 138: 217-221
- Habe, H., K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 1996. Analysis of cumene (isopropylbenzene) degradation genes from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4471-4477.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hanlon, S. P., R. A. Holt, G. R. Moore, and A. G. McEwan. 1994. Isolation and characterization of a strain of *Rhodobacter sulfidophilus*: A bacterium which grows autotrophically with dimethyl sulphide as electron donor. *Microbiology (Reading)* 140: 1953-1958

- Hatton, A. D., G. Mallin, S. M. Turner, and P. S. Liss. 1996. DMSO: a significant compound in the biogeochemical cycle of DMS. In *Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds*. (ed. R. P. Kiene, P. T. Visscher, M. D. Keller and G. O. Kirst), pp. 405-412. New York: Plenum Press.
- Hewitt, C. N., and B. Davison. 1997. Field measurements of dimethyl sulphide and its oxidation products in the atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **352**: 183-189.
- Higgins D. G., and P. M. Sharp. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**:151-153.
- Horinouchi M, Kasuga K, Nojiri H, Yamane H, Omori T. 1997. Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**: 99-105.
- Johnson, G. R., and R. H. Olsen. 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3336-3346.
- Kertesz, M. A., A. M. Cook, and T. Lelsinger. 1994. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 195-215.
- Kiene, R. P., and T. S. Bates. 1990. Biological removal of dimethyl sulfide from sea water. *Nature* **345**: 702-705.
- Koiv, V., R. Marits, and A. Heinaru. 1996. Sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase gene *tfdB* and 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase gene *tfdC* of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011. *Gene* **174**: 293-297.
- Langner J., and H. Rodhe. 1991. A global three-dimensional model of the tropospheric sulfur cycle. *J. atmos. Chem.* **13**: 225-263.
- Lelieveld, J., G.-J. Roelofs, L. Ganzeveld, J. Feichter, and H. Rodhe. 1997. Terrestrial sources and distribution of atmospheric sulphur. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **352**:149-158.
- Lovelock, J. E., and R. J. Maggs. 1972. Atmospheric DMS and the natural sulphur cycle. *Nature* **237**: 452-453.
- Ng, L.C., V. Shingler, C. C. Sze, and C. L. Poh. 1994. Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl) phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. *Gene* **151**: 29-36.
- Ni, S. and D. R. Boone. 1991. Isolation and characterization of a dimethyl sulfide-degrading methanogen, *Methanobrevibacter* HI350, from an oil well, characterization of *Methanobrevibacter* HI350 T4/M-T, and emendation of *Methanobrevibacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**: 410-416.
- Nojiri, H., J.-W. Nam, M. Kosaka, K. Morii, T. Takemura, K. Furihata, H. Yamane, and T. Omori. Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) from *Pseudomonas* sp. strain CA10 catalyzes a variety of oxygenase reactions: Angular dioxygenation, *cis*-dihydroxylation, and sulfoxidation. submitted.
- Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler. 1990. Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6826-6833.
- Ogata, K., C. Kaniel-Ishii, M. Sasaki, H. Hatanaka, A. Nagadoi, M. Enari, H. Nakamura, Y. Nishimura, S. Ishii, and A. Sarai. 1996. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat. Struct. Biol.* **3**:178-87.
- Omori, T., L. Monna, Y. Saiki, and T. Kodama. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* strain SY1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 911-915.
- Omori, T., Y. Saiki, K. Kasga, and T. Kodama. 1995. Desulfurization of alkyl and aromatic sulfides and sulfonates by dibenzothiophene desulfurizing *Rhodococcus* sp. strain SY1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 1195-1198.
- Otaka, E., and T. Ooi. 1989. Examination of protein sequence homologies. 5. New perspectives on evolution between bacteria and chloroplast-type ferredoxins inferred from sequence evidence. *J. Mol. Evol.* **29**: 246-254.
- Park, S. J., M. Hirai, M. Shoda. 1993. Treatment of exhaust gases from a night soil treatment plant by a combined deodorization system of activated carbon fabric reactor and peat biofilter inoculated with *Thiobacillus thioautotrophicus* DW44.J. *Ferment. and Bioengineering* **76**: 423-426.

- Penner, J. E., C. A. Atherton, and T. E. Graedel. 1994. Global emissions and models of photochemically active compounds. In *Global atmospheric-biospheric chemistry* (ed. R. Prinn), pp. 223-248. New York: Plenum Press.
- Phae, C. G., and M. Shoda. 1991. A new fungus which degrades hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide. *Biotechnol. Lett.* **13**:375-380.
- Pham, M., J. F. Müller, G. P. Brasseur, C. Granier, and G. Mégie. 1995. A three-dimensional study of the tropospheric sulfur cycle. *J. geophys. Res.* **100**: 26061-26092.
- Pol, A., H., J., M., Op-Den-Camp, S., G., M., Mees, M., A., S., H., Kersten, and C., Van-Der-Drift. 1994. Isolation of a dimethylsulfide-utilizing *Hyphomicrobium* species and its application in biofiltration of polluted air. *Biodegradation* **5**(2): 105-112.
- Powlowski, J., J. Sealy, V. Shingler, and E. Cadieux. 1997. On the role of DmpK, an auxiliary protein associated with multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Biol. Chem.* **272**: 945-951.
- Powlowski, J., and V. Shingler. 1990. In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6834-6840.
- Powlowski, J., and V. Shingler. 1994. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* **5**: 219-236.
- Qian, H., U. Edlund, J. Powlowski, V. Shingler, and I. Sethson. 1997. Solution structure of phenol hydroxylase protein component P2 determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **36**: 495-504.
- Ravishankara, A. R., Y. Rudich, R. Talukdar, and S. B. Barone. 1997. Oxidation of atmospheric reduced sulphur compounds: Perspective from laboratory studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **352**: 171-182.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sato, S., N. Ouchiya, T. Kimura, H. Nofiri, H. Yamane, and T. Omori. 1997. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequence of genes and characterization of meta-cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* **179**: 4841-4849.
- Schirmer, F., S. Eht, and W. Hillen. 1997. Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J. Bacteriol.* **179**: 1329-1336.
- Shine, J., and L. Dalgarno. 1975. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* **254**: 34-38.
- Shooter, D., and P. Brimblecombe. 1989. Dimethylsulfide oxidation in the ocean. *Deep-Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* **36**(4):577-586.
- Simon, M. J., T. D. Osslund, R. Saunders, B. D. Ensley, and S. Suggs, A. A. Harcourt, W.-c. Suen, D. L. Cruden, D. T. Gibson, and G. J. Zylstra. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strain G7 and NCIB 9816-4. *Gene* **127**: 31-37.
- Sivelä, S., and V. Sundman. 1975. Demonstration of *Thiobacillus*-type bacteria which utilize methyl sulphides. *Arch. Microbiol.* **103**:303-304.
- Smet, E., H. Van-Longhove, and W. Verstraete. 1997. Isobutyraldehyde as a competitor of the dimethyl sulfide degrading activity in biofilters. *Biodegradation* **8**(1): 53-59.
- Smith, N. A., and D. P. Kelly. 1988. Isolation and physiological characterization of autotrophic sulfur bacteria oxidizing dimethyl disulfide as sole source of energy. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1407-1417.
- Smith, N. A., and D. P. Kelly. 1988. Mechanism of oxidation of dimethyl disulphide by *Thiobacillus thioparus* strain E6. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3031-3039.
- Spiro, P. A., D. J. Jacob, and J. A. Logan. 1992. Global inventory of sulfur emissions with $1^\circ \times 1^\circ$ resolution. *J. geophys. Res.* **97**: 6023-6036.
- Stalnthorpe, A. C., V. Lees, G. P. C. Salmond, H. Dalton, and J. C. Murrell. 1990. The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* Bath. *Gene* **91**: 27-34.
- Suylen, G. M. H., G. C. Stefess, and J. G. Kuenen. 1986. Chemolithotrophic potential of a *Hyphomicrobium* species, capable of growth on methylated sulfur compounds. *Archives of Microbiology* **146**(2): 192-198.
- Suylen, G. M. H., P. J. Large, J. P. Van Dijken, and J. G. Kuenen. 1987. Methyl mercaptan oxidase, a key enzyme in the metabolism of methylated sulphur compounds by *Hyphomicrobium* EG. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2989-2997.
- Suzuki, M., T. Hayakawa, J. P. Shaw, M. Rekik, and S. Harayama. 1991. Primary Structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *J. Bacteriol.* **173**: 1690-1695.

- Takeo, M., Y. Maeda, H. Okada, K. Miyama, K. Mori-K, M. Ike, and M. Fujita. 1995. Molecular cloning and sequencing of the phenol hydroxylase gene from *Pseudomonas putida* BH. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 485-488.
- Takizawa, N., N. Kaida, S. Torigoe, T. Moritani, T. Sawada, S. Satoh, and H. Kiyohara. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* **176**: 2444-2449.
- Tallant, T. C., and J. A. Krzycki. 1997. Methylthiol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethyl sulfide and methylmercaptopropionate. *J. Bacteriol.* **179**: 6902-6911.
- Tanimoto, Y. and F. Bak. 1994. Anaerobic degradation of methylmercaptan and dimethyl sulfide by newly isolated thermophilic sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2450-2455.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-80.
- 東京大学医科学研究所制御研究部編「新細胞工学実験プロトコール」秀潤社
- Turner, S., M., and P. D. Nightingale, L., J., Spokes, M., I., Liddicoat, P., S., Liss. 1996. Increased dimethyl sulphide concentrations in sea water from insitu iron enrichment. *Nature (London)* **383**: 513-517.
- Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**: 3-11.
- Visscher, P. T., and H. Van Gernerden. 1991. Photo-autotrophic growth of *Thiocapsa roseopersicina* on dimethyl sulfide. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 247-250.
- Visscher, P. T., and B. F. Taylor. 1993. A new mechanism for the aerobic catabolism of dimethyl sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3784-3789.
- Warneck, P. 1988. Chemistry of the natural atmosphere. San Diego: Academic Press.
- Yen, K.-M., M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset, H. S. Lu., A. A. Harcourt, and K. K. Chen. 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* **173**: 5315-5327.
- Yen, K. M., and M. R. Karl. 1992. Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* **174**: 7153-7261.
- Zeyer, J., P. Eicher, S. G. Wakeham, and R. P. Schwarzenbach. 1987. Oxidation of dimethyl sulfide to dimethyl sulfoxide by phototrophic purple bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2026-2032.
- Zhang, L., M. Hirai, and M. Shoda. 1991. Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol and hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp. 155 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 392-396.
- Zhang, L., I. Kuniyoshi, M. Hirai, and M. Shoda. 1991. Oxidation of dimethyl sulfide by *Pseudomonas acidovorans* DMR-11 isolated from peat biofilter. *Biotechnol. Lett.* **13**: 223-228.

謝辞

本論文を終えるに当たりまして、親身なご指導と暖かい励ましをしてくださいました東京大学生物生産工学研究センター生物制御工学研究室教授 大森俊雄先生、常時熱心にご指導くださり、細部に到るまでご配慮いただきました元同研究室助教授、現在東京大学農学生命科学研究科応用生命工学生物構造工学研究室教授 山根久和先生、東京大学生物生産工学研究センター生物制御工学研究室助手 野尻秀昭先生に深謝いたします。また、同様に様々な面でお世話になりました元同研究室助手 西村靖彦先生に深く感謝いたします。

貴重なプラスミドを快く分譲して下さいました、理化学研究所 工藤俊章先生、海洋バイオテクノロジー研究所 原山重明先生、岡山理科大学 浄原法蔵先生、東京大学医科学研究所 笹川千尋先生、University of Umeå V. Shingler博士、University of Michigan Medical School R. H. Olsen博士、University of Tartu V. Koiv博士、University of North Dakota K. D. Young博士、に深く感謝いたします。

また、実験を行う上で貴重なご指導、ご助言を頂きました、元東京大学農学生命科学研究科応用生命工学専攻応用微生物学研究室教授 児玉徹先生、同研究室 木邑敏章氏、小松徹史氏、斎木 裕子氏、理化学研究所 新井博之氏、生物制御工学研究室 春日和氏、NEDO 高見和孝氏に深く感謝いたします。

そして、本研究をまとめる上で様々な御協力いただきました、南貞媛氏、吉田貴子氏、池田直弘氏、八木研氏、能村隆氏、遠藤隆主氏、綾部裕子氏をはじめ、生物制御工学研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、陰ながら支えて下さった両親に深く感謝いたします。

平成11年 1月

堀之内 正枝



