

(57) PCB 分解菌における 分解代謝産物存在下での分解遺伝子の転写抑制

伊藤拓¹・荒木直人²・遠藤銀朗¹・福田雅夫²・宮内啓介^{1*}

¹東北学院大学工学研究科 (〒985-8537宮城県多賀城市中央1-13-1)

²長岡技術科学大学工学部生物系 (〒940-2188新潟県長岡市上富岡町1603-1)

* E-mail: kmiya@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

ポリ塩化ビフェニル分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のビフェニル初発分解に関与する *bphAa* 遺伝子の転写は、ビフェニル存在下で活性化することが知られている。本研究では、ビフェニルの分解産物である安息香酸存在下でその転写活性化が抑制されることを見出した。抑制の原因物質を解明するため、安息香酸以降の代謝産物の分解遺伝子を破壊することで代謝産物を蓄積させる株を作製し、レポータープラスミドを用いて *bphAa* プロモーター活性を測定した。安息香酸分解遺伝子 *benA* を破壊した株では野生株と比較して抑制が弱まったが、その直下流の代謝産物である *cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate (DHC) 分解遺伝子 *benD* を破壊した株、カテコール分解遺伝子 *catA* を破壊した株では、ビフェニル存在下においても活性化の抑制が観察された。これらの結果から、カテコールおよび DHC が転写抑制に関与していることが強く示唆された。

Key Words : PCB, *Rhodococcus*, catabolite repression

1. はじめに

人類は科学技術の発展に伴い様々な化学物質を人工的に合成し使用し続けることによって、それらの化学物質を環境中に放出してきた。これらの物質は、通常天然には存在しない化合物であり、化学的な安定性や機能性を重視して合成されたため分解されにくく、生体に対して毒性を示し、環境を汚染する場合がある。そのような環境汚染物質の一つとしてポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl, 以下 PCB) がある。PCB は、ビフェニル環上の水素原子が塩素原子に置換した化合物の総称であり、理論的には 209 種類の異性体が合成可能である。一般的に PCB と呼ばれているものは様々な異性体の混合物である。

PCB は 1881 年にドイツの化学者シュミットとシュルツによって初めて合成された¹⁾。PCB は化学的に非常に安定な物質であり、絶縁性、不燃性、高脂溶性、低揮発性等の優れた特性を有していることから大量生産され、幅広く利用された。しかし、1960 年代後半にスウェーデンで死んだ海鳥の体内から高濃度の PCB が検出されたのをきっかけに、世界各国で PCB による汚染が報告

された。日本では 1968 年に、食用油の脱臭のための熱媒体として利用されていた PCB の配管に穴が開いたことにより PCB が混入し、人体に深刻な被害をもたらしたカネミ油症事件が発生した^{1,2)}。この時混入した PCB の濃度は約 1,000 ppm で、人体に大きな影響を与えるだけの高濃度汚染であった²⁾。

その後 PCB は、発癌性、ホルモン異常、内臓障害、胎児への催奇性などの生物に対する有害性を示すことが発覚し、1970 年代には環境汚染物質と認識され使用・生産・廃棄が制限された¹⁾。PCB 特別措置法に基づく PCB 廃棄物等の届出の全国集計結果によると平成 15 年 3 月 31 日現在、PCB は 93t、PCB を含む油は 175,244t が保管されている¹⁾。しかし、廃棄できず保管された PCB は処理が進んでいない。このようなことから PCB の処理と汚染の浄化は重要な課題の一つであると考えられる。

PCB を無害化する方法として、物理・化学的処理と生物学的処理がある。物理・化学的処理としては高温焼却処理、紫外線やアルカリ触媒での塩素除去によってビフェニルに変換する方法等が開発されている。しかし、物理・化学的処理は処理条件が厳しい、コストが高いなどの問題がある。

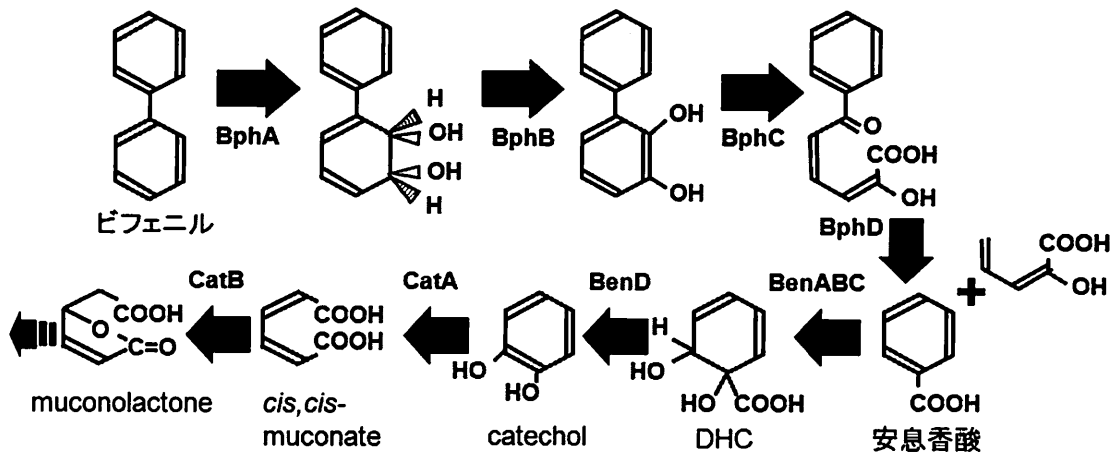


図-1 *Rhodococcus jostii* RHA1におけるビフェニル分解経路

一方、生物学的処理は微生物の分解能力を活用した方法である。生物学的処理は物理・化学的処理と比べて安価で安全な方法になると考えられるため実用化が望まれている。

PCB汚染の微生物を用いた浄化を目的として、これまでの研究でPCB分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1が単離され、そのPCB分解経路、及び分解に関与する遺伝子群(*bph*遺伝子群)が明らかにされている(図-1)⁹⁾。また、これらの分解遺伝子群はゲノム上に分かれて存在しているが、共通のプロモーター領域を持っており、ビフェニル存在下でBphSおよびBphTタンパク質によって同時に転写が活性化されることが明らかになっている⁹⁾。RHA1株はPCBのみが存在する環境下ではPCBを分解しない。しかし、ビフェニルが共存するとビフェニルを分解する酵素群の発現が誘導され、これらの酵素は基質特異性が低いため、PCBの分解も同時に触媒する。これを共代謝(co-metabolism)という。

PCB分解菌の環境工学的利用に関しては、紫外線でPCBを脱塩素をして低塩素置換のものに変換した後、閉鎖系で二種類のPCB分解菌を用いて分解する方法が報告されている⁹⁾。

上記のような系でRHA1株を有効に用いるためには、PCB分解に関与する遺伝子群の発現を可能な限り高め、分解活性が高い菌株を調整することが求められる。そこで本研究では、RHA1株のPCB分解活性の指標として、ビフェニル初発分解酵素BphAを構成するサブユニットであるBphAa、BphAb、BphAc、BphAdのうち、BphAaをコードする*bphAa*遺伝子のプロモーター領域(*P_{bphAa}*)からの転写活性を用い、分解産物が分解遺伝子群の発現に対して及ぼす影響について調べた。

2. 実験方法

(1) 使用菌株とプラスミド

本研究で用いた菌株を表-1に、プラスミドを表-2に示す。野生株である *Rhodococcus jostii* RHA1はPCB分解菌であり、ビフェニルを単一炭素源として生育することができる。RHA1株はビフェニルを蓋上に置く形で単一炭素源として加えたM9寒天培地(6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄·7H₂O solution, 1 ml 0.1 M CaCl₂ solution, in 1,000 ml of dist. Water)に植え継ぎ、培養は30℃でおこなった。RHA1株の遺伝子をそれぞれ破壊した変異株、RHA1Δ*bphA*株、RHA1Δ*bphD*株、RHA1Δ*catA*株、RHA1Δ*catB*株は、1/5LB寒天培地(2 g Bacto trypton, 1 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. Water)に植え継ぎ、培養は30℃で行った。大腸菌の培養にはLB培地(10 g Bacto trypton, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml of dist. Water)を用い、培養は37℃で行った。

(2) *Rhodococcus*属細菌の形質転換

本研究において、*Rhodococcus*属細菌の形質転換にはエレクトロポレーション法を用いた⁹⁾。

(3) プロモーター活性測定

RHA1株のPCB分解活性の指標として、PCB分解の初発反応を触媒する酵素遺伝子である*bphAa*遺伝子のプロモーター活性を測定した。プロモーター活性が高いということは、転写量、ひいてはタンパク質の生成量が多いということで、分解活性も高いと考えることができる。本研究ではルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたレポータープラスミドを用い、容易に活性を測定できる実験系を用いた。レポータープラスミド

pKLAF1⁹(図-2)は、ルシフェラーゼ遺伝子上流に *bphAa* 遺伝子のプロモーター領域が組み込まれている。このプラスミドを持つ RHA1 株中では、*bphAa* 遺伝子が発現するときはルシフェラーゼ遺伝子も発現し、発光する。

pKLAF1 を導入した菌株を、カナマイシンを最終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB が 10 ml 入った試験管で一晩培養した。遠心(4,000 rpm, 5 min)して菌体を回収し、上清を捨てた後、1/5LB 10 ml で菌体を洗浄した。再度、遠心(4,000 rpm, 5 min)し上清を捨てた後、カナマイシンを最終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB 1 ml で再懸濁した。この菌液をカナマイシンを最終濃度 50 µg/ml で添加した 1/5LB 10 ml に OD₆₀₀ が 1.0 となるように加えた。必要に応じてビフェニル、安息香酸を最終濃度 10 mM となるように加えた。30℃で培養し、3 時間おきに発光値と菌液の濁度(OD₆₀₀)を測定した。発光値は菌液 100 µl に 1-decanal を 2 %含む LuxBuffer (10 mM リン酸 Buffer (pH 7.0) 50 ml, 100 % EtOH 49 ml)を 25 µl 加え、5 秒間の発光を測定した。発光の測定装置として BERTHOLD TECHNOLOGIES 社製 MicroLuminat Plus LB96V-H を用いた。測定は各サンプルにつき 3 回行い、その平均値を活性値とした。発光値/OD₆₀₀の数値を単位菌数あたりのルシフェラーゼ活性とした。

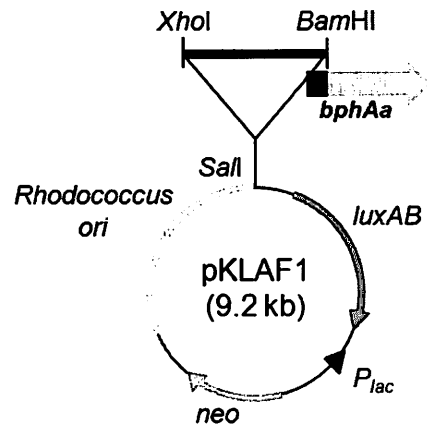


図-2 レポータープラスミド pKLAF1

(4) 接合を用いた相同組換えによる遺伝子破壊

RHA1 株中の目的の遺伝子を破壊するために、van der Geize らによる方法を用いた¹⁰⁾。目標となる遺伝子(*benA*, *benD*, *catA*, *catB*)と用いたプライマーの位置を図-3 に記す。プライマーの配列を表-3 に記す。

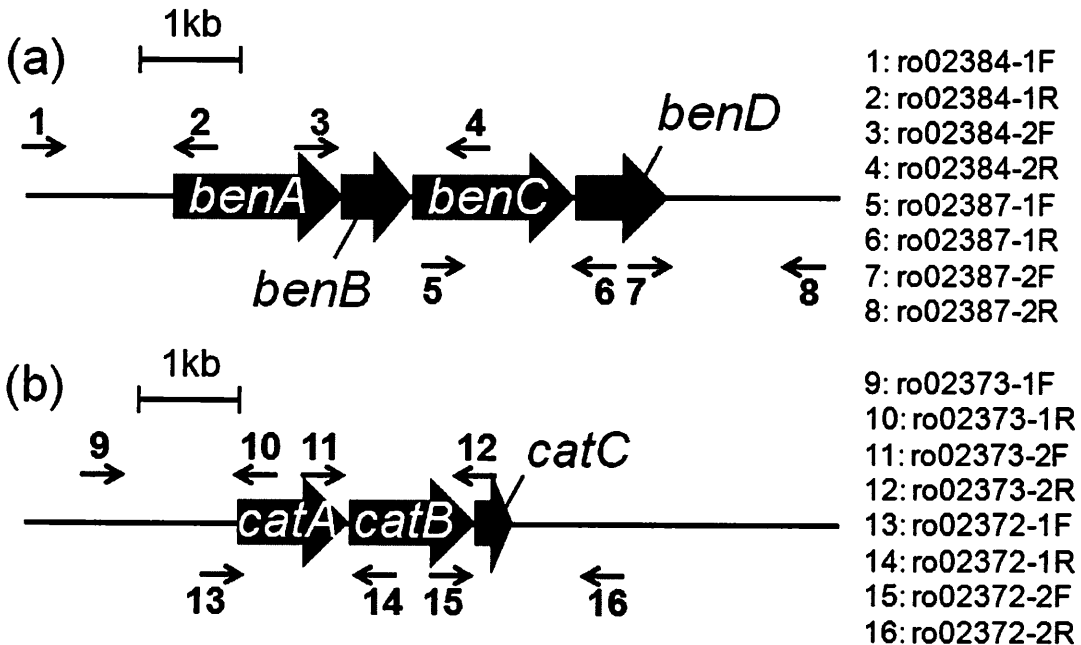


図-3 遺伝子破壊をおこなった遺伝子とその近傍の遺伝子地図、および PCR で用いたプライマーの位置。

数字とプライマー名の対応は横に記載。(a) *benA* および *benD* 周辺 (b) *catA* および *catB* 周辺。

表-1 使用菌株

strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB 分解菌、野生株、BPH ⁺ BEN ⁺	7)
<i>E. coli</i> S17-1	DNA の接合伝達に使用 <i>recA</i> ; harbors the <i>tra</i> genes of plasmid RP4 in the chromosome, <i>proA thi</i>	8)
<i>E. coli</i> JM109	クローニングに使用 <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lac^f lacZΔM15]</i>	9)
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>benA</i>	<i>benA</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>benD</i>	<i>benD</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>catB</i>	<i>catB</i> 破壊株、BEN ⁻	this study
<i>R. jostii</i> RHA1Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> 破壊株、BEN ⁻	this study

BPH⁺ BEN⁺ : ビフェニルと安息香酸をそれぞれ単一炭素源として生育可。BEN⁻ : 安息香酸を単一炭素源として生育不可。

表-2 使用プラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pKLAFl	<i>bphAa</i> 転写活性を観察するレポータープラスミド pKLA1 with 1.4-kb XhoI-BamHI fragment of RHA1 carrying promoter region of <i>bphAa</i>	4)
pKLAPBENAFa	<i>benA</i> 転写活性を観察するレポータープラスミド pKLA1 with 536 bp SalI fragment of RHA1 carrying promoter region of <i>benA</i>	this study
pGEM-T easy	cloning vector, アンピシリン耐性	Promega 社
pK18mobsacB	カナマイシン耐性、 <i>sacB</i> 、 <i>oriT</i>	10)
pK18 Δ <i>benA</i>	<i>benA</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study
pK18 Δ <i>benD</i>	<i>benD</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study
pK18 Δ <i>catA</i>	<i>catA</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study
pK18 Δ <i>catB</i>	<i>catB</i> 遺伝子破壊用プラスミド	this study

表-3 使用プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
ro02384-1F	AAGCTTCACGCTCACCCAGGCCGAC	forward primer for upstream of <i>benA</i>
ro02384-1R	TCTAGACAGGGTGTCTAGTCATGGGA	reverse primer for upstream of <i>benA</i>
ro02384-2F	TCTAGAGCGAACAAACCGCTGAGGGA	forward primer for downstream of <i>benA</i>
ro02384-2R	GGATCCCCGGGAACGGTGATGTTCA	reverse primer for downstream of <i>benA</i>
ro02387-1F	TCTAGAAGTACCTGCGCAGCCGCGC	forward primer for upstream of <i>benD</i>
ro02387-1R	CTGCAGGACGAGTCCGCTCATGCGA	reverse primer for upstream of <i>benD</i>
ro02387-2F	CTGCAGGGCGACCTCGGCTAGCAGC	forward primer for downstream of <i>benD</i>
ro02387-2R	AAGCTTGCGTCTTCCATGATCTTCG	reverse primer for downstream of <i>benD</i>
ro02373-1F	TCTAGACGATCTGACCGACGTGACG	forward primer for upstream of <i>catA</i>
ro02373-1R	GCATGCCTCGGTGGTGGTCATTTGT	reverse primer for upstream of <i>catA</i>
ro02373-2F	GCATGCCTCGACCCCGCGTGACCC	forward primer for downstream of <i>catA</i>
ro02373-2R	AAGCTTAAGTCGATGCCGGGTTCGG	reverse primer for downstream of <i>catA</i>
ro02372-1F	GAATTCACATTTCAATGTGACTGCG	forward primer for upstream of <i>catB</i>
ro02372-1R	TCTAGAGGTGGAACGGGTACCGCG	reverse primer for upstream of <i>catB</i>
ro02372-2F	TCTAGATGGACCAAGAACTAAGGAG	forward primer for downstream of <i>catB</i>
ro02372-2R	AAGCTTCCGACGCACCCGTCTTCG	reverse primer for downstream of <i>catB</i>
PbenA_F	TTCCGTGTCTGAGCGATTCTG	forward primer for promoter of <i>benA</i>
PbenA_R	GTCGACGAGTTCCGCTCTGTTGC	reverse primer for promoter of <i>benA</i>

3. 結果と考察

(1) *bphAa* プロモーター活性への安息香酸の影響

pKLAFl を導入した RHA1 株(以後、RHA1(pKLAFl)と表記する)を 1/5LB 培地、および、それにビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加え培養し、3 時間ごとにルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図4に示す。

1/5LB 培地の場合、*bphAa* プロモーター転写活性の上昇は見られない。ビフェニルを加えた系では、*bphAa* プロモーター転写活性の上昇が観察された。一方、ビフェニルと安息香酸を加えた系では *bphAa* プロモーター転写活性化の抑制が見られた。この結果から、安息香酸を加えることで、*bphAa* プロモーターのビフェニルによる転写活性化が抑制されることが明らかになった。これは、カタボライト抑制が働いた結果と考えられる。カタボライト抑制とは、ある物質の代謝産物(カタボライト)がその物質の分解に関わる上流の遺伝子の発現を負に制御することをいう。RHA1 株はビフェニルと安息香酸が共存するとき、下流の安息香酸を分解する間、上流のビフェニル分解を抑制していると考えられる。安息香酸は RHA1 株中でさらに分解されるため、プロモーター活性抑制の直接の原因が安息香酸であるのか、さらに下流の分解産物であるのかを調べた。

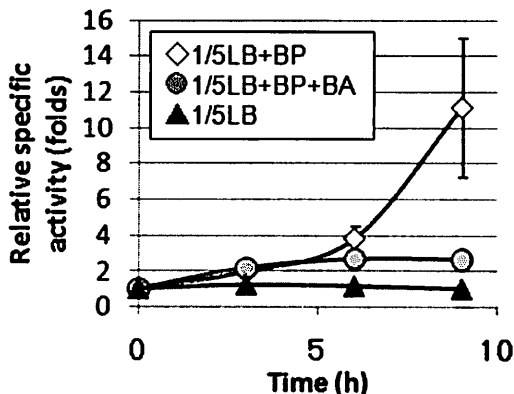


図4 RHA1 株における *bphAa* プロモーター活性に対するビフェニル(BP)、安息香酸(BA)の影響。縦軸は 0 時間目の活性を 1 とした時の比。pKLAFl を導入した RHA1 株を 1/5LB 培地に BP(終濃度 10 mM)及び、ビフェニル+安息香酸(終濃度 10 mM)を加えた培地で培養し、3 時間おきに発光値と OD₆₀₀ を測定した。発光値を OD₆₀₀ で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。

(2) 相同組換えによる *benA*、*benD*、*catA*、*catB* 遺伝子の破壊

菌体内に安息香酸およびその代謝産物を蓄積させて *bphAa* プロモーター活性への影響を調べるため、安息香酸以降の分解に関与する *benA*、*benD*、*catA*、*catB* 遺伝子の破壊株の作製を試みた。候補株を取得後、目標遺伝子の上流断片の 5'側プライマーと、下流断片の 3'側プライマーを用いた PCR およびサザンハイブリダイゼーションによって目標遺伝子の欠損を確認した(データは示さない)。このようにして得られた破壊株をそれぞれ RHA1 Δ *benA*、RHA1 Δ *benD*、RHA1 Δ *catA*、RHA1 Δ *catB* と命名した。

これらの遺伝子破壊株を、安息香酸を終濃度 10mM で添加した M9 寒天培地に塗布して生育を観察したところ、生育しなかった(データは示さない)。この結果より、各破壊株では安息香酸を代謝する遺伝子が破壊されたことが示された。安息香酸存在下において、破壊株では各遺伝子産物が触媒する反応の手前の物質が蓄積していると推測される。

(3) 破壊株における *bphAa* プロモーター転写活性

作製した遺伝子破壊株 RHA1 Δ *benA*、RHA1 Δ *benD*、RHA1 Δ *catA*、RHA1 Δ *catB* にレポータープラスミド pKLAFl を導入した後に、1/5LB 培地、および 1/5LB 培地にビフェニル、またはビフェニルと安息香酸を加えて培養し、*bphAa* プロモーター活性を比較した。

RHA1 Δ *benA*(pKLAFl)においては、RHA1(pKLAFl)と比較してビフェニルと安息香酸を添加した系の抑制が弱まり、ビフェニルのみの系と近い活性を示した(図5 パネルa)。この結果から、抑制の原因物質が安息香酸ではないことが示唆された。

RHA1 Δ *benD*(pKLAFl)では、RHA1 Δ *benA*(pKLAFl)と比較して、ビフェニルと安息香酸を添加した系と、ビフェニルのみの系の両方で活性化が抑えられた(図5 パネルb)。RHA1 Δ *catA*(pKLAFl)においては、ビフェニルを添加した系と、ビフェニルと安息香酸を添加した系の双方で、 Δ *benD*株よりもさらに低い、1/5LBの系と同程度の活性が観察された(図5 パネルc)。このとき、菌液の濁度(OD₆₀₀)は上昇傾向を示していたため(図-6)、活性の低下は菌の活性の低下によるものではないと考えられる。ビフェニル、および安息香酸存在下において、RHA1 Δ *benD*(pKLAFl)では *cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate (DHC)が、RHA1 Δ *catA*(pKLAFl)ではカテコールが菌体内に蓄積されていると推測される。これらの結果から、抑制の原因物質はDHCとカテコールであることが示唆された。また、二つの物質の中でもカテコールが特に強い抑制の原因物質であることが強く

示唆された。

RHA1 $\Delta catB$ (pKLAFl)では、ビフェニルを添加した系では活性の上昇が、ビフェニルと安息香酸を加えた系で活性の抑制が観察された(図-5 パネルd)。これはRHA1(pKLAFl) (図-4)と同様の活性変化である。この結果から、RHA1 $\Delta catB$ (pKLAFl)で蓄積する *cis,cis*-mucate は抑制の原因物質ではなく、それよりも上流の物質が抑制に関与していることが示唆された。この結果は、他の破壊株の結果と矛盾しない。RHA1株とRHA1 $\Delta catB$ 株においてビフェニルと安息香酸を加えた系で観察される活性の抑制(図4および図5 パネルd)は、代謝の際に生産されるDHCおよびカテコールによるものと考えられる。

この現象が *bphAa* プロモーターのようなBphS、BphT支配下のプロモーターに特異的なものであるかを調べるため、*bphAa* プロモーター領域の代わりに、*benA* のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミド

pKLAPBENAFを構築して実験した。*benA*はBphS/BphT支配下になく、安息香酸存在下でその転写が活性化されることが明らかとなっている¹²⁾。RHA1(pKLAPBENAF)を1/5LB培地にビフェニルと安息香酸を添加した系で培養した場合、安息香酸が存在するため転写が活性化する。RHA1 $\Delta catA$ (pKLAPBENAF)を同じ条件で培養した場合は、菌体内にカテコールが蓄積するにもかかわらず、*benA*プロモーターからの転写がRHA1株と同様に活性化した(図-7)。このことから、カテコールの蓄積による転写の抑制は *bphAa* プロモーターのようなBphS、BphT支配下のプロモーターに対して特異的な現象であることが強く示唆された。

PCB分解菌における分解遺伝子群の転写制御については多くの研究がなされている。例えば、*Acidovorax* sp. KKS102や *Pseudomonas pseudocaligenes* KF707では、PCB分解遺伝子群はオペロンとしてゲノム中の一カ所に集中して存在している。KKS102株においては、BphSタン

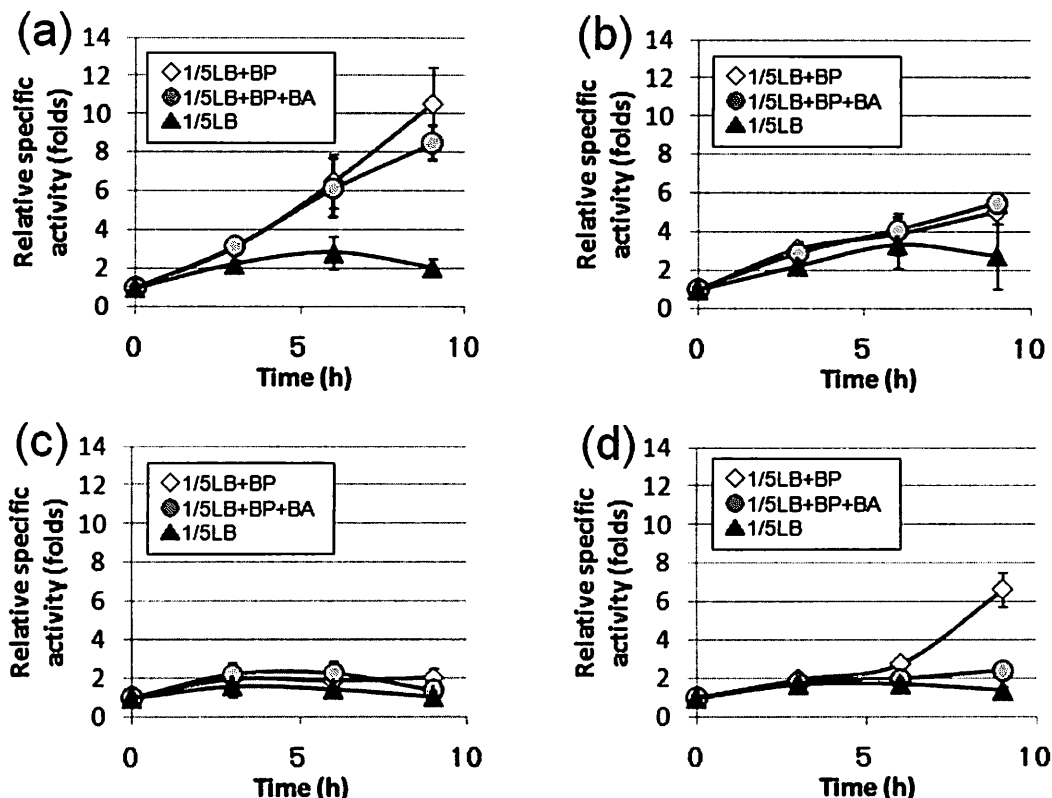


図-5 破壊株における *bphAa* プロモーター活性に対するビフェニル(BP)、安息香酸(BA)の影響。縦軸は0時間目の活性を1とした時の比。pKLAFlを導入した破壊株を1/5LB培地にビフェニル(終濃度10 mM)及び、必要に応じてビフェニル+安息香酸(終濃度10 mM)を加えた培地で培養し、3時間おきに発光値とOD₆₀₀を測定した。発光値をOD₆₀₀で割った数値を単位菌数あたりの *bphAa* プロモーターの転写活性とした。(a) RHA1 $\Delta benA$ 株 (b) RHA1 $\Delta benD$ 株 (c) RHA1 $\Delta catA$ 株 (d) RHA1 $\Delta catB$ 株。

パク質が分解遺伝子群の転写抑制因子として機能しており、BphCタンパク質による代謝産物がBphSタンパク質と結合すると転写抑制が解かれ、転写が活性化する¹³⁾。KF707株においては、BphR1とBphR2の2種類の転写活性化タンパク質が協調して分解遺伝子群の転写を制御していることが明らかとなっている¹⁴⁾。KKS102株においては、コハク酸、フマル酸、酢酸の存在下でPCB分解遺伝子群の転写が抑制されることが明らかになっている¹⁵⁾が、これらの菌においては、ビフェニル代謝産物による転写抑制の報告はない。RHA1株においては、PCB分解遺伝子群の転写がグルコースやフルクトースの存在下で抑制されることが明らかになっている¹⁶⁾が、この抑制システムが本研究の安息香酸存在下での転写抑制と同一であるかは不明である。また、RHA1と同じ*Rhodococcus*属の*Rhodococcus* sp. DK17においては、フタル酸の分解遺伝子群が安息香酸存在下で抑制されることが明らかになっている¹⁷⁾が、この場合の安息香酸はフタル酸の代謝産物ではない。

本研究で明らかとなった、安息香酸代謝産物による上流分解遺伝子のビフェニルによる転写活性化の抑制の詳しい制御機構は不明であるが、カテコールや DHC

存在下で *bphAa* プロモーター上流に結合して BphT による転写活性化を阻害するタンパク質の存在や、BphS と BphT に直接結合して転写活性化を阻害するタンパク質の存在が考えられる。

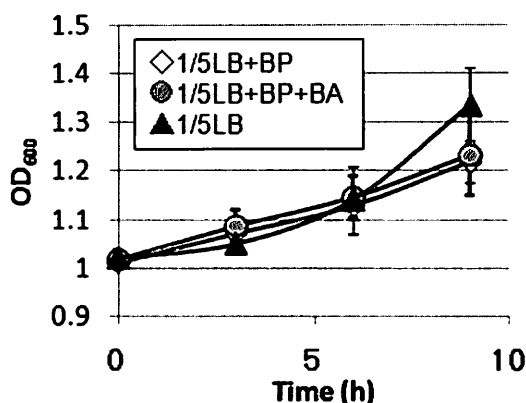


図-6 RHA1Δ*catA*(pKLAF1)を用いたプロモーター活性測定の際の菌液の濁度(OD₆₀₀)の変化。

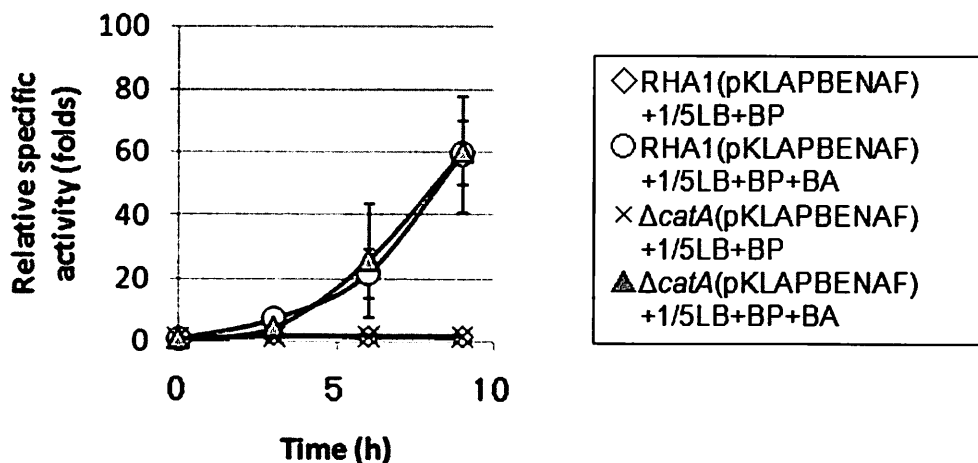


図-7 RHA1株とRHA1Δ*catA*株における*benA*プロモーター活性の変化。縦軸は0時間目の活性を1とした時の比。pKLAPBENAFを導入した菌株を1/5LB培地にビフェニル(BP)と安息香酸(BA)をともに終濃度10 mMになるように加えて培養した。3時間おきに発光値とOD₆₀₀を測定し、発光値をOD₆₀₀で割った数値を単位菌数あたりの*bphAa*プロモーターの転写活性とした。

4. 結論

PCB分解菌*Rhodococcus jostii* RHA1株においてビフェニル存在下における**bphAa**プロモーターの転写活性化は、ビフェニル分解の中間代謝産物である安息香酸の存在下で抑制された。抑制の原因物質が、安息香酸か、より下流の分解産物であるかを解明するため、RHA1Δ*benA*株、RHA1Δ*benD*株、RHA1Δ*catA*株、RHA1Δ*catB*株を作製し、解析した。その結果、抑制の原因物質はRHA1Δ*benD*株で蓄積されると推測されるDHCや、RHA1Δ*catA*株で蓄積されると推測されるカテコールであることが強く示唆された。

本研究で得られた結果より、RHA1株のDHCおよびカテコール分解活性を強化する、もしくは分解遺伝子転写活性化の抑制メカニズムを明らかにし、それを破壊することで、効率よくPCBを分解できる菌を育種することが可能になると考えられる。微生物を用いたPCB分解処理の方法として、バイオリアクターが考えられる。閉鎖系であるバイオリアクターでは、遺伝子操作菌株の利用が比較的容易であることから、抑制メカニズムを明らかにし遺伝子操作によって菌株の分解活性を向上させれば、そのような菌株をPCBを分解除去する閉鎖型バイオリアクター技術に活用し、環境保全上重要なPCB処理技術の開発を可能にするものと考えられる。

参考文献

- 1)財団法人産業廃棄物処理事業振興財団：廃棄物処理方針処理基準に基づく PCB 処理技術ガイドブック(改訂版) 2005
- 2)増田義人：油症などにみられる PCB、PCDF の人体に対する毒性影響。福岡医誌 Vol. 100, pp.141-155, 2009
- 3)福田雅夫・宮内啓介・政井英司： *Rhodococcus* 属細菌の PCB 分解システム。蛋白質 核酸 酵素 Vol. 50, pp. 1541-1547, 2005
- 4)Takeda H, Hara N, Sakai M, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1. *Biosci Biotechnol Biochem*. Vol.68, pp.1249-1258, 2004
- 5) 金原 和秀・潮木 知良・京谷 隆・志村 稔・早川 敏雄：光脱塩素と生物分解のハイブリッド法による PCB 処理。生物工学会誌 Vol.82, pp.56-62, 2004
- 6)Masai E, Yamada A, Healy JM, Hatta T, Kimbara K, Fukuda M, Yano K. Characterization of biphenyl catabolic genes of Gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 61, pp.2073-2085, 1995

- 7)Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Characterization of Transcriptional Regulatory Genes for Biphenyl Degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriology*, vol.186, pp.2134-2146, 2004
- 8)Simon R, Preifer U, Puhler A: Abroad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Biotech*, Vol.9, pp.784-791, 1983
- 9)Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequencing of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene*, Vol.33, pp.103-119, 1985
- 10)Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski, Thierbach G, Puhler A: Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, Vol.145, pp.69-73, 1994
- 11)Van der Geize R, Hessels GL, van Gerwen R, van der Meijden P, Dijkhuizen L. Unmarked gene deletion mutagenesis of *ksrD*, encoding 3-ketosteroid Δ1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol Lett*. Vol.205, pp.197-202, 2001
- 12)Kitagawa W, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J Bacteriol*. Vol. 183, pp. 6598-606, 2001
- 13)Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, Takagi M, Ohta A, Nagata Y. BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. *J Biol Chem*. Vol. 276, pp. 36146-54, 2001
- 14)Watanabe T, Fujihara H, Furukawa K. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudocaligenes* KF707. *J Bacteriol*. Vol. 185, pp. 3575-82, 2003
- 15)Ohtsubo Y, Goto H, Nagata Y, Kudo T, Tsuda M. Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Mol Microbiol*. Vol. 60, pp. 1563-75, 2006
- 16)Araki N, Niikura Y, Miyauchi K, Kasai D, Masai E, Fukuda M. Glucose-mediated transcriptional repression of PCB/biphenyl catabolic genes in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J Mol Microbiol Biotechnol*. Vol. 20, pp. 53-62, 2011
- 17)Choi KY, Zylstra GJ, Kim E. Benzoate catabolite repression of the phthalate degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol*. Vol.73, pp. 1370-4, 2007

(2011.5.30受付)

Transcriptional Repression of PCB/BP catabolite genes by its intermediate metabolite

Taku ITO¹, Naoto ARAKI², Ginro ENDO¹, Masao FUKUDA², Keisuke MIYAUCHI¹

¹*Tohoku Gakuin Univ., Tagajo, Miyagi, JAPAN*

²*Nagaoka Univ. Tech., Nagaoka, Niigata, JAPAN*

Rhodococcus jostii RHA1 is a polychlorinated biphenyls (PCBs) degrader and its PCB degradation genes (*bph* genes) have been well characterized. It is known that in the presence of biphenyl (BP) the transcription of *bph* genes is activated by the two-component system, BphS and BphT. In this study, we found that the transcriptional activation by BP is repressed in the presence of benzoate. In RHA1, benzoate is degraded via catechol by benzoate 1,2-dioxygenase (BenABC), 1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate (DHC) dehydrogenase (BenD), catechol 1,2-dioxygenase (CatA), and muconate cycloisomerase (CatB). To investigate the transcriptional repression of *bph* genes in the presence of benzoate metabolites, single-deletion mutants of *benA*, *benD*, *catA*, and *catB* were constructed. In the *benA*-deletion mutant, the promoter activation by BP was less repressed by benzoate than in wild type. The *benD*- and *catA*-deletion mutants showed low transcriptional activation in the presence of both BP, and BP and benzoate. The *bphAa* promoter activity in the *catA*-deletion mutant was much lower than that in the *benD*-deletion mutant. The *catB*-deletion mutant showed nearly the same repression pattern as RHA1. These results suggested that the repression of the BP-mediated transcriptional activation of *bphAa* is caused by catechol and DHC, which are metabolites of BP.