

御に重要な役割を果たしているのではないかと期待している。

謝辞 本研究は横浜市立大学生体超分子創製科学研究室にて行ったものであり、多大なる御助力を賜りました古久保哲朗教授を始め、室員の皆様、並びに共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

- 1) Warner, J.R. (1999) *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 437-440.
- 2) Morse, R.H. (2000) *Trends Genet.*, **16**, 51-53.
- 3) Piña, B., Fernández, L.J., García, R.N., & Idrissi, F.Z. (2003) *Mol. Genet. Genomics*, **268**, 791-798.
- 4) Martin, D.E., Souillard, A., & Hall, M.N. (2004) *Cell*, **119**, 969-979.
- 5) Hall, D.B., Wade, J.T., & Struhl, K. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3672-3679.
- 6) Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S.W., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K., & Kokubo, T. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 6686-6705.
- 7) Lempiäinen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., & Shore, D. (2009) *Cell*, **33**, 704-716.
- 8) Jorgensen, P., Rupeš, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J. R., & Tyers, M. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2491-2505.
- 9) Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., & Thuriaux, P. (2002) *EMBO J.*, **21**, 5498-5507.
- 10) Kasahara, K., Ki, S.W., Aoyama, K., Takahashi, H., & Kokubo, T. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1343-1357.
- 11) Hampsey, M. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 564-566.
- 12) Khapersky, D.A., Ammerman, M.L., Majovski, R.C., & Ponticelli, A.S. (2008) *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 3757-3766.
- 13) Eichner, J., Chen, H.T., Warfield, L., & Hahn, S. (2010) *EMBO J.*, **29**, 706-716.
- 14) Kasahara, K., Ohya, Y., & Kokubo, T. (2011) *Nucleic Acids Res.* (in press).
- 15) Jiang, C. & Pugh, B.F. (2009) *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 161-172.
- 16) Merz, K., Hondele, M., Goetze, H., Gmelch, K., Stoeckl, U., & Griesenbeck, J. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 1190-1204.

笠原 浩司

(東京農業大学応用生物科学部アイソトープセンター)

Novel regulatory mechanisms for transcriptional initiation of ribosomal protein genes in *S. cerevisiae*

Koji Kasahara (Tokyo University of Agriculture, Faculty of Applied Biosciences, Isotope Center, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan)

未知・未培養微生物由来の遺伝子資源の探索

1. はじめに

最近の研究によると、地球上には約 5×10^{30} 個の微生物が生息しており、地球上のバイオマスの半分に相当すると言われている¹⁾。分子生物学の発達によってDNAレベルで微生物を検出することが可能になり、環境中には従来の微生物の分離・培養技術では検出することができなかった非常に多くの種類の未知微生物が存在している可能性を示すデータが得られている²⁾。我々は、これまでに微生物の分離・培養技術の改良や、「メタゲノム法」という微生物資源に対する新しいアプローチによって、未知微生物や遺伝子、酵素の探索を行ってきた。

2. ダイオキシン化合物を分解する環境微生物の分離と解析

我々は、ダイオキシンを分解する微生物に関する研究を行っている。ダイオキシンは、二つの芳香環がエーテル結合した化合物であり、このような芳香環に塩素が置換した化合物は、ヒトに対する催奇性や発がん性が指摘されている³⁾。環境中へ放出されたダイオキシンは、一般的には低濃度であるが、食物連鎖による生物濃縮が起こることから、環境汚染物質として排出規制や浄化の対象になっている。

環境中に放出されたダイオキシン化合物が生分解されることは報告されているが、ダイオキシンを分解する微生物そのものの分離に成功した例は僅かであった^{4,5)}。そこで、我々は、ダイオキシンを分解する微生物の探索を行い、鹿児島県の離島から採取した土壌より、ダイオキシンを分解するユニークな微生物の分離に成功した⁶⁾。我々が分離したダイオキシン分解菌 *Rhodococcus opacus* SAO101 株は、ダイオキシンやジベンゾフランなど、単環や複素環の化合物を唯一の炭素源として生育する非常にユニークな微生物である。特筆すべきは、塩素化ダイオキシン (chlorinated dibenzo-*p*-dioxin (CDD)) に対して分解活性を有していることであり、一つの塩素が置換された塩素化ダイオキシン化合物 1-CDD を完全に分解することができる。また、分離した SAO101 株は毒性の高い三つの塩素が置換した塩素化ダイオキシンに対しても分解活性を示した⁶⁾。

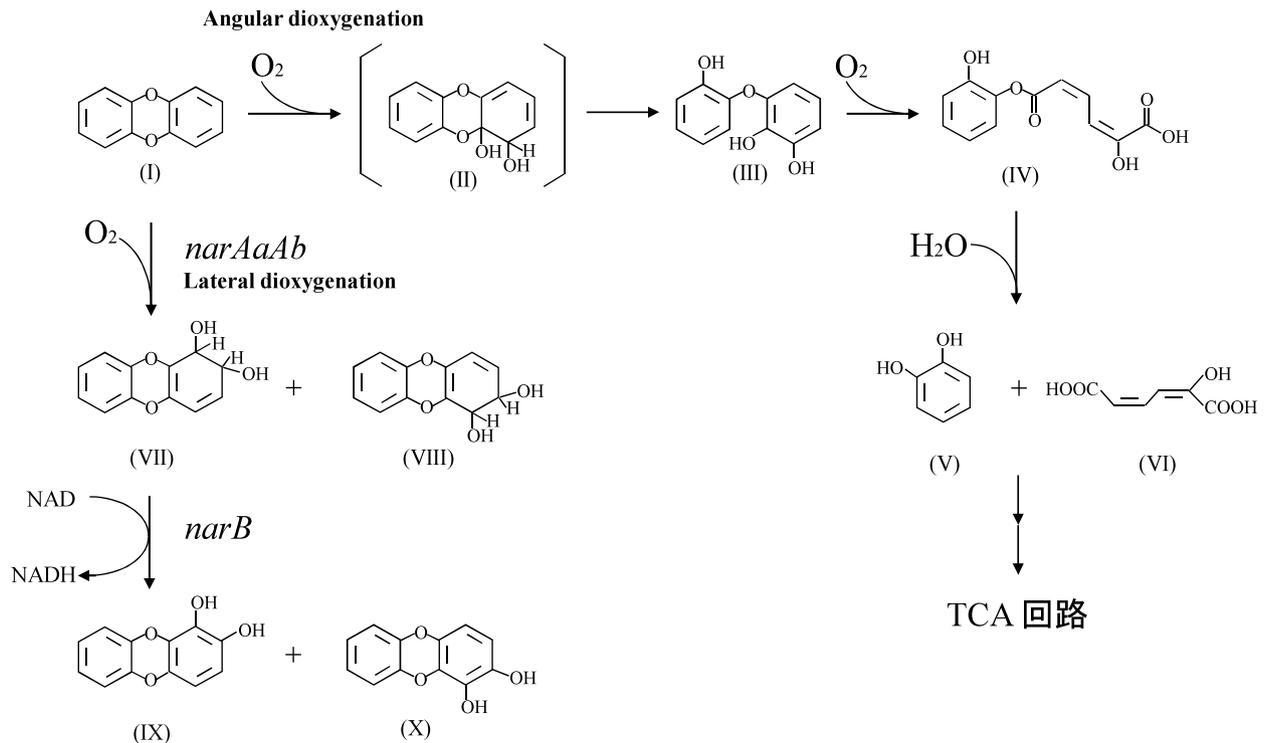


図1 *R. opacus* SAO101株によるダイオキシン類化合物の分解経路

酵素：*narAaAb*, ring-hydroxylating dioxygenase; *narB*, dihydrodiol dehydrogenase. 化合物：(I) ダイオキシン, (II) dioxin-*p*-dioxin-*cis*-dihydrodiol, (III) 2,2',3'-trihydroxydiphenyl ether, (IV) 2-hydroxy-6-oxo-6-(2-hydroxyphenoxy)-hexa-2,4-dienoate, (V) カテコール, (VI) 2-hydroxy-*cis,cis*-muconic acid, (VII) *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzo-*p*-dioxin, (VIII) *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrodibenzo-*p*-dioxin, (IX) 1,2-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin, (X) 3,4-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin.

既往の研究において、ダイオキシン化合物 (I) の微生物分解は、末端ジオキシゲナーゼ (terminal dioxygenase) による 4,4a 位への酸素添加 (angular dioxygenation) を通じた水酸化物である dioxin-*p*-dioxin-*cis*-dihydrodiol (II) の生成から開始され、続いて、2,2',3'-trihydroxydiphenyl ether (III) に変換された後に、さらに extradiol dioxygenase によるメタ開裂により 2-hydroxy-6-oxo-6-(2-hydroxyphenoxy)-hexa-2,4-dienoate (IV) が生成し、カテコール (V) と 2-hydroxy-*cis,cis*-muconic acid (VI) を経由して、TCA 回路へ至るものと推定されている⁷⁾(図1)。一方、SAO101 株によるダイオキシン分解の際に蓄積される分解産物を調べたところ、2,2',3'-trihydroxydiphenyl ether (III) と共に、1,2-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin (VII) や 2,3-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin (VIII) が大量に蓄積していることを確認した。SAO101 株は angular dioxygenation と共に、1,2 位と 2,3 位へ酸素が添加する lateral dioxygenation を通して、ダイオキシン化合物を分解することを示しており、この結果は、一

つの菌株において、2 種類の代謝経路がダイオキシン分解に関与していることを示すユニークな例である。

さらに、SAO101 株からダイオキシン分解に関わる末端ジオキシゲナーゼ遺伝子のクローニングを行い、ダイオキシンを 1,2-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin や 2,3-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin へ変換する酵素遺伝子をクローニングした⁸⁾。クローニングした末端ジオキシゲナーゼは、大サブユニット (*narAa*) と小サブユニット (*narAb*) から構成されるマルチコンポーネント酵素であり、二つのコンポーネントを共発現した *Rhodococcus* 属細菌 IAM1399 株は、ダイオキシンを 1,2-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin や 2,3-dihydroxydibenzo-*p*-dioxin へ変換することができる⁸⁾。以上の結果は、SAO101 株によるダイオキシン分解は、既往研究によって見出されている酵素とは触媒機能が異なる酵素が関与していることを示している。

3. 分子生態学的手法によるダイオキシンを分解する微生物相の解析

近年の分子生態学的手法の発達によって、難培養微生物を含む複雑な微生物相を網羅的に把握することが可能になっており、環境中における物質循環と微生物との関わりについて理解が深まってきている。そこで我々は、環境サンプルにおいてダイオキシンの生分解に関わる微生物相の解析を行った。方法としては、ダイオキシンを添加した土壌より直接抽出したDNAから、微生物の系統分類の指標となる16S rRNA遺伝子をPCRによって増幅し、決定した配列情報を公共データベースに照合することで、土壌中の微生物相の解析を行った⁹⁾。その結果、一定期間、ダイオキシンを添加した土壌には、 α -プロテオバクテリアに属する微生物の存在比が高いことを示すデータが得られた。さらに、検出した微生物集団は、過去に分離や培養が行わ

れていない微生物種から構成されており、土壌には、ダイオキシン化合物の分解に関わる未知の微生物集団が存在することを明らかにした。

また、芳香族化合物を分解する末端ジオキシゲナーゼは、大小2種類のサブユニットから構成されるマルチコンポーネント酵素で、鉄硫黄タンパク質として知られている¹⁰⁾。大サブユニットのアミノ酸配列には、鉄-硫黄結合領域（[Fe₂-S₂ Rieske center]）が存在しており、この領域の遺伝情報に基づき、末端ジオキシゲナーゼを特異的に増幅するPCRプライマーを作成し、環境サンプル中から芳香族化合物の分解に関与する末端ジオキシゲナーゼを検出する研究が行われている¹¹⁾。我々は、ダイオキシンを分解する末端ジオキシゲナーゼの鉄-硫黄結合領域の配列情報を活用し、環境サンプルからダイオキシン分解に関与する末端ジオキシゲナーゼ遺伝子を検出する手法の構築に成功している⁹⁾。同手法の開発は、環境におけるダイオキシン

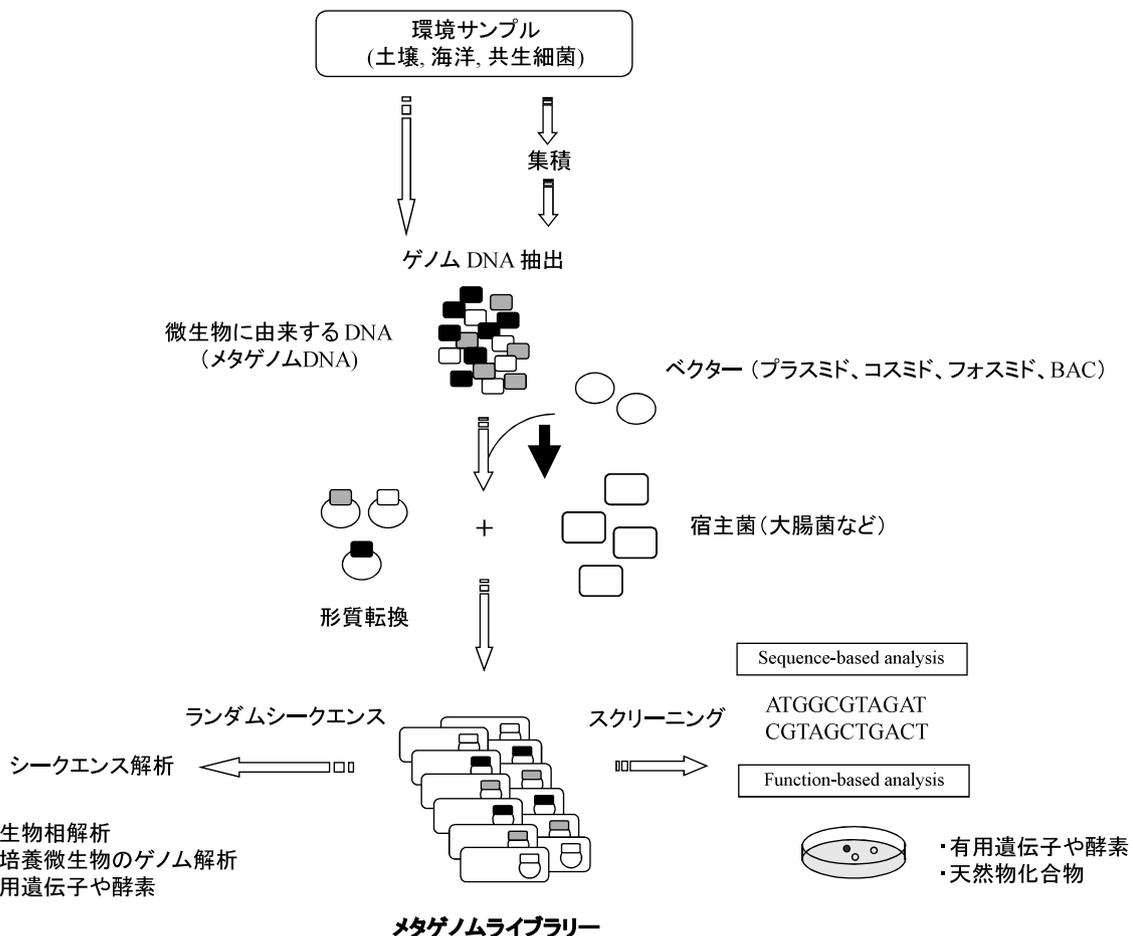


図2 環境サンプルに由来するメタゲノム DNA ライブラリーの構築と解析について

の生分解のモニタリングや、未知なダイオキシン分解菌の探索へ応用が期待できる。

4. メタゲノム法による有機化合物の物質変換に関わる新規酵素の探索

未知微生物へアクセスする手段として、「メタゲノム解析」という画期的な手法が開発されている¹²⁾。「メタゲノム解析」とは、土壌や活性汚泥、海水など微生物が生息する環境サンプルから、微生物の分離や培養を経ずに、メタゲノム DNA をクローニングし、未知微生物のゲノム構造の決定や遺伝子の検出、代謝系を解析する手法である (図 2)。近年、メタゲノム解析によって、抗生物質耐性、ビタミン合成、物質変換など、産業上有用性の高い遺伝子・酵素や生理活性物質などの化合物の分離が報告されている¹³⁾。

我々は、有機化合物を含む工業廃水の処理に利用する活

性汚泥を対象に、メタゲノム解析を用いた有機化合物の物質変換に関わる新規遺伝子・酵素の探索を行った¹⁴⁾。活性汚泥法とは、排水・汚水の浄化手段として下水処理場などで広く利用されており、活性汚泥中に存在する微生物が有機化合物の分解 (処理) に関わっている。浄化の主役である微生物に関しては、殆どの微生物が今までに分離や培養が行われていない微生物から構成されており、未知遺伝子資源を探索する対象となっている¹⁵⁾。

我々は、まず活性汚泥から高分子 DNA を抽出して、平均インサート長が約 40 kb のフォスミドライブラリー (メタゲノムライブラリー) を作製し、形質転換した大腸菌のコロニーから、化合物を産生するクローンを分離した。そのうち、クローン M103 はインドールから紫色の色素を産生し、抽出した色素の成分分析から色素はインジゴ、インジルビンの混合物であることを明らかにした (図 3)。また、色素を合成する遺伝子は、脂肪酸の β-酸化に関わる

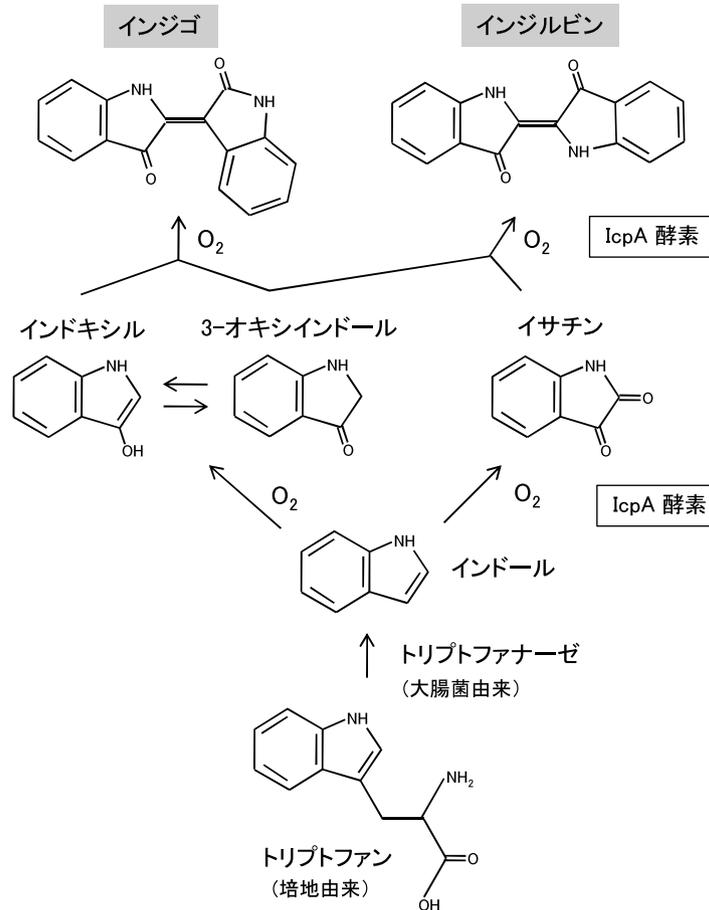


図 3 大腸菌が発現する IcpA 酵素によるインジゴ・インジルビンの合成経路について

フラボタンパク質の一種であるアルデヒドデヒドロゲナーゼに類似した新規なモノオキシゲナーゼ (IcpA) であることを明らかにし、我々は大腸菌を宿主とした酵素の発現系とインジゴやインジルピンを生産する系の構築に成功した。

トルエンジオキシゲナーゼなどインジゴを合成することが知られている酵素は、複数のコンポーネントが会合したマルチコンポーネント酵素であり、インジゴを合成する微生物を育種するためには、各コンポーネントを共発現する必要がある。しかし、宿主として使用する微生物の性質や培養条件によって、コンポーネントの会合が不安定になることがある¹⁰⁾。一方、本酵素は *icpA* 遺伝子を単独で発現することで、インジゴやインジルピンを合成できる点に特徴があり、微生物や植物など多様な生物種による異種発現への応用が期待できる。また、インジゴは、染料として全世界で年間約1万7千トンが利用されており、現在は殆どが化学合成で生産されているが、既存の生産技術は、エネルギー消費が多く、環境負荷が高い。さらに、インジルピンは、抗がん活性を示す化合物として、臨床現場における応用が試みられており、IcpA 酵素は、インジゴやインジルピンを生産する環境に優しいバイオプロセスの構築へ応用が期待されている。

5. おわりに

人類は、農業や食品製造、環境浄化、医薬品、化成品の生産など、様々な分野において微生物を活用し、豊かな社会の創造に役立ててきた。しかし、これまでに人類が手にしている微生物遺伝子資源は、ほんの一部に過ぎず、有用な遺伝子資源の探索と活用は、私達の生活をより豊かにする可能性がある。今後の研究の進展に期待したい。

- Whitman, W.B., Coleman, D.C., & Wiebe, W.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 6578-6583.
- Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 4576-4579.
- Henriksen, G.L., Ketchum, N.S., Michalek, J.E., & Swaby, J.A. (1997) *Epidemiology*, 8, 252-258.
- Cerniglia, C.E., Morgan, J.C., & Gibson, D.T. (1979) *Biochem. J.*, 180, 175-185.
- Harms, H., Wittich, R.-M., Sinnwell, V., Meyer, H., Fortnagel, P., & Francke, W. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1157-1159.
- Kimura, N. & Urushigawa, Y. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 138-143.
- Krecka, G.M. & Gibson, D.T. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 288-296.

- Kimura, N., Kitagawa, W., Mori, T., Nakashima, N., Tamura, T., & Kamagata, Y. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 474-484.
- Kimura, N. & Kamagata, Y. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 365-373.
- Mason, J.R. & Cammack (1992) *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 277-305.
- Kimura, N., Nishi, A., Goto, M., & Furukawa, K. (1997) *J. Bacteriol.*, 179, 3936-3943.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., & Goodman, R.M. (1998) *Chem. Biol.*, R245-R249.
- Kimura, N. (2006) *Microb. Environ.*, 21, 201-215.
- Kimura, N., Sakai, K., & Nakamura, K. (2010) *Microb. Environ.*, 25, 133-139.
- Wagner, M. & Loy, A. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 218-227.

木村 信忠

(独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

Exploring for the biological and genetic resources from the uncultivated bacteria

Nobutada Kimura (Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

細胞内在性タンパク質の選択的化学修飾とエンジニアリング

はじめに

生命科学はポストゲノム時代を迎え、分子システムとしての生物の理解が進みつつある。それに伴い、個々の精製タンパク質の *in vitro* での生化学的解析に加え、細胞、組織、個体といったより高次の複雑系におけるタンパク質の機能を分子レベルで解明することが大きな課題となっている。特に近年、細胞や生体内でのタンパク質の挙動をそのままの環境下で「その場解析」する重要性が高まってきた¹⁾。現在、そのためのアプローチの一つとして、GFPなどの蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングが世界中の研究室で盛んに行われている²⁾。その有用性について疑う余地はないが、この手法では、対象タンパク質に蛍光タンパク質を融合したものを細胞内に発現させ、あくまでもその「影武者」となる分子を観察しているという点に注意しなくてはならない。また、遺伝子発現を要する手法では、必然的に対象タンパク質を余分に(過剰)発現させるため、