

Nocardioides属細菌におけるフェナントレン分解の o-フタル酸経路に関する生化学的ならびに遺伝子レ ベルでの研究

著者	岩淵 徳郎
号	610
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/16215

氏 名(本籍) 岩 瀨 徳 郎

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 610 号

学位授与年月日 平成 11 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 *Nocardioides* 属細菌におけるフェナントレン分解の
o-フタル酸経路に関する生化学的ならびに遺伝子レベ
ルでの研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 水 野 重 樹
教 授 神 尾 好 是
教 授 折 谷 隆 之

論文内容要旨

第1章 序論

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は産業活動等による化石燃料を主な汚染源とする環境汚染物質であり、環境中に放出された PAHs の多くは微生物による生分解、また紫外線等による化学分解を受け除去される。よって微生物の PAHs 分解機構を理解することは、環境汚染物質除去技術開発のための基礎的情報を得るために重要である。

細菌による PAHs 分解は2環の PAH である naphthalene を用いて主に研究が進められた。Naphthalene は ring-hydroxylating dioxygenase および dehydrogenase により 1,2-naphthalenediol に変換され、その後 5 段階の酵素反応によって 2-hydroxybenzoate [salicylate] (以下 salicylate) を経て 1,2-benzenediol [catechol] (以下 catechol) に変換される (Fig. 1)。Naphthalene 分解過程に関与する酵素の幾つかは精製されその生化学的特性が明らかにされており、naphthalene 分解遺伝子群は *Pseudomonas putida* PpG7 株に内在する約 82 kb の NAH7 プラスミドから主にクローニングされ、詳細に解析された。

3環の PAH である phenanthrene の細菌による分解は、2種の分解経路が提唱されている。1つは salicylate を経て分解される経路 (Sal 経路) であり、もう1つは 1,2-benzenedicarboxylate [*o*-phthalate] (以下 *o*-phthalate) を経て分解される経路 (OPA 経路) である (Fig. 1)。両経路において phenanthrene は 1-hydroxy-2-naphthalenecarboxylate [1-hydroxy-2-naphthoate] (以下 1-hydroxy-2-naphthoate) に変換されるが、1-hydroxy-2-naphthoate 以降の分解過程が異なる。Sal 経路では 1-hydroxy-2-naphthoate は 1,2-naphthalenediol、salicylate、catechol を経て分解され、OPA 経路では 1-hydroxy-2-naphthoate は *o*-phthalate、3,4-dihydroxybenzoate [protocatechuate] (以下 protocatechuate) を経て分解される。Sal 経路の 1,2-naphthalenediol 以降の分解経路は naphthalene の 1,2-naphthalenediol 以降の分解経路と共通である (Fig. 1)。

Phenanthrene 分解の特徴であり、興味深い点の1つは2種の経路に分岐する

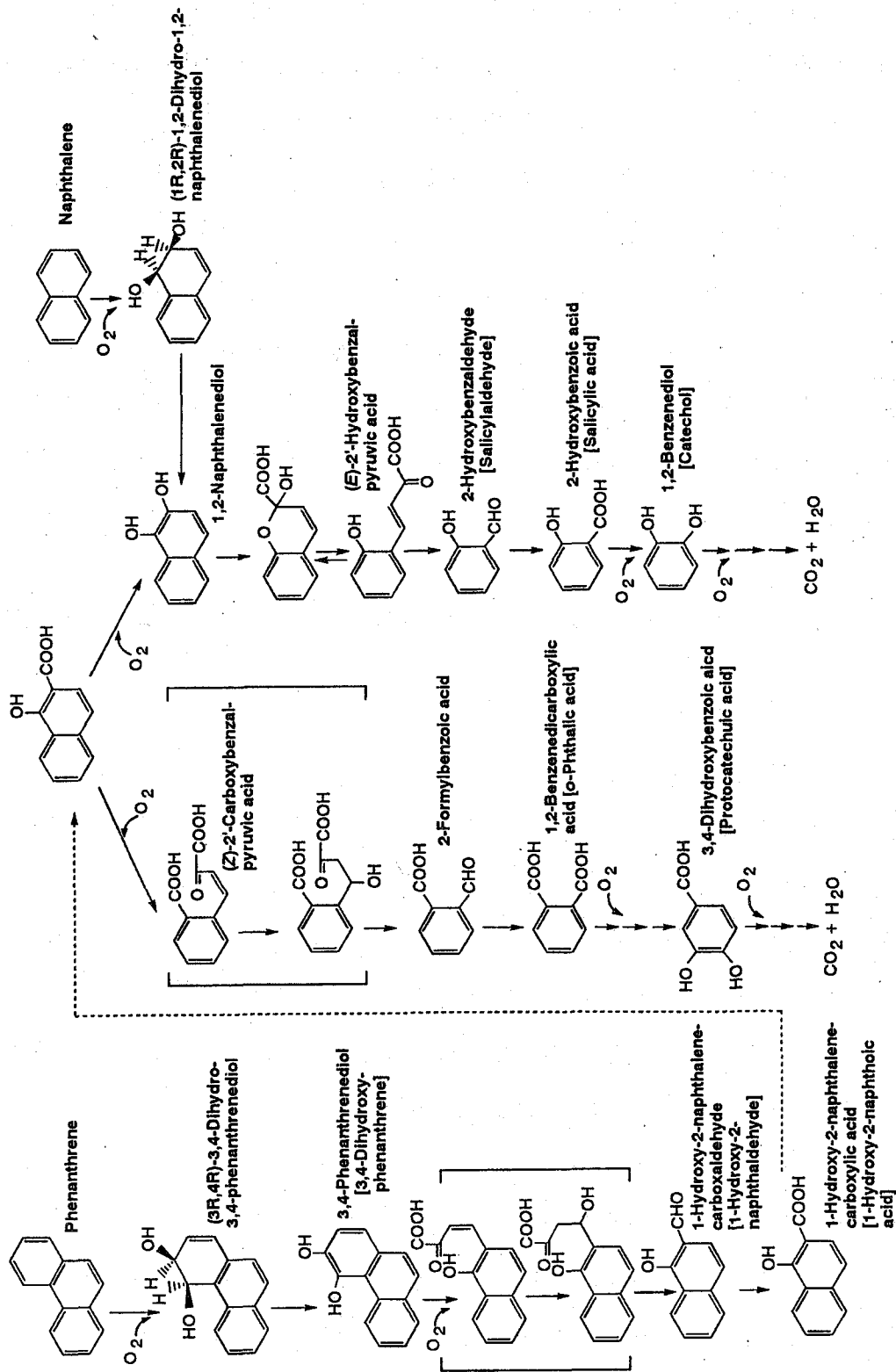


Fig. 1. Proposed pathways for the degradation of phenanthrene and naphthalene in bacteria. []:deduced steps.

1-hydroxy-2-naphthoate 以降の分解過程であり、特に OPA 経路は naphthalene 分解経路と共通である Sal 経路と異なり、phenanthrene 分解に特徴的な分解経路である。しかしこの経路については殆ど理解されておらず、分解に関与する酵素および遺伝子、中間産物の化学構造など詳細は不明である。

本研究では細菌における phenanthrene の OPA 経路分解を理解することを目的に、phenanthrene を OPA 経路で分解する細菌 *Nocardioides* sp. KP7 株を分離し、本株の 1-hydroxy-2-naphthoate から *o*-phthalate に至る分解過程に関与する酵素の精製、遺伝子のクローニングを行うとともに、本過程における中間産物の化学構造を明らかにした。また、本株における phenanthrene 分解遺伝子群の構造についても解析を行った。

第 2 章 Phenanthrene 分解菌 *Nocardioides* sp. KP7 の分離、同定および分解経路の解析

クウェートの海浜砂を分離源に 0.1% (w/v) の phenanthrene を唯一の炭素源として添加した無機塩培地 (BSM) で 40°C で 1 カ月間集積培養を行い、phenanthrene 分解菌 KP7 株を分離した。形態学的、生化学的および化学的分類手法に基づき KP7 株の分類学的位置を検討し、*Nocardioides* 属細菌と同定した (Table 1)。また、本株の 16s rDNA (1,483 bp) を PCR で増幅後クローニングし、3 つのクローンの解析から決定した 16s rDNA 塩基配列 (Genbank: #D87974) をもとに無根系統樹を作成し、本株が *Nocardioides* 属のクラスターに属することを分子遺伝学的にも確認した (Fig. 2)。

本株の phenanthrene 分解経路解析のため、phenanthrene (0.1% w/v) を添加した Marine broth (MB; Difco) で培養した菌体を集菌後リン酸緩衝液 (pH 7.5) に分散し、菌分散液に終濃度が 2 mM になるよう 1-hydroxy-2-naphthoate を添加し、室温にて 1 分または 3 分間静置した。その後 10 N の HCl を 100 μ l 添加し、遠心により上清を回収した。回収した上清から酢酸エチルで変換産物を抽出後 TLC で分析した。その結果、変換産物として 2-formylbenzoic acid と *o*-phthalic acid が検

Table 1. Morphological, biochemical and chemical characteristics of strain KP7.

Character	
Morphology	Coryneform rod
Motility	Motile
Flagellum	A polar flagellum
Gram-staining	Positive
Spore formation	Non-spore forming
Cytochrome oxidase	Not produce
Catalase	Produce
Major isoprenoid quinone	MK-8
Fatty acid composition	14-Methylpentadecanoic acid (predominant) Heptadecenoic acid (lesser amount) Heptadecanoic acid (lesser amount) Octadecenoic acid (lesser amount)
G+C content	63%

Cells grown on MB medium were used in these experiments.

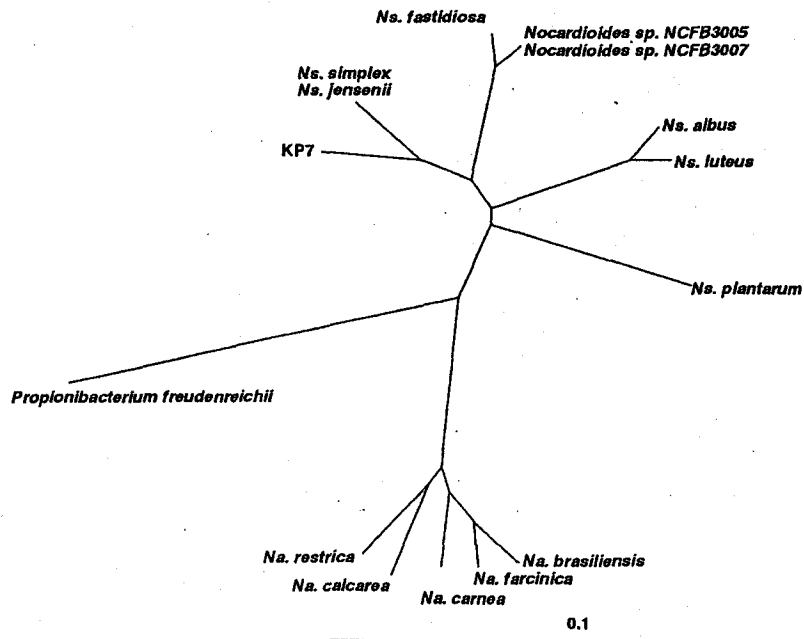


Fig. 2. Phylogenetic tree of strain KP7, related *Nocardioidea* and other strains. This unrooted tree based on the 16S rDNA sequences was produced by using the algorithm of Fitch and Margoliashi. *Ns.*: *Nocardioidea*; *Na.*: *Nocardia*.

出された。よって KP7 株は phenanthrene を OPA 経路で分解すると考えられた (Fig. 3)。更に OPA 経路に特徴的な酵素である 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase および 2-formylbenzoate dehydrogenase 活性の phenanthrene による誘導性を検討した結果、それぞれ 9 倍および 4 倍に誘導された。以上より *Nocardioides* sp. KP7 株は phenanthrene を OPA 経路で分解すると結論した。

第 3 章 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の生化学的特性および構造遺伝子

Phenanthrene を含む MB で培養した KP7 株の cell extract より陰イオン交換カラム (TSK DEAE-5PW)、疎水カラム (TSK Phenyl-5PW)、ゲル濾過カラム (TSKgel G3000SW_{XL}) を用いて 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase を精製した。SDS-PAGE 上の分子質量は 45 kDa、ゲル濾過上の分子質量は 270 kDa であり、本酵素は 45 kDa のサブユニットからなる 6 量体と考えられた。1-Hydroxy-2-naphthoate に対する K_m 値は 10 μ M、 k_{cat} 値は 114^sであった。本酵素は 1 分子の 1-hydroxy-2-naphthoate に対し 1 分子の酸素を消費した。本酵素は 1 サブユニット

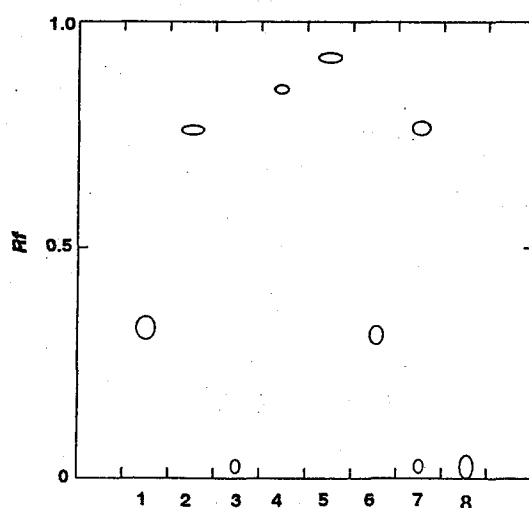


Fig. 3. TLC analysis of metabolites of 1-hydroxy-2-naphthoate transformed by strain KP7. Samples were developed with a solvent system of ethyl acetate/2-propanol (2:1 v/v). Lane 1, 1-hydroxy-2-naphthoic acid; lane 2, 2-formylbenzoic acid; lane 3, *o*-phthalic acid; lane 4, protocatechuic acid; lane 5, salicylaldehyde; lane 6, salicylic acid; lane 7, degradation product of 1-hydroxy-2-naphthoate after 1 min of incubation; lane 8, ditto after 3 min of incubation.

あたり 1 分子の Fe(II) を有しており、Fe(II)キレーターである *o*-phenanthroline により失活しアスコルビン酸存在下で Fe(II) と反応させると活性を回復した (Table 2; Table 3)。よって本酵素の活性には Fe(II) が必須であることが明らかとなった。本酵素は gentisate、3-hydroxyanthranilate、2-hydroxy-1-naphthoate、3-hydroxy-2-naphthoate、salicylate、3-hydroxybenzoate、4-hydroxybenzoate、protocatechuate を基質としなかった。また、3-hydroxy-2-naphthoate は 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase 活性を阻害し、 K_i 値は 22 μ M であった。

KP7 株の total DNA をテンプレートに精製酵素の N 末アミノ酸配列から設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、75 bp の PCR product が得られた。本 PCR product をクローニングし塩基配列を解析した結果、プライマー設計領域のアミノ酸配列と完全に一致した。そこで KP7 株の total DNA を *Sau*3AI で部分消化しコスミドベクター pLAFR3 の *Bam*HI サイトに連結して *E. coli* S17-1 株に構築した遺伝子ライブラリーから 75 bp の PCR product をプローブにコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行い、7 個の陽性クローンを得た (Fig. 4)。全陽性クローンは 3 本の共通する *Bam*HI 断片 (1.0 kb, 1.8 kb, 6.2 kb) を有していた。これら *Bam*HI 断片を電気泳動で分離後、テンプレートにして前述のプライマーを用いてそれぞれ PCR を行ったところ 6.2 kb の *Bam*HI 断片からのみ 75 bp の PCR product が得られた。よって 6.2 kb *Bam*HI 断片に 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の N 末端部分がコードされることが示された。そこで 6.2 kb *Bam*HI 断片をサブクローニングし、1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の構造遺伝子を決定した (Fig. 5)。本遺伝子を *phdI* (phenanthrene degradation) とした。*phdI* は 1,161 bp で、推定アミノ酸配列と精製酵素の N 末配列 (55 残基) は一致した。推定アミノ酸配列より計算されるサブユニット分子質量 (43.1 kDa) は SDS-PAGE 上の分子質量とほぼ一致した。なお、本酵素のアミノ酸配列はこれまで知られている環開裂型 dioxygenases とは相同性がなかったが、最近報告された *Sphingomonas* sp. RW5 株および *Pseudomonas* sp. U2 株の gentisate 1,2-dioxygenase とそれぞれ 30.5%、28.4% の相同性を示した (Fig. 6)。

Table 2. Effects of chelating reagents on the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase activity.

Chelater	Concentration	% Activity
EDTA	1 mM	95.2
	10 mM	90.8
	100 mM	71.4
EGTA	1 mM	94.2
	10 mM	100
<i>o</i> -Phenanthroline	10 μ M	21.0
	100 μ M	0
	1 mM	0
Control	-----	100

Table 3. Reactivation by metals of inactivated 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase.

Metal	% Activity *
[Initial]	100
[After being inactivated by 0.1mM <i>o</i> -phenanthroline]	2.5
FeSO ₄ (0.1 mM)	85.0 ^a
ZnSO ₄ (0.1 mM)	6.2 ^a
MnCl ₂ (0.1 mM)	7.4 ^a
Co(NO ₃) ₂ (0.1 mM)	6.9 ^a
MgCl ₂ (0.1 mM)	7.7 ^a
---	5.2 ^a

* Activity after incubation for 30 min under anaerobic condition in the presence of 0.1 mM ascorbate and the relevant metal.

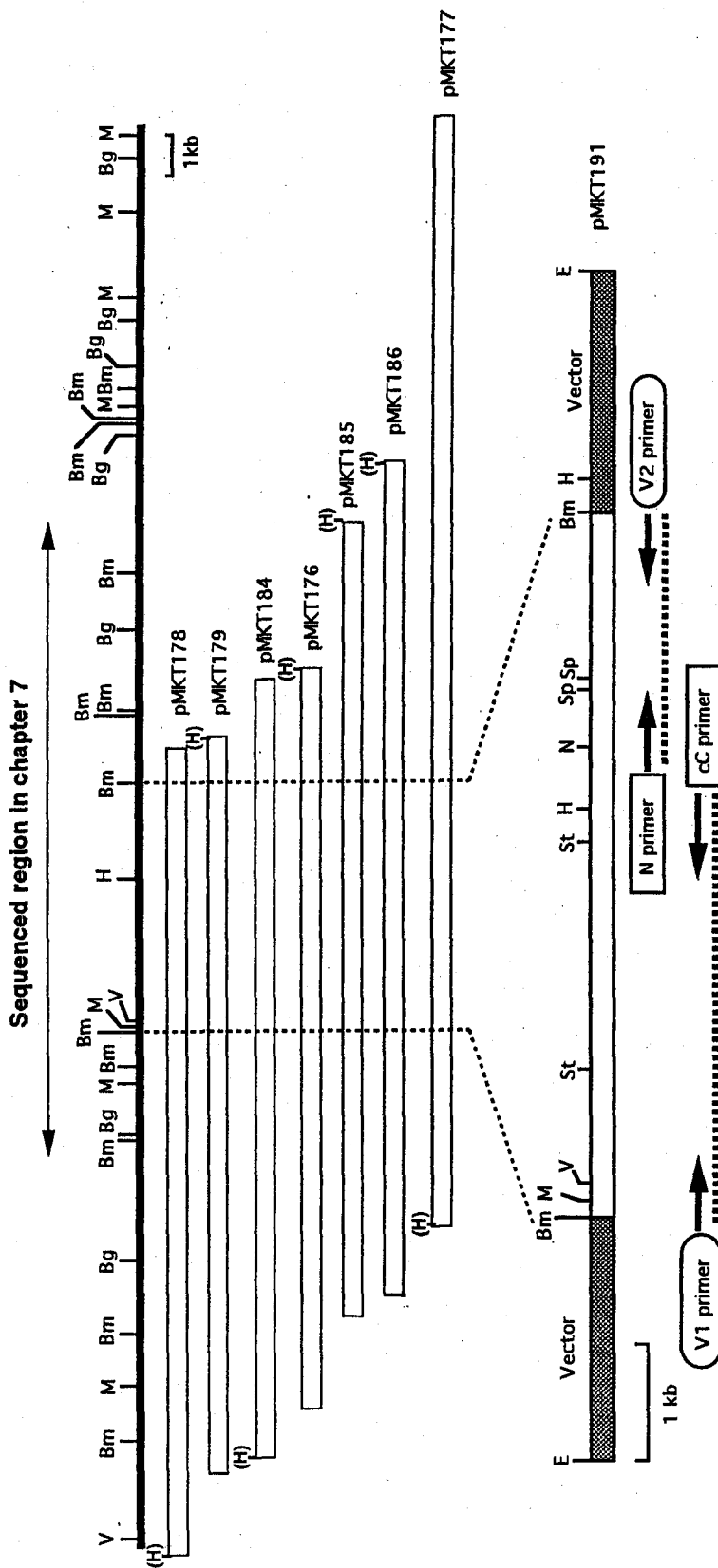


Fig. 4. Restriction maps of the seven positive clones and mapping strategy of the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase gene (*phdD*). The solid line indicates the restriction sites (Bg, *Bgl*II; Bm, *Bam*HI; M, *Mlu*I; H, *Hind*III; N, *Not*I; Sp, *Spl*I; St, *Stu*I; and V, *Eco*RV). Open boxes indicate DNA inserts of positive clones, and arrows indicate the PCR primers used. Combination of the V1 and cC primers amplified a 3.6 kb-long fragment, whereas combination of the V2 and N primers amplified a 2.6 kb-long fragment. Thus the 5'-end of the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase gene was located 3.6 kb right from the left *Bam*HI site of pMKT191.

```

-10      1      10      20      30      40      50      60
GGTCGAGGGGAGACCACCCATGAACCTCGAGCAACACCCGGAGCCCTGAGGCGGCACAGCCGCCACGCTCGAAGCTTTC
      M N S S N T G A P R A A Q A A T L R A E
      70      80      90      100     110     120     130     140
GATAGACGGCGCGGAGCAATACCTGCGCGGCCAGTGGATCGCTGAGGAGCACCTGATGCGCGCTATCGGGGGCCCGCG
D R R A A R Q Y L R G Q W I A E E H L M R A I G G P R
      150     160     170     180     190     200     210     220
GCCCGCCGGCATTCCCTACCAGTGGGAGTGGAAAAGCGTCGAGGTGGCGCTCGACGAGGCTACGATCGCCCTTGGCCCGG
P A G T P Y R W R W K S V E V A L D E A T I A L G P V
      230     240     250     260     270     280     290     300
TCGACACGGCCCGTCGCCATCTGACCTTCGTCACCCCGGGCTGATGGACCGCGGACGCGCCACTACGCACACCATCTCA
      D T A R R H L T F V N P G L M D R G S A T T H T I S
      310     320     330     340     350     360     370     380
GCGGGCTTCAGCTCGTGAAGCCCGGAGAGGTGTGTTGGTCGCACCCGACACACGATGAGCGCGGTGCGCTTCGTCACGAA
      A G F Q L V K P G E V C W S H R H T M S A V R F V T K
      390     400     410     420     430     440     450     460
GGGCCACCCGGATGCCCTTACCGCTGTCGACGCGGAGCGCCTCCCGATGGAGGACTTCGACTTGTCTCATCCCCCGGAT
      G H P D A F T A V D G E R L P M E D F D L L I T P R F
      470     480     490     500     510     520     530     540
TCTCTPGGCACGACCACCAATCCGGAGATGCGGAGCTGGTCTGGCTGGATGGCCTCGACATCGGCCTACTGCAAAAGC
      S W H D H H N S G D A D V V W L D G L D I G L L Q S
      550     560     570     580     590     600     610     620
CTCGGCGGAGTGTCTTACGAGCCCTACGGCGATGACAGCCAGAATGTGCGCCCTCCAGCAGTGGGGGATCGGTACCGG
      L G G V F Y E P Y G D D S Q N V R P S S S E G I G T R
      630     640     650     660     670     680     690     700
CAGCCACTGGCTCCGGCCTTGGGAGCGCGGAGAGTAGGCTTCCGATCCGATACCCCGTGGAAAGGAGTCAACG
      S H W L R P T W E R G R E S R L P I R Y P W K E V N A
      710     720     730     740     750     760     770     780
CGGCGCTTACGCTTACGACCTCGATGCCGGCACCCTTACGACGGGCTGGCCCTGCGCTACGCGAACCCCTGTCACCGG
      R L D V Y D L D A G T P Y D G L A L R Y A N P V T G
      790     800     810     820     830     840     850     860
GGCCCCACGATGGCGAGCTGGACTGTGGGTGACGCGCCTCGCCCCGGGTTTCGACGGAAAGTCGACCGCCGCTCCTC
      G P T M A T M D C W V Q R L A P G F D G K S H R R S S
      870     880     890     900     910     920     930     940
CAGCGCATCACCTACGTGATCTCGGGCTCGGGAAACCATGGTGACCGAAGACGAAACGATCACTTTCAACCGGGCGGACG
      S A I T Y V I S G S G T M V T E D E T I T P N R G D V
      950     960     970     980     990     1000    1010    1020
TCATCTCGTTGCCGAACCTGGACCAACTCCGTTGGACCAACGATTCGAAATCGAGCCCGTGTCTTCTTCTCGATGCAC
      I S L P N W T N F R W T N D S E I E P V L L F S M H
      1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
GACATTCCTGCGCTCGAGGCGTTCGGCTTCCTCTACGAGGAGCCCGAGGGAATCCTGAACGCGACACCGCCCTATCAA
      D I P A L E A F G F L Y E E P E A I L N A T P A P I N
      1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
TCCACCCCGCTCGCTCAATCCGATCTACCGGGCGGCGCTTTCTACGATCAGGACGAACTATGACGTCAC
      P T P S L N P I Y R A G A F Y D Q D E L *

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase gene (*phdI*). The deduced amino acid sequence is also presented. The amino-terminal amino acid sequence of the purified enzyme determined by Edman degradation is underlined. The putative Shine-Dalgarno sequence is also underlined. (GenBank: #D89987 and #AB000735)

```

PhdI      1:MNSSNTGAPEAAQAATLEAFDRRAAEQYLRGQWIAEHLMRAIGGPRPAGIPYRWEWKS 60
GtdA     1:M-QPVL-AND-QQAQLTALY-DEMRLPKLPLWEVLHA-LVLAE-PASLARAHWHYGEV 54
NagI     1:M-SHEL-GR--LE-DLPQDYRDELKQLNLVPLWPSLRA-VLPPNVPTROTQPTYYSYQTL 54
          * * * * *

PhdI     61:EVALDEATIALGPDVTARRHLTFVNPGLMDRGSATHTISAGFQLVKPGEVCWSHRHTMS 120
GtdA    55:RDFLLRSGDLISAEQAERRVLIENPGLG-GSSAITPSLYAGLQLILPGEVAPCHRHTQC 113
NagI    55:KPLLLKAGELTPIEKAERRVVLANPGHGLEKMQASAAIYLGMQLLLPGEWAPSHRHTPN 114
          * * * * *

PhdI    121:AVRFVTKGHPDAFTAVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHDHNSGDADVVWLDGLDIGLLQS 180
GtdA   114:ALRFILGE-GAYTAVDGEKAVMSPFDLVLPFGGQWHDHNGTDPMIWLDGLDIPTRH 172
NagI   115:AVRMIVEGE-GAYTTVDGKCPMSRGLLITPTGLWHEHGHGNEPVVWLDVLDLPLVY 173
          * * * * *

PhdI    181:LGGVFYEPYGDDSQNVRPSSSEGIGTRSHWL--RPTWERGR-ESRLPI-RYPWKEVNARL 236
GtdA   173:FDASFAEKWPQAQHPMAPPDGLARYGHNLPRMGTADRRTSQPLFHYPKQWRPAL 232
NagI   174:MEASYHID-GERQQVD-PGRGDC-AW-TRA-GVVPTPVFQRSKRYPLLRYPWADTRAL 228
          * * * * *

PhdI    237:-DVYDL DAGTPYDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAPGFDGKSHRRSSSAITY-VI 294
GtdA   233:DHLASTAQVDPHLGHAEFTNPADGGPVMETISAHVRLIPRGME-TAPRRSTDGTIFVVV 291
NagI   229:LSLA-ADQPEQECVQ-VTYVNPETGDDAENILGFYALMLKPGQTLRPLVRSF-AVVFHQI 285
          * * * * *

PhdI    295:SGSGTMVTEDETITFNRGDVISLPNWTNFRWTDNSEIEPVLLFSMHDIPALEA-FGFLYE 353
GtdA   292:EGKGQVEIDGVSTRLSPRDVVIPSWKRRHF-HAEDELIIFGF--SDKAC-QQKLG-LF- 345
NagI   286:EGRSEARIAESTFALREADTCCAPGYTEVTLKNLSADQPSFIF-MADESPLHRKLG-VF- 342
          * * * * *

PhdI    354:EPEAILNATPAPINPTPSLNPYRAGAFYDQDEL 387
GtdA   346:-REENL----- 350
NagI   343:-ENRG----- 346

```

Fig. 6. Alignment of the deduced amino acid sequences of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase (PhdI) from *Nocardioides* sp. KP7, gentisate 1,2-dioxygenases from *Sphingomonas* sp. strain RW5 (GtdA) and *Pseudomonas* sp. strain U2 (NagI). Common residues are marked with asterisks. Dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment.

Fig. 4 に示した pMKT191 から 1.6 kb の *SmaI/SpII* 断片を切り出し pUC18 の *SmaI/BamHI* サイトを用いて構築した *phdI* を含むプラスミド pMKT290 で形質転換した *E. coli* JM109 の cell extract 中には 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase 活性が認められ、*phdI* が 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase をコードしていることが確認された。

第 4 章 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase 反応生成物の化学構造

1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の反応生成物は 300 nm に最大吸光を示し、その構造は (Z)-2'-carboxybenzalpyruvate と考えられていたが確認されていなかった (Fig. 1)。本章では 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の反応生成物の化学構造を明らかにした。

第 3 章で作成した *phdI* を有する pMKT290 で形質転換した *E. coli* JM109 の cell

extract より陰イオン交換カラム (TSK DEAE-5PW)、疎水カラム (TSK Phenyl-5PW)、陰イオン交換カラム (MonoQ HR5/5) を用いて組換え体 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase を精製した。精製酵素の SDS-PAGE 上の分子質量は native 酵素と同じであった。組換え体酵素を 1-hydroxy-2-naphthoate を含む 10 mM Tris-H₂SO₄ 緩衝液 (pH 7.5) 中で反応させた後、10N HCl で反応液の pH を 2.5 にした。その後、クロロホルムと酢酸エチルで反応生成物を抽出し乾固した。乾固物を 0.1% (v/v) リン酸を含む 10%メタノールに溶解し、HPLC (ODS-C₁₈カラム) で反応生成物を精製した。なお、本精製物は乾燥後、D₂O に溶解した。

精製した反応生成物は ¹H-NMR、¹³C-NMR および FAB-MS で解析した (Table 4)。pH2.5 および pH を 7.5 に上げた条件での解析の結果、pH2.5 では II および III の 2 種の物質が検出され、pH7.5 では I が主成分であり、II も含まれていた (Fig. 7)。生体内の pH 域より、pH7.5 での構造 (I: (*E*)-4-(2-carboxylatophenyl)-2-oxo-3-butenate [common name: (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate]) が 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の反応生成物と考えられた。

しかし、先述の構造は抽出操作の過程で pH を変動させた試料の結果であったため、pH 変動を伴わない条件での構造を解析するため組換え体 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase による変換反応時における 1-hydroxy-2-naphthoate の構造変化を ¹H-NMR でモニターしながら解析を行った。反応開始から 180 min までの ¹H-NMR のチャートを Fig. 8 に示した。その結果、1-hydroxy-2-naphthoate のシグナル (0 min) の減少に伴い、(*E*)-4-(2-carboxylatophenyl)-2-oxo-3-butenate (180 min; [(*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate]) のシグナルが増大し、そのシグナルに収束した。

以上より 1-hydroxy-2-naphthoate は 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase により (*E*)-4-(2-carboxylatophenyl)-2-oxo-3-butenate [(*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate] に変換されることが確認された。

Table 4. NMR spectra for the products recorded in D₂O.

Compound I (at pH7.5)			Compound II (at pH2.5)			Compound III (at pH 2.5)		
Position	¹³ C δ	¹ H δ (multiplicity, J in Hz)	Position	¹³ C δ	¹ H δ (multiplicity, J in Hz)	Position	¹³ C δ	¹ H δ (multiplicity, J in Hz)
1	172.83		1	168.69		1	174.15	
2	198.00		2	201.44		2	93.84	
3	124.53	6.91(d,16.4)	3	43.67	3.60(dd,18.3,4.4)	3	43.5	2.69(dd,15.1,2.7)
4	148.99	8.05(d,16.4)			3.40(dd,18.3,7.9)			2.36(dd,15.1,9.3)
1'	131.40		1'	78.65	6.10(dd,7.9,4.4)	1'	79.65	5.85(dd,9.3,2.7)
2'	142.03		3'	173.96		3'	175.05	
3'	128.22	7.51(m)	4'	149.91		4'	150.53	
4'	131.99	7.50(m)	5'	125.94	7.93(d,6.6)	5'	125.85	7.91(d,7.6)
5'	130.04	7.49(m)	6'	130.23	7.65(t,7.6)	6'	130.11	7.65(t,7.6)
6'	128.03	7.81(d,7.1)	7'	135.86	7.82(t,7.6)	7'	135.72	7.83(t,7.6)
2'-C=O	177.81		8'	122.91	7.64(d,7.6)	8'	123.01	7.64(d,7.6)
			9'	125.27		9'	125.00	

The pH value was adjusted with DCl and NaOD.
Trimethylsilylpropionic acid sodium salt (TMSP) was used as an external standard.

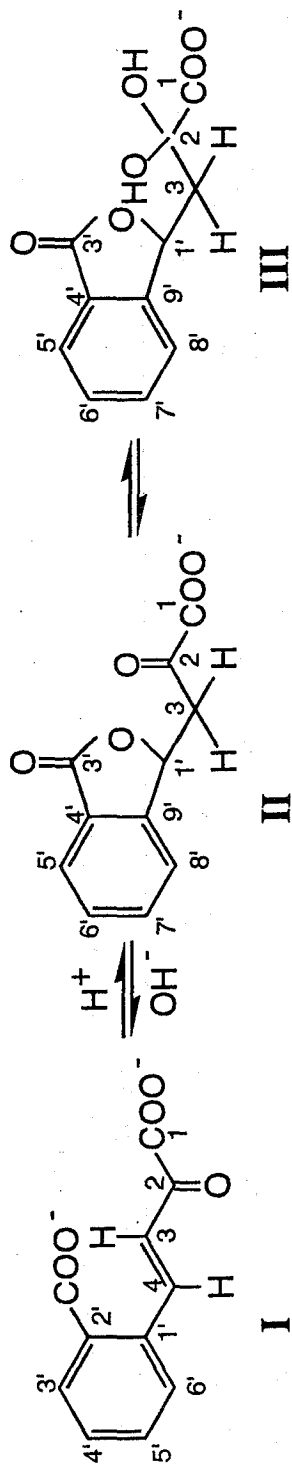


Fig. 7. The structure of the ring-cleavage products identified by NMR and FAB-MS analyses. In a solution at pH 2.5, compounds II and III were revealed. When the pH of the solution was raised to pH 7.5, compounds I and II were revealed, compound I being the major species. compound I, (*E*)-4-(2-carboxyphenyl)-2-oxo-3-butenoate [common name: (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate]; compound II, 2-oxo-3-(3-oxo-1,3-dihydro-1-isobenzofuranyl)propanoate; compound III, 2,2-dihydroxy-3-(3-oxo-1,3-dihydro-1-isobenzofuranyl)propanoate.

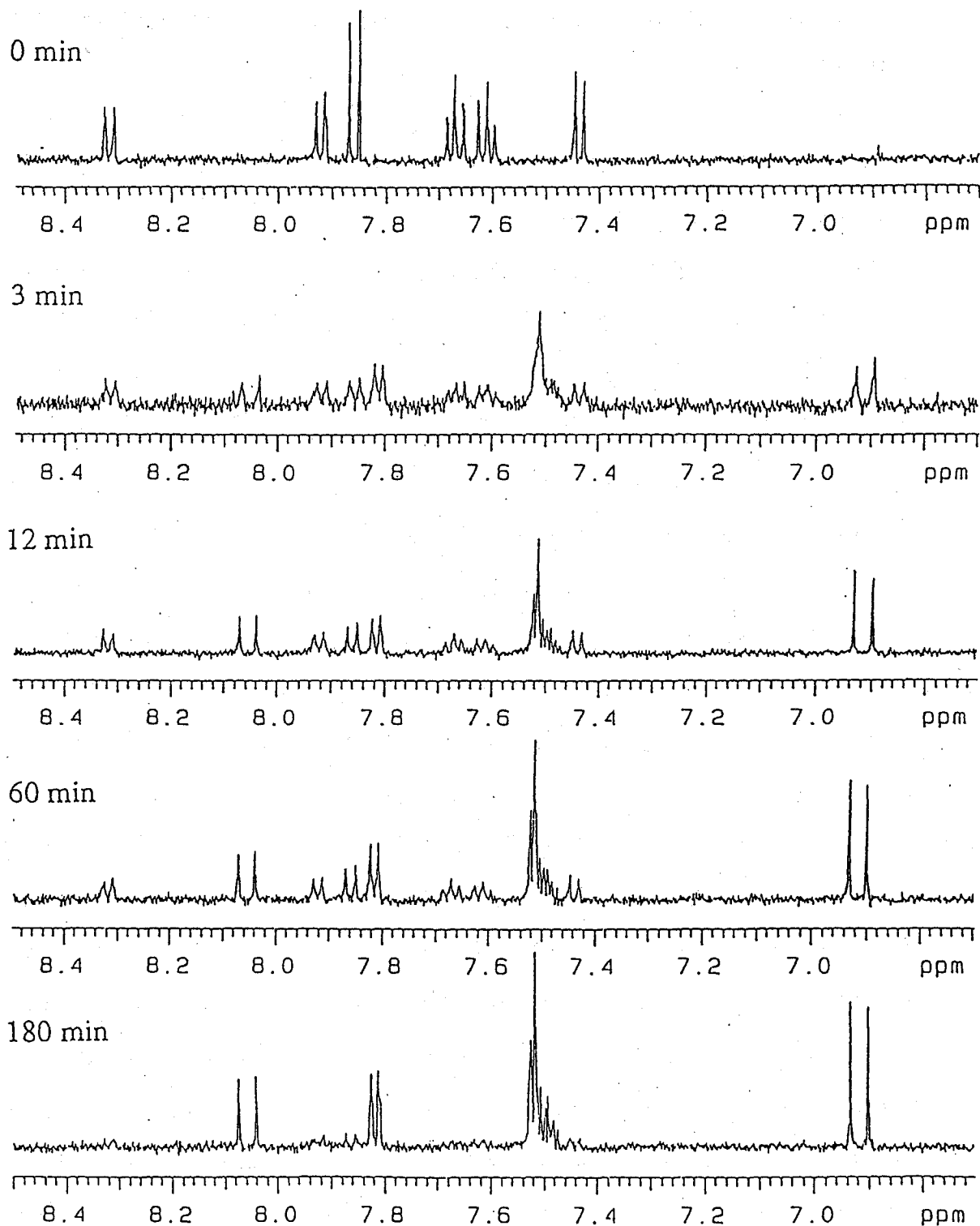


Fig. 8. Time course of the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase reaction monitored by $^1\text{H-NMR}$ at pH 7.5 in 50 mM deuterated potassium phosphate buffer.

第 5 章 (*E*)-2'-Carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase の生化学的特性および構造遺伝子

KP7 株の cell extract 中の (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase の比活性は phenanthrene によって 10 倍に誘導された。

Phenanthrene を含む MB で培養した KP7 株の cell extract より陰イオン交換カラム (TSK DEAE-5PW)、疎水カラム (TSK Phenyl-5PW)、陰イオン交換カラム (MonoQ HR5/5) を用いて (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase を精製した。本酵素の SDS-PAGE 上の分子質量は 38 kDa、ゲル濾過上の分子質量は 113 kDa であり、本酵素は 38 kDa のサブユニットからなる 3 量体と考えられた。本酵素の (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate に対する K_m 値は 50 μM 、 k_{cat} 値は 13^sであった。本酵素は 1 モルの (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate を 1 モルの 2-formylbenzoate と 1 モルの pyruvate に変換した。なお、本酵素は (*E*)-2'-hydroxycinnamate、benzalpyruvate、(*E*)-2'-methoxybenzalpyruvate を基質としなかった。

本酵素の構造遺伝子は *phdI* に連続して存在し、全長は 996 bp であった (Fig. 9)。なお、本遺伝子を *phdI* とした。本配列から得られた推定アミノ酸配列は精製酵素の N 末配列と一致し (24 残基)、計算されるサブユニット分子質量 (34.5 kDa) は SDS-PAGE 上の分子質量とほぼ一致した。本酵素のアミノ酸配列は naphthalene 分解菌 *P. putida* PpG7 株の (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase (NahE) および dibenzothiophene 分解菌 *Pseudomonas* sp. C18 株の (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase (DoxI) とそれぞれ約 40% の相同性を示した (Fig. 10)。また、naphthalenesulfonate 分解菌 *P. vesicularis* BN6 株の (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase の N 末配列 (24 残基) とも 29.2% の相同性を示し、BN6 株の (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase サブユニット分子質量 38.5 kDa、活性酵素分子質量 120 kDa とも類似していた。KP7 株の (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase と他の aldolases とはアミノ酸配列上の相同性は低く、(*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase と (*E*)-2'-

-80 -70 -60 -50 -40 -30 -20
 AACGCGACACCGGCCCTATCAATCCCACCCCTCGCTCAATCCGATCTACCGGGCGGGCGCTT
 N A T P A P I N P T P S L N P I Y R A G A F

-10 1 10 20 30 40 50
 TCTACGATCAGGACGAACTATGACGTACCCCGCGTGACATCCGCCGACATTACAGGGCTCGTTGGCAT
[phdJ] M T S P A V T S A D I T G L V G I
Y D Q D E L * [phdI]

60 70 80 90 100 110 120
 CGTGGCGACGCCCTCGAAGCCGGGCTCGGAAGCGCCGGACGCTGTAGACACCGTCGACCTCGACGAGACC
V P T P S K P G S E A P D A V D T V D L D E T A

130 140 150 160 170 180 190
 GCGCGCATGGTCGAAGTCACTCGCTCCGGTGTGACGTGCTGCTGACCAATGGCACCTTCGGCGAAG
 R M V E L I V A S G V D V L L T N G T F G E V

200 210 220 230 240 250 260
 TCGCTACTCTCACTTATGAAGAACTACTGGCGTTCAACGACACGGTCATCCGTACGGTCGCTAATCGCAT
 A T L T Y E E L L A F N D T V I R T V A N R I

270 280 290 300 310 320 330
 ACCCGTCTTTCGCGGGCCCTCGACGCTGAACACCCGCGACACGATCGCCCGCAGGCTCGCCCTAATGGGG
 P V F C G A S T L N T R D T I A R R L A L M G

340 350 360 370 380 390 400
 CTCGGTGCAGAACGGTCTCTTCGTCGGGCGACCAATGTGGCTACCTCTCGACGACGAGCAGCTGGTGTCTCT
 L G A N G L F V G R P M W L P L D D E Q L V S Y

410 420 430 440 450 460 470
 ACTACGCGCGCGTGTGCGATGCCGTTCCGGTTGCCGTTGCTGCTGCTCTACGACAACACTGGAGTGTCAA
 Y A A V C D A V P V A A V V V Y D N T G V F K

480 490 500 510 520 530 540
 GGGCAAATCTCCTCCGCGGTACGCGCGCTGGCCGAGATCCCGCAGATCGTGGCATCGAAGCATCTG
 G K I S S A A Y A A L A E I P Q I V A S K H L

550 560 570 580 590 600 610
 GCGTACTCTCGGGCAGCGATGCCTATGCGAGCGACCTGGCCGCTGTAAAAGGCCGCTTTCTCTGTTC
 G V L S G S D A Y A S D L A A V K G R F P L L P

620 630 640 650 660 670 680
 CCACCGGGACAATTGGCTCCCTCACTCGAGGCATTCCTCCCGGCAAGTGGCCGGCGCTTGGAGCGGTGA
 T A D N W L P S L E A F P G E V P A A W S G D

690 700 710 720 730 740 750
 TGTGGCCTGCGGCCCCGAACCCGTGATGGCGCTCCGCGCGCGATCGCGGAGGGACTCTGGGACGACGCC
 V A C G P E P V M A L R R A I A E G L W D D A

760 770 780 790 800 810 820
 CGTGCCGTGCATGAAGACATCGCATGGGCCACGGAGCCCTGTTCCCGGGCGCGATATAAGTAAGTTCA
 R A V H E D I A W A T E P L F P G G D I S K F M

830 840 850 860 870 880 890
 TGCCATACAGCATCCAGATCGACCGGGCCGAGTTCGAGGCCGCGGTTACATCGTGGCCCGCCCCAGCCG
 P Y S I Q I D R A E F E A A G Y I V P G P S R

900 910 920 930 940 950 960
 GCATCCCTACGGCACCGCCCCAGCCGCTACCTCGAAGGGGGCGCCGAGGTGCGCCCGCTTGGGCGGGC
 H P Y G T A P A A Y L E G G A E V G R R W A G

970 980 990 1000 1010 1020 1030
 ATTGCCAGAAGTACGTGCAACTCTCGCCGAACCATAGCACCCGACCACCAATCGCTCCACCCGCGAGTA
 I R Q K Y V A T L A E P *

1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CAGCCGCGACTGCCTCAGCTGGGGCATCATCGAAGGAGCCTGCCGCCACCTGGTCGCCGACCGGATGGAC

Fig. 9. Nucleotide sequence of the (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase gene (*phdJ*). The deduced amino acid sequence is also presented, and the putative Shine-Dalgarno sequence is underlined. *phdI*, 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase gene; *phdJ*, (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase gene. The amino-terminal amino acid sequence of the purified enzyme determined by Edman degradation is also underlined. (GenBank: #D89988 and #AB000735)

```

PhdJ 1:-----MTSPA VTSADITGLVGI VPTPSKPGSEAPDAVDTVDLDETARMVELIVASGVDVL 55
NahE 1:MLNKVIKTT-RLTAEDINGAWT IMPTPSTPDASDWRSTNTVDLDETARIVEELIAAGVNGI 60
DoxI 1:MSNKIMKTS-RLTAEDINGAWT IMPTPSTPDASDWRSTATV DLEETARIVEELIAAGVNGI 60
      * * * * *
PhdJ 56:LTNGTFGEVATLT YEELLAFNDTVIRTVANRIPVFCGASTL NTRDTIARRLALMGLGANG 115
NahE 61:LSMGTFGECATLTWEEKRDYVSTV VETIRGRVYFCGTTALNTR E VIRQTRELIDIGANG 120
DoxI 61:LSMGTFGECATLTWDEKRDYVSTIV ETIRGRVYFCGTTALNTR E VIRQTRELIDIGANG 120
      * * * * *
PhdJ 116:L FVGRPMWLPLDDEQLVSYAAVCD AVPVAAVVYDNTGV FKGKISSAAYAALAEIPQIV 175
NahE 121:TMLGVPMWVKMDLPTAVQFYRDVAGAVPEAAIAIYANPEAFKFD FPRPFWAEMSKI PQVV 180
DoxI 121:TMLGVPMWVKMDLPTAVQFYRDVADAVPEAAIAIYANPEAFKFD FPRPFWAEMSKI PQVV 180
      * * * * *
PhdJ 176:ASKHLGVLSGSDAYASDLAAVKGRFPLPTADNWLPSLEAFPGEVPAAWSGDVACGP-EP 234
NahE 181:TAKYLG I--GMLDLDLKLAP-NIRF--LPHEDDYAAARINPERITAFWSSGAMCGPATA 235
DoxI 181:TAKYLG I--GMLDLDLRLAP-NIRF--LPHEDDYAAARINPERITAFWSSGAMCGPATA 235
      * * * * *
PhdJ 235:VM---ALRRAIAEGLWDDARAVHEDIAWATEPLFPGGDISKFM PYSIQIDRAEFEAAGYI 291
NahE 236:IMLRDEVERAKSTGDWIKAKAISDDMRAADSTLFPRGDFSEFSKY NIGLEKARMDAAGWL 295
DoxI 236:IMLRDEVVRAKSTGDWAKAKAISDDMRAADSTLFPRGDFSEFSKY NIGLEKARMDAAGWL 295
      * * * * *
PhdJ 292:VPGPSRHPYGTAPAAYLEGGAEVGRRWAGIRQKYVATLAEP 332
NahE 296:KAGPCRPPYNLVPEDYLVGAQKSGKAWAALHAKYSK----- 331
DoxI 296:KAGPCRPPYNLVPEDYLAGAQKSGKAWAALHAKYSNELK-- 334
      * * * * *

```

Fig. 10. Alignment of the deduced amino acid sequences of (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase and (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolases. PhdJ, (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from strain KP7; NahE, (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from naphthalene catabolic plasmid NAH7 in *P. putida* PpG7; DoxI, (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from *Pseudomonas* sp. C18. Conserved amino acids are shown by asterisks. Dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment.

hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase は alsolases の中で新しいファミリーを形成していると考えられた。

phdJ を pET-22b(+) にクローニングしたプラスミド pMKT310 で形質転換した *E. coli* BL21(DE3) の cell extract 中の (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase 活性を測定したところ、IPTG 誘導でのみ活性が認められた。よって *phdJ* が KP7 株の (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase をコードしていることが確認された。

第 6 章 2-Formylbenzoate dehydrogenase の生化学的特性および構造遺伝子

Phenanthrene を含む MB で培養した KP7 株の cell extract より陰イオン交換カラム (TSK DEAE-5PW)、疎水カラム (TSK Phenyl-5PW)、アフィニティーカラム (TSK Blue-5PW) を用いて 2-formylbenzoate dehydrogenase を精製した。精製酵素の SDS-PAGE 上の分子質量は 53 kDa、ゲル濾過上の分子質量は 205 kDa であり、

本酵素は 53 kDa のサブユニットからなる 4 量体と考えられた。本酵素の 2-formylbenzoate に対する K_m 値は 100 μM 、 k_{cat} 値は 39 $^\circ\text{s}$ であり、 NAD^+ に対する K_m 値は 83 μM 、 k_{cat} 値は 32 $^\circ\text{s}$ であった。本酵素は 2-formylbenzoate の他に 2-nitrobenzaldehyde を基質とし、 K_m 値は 2.8 mM、 k_{cat} 値は 48 $^\circ\text{s}$ であった。なお、3-formylbenzoate、4-formylbenzoate、benzaldehyde、salicylaldehyde、2-methylbenzaldehyde、2-chlorobenzaldehyde、2-fluorobenzaldehyde、2-formylbenzenesulfonate、2-methoxybenzaldehyde、1-hydroxy-2-naphthaldehyde、*n*-hexylaldehyde を基質としなかった。

第 3 章で得られた 7 個の *phdI* 陽性クローン (Fig. 4) をテンプレートに、精製酵素の N 末アミノ酸配列より設計したプライマーで PCR を行ったところ、5 クローン (pMKT176, 177, 184, 185, 186) から 71 bp の PCR 断片が得られた。この断片をクローニングし塩基配列を決定したところプライマー設計領域のアミノ酸配列と完全に一致した。よって 2-formylbenzoate dehydrogenase 遺伝子の 5' 領域は pMKT184 の 3' 末領域に存在することが示唆された。そこで Fig. 4 の pMKT186 の 10.4 kb *HindIII* 断片をサブクローニング後 (pMKT260)、2-formylbenzoate dehydrogenase 遺伝子をクローニングし塩基配列を決定した (Fig. 11)。なお、本遺伝子を *phdK* 遺伝子とした。*phdK* は全長 1,455 kb で、本配列から得られる推定アミノ酸配列より計算されるペプチド分子質量 (51.8 kDa) は精製酵素の SDS-PAGE 上の分子質量とほぼ一致した。また、精製酵素の決定 N 末アミノ酸配列 (29 残基) と一致した。*phdK* の推定アミノ酸配列と相同性のある配列をデータベース上で検索したところ、toluene/xylene 分解菌 *P. putida* mt-2 株に内在する TOL プラスミド pWW0 上にコードされる benzaldehyde dehydrogenase (XylC) および 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (XylG) とそれぞれ 33.4%、32.5% の相同性があることが明らかとなった。KP7 株の 2-formylbenzoate dehydrogenase の 227 番から 234 番のアミノ酸配列は aldehyde dehydrogenase スーパーファミリーの共通配列である (F/Y)(I/T)G(S/E)(T/P)XX(G/F) を有していた (Fig. 12)。

-20 -10 1 10 20 30 40 50

CGAACAACTTTTCAGGAGCAACAAGTGACGCACCTCGCAAGTTTGACGAGTACAGGTGGAACGTGGTGGTCGA
M T T P R K F D R V R W N V L V D

60 70 80 90 100 110 120 130
CGGAGTCCCTCAATGTTGAGTCGAGATACCCATTAGCGATCCGTCGACCGGGCGGTATCTCACTCAAGTCCGGACT
G V P L N V E S R Y P T S D P S T G R Y L T Q V P D C

140 150 160 170 180 190 200 210
GC CGGAGGCCGATGTCGACCGTCCAGGCGTCCAGGCGTACGGCAGGCGCAGGCTGAGTGGGGCGCTCTCCCGCCGCGCGCC
A E A D V D R A V Q A S R Q A Q A E W G A L P P R A

220 230 240 250 260 270 280 290
CGTGGCGGAAGCTCCGCGAGCTCATCACACTGCTTCGGGAGCATCGTGAGGAGTTCCGCTATGCTCGATGCCATCGACGG
R A A K L R E L I T L L R E H R E E F A M L D A I D G

300 310 320 330 340 350 360 370
CGGCTTCCCATCTCGATGTCGAAATGATGATAGACGCGGGCGCTCGAACTGATGGACATCTTCGCCGACATGGCCCTCG
G F P I S M H R N D V D A A L E L M D I F A D M A L D

380 390 400 410 420 430 440 450
ACCTCGGGGCAAGACAATCCGGTCACTAGTACGAACTCCACTTCACCAAGCATGAGCCCTTTGGCGTCCGCGCACGAATC
L G G K T I P V S T N L H F T T H E P F G V V A R I

460 470 480 490 500 510 520 530
GGCGGTTTAAACCACTTCTTTTTTCGGCGCTCCAAAGTGGCGGCGCTCTCATGGCGGTAACCTCGGTATCCTGAA
G A F N H P F F F A A S K V A A P L M A G N S V I L K

540 550 560 570 580 590 600 610
GGCGCCGACGACGCGCTCTCGTTCGACTCGCGGAGGTCGCGGCGGAAGTGTCTACCGCAGAACCTTCTCATT
A P D Q T P L S S L R L A E V A A E V L P Q N L L I T

620 630 640 650 660 670 680 690
CGATCAGCGGTCCGCGAAGAGTGGCGGCTCGGGCGATTGTGGCGCATCCGCGAGATCAAACGGATCGGCTTCATCGGCTCG
I S G R G R V A G R A I V R H P Q I K R I G F I G S

700 710 720 730 740 750 760 770
ACAGACACGGGACGGTCCGATTCAGCGCGATGCTGCGGAGGTCGCGGCAAGCACATCTCGCTGGAGCTCGGCGGAAAGAA
T D T G R S I Q R D A A E V A V K H I S L E L G G K N

780 790 800 810 820 830 840 850
CGCCGAGTCTGTTTGGCGACCGCCCTCGAACAGGCGGCGTGGGCGCGGTGAACGGGATGAATTCACCTGGACCG
A Q I V F A D A D L E Q A A L G A V N G M H F T W T A

860 870 880 890 900 910 920 930
CTGGCCAGAGCTGTGGCTGACGAGTAGGCTCCTCGTTCACGAGTCCGCTGCGGACCAAGTATCGCCCGGGTGGTTGAG
G Q S C G S T S R L L V H E S V A D Q V I A R V V E

940 950 960 970 980 990 1000 1010
CTGGTGTCCGATCGCTTGGCCCTCCGCTGGACGAGAAGCCAGATGGGCGCCCTGGTCTCGCAGGCGCAGTACGA
L V S A I A V G P P L D E N A Q M G P L V S Q A Q Y D

1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090
CAAGTCCGATCACGCGATGGGGAGGATCCGGGAGGGGCAAGGTCGCTCGCAGGCGGTGGCAGGCGCTGAGGGAGTGG
K S V H A I G E G I R E G A K V V A G G G R P E G V G

1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
GAGAAGGGGCTGGTACCTCGCGCCACTGTCTTGGCGGACGTCGCGCCCGTTCGTTTATGAGCAGAACGAGATTTTC
E G G W Y L A P T V L A D V R P G S F I E Q N E I F

1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250
GGCCCCGTGCTCTCAGTATTATCTTCGCGACCGACGACGAAAGCGGTGGCAATCGCCAAATGGTGTGAGTACGGGCTCAC
G P V L S V I I F A T D D E A V A I A N G V E Y G L T

1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
CGCCAGCGTTTGGACGAGCATCACACGGGCGCACCTGATCGCTCGACGGGTCGAGGCTGGCTACGTGCTCGTCAACG
A S V W T S D I T R A H L I A R R V E A G Y V L V N G

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410
CGGGAGCCGCACTATTGGGGCCTCCCGTTCGGCGCGCTCAAGTCTGTCAGGGGTAGGTAGTGAGGAATCAATGGAGGAG
G S R H Y W G L P F G G V K S S G V G S E E S M E E

1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490
CTGATTTCTACCGGAGAACCAACCCCGTTCGTTCTCGGTTGAGTGCCAAAGGTCGGGGCTTCCAACCTCGCGGG
L I S Y T E T K T T T V V L G *

1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570
AGCCTGACGACACTTGGCAGCAGCGCGCCAGGCTGCTTTAGTTCAGGTACGACTAGCCTCCATCCGTGTTGCGCTCC

Fig. 11. Nucleotide sequence of the 2-formylbenzoate dehydrogenase gene (*phdK*). The deduced amino acid sequence is also presented. Amino-terminal amino acid sequence of the purified enzyme determined by Edman degradation is underlined. The putative Shine-Dalgarno nucleotide sequence is also underlined. (GenBank: #D89989 and #AB000735)

```

PhdK 1:MTTPRNFQ-EYRWNVLVDGVFLNVESRYFISDPSTGRYLQVFDCAEADVDRVQASRQA 59
XylC 1:MRRETKQPIWYGVFSSNWEARGGVANVV-DPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKRA 59
XylG 1:MKEIK-HFIS-GELVGS----ASGKLFQNV-SPANQVIGRVHEAGRAEVDAAVRAARA 53
* * * * *

PhdK 60:-QAEWGALPPRARAANKRELITLLREH-REEF--A-M--LDAIDGGFFISMMRNDVDAAL 112
XylC 60:QKE-WAALPFSERAAIVRKAEEKKEREY-EFAD-W-NVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQM 115
XylG 54:LKGFPGKMTVAERAEILERVADGITAR-FGEFLKARMPGSRQAEVAGQPBRESARRANFK 112
* * * * *

PhdK 113:EL-MDIFADMALDLGKTIPTVSTNLHFTTHEFFGVVARIGAFNHPFFFAASKVAAPLMAQ 171
XylC 116:EQE-AQAGLALPAGTL-FPSA-VPGRMNLQQRVVPVGVVGIAPWNFFLFLAMRSVAPALALG 173
XylG 113:VPADLLKNVANEAFEMATPDGAGALNYGVRPKGVISPNWFLLLMTXVGPALACG 172
* * * * *

PhdK 172:NSVILKAPDQTPFLSSRL-AEVAAEV-LPQNLLITISGRGR-VAGRAIVRHPQIKRIGEL 228
XylC 174:NAVILKFDLQTAVTGGALIAEIFSADGMPDGLVBLVPG-GAD-VGSEMVANSNGINMISET 231
XylG 173:NCVVVKPSEETPLT-ATLLGEVHQAGVPAGVYVNVVGGFSGDSAGAPLTEBPDVDAYTET 231
* * * * *

PhdK 229:GSDTGRSIQRDAAEVAVKHISLELGGKNAQIVFADADLEQAALGAVNGMNFTWTAGQSC 288
XylC 232:GSDTGRSLI-GEKCGRMLKVALELGGNVHIVLPDAD-LEGAVSCAAWGTFLHQGQVC 288
XylG 232:GRTGTGETI-MRAARKGVRQVSELELGGKNAQIVFADCD-MDKAIEGTLRSAL-ANCGQVC 288
* * * * *

PhdK 289:GSTRLLVHESVADQVIARVVVLSAIAVGPPLDENAQMGPLVSAQYDKSVHAIGEGIR 348
XylC 289:MAAGRELVRDVAQQYAEKALRAKLVVGGDPNSDQVBLGPLINEKQVVRVHALVESAQR 348
XylG 289:LGTERVYVERFIFDAPVARLKAGAEALKIGEPNDPEANFGPLISHKPREKVPSSYYQQAVD 348
* * * * *

PhdK 349:EGAKVVVAGG-GRP-EGVGG-GWYLAPTFLADVRRGSPFIEQNEIFGVPVLSVIFATDDEA 405
XylC 349:AGAQLVAGGTYQD-R-YYQ-AT--V--I-MDVKPEHMEVFRSEIFGPVAPITVFDSEEA 399
XylG 349:DGATVVTGGVPEMPALAGGAW-VQPTIWTGLADDSAVVTEEIFGPCCHIRPFDSEEA 407
* * * * *

PhdK 406:VAIANGVEYGLTASVWTSDITRAHLIARRVEAGYVLVNGGSRH-YWGLPFGGVKSSGVGS 464
XylC 400:IELANCSEYGLAASIBTRALATGLDIAKRLNTGMVHINDQPINCEPVPFPGMGASGSGG 459
XylG 408:IELANSLPYGLASAIWTVNRRAHRVAGQTEAGIVVNSWFLR-DLRTAPGGSKQSGI-G 465
* * * * *

PhdK 465:-EESNEELISYETKTTTVVLG----- 485
XylC 460:RFGGPASIEEFTQSQHISMVEKPNYPF 487
XylG 466:REGGVHSLEPYTELKNIC-V-KL----- 486

```

Fig. 12. Alignment of the deduced amino acid sequences of 2-formylbenzoate dehydrogenase from strain KP7, benzaldehyde dehydrogenase encoded by the *xyIC* on TOL plasmid pWW0, and 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase encoded by the *xyIG* gene on TOL plasmid pWW0. PhdK, 2-formylbenzoate dehydrogenase; XylC, benzaldehyde dehydrogenase; XylG, 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase. The consensus sequence of aldehyde dehydrogenase superfamily is underlined. Asterisks indicate identical amino acids, and dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment.

phdK を pET-22b(+) にクローニングしたプラスミド pMKT314 で形質転換した *E. coli* BL21(DE3) の cell extract 中の 2-formylbenzoate dehydrogenase 活性を測定したところ、IPTG 誘導でのみ活性が認められた。よって *phdK* が 2-formylbenzoate dehydrogenase をコードしていることが確認された。

第 7 章 *Nocardioides* sp. KP7 の phenanthrene 分解遺伝子群の構造

本章では第 3 章で得られた 7 個のコスミドクローンの制限酵素地図からクローン作製時に組換えが起きていないことが確認されている 16,775 bp 領域 (Fig. 4) の全塩基配列を決定し、*Nocardioides* sp. KP7 株の phenanthrene 分解遺伝子群の構造を解析した。

塩基配列より本領域 (16,775 bp) には 7 つのオープンリーディングフレーム (orf) が存在した (Fig. 13)。うち 3 つは *phdI*, *phdJ*, *phdK* である。また、*phdI* の

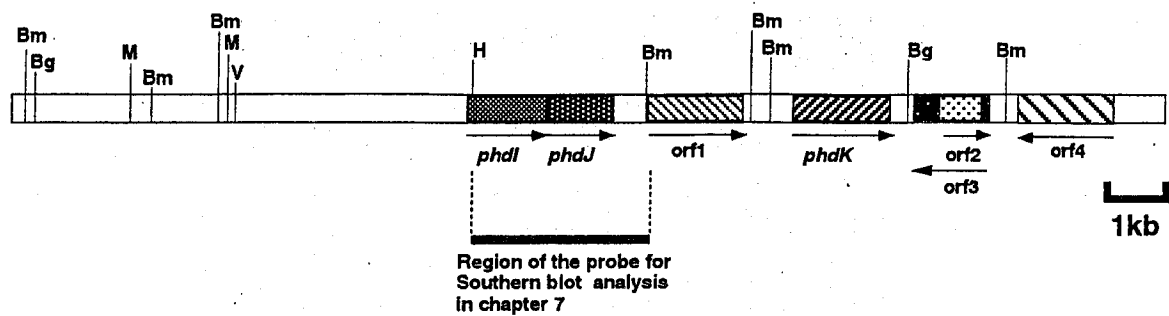


Fig. 13. Organization of *phdI*, *phdJ*, *phdK*, and other orfs on a 16,775 bp-long DNA fragment of *Nocardioides* sp. KP7. *phdI*, the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase gene; *phdJ*, (*E*)-2-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase gene; *phdK*, 2-formylbenzoate dehydrogenase gene. Locations: *phdI*, 6,724 to 7,887; *phdJ*, 7,884 to 8,882; *orf1*, 9,369 to 10,790; *phdK*, 11,483 to 12,940; *orf2*, 13,687 to 14,457; *orf3*, 13,224 to 14,457 (complementary strand); *orf4*, 14,653 to 15,846 (complementary strand). Abbreviations: Bg, *BglII*; Bm, *BamHI*; V, *EcoRV*; H, *HindIII*; M, *MluI*. (GenBank: #AB000735)

5'上流域 (6,723 bp) には機能タンパクと思われる orfs は見い出されなかった。*phdJ* と *phdK* の間には 1,419 bp の *orf1* があり、本配列から得られる推定アミノ酸配列は *P. putida* PRS2000 株の 4-hydroxybenzoate transport protein (PcaK) と 27% の相同性を示した (Fig. 14)。*phdK* の 3'下流域 (3,834 bp) には *phdK* の順方向に *orf2* (768 bp) が、また *orf2* を含む同じ領域に *phdK* とは逆方向に *orf3* (1,191 bp) が存在した (Fig. 13)。*orf2* および *orf3* とともにデータベース (Swiss-Prot および Genbank) 上には相同性を示すアミノ酸配列および DNA 配列は見い出されなかった。*orf2* の 3'下流には *phdK* と逆方向に *orf4* (1,248 bp) が存在し、本配列から得られる推定アミノ酸配列は bacterial cytochrome P-450 タンパクと相同性を示した。*orf4* の推定アミノ酸配列と相同性を示したタンパクは、*Agrobacterium tumefaciens* の cytochrome P-450-pinf1 (26%)、*Saccharopolyspora erithraea* の 6-deoxyerythronolide B hydroxylase (31%)、*Pseudomonas* sp. の cytochrome P-450-terp (29%)、*Bacillus subtilis* の cytochrome P-450-109 (29%)、*Rhodococcus fascians* の cytochrome P-450 fas1 (26%) であった。*orf4* は cytochrome P-450 の保存配列 FGXGXHXCXG を有していた。今回解析した 16,775 bp の連続した DNA 上には phenanthrene 分解に明らかに必要と思われる遺伝子は *phdI*、*phdJ*、*phdK* であり、他の phenanthrene 分解に関与し得る遺伝子はこれらの近傍に隣接して存在しなかった。

```

Orf1 1' MNTSPGAPTGVRAFVDSQPIGRQRRLIVLHVFLINVDGMDITLASHLFPVIRDWG
PcaK 1' MNQAQNSVVKSLDVQSFINQQPLSRXQWRVLLCFLIVFLDGLDTAAMGFIAPALSQEWG
Orf1 58' VPVSAVTLVSLVGVVAMAIGALVSGPVADRHRGRKGVTVVGFVLPCLATAGLGLTGDHNSF
PcaK 61' IDRASLGPVMSAALIGHVFGALGSGPLADRFGRKGVLVGAVLVFPGGFSLASAYATNVDQL
Orf1 118' AALRIISCFGLGAVMPVALTIVADWMPKARRAQNVSIAGVGVGSIIGAYLAAAVIPTL
PcaK 121' LVLRFPLTGLGLGAGMPNATLLSEYTPERLKSLLVTSMFCCFNLMAGGGFISAKMIPAY
Orf1 178' GWQVMVLIAGLAPLILPPFFVALVPEPAIISVRRGIPEARIRSAALVAPDRDIAGVDLT
PcaK 181' GWHSLLVIGGVLPDLLLALVLMVWLPESARFLVVRNRGTDKIRKTLSPAPQVVAEAGSFS
Orf1 238' RAGLTLGAGEVRKALFAEILCRPPLLVTLIIVGVFFVQVQSGLLVLQYHFMMLLQAPAPG
PcaK 241' VPE---QKAVAARSVFAVIFSGTYGLGTHLLWLTYPHGLVIVVYLLTSWLPMLMRDSEGAS
Orf1 298' LSTVESGLIVAMYGWALIGQLTIAPILKXRFDRFIALAAFIFWSVVGILLVAAFGTGFQF
PcaK 297' M--EQAQAFIGALFQFGVLSAVGVGWANDRYNPHKVIGIFYLLAGVFAYAVGQ-SLG-NI
Orf1 358' FGYFTLLFAIGLSLPATAAAMQSVTTLAYEHEEFRATGMGSAGFAGRLGTLTYGALGGTLI
PcaK 353' TVLATLVLIAGMCVNGAQSAMPSLAARFYFTQGRATGVSWMLGIRGFCAILGAWSGATLL
Orf1 418' GAG--FGITTVSLVLAAPLAVS IGLVFSLRALSRRAGIAPEPHQITPGNEVDDAHVST
PcaK 413' GLGWNFEQVLTALLVPAALA-TVGVIVKGLVSHADAT

```

Fig. 14. Alignment of the deduced amino acid sequence of the orf1 product with that of PcaK from *P. putida* PRS2000. Orf1, deduced amino acid sequence of the orf1 product; PcaK, deduced amino acid sequence of the *pcaK* gene. Asterisks indicate identical amino acids, periods indicate similar amino acids between two sequences, and dashes indicate gaps introduced to maximize the alignment. The consensus sequences for the superfamily of transporter, (R/K)XXX(R/K) and (N/D)(R/K)XGR(R/K), are underlined.

芳香族分解系遺伝子群はプラスミド上にコードされている場合が多い。そこで、KP7株の phenanthrene 分解遺伝子群がプラスミドコードか染色体コードかをパルスフィールドゲル電気泳動とサザンプロット法を用いて解析した。プローブには *phdI* と *phdJ* を含む約 2.5 kb の *HindIII/BamHI* 断片を用いた (Fig. 13)。なお、*phdI*, *phdJ*, *phdK* を含む DNA 鎖は約 50 kb にわたり連続していることが明らかになっている (斉藤私信)。Total DNA を制限酵素消化しない場合、プローブは電気泳動でウェルから殆ど移動しない 2,200 kb 以上の部分にハイブリダイズした。またエチジウムブロマイド染色像上では 50 kb 弱から 2,200 kb 強の範囲にはプラスミドは確認されなかった。*XbaI* および *HindIII* で消化した場合はそれぞれ約 430 kb および約 140 kb の部位にハイブリダイズした。以上より、KP7株の phenanthrene 分解遺伝子群は染色体 DNA 上にコードされる可能性が高いと考えられた。

第8章 総合考察

1-Hydroxy-2-naphthoate から *o*-phthalate に至る変換反応は3段階の酵素反応によって行われていた (Fig. 15)。1-Hydroxy-2-naphthoate は 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase により O_2 分子の添加とベンゼン環の開裂を受け (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate に変換された。これまで知られている環開裂型 dioxygenase は、全てベンゼン環の2カ所が *ortho* または *para* の位置に水酸化されている芳香族化合物を基質とするのに対し、1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase はベンゼン環の1カ所のみが水酸化されたベンゼン環の開裂を触媒する新しい型の環開裂 dioxygenase であった。また、検討した8種の1-hydroxy-2-naphthoate 類縁体を基質とせず、基質特異性も高かった。環開裂型 dioxygenase は開裂様式から extradiol 型と intradiol 型に分類されるが、前者は Fe(II) を、後者は Fe(III) を補因子とする。1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase は Fe(II) を補因子とすることから extradiol 型に類似していた。アミノ酸配列は両型と相同性を示さず、類似の環開裂様式を示す gentisate 1,2-dioxygenase に相同性を示し、環開裂型 dioxygenase の中で新たなファミリーを形成すると思われた。

1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の反応生成物の化学構造は (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate と同定された。1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase の反応初期生成物は (*Z*)-2'-carboxybenzalpyruvate と推測されるが、反応過程中に (*Z*)-2'-carboxybenzalpyruvate の3位と4位の炭素原子間の2重結合が一時的に切断し、再度2重結合が形成される過程の存在が示唆され、その際に (*Z*)-体から (*E*)-体に変換されると考えられた。

1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase によって1-hydroxy-2-naphthoate から生成した (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate は、引き続き (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase によって 2-formylbenzoate と pyruvate に変換された。(E)-2'-Carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase は naphthalene 分解および dibenzothiophene 分解の酵素である (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase (NahE, DoxI) の

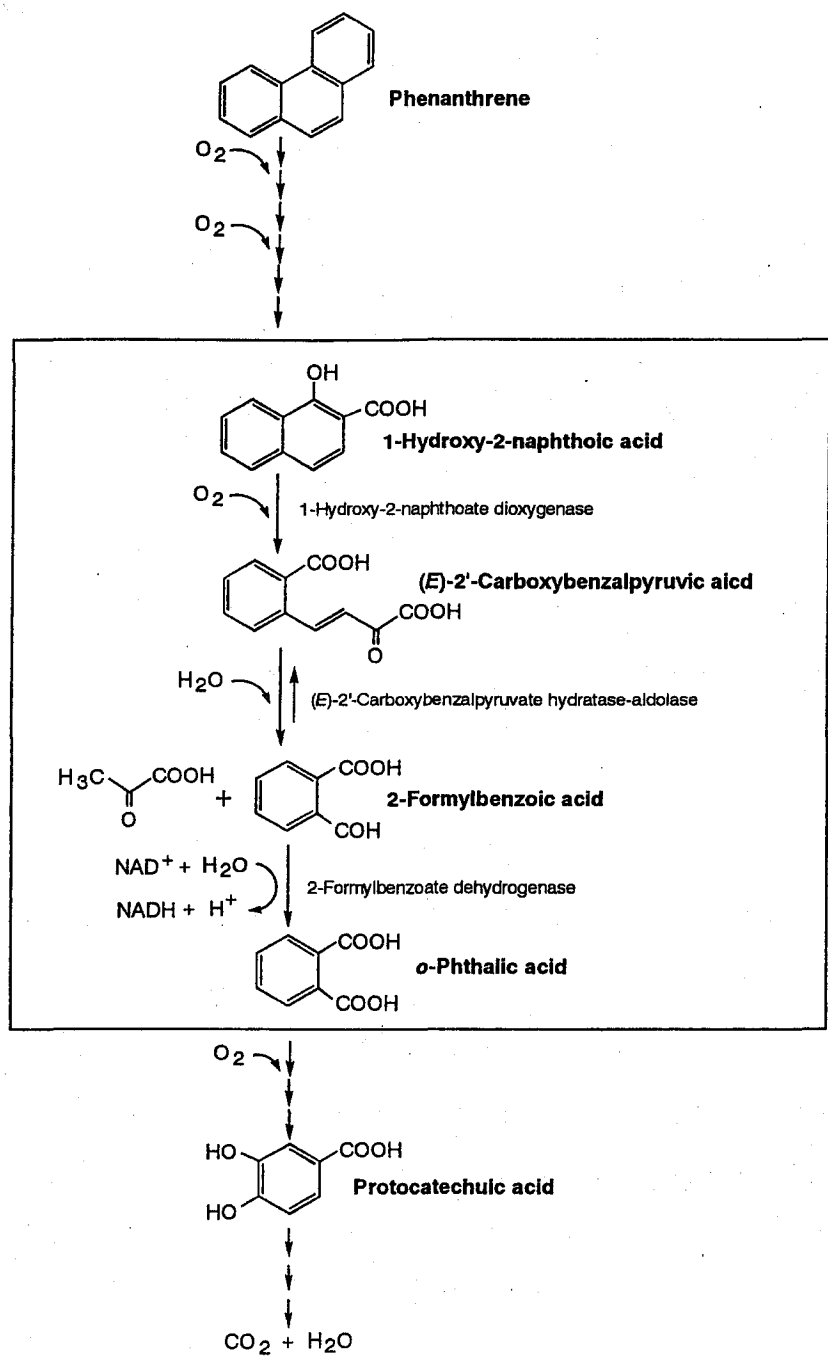


Fig. 15. Pathway from 1-hydroxy-2-naphthoate to o-phthalate in phenanthrene degradation by strain KP7 established in this study.

アミノ酸配列と相同性を示し、更にサブユニットの分子質量および 3 量体を形成する点も類似していた。PAH 分解において benzalpyruvate 類縁体の変換には hydration と aldolation の両活性を有する酵素が用いられていると思われた。

(E)-2'-Carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase により (E)-2'-carboxybenzalpyruvate から生成する 2-formylbenzoate は引き続き 2-formylbenzoate dehydrogenase によって *o*-phthalate に変換された。KP7 株の 2-formylbenzoate dehydrogenase は既に精製されている phenanthrene を OPA 経路で分解する *Alcaligenes faecalis* AFK2 株の 2-formylbenzoate dehydrogenase とサブユニット分子質量、基質特異性も異なり、別の分子であることが示唆された。KP7 株の 2-formylbenzoate dehydrogenase はサブユニット分子質量およびアミノ酸配列から aldehyde dehydrogenase スーパーファミリーに属する酵素と考えられ、AFK2 株の 2-formylbenzoate dehydrogenase はサブユニット分子質量から同スーパーファミリーには属さないことが示唆された。

既に知られている芳香族化合物の分解遺伝子群の多くは一連の遺伝子がクラスターを形成している。KP7 株では *phdI* と *phdJ* が連続していたが、*phdJ* と *phdK* との間には *orf1* が挿入されていた。*orf1* 産物は *P. putida* PRS2000 株の 4-hydroxybenzoate transporter (PcaK) と相同性を示した。1-Hydroxy-2-naphthoate と 4-hydroxybenzoate は部分的に構造が似ていることから、*orf1* 産物が 1-hydroxy-2-naphthoate transporter である可能性が考えられた。*phdK* の 3'末下流域には P-450 類似配列 (*orf4*) が存在した。P-450 はカビなどで PAH 分解に関与しているが、*orf4* 産物の phenanthrene 分解への関与は不明である。*phdI* の 5'末上流域 (約 6.7 kb) および *phdK* の 3'末下流域 (約 3.8 kb) には KP7 株の phenanthrene 分解に明らかに関与していると思われる遺伝子はなく、本株の phenanthrene 分解遺伝子群は、他の芳香族化合物の分解遺伝子群の構造と異なりゲノム上でクラスターを形成していなかった。KP7 株の phenanthrene 分解では、1-hydroxy-2-naphthoate より上流および *o*-phthalate より下流の分解経路に関与する遺伝子は *phdI*、*phdJ*、*phdK* とは離れた場所に存在すると考えられた。また、*phdI*、*phdJ*、*phdK* は染色

体 DNA 上にコードされていると思われた。

KP7 株は phenanthrene 分解において、他の PAH 分解と類似している物質を分解する場合は進化的に類似の酵素を用い、新規な物質を分解する際には進化的にも新規な酵素を用いて分解していると思われた。OPA 経路の 1-hydroxy-2-naphthoate から *o*-phthalate までの過程は phenanthrene 分解に特徴的な経路であり、KP7 株の場合はこれに対応する遺伝子も 1-hydroxy-2-naphthoate より上流、および *o*-phthalate より下流の遺伝子群とは独立して獲得した可能性も考えられた。

要約

- (1) Phenanthrene を OPA 経路で分解する *Nocardioides* sp. KP7 株を分離した。
- (2) 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase を精製しその生化学的特性を明らかにするとともに、同遺伝子 (*phdI*) をクローニングした。本酵素は新しいタイプの環開裂 dioxygenase であり、すでに知られている環開裂 dioxygenase とは進化上異なり、gentisate 1,2-dioxygenase と新たなファミリーを形成すると考えられた。
- (3) 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase によって生成する 1-hydroxy-2-naphthoate の環開裂物質を (*E*)-4-(2-carboxylatophenyl)-2-oxo-3-butenate [common name: (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate] と同定した。
- (4) (*E*)-2'-Carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase を精製しその生化学的特性を明らかにするとともに、同遺伝子 (*phdJ*) をクローニングした。本酵素は naphthalene 分解系酵素の (*E*)-2'-hydroxybenzalpyruvate hydratase-aldolase と類似していた。
- (5) 2-Formylbenzoate dehydrogenase を精製しその生化学的特性を明らかにするとともに、同遺伝子 (*phdK*) をクローニングした。本酵素は aldehyde dehydrogenase スーパーファミリーに属する酵素であった。
- (6) *Nocardioides* sp. KP7 株の phenanthrene 分解遺伝子群は他の芳香族分解遺伝子群とは異なり、ゲノム上でクラスターを形成していなかった。
- (7) *Nocardioides* sp. KP7 株の phenanthrene 分解遺伝子 (*phdI*, *phdJ*, *phdK*) は染色体 DNA 上にコードされると考えられた。

本論文に関する主論文

- Iwabuchi, T., Harayama, S. (1997) Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179:6488-6494.
- Iwabuchi, T., Harayama, S (1998) Biochemical and genetic characterization of *trans*-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from a phenanthrene-degrading *Nocardioides* strain. J. Bacteriol. 180:945-959.
- Iwabuchi, T., Harayama, S (1998) Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. J. Biol. Chem. 273:8332-8336.
- Iwabuchi, T., Yamauchi-Inomata, Y., Katsuta, A., Harayama, S. (1998) Isolation and characterization of marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42°C. J. Mar. Biotechnol. 6:86-90.
- Adachi, K., Iwabuchi, T., Sano, H., Harayama, S. (1999) Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. (in press)

参考論文

- Ishihara, H., Hara, N., Iwabuchi, T. (1989) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus licheniformis* bacitracin synthetase 2 gene. J. Bacteriol. 171: 1705-1711.
- Venkateswaran, K., Iwabuchi, T., Matsui, Y., Toki, H., Hamada, E., Tanaka, H. (1991) Distribution and biodegradation potential of oil-degrading bacteria in north eastern Japanese coastal waters. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 113-122.
- Venkateswaran, K., Iwabuchi, T., Matsui, Y., Toki, H., Hamada, E., Tanaka, H. (1993) Evaluation of various media with reference to the growth and biodegradation potential of oil-degrading microorganisms. Biomedical Lett. 48: 43-50.
- Venkateswaran, K., Tanaka, H., Komukai, S., Toki, H., Iwabuchi, T., Miyachi, S. (1993) Ecodynamics of oil-degrading bacteria and significance of marine mixed populations in the degradation of petroleum compounds. Proc. Int. Oil Spill Conf., Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp.427-434.
- 岩瀨徳郎 (1993) 海洋流出油の微生物分解. 水環境学会誌. 16:770-774. (Review)

- Iwabuchi, T., Venkateswaran, K., Harayama, S., Tanaka, H. (1994) Low growth yield of a marine *Pseudomonas* grown on phenanthrene: general phenomenon in bacteria grown on polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Mar. Biotechnol.* 2: 11-14.
- Iwabuchi, T., Maruyama, T., Sei, Y., Adachi, K. (1995) Effects of immunosuppressive peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) inhibitors, cyclosporin A, FK506, ascomycin and rapamycin, on hair growth initiation in mouse: immunosuppression is not required for new hair growth. *J. Dermatol. Sci.* 9:64-69.
- Iida, T., Furutani, M., Iwabuchi, T., Maruyama, T. (1997) Gene for a cyclophilin-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase from a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum*. *Gene* 204:139-144.
- Saito, A., Iwabuchi, T., Harayama, S. (1999) Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere* (in press)

論文審査結果要旨

多環芳香族炭化水素 (PAH) は産業活動等により化石燃料から生じる環境汚染物質であり、環境中に放出された PAH の多くは微生物による生分解または紫外線等による化学分解を受けて除去される。よって微生物の PAH 分解機構を理解することは、環境汚染物質除去技術開発のための基礎的情報を得るために重要である。本研究では 3 環の PAH であるフェナントレン (phenanthrene) の細菌による分解経路、分解に関与する酵素、中間産物の化学構造などを明らかにすることを目的とした。

クウェートの海浜砂から集積培養により phenanthrene 分解菌 KP 7 株を分離し、形態学的、生化学的、化学的分類手法に 16S rDNA の塩基配列分析を加えて *Nocardioides* 属の一菌株であると同定した。本菌株の phenanthrene 分解中間体に 2-formylbenzoic acid と *o*-phthalic acid (OPA) が検出されたこと、phenanthrene により 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase および 2-formylbenzoate dehydrogenase の酵素活性が誘導的に発現することから、本菌は phenanthrene を OPA 経路で分解するものと考えられた。

次に phenanthrene を含む培地で培養した KP 7 株の細胞抽出液から 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase を精製し、45kDa のサブユニットからなる 6 量体を形成すると推定した。本酵素は 1 分子の 1-hydroxy-2-naphthoate に対し 1 分子の酸素を消費し、1 サブユニットあたり 1 分子の Fe (II) の結合が活性に必須であった。精製酵素の N 末配列を基に PCR 法で DNA プローブを作り、KP 7 株のゲノム DNA コスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、本酵素の構造遺伝子を含むクローンを得て、1161bp からなる遺伝子配列を決定し、本遺伝子を *phdI* と名づけた。この遺伝子が大腸菌中で発現させ、組換え体酵素を精製した。この酵素を上記基質と反応させ、反応生成物を分離精製し、¹H-NMR、¹³C-NMR および FAB-MS で解析、その構造を (*E*)-4-(2-carboxylatophenyl)-2-oxo-3-butenoate と決定した。

次に、上記と同様の細胞抽出液から 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより (*E*)-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase を精製し、分子質量と酵素化学的性質を明らかにした。また、本酵素の構造遺伝子がゲノム DNA 上で *phdI* に連続して存在し、塩基配列決定から全長 996bp であることを示し、本遺伝子を *phdJ* と名づけた。また、同様に 2-formylbenzoate dehydrogenase を精製し、分子質量と酵素化学的性質を明らかにしたうえ、遺伝子クローニングを行い、*phdJ* の下流域に存在する 1455bp の *phdK* 遺伝子を明らかにした。そして、約 16.8kb のゲノム DNA 上にこれまでにクローニングした 3 種の遺伝子と、その他の 4 種の遺伝子様配列がどのように分布しているかを明らかにした。

以上のように、本研究において著者は phenanthrene の OPA 経路による分解過程を酵素化学的に明らかにし、さらにそれぞれの酵素の遺伝子構造とゲノム上の相互位置関係を明らかにし、細菌による 3 環 PAH の分解系に新知見を加えたことから、審査員一同著者は博士 (農学) の学位を授与されるに充分の資格を有すると判定した。