

中等度好熱性細菌を利用した微生物脱硫と
高機能脱硫細菌の創製

(研究課題番号 13650859)

平成 13 年度～平成 15 年度科学研究費補助金 基盤研究(C) (2)

研究成果報告書

平成 16 年 5 月

研究代表者 桐村 光太郎

(早稲田大学理工学部 教授)

目次

はしがき

研究組織等	i
-------	---

発表した成果

研究発表	ii
研究成果による工業所有権の出願・取得状況	vi

研究成果

第1章 新規好熱性ジベンゾチオフェン（DBT）脱硫細菌 <i>Bacillus subtilis</i> WU-S2B および <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 による DBT およびその誘導体の脱硫	1
1.1. 緒言	1
1.2. 結果	2
1.2.1. 好熱性 DBT 脱硫細菌 WU-S2B および WU-F1 の単離 および同定	2
1.2.2. <i>B. subtilis</i> WU-S2B および <i>M. phlei</i> WU-F1 の DBT を 硫黄源とした増殖特性	2
1.2.3. <i>B. subtilis</i> WU-S2B および <i>M. phlei</i> WU-F1 による DBT 誘導体の脱硫	3
1.2.4. <i>B. subtilis</i> WU-S2B および <i>M. phlei</i> WU-F1 による DBT 脱硫の温度依存性	3
1.3. 考察	11
1.4. まとめ	12
1.5. 参考文献	13
第2章 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 <i>Mycobacterium</i> <i>phlei</i> WU-F1 による水素化脱硫処理された軽油の脱硫	14
2.1. 緒言	14

2.2. 結果	15
2.2.1. <i>M. phlei</i> WU-F1 の増殖菌体による軽油の脱硫	15
2.2.2. <i>M. phlei</i> WU-F1 の休止菌体による軽油の脱硫	15
2.3. 考察	20
2.4. まとめ	22
2.5. 参考文献	23
第3章 好熱性ジベンゾチオフェン (DBT) 脱硫細菌 <i>Bacillus subtilis</i> WU-S2B および <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子のクローニングおよび機能解析	25
3.1. 緒言	25
3.2. 結果	26
3.2.1. <i>B. subtilis</i> WU-S2B 由来 DBT 脱硫遺伝子のクローニング	26
3.2.2. DBT 脱硫遺伝子 <i>bdsABC</i> の塩基配列解析	26
3.2.3. <i>M. phlei</i> WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子のクローニング	28
3.2.4. <i>bdsABC</i> の大腸菌における発現	28
3.2.5. 組換え大腸菌による DBT 脱硫の温度依存性	28
3.3. 考察	35
3.4. まとめ	37
3.5. 参考文献	38
第4章 インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法による好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 <i>Bacillus subtilis</i> WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングおよび機能解析	40
4.1. 緒言	40
4.2. 結果	43
4.2.1. インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法による <i>B. subtilis</i> WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニング	43
4.2.2. <i>frb</i> の大腸菌における発現	44
4.2.3. <i>frb</i> と <i>bdsABC</i> を共発現させた組換え大腸菌の DBT 脱硫活性	44
4.3. 考察	48
4.4. まとめ	51
4.5. 参考文献	52

第5章 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 由来フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングおよび機能解析	55
5.1. 緒言	55
5.2. 結果	56
5.2.1. <i>M. phlei</i> WU-F1 由来フラビンレダクターゼの N 末端および内部アミノ酸配列の決定	56
5.2.2. <i>M. phlei</i> WU-F1 由来フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニング	56
5.2.3. <i>frm</i> の大腸菌における発現	57
5.2.4. <i>frm</i> と <i>bdsABC</i> を共発現させた組換え大腸菌の DBT 脱硫活性	57
5.3. 考察	63
5.4. まとめ	65
5.5. 参考文献	66
第6章 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 の遺伝子増幅による活性の強化	68
6.1. 緒言	68
6.2. 結果	69
6.2.1. <i>Mycobacterium-Escherichia coli</i> シャトルベクターの構築	69
6.2.2. <i>M. phlei</i> WU-F1 の遺伝子増幅による脱硫活性の強化	69
6.3. 考察	72
6.4. まとめ	73
6.5. 参考文献	74
総括	75

はしがき

本研究書は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究課題番号13650859「中等度好熱性細菌を利用した微生物脱硫と高機能脱硫細菌の創製」によって、平成13～15年度の3年間にわたって実施した研究の成果を取りまとめたものである。

本研究では、現行の石油精製工程を補完する新規な技術の開発を目的として、バイオ脱硫に関する研究を実施した。すなわち、石油（とくに軽油）の脱硫に使用可能な生体触媒を開発するために2種類の好熱性脱硫細菌を単離し、それぞれの脱硫機能を細胞レベルならびに遺伝子レベルで解析するとともに、実際の軽油に対する脱硫試験を行い、性能評価を行った。

ジベンゾチオフェンを難除去性の有機硫黄化合物のモデルとした探索により新規な2種類の好熱性脱硫細菌を取得したこと、硫黄原子特異的な酸化的脱硫（分解）代謝機構とそれに関与する酵素群を明らかにしたこと、脱硫酵素群およびこれらと共役するフラビンレダクターゼをコードする遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し新規性を明らかにしたこと、それぞれの遺伝子の大腸菌における高発現とともに複数遺伝子の協調的発現により脱硫代謝機構の機能発現にも成功し遺伝子資源としての新規性と有用性を明らかにしたこと、などが主要な成果である。

本研究で得られた成果は、バイオ脱硫の分子基盤となる研究成果であり、生物工学をはじめとして応用生物化学の分野において基礎と応用の両面にわたる新規かつ独創的な内容と確信している。ここに、本研究に関する助成をいただいた日本学術振興会科学研究費に慎んで謝意を表するものである。

研究組織

研究代表者	桐村 光太郎	（早稲田大学理工学部 教授）
研究分担者	木野 邦器	（早稲田大学理工学部 教授）
研究分担者	宇佐美 昭次	（早稲田大学理工学部 教授、現・名誉教授）

交付決定額

平成13年度	1, 500 千円
平成14年度	1, 400 千円
平成15年度	700 千円

発表した成果 (2001 年 4 月～2004 年 3 月)

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kohtaro Kirimura, Koji Harada, Hidekazu Iwasawa, Takeomi Tanaka, Toshiki Furuya, Yoshitaka Ishii, and Kuniki Kino.
Identification and functional analysis of the genes encoding dibenzothiophene-desulfurizing enzymes from thermophilic bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol., Accepted for publication.
2. Toshiki Furuya, Syusuke Takahashi, Yoshitaka Ishii, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura.
Cloning of a gene encoding flavin reductase coupling with dibenzothiophene monooxygenase through coexpression screening using indigo production as selective indication, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 313, No. 3, 570-575, January 2004.
3. Toshiki Furuya, Yoshitaka Ishii, Ken-ichi Noda, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura.
Thermophilic biodesulfurization of hydrodesulfurized light gas oils by *Mycobacterium phlei* WU-F1, FEMS Microbiol. Lett., Vol. 221, No. 1, 137-142, April 2003.
4. Kohtaro Kirimura, Toshiki Furuya, Rika Sato, Yoshitaka Ishii, Kuniki Kino, and Shoji Usami.
Biodesulfurization of naphthothiophene and benzothiophene through selective cleavage of carbon-sulfur bonds by *Rhodococcus* sp. strain WU-K2R, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 68, No. 8, 3867-3872, August 2002.
5. Toshiki Furuya, Kohtaro Kirimura, Kuniki Kino, and Shoji Usami.
Thermophilic biodesulfurization of naphthothiophene and 2-ethylnaphthothiophene by a dibenzothiophene-desulfurizing bacterium, *Mycobacterium phlei* WU-F1, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 58, No. 1, 237-240, February 2002.
6. Toshiki Furuya, Kohtaro Kirimura, Kuniki Kino, and Shoji Usami.
Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives by *Mycobacterium phlei* WU-F1, FEMS Microbiol. Lett., Vol. 204, No. 1, 129-133, October 2001.

(2) 口頭発表

1. 岩崎勇一郎、古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎.
遺伝子組換えを利用した好熱性ジベンゾチオフエン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 の脱硫活性の向上、2004 年度日本農芸化学会大会、広島（講演要旨集 p.41）、2004 年 3 月.
2. 古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎.
新規好熱性脱硫細菌の機能解析と軽油の超深度脱硫への応用、日本化学会第 84 春季年会、西宮（講演要旨集 p.1170）、2004 年 3 月.
3. 古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎.
好熱性ジベンゾチオフエン脱硫細菌を利用した軽油の超深度脱硫、第 1 回生体機能関連化学・バイオテクノロジー部会合同シンポジウム、熊本（講演要旨集 p.230-231）、2003 年 10 月.
4. 岩崎勇一郎、古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎.
好熱性ジベンゾチオフエン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 の遺伝子組換えによる脱硫能力の強化、2003 年度日本生物工学会大会、熊本（講演要旨集 p.204）、2003 年 9 月.
5. Toshiki Furuya, Yoshitaka Ishii, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura.
Application of *Mycobacterium phlei* WU-F1 as a biocatalyst to thermophilic biodesulphurization of hydrodesulphurized light gas oils, 11th European congress on biotechnology, Basel, Switzerland (Abstract p.132), August 2003.
6. Yoshitaka Ishii, Toshiki Furuya, Sinya Kozaki, Rika Sato, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura.
Biodesulphurization of naphthothiophene through the sulphur-specific degradation pathway, 11th European congress on biotechnology, Basel, Switzerland (Abstract p.132), August 2003.
7. 古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎.
好熱性ジベンゾチオフエン脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B と *Mycobacterium phlei* WU-F1 からの異なるフラビンレダクターゼをコードする遺伝子のクローニング、2003 年度日本農芸化学会大会、東京（講演要旨集 p.233）、2003 年 4 月.

8. 石井義孝、小崎慎矢、古屋俊樹、木野邦器、桐村光太郎。
好熱性ナフトチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-0103 の単離と軽油の微生物脱硫、2003 年度日本化学会大会、東京（講演要旨集 p.962）、2003 年 3 月。
9. 石井義孝、佐藤里佳、古屋俊樹、木野邦器、桐村光太郎。
Rhodococcus sp. WU-K2R によるナフトチオフェン脱硫経路の解析、2003 年度日本化学会大会、東京（講演要旨集 p.961）、2003 年 3 月。
10. 石井義孝、小崎慎矢、古屋俊樹、木野邦器、桐村光太郎。
好熱性ナフトチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-0103 による軽油の脱硫、2002 年度日本生物工学会大会、大阪（講演要旨集 p.151）、2002 年 10 月。
11. 辻寛子、古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。
好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B からのフラビンレダクターゼをコードする遺伝子のクローニングと発現、2002 年度日本生物工学会大会、大阪（講演要旨集 p.171）、2002 年 10 月。
12. 古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。
好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 からのフラビンレダクターゼをコードする遺伝子のクローニングと発現、2002 年度日本生物工学会大会、大阪（講演要旨集 p.171）、2002 年 10 月。
13. Yoshitaka Ishii, Toshiki Furuya, Koji Harada, Hidekazu Iwasawa, Takako Murakami-Nitta, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura.
Molecular cloning and expression analysis of moderately thermophilic dibenzothiophene-desulfurization genes from *Bacillus subtilis* WU-S2B, 9th International symposium on the genetics of industrial microorganisms, Gyeongju, Korea (Abstract p.154), July 2002.
14. Toshiki Furuya, Yoshitaka Ishii, Koji Harada, Takeomi Tanaka, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura.
Functional analysis of moderately thermophilic dibenzothiophene-desulfurization genes from *Bacillus subtilis* WU-S2B, 9th International symposium on the genetics of industrial microorganisms, Gyeongju, Korea (Abstract p.152), July 2002.

15. 石井義孝、古屋俊樹、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次.
中等度好熱性細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 を利用した軽油の微生物脱硫、2002 年度日本化学会大会、東京（講演要旨集 p.888）、2002 年 3 月
16. 桐村光太郎、古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、宇佐美昭次.
軽油の微生物脱硫を目的とした中等度好熱性脱硫細菌の単離、2002 年度日本化学会大会、東京（講演要旨集 p.888）、2002 年 3 月.
17. 佐藤里佳、古屋俊樹、石井義孝、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次.
Rhodococcus sp. WU-K2R と *Mycobacterium phlei* WU-F1 における異なる分解機構によるナフトチオフェンの脱硫、2002 年度日本農芸化学会大会、仙台（講演要旨集 p.11）、2002 年 3 月.
18. 古屋俊樹、石井義孝、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次.
ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 による軽油の高温脱硫、2002 年度日本農芸化学会大会、仙台（講演要旨集 p.11）、2002 年 3 月.
19. 田中武臣、原田幸治、古屋俊樹、石井義孝、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次.
中等度好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B 由来の脱硫酵素遺伝子 *bdxABC* の解析、2001 年度日本生物工学会大会、甲府（講演要旨集 p.117）、2001 年 9 月.
20. 佐藤里佳、古屋俊樹、石井義孝、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次.
Rhodococcus sp. WU-K2R によるナフトチオフェンの微生物脱硫、2001 年度日本生物工学会大会、甲府（講演要旨集 p.116）、2001 年 9 月.
21. 古屋俊樹、石井義孝、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次.
中等度好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 による軽油の脱硫、2001 年度日本生物工学会大会、甲府（講演要旨集 p.116）、2001 年 9 月.
22. Yoshitaka Ishii, Kohtaro Kirimura, Toshiki Furuya, Koji Harada, Kuniki Kino, and Shoji Usami.
Cloning and expression of the genes encoding dibenzothiophene-desulfurizing enzymes of *Bacillus subtilis* WU-S2B, 5th International symposium on biocatalysis and biotransformation, Darmstadt, Germany (Abstract p.252), September 2001.

23. Toshiki Furuya, Yoshitaka Ishii, Kohtaro Kirimura, Kuniki Kino, and Shoji Usami.

Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene, naphthothiophene and their derivatives by *Mycobacterium phlei* WU-F1, 5th International symposium on biocatalysis and biotransformation, Darmstadt, Germany (Abstract p.251), September 2001.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

1. 桐村光太郎、古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、宇佐美昭次、丸橋健司.

微生物を用いた複素環硫黄化合物の脱硫方法、特許出願番号 P2003-135054A、公開日 2003 年 5 月 13 日

2. 桐村光太郎、和泉好計、大城隆、岩澤秀和、原田幸治、古屋俊樹、石井義孝、木野邦器、宇佐美昭次、丸橋健司.

耐熱性脱硫酵素とそれをコードする遺伝子、特許出願公開番号 P2002-253247A、公開日 2002 年 9 月 10 日

3. 桐村光太郎、古屋俊樹、木野邦器、宇佐美昭次、石井義孝.

微生物を用いた複素環硫黄化合物の分解方法、特許出願公開番号 P2002-259A、公開日 2002 年 1 月 8 日

4. 桐村光太郎、古屋俊樹、木野邦器、宇佐美昭次、石井義孝.

微生物高温脱硫方法、特許出願公開番号 P2001-231546A、公開日 2001 年 8 月 28 日

第1章 新規好熱性ジベンゾチオフエン(DBT)脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 による DBT およびその誘導体の脱硫

1.1. 緒言

ディーゼル車の燃料である軽油中には多くの有機硫黄化合物が含まれており、燃焼により硫黄酸化物を生じることから、酸性雨や大気汚染などの深刻な環境問題を引き起こしている。現在、軽油は高温高压条件下（300-350℃、50-100 atm）において金属触媒を用いた水素化脱硫により処理されているが、ヘテロ環硫黄化合物は完全には除去されずに残存している。種々のジベンゾチオフエン（DBT）誘導体が水素化脱硫後の軽油中に検出されており、DBT は難脱硫性化合物のモデルとして一般的に認識されている。一方、DBT 脱硫細菌を生体触媒として利用するバイオ脱硫は軽油中の有機硫黄化合物を穏和な条件下で除去可能とする有望な技術であり、超深度脱硫の実現に向けて水素化脱硫を補完する技術として注目されている¹⁻⁴⁾。

これまでに多くの常温性 DBT 脱硫細菌が取得されており¹⁾、これらの細菌を炭素-硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫することが明らかにされている⁵⁾。一方、水素化脱硫直後の高温状態にある軽油にバイオ脱硫を適用することを想定すると、好熱性 DBT 脱硫細菌の方が常温性のものより実用的である。バイオ脱硫を高温条件下で行えれば、水素化脱硫直後の軽油を常温にまで冷却する必要がなく、またプロセスへの雑菌汚染を抑制することも可能である^{2,4)}。これまでに、*Paenibacillus* sp. A11-2 が 50℃付近で炭素-硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫したことが報告されている⁶⁾。しかしながら、この細菌以外には好熱性 DBT 脱硫細菌の報告はない。

本章では、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌として *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 を単離し、DBT およびその誘導体に対する脱硫活性を評価した。

1.2. 結果

1.2.1. 好熱性 DBT 脱硫細菌 WU-S2B および WU-F1 の単離および同定

好熱性 DBT 脱硫細菌を取得するために、微生物源として日本各地から約 1000 種の土壌、廃水、石油スラッジなどの試料を採取した。それぞれの試料を適当な濃度で蒸留水に懸濁し、0.2 ml の懸濁液を DBT を唯一の硫黄源とする 5 ml の A-2 (Table 1.1) または AF (Table 1.2) 液体培地に接種し、50°C で 3-5 日間培養した。5 回の継代培養後、培養液を適当な濃度で蒸留水により希釈し、LB 固体培地に塗布した。50°C で 3-5 日間培養した後、プレート上に形成されたコロニーを再び DBT を唯一の硫黄源とする A-2 または AF 液体培地に接種した。A-2 または AF 液体培地での培養と LB 固体培地での単コロニー分離を繰り返すことにより、50°C で DBT を唯一の硫黄源として安定な増殖を示す株を選択し、WU-S2B (A-2 培地由来) および WU-F1 (AF 培地由来) を以降の研究に用いた。

WU-S2B (Fig. 1.1A) は 0.6-0.8 μm \times 2.5-4.0 μm の桿菌で、グラム陽性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、孢子形成能を示した。さらに、ドイツの DSMZ 社に分類学的同定を依頼し、WU-S2B の 16S rDNA の部分配列は *Bacillus subtilis* の標準株と 99.8% の相同性を有することが明らかとなった。これらの結果から、WU-S2B を *B. subtilis* と同定した。

WU-F1 (Fig. 1.1B) は 0.5-1.0 μm \times 1.5-2.0 μm の桿菌で、グラム陽性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、孢子形成能を示さなかった。さらにドイツの DSMZ 社に分類学的同定を依頼し、WU-F1 の脂肪酸パターンは *Mycobacterium* 属細菌に特有のものであり、ミコール酸パターンは *M. phlei* の標準株と類似性を有することが明らかとなった。さらに、WU-F1 の 16S rDNA の部分配列は *M. phlei* の標準株と 100% の相同性を有することが判明した。これらの結果から、WU-F1 を *M. phlei* と同定した。

1.2.2. *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 の DBT を硫黄源とした増殖特性

B. subtilis WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は 50°C で DBT を唯一の硫黄源として増殖し、顕著な代謝産物を生成した。この代謝産物は HPLC 分析により純品の 2-ヒドロキシビフェニル (2-HBP) と同じ保持時間を示し、GC-MS 分析により 2-HBP と同じマススペクトルを示したことから、2-HBP と同定した。*B. subtilis* WU-S2B およ

び *M. phlei* WU-F1 は DBT の代わりに DBT スルホン (DBTO₂) も唯一の硫黄源として増殖し、2-HBP を生成した。したがって、Fig. 1.2 に示すように、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は炭素-硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫することが明らかとなった。そこで、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 の増殖菌体による DBT 脱硫の経時変化について検討した。Fig. 1.3 に示すように、*B. subtilis* WU-S2B は 50℃ で 0.54 mM の DBT を 5 日間で分解し、2-HBP を生成した。*M. phlei* WU-F1 は 0.54 mM の DBT を 3 日間で分解した。一方、これらの細菌は DBT を唯一の炭素源、または唯一の炭素源かつ硫黄源として利用しないことを確認した。また、2-HBP を唯一の炭素源として利用しないことも確認した。

1.2.3. *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 による DBT 誘導体の脱硫

種々の DBT 誘導体が水素化脱硫後の軽油中に検出されているが、入手可能な DBT 誘導体が限られているため、2,8-ジメチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4-ベンゾ DBT (Fig. 1.4) について脱硫試験を行った。*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は 50℃ で 2,8-ジメチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4-ベンゾ DBT を唯一の硫黄源として増殖した。そこで、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 の休止菌体による DBT 誘導体分解の経時変化について検討した。Fig. 1.5 に示すように、*B. subtilis* WU-S2B は 50℃ で 0.81 mM の DBT を 12 時間で分解し、2,8-ジメチル DBT および 4,6-ジメチル DBT も 50% 分解した。さらに、*B. subtilis* WU-S2B は 3,4-ベンゾ DBT に対しても脱硫活性を示した (データ省略)。一方、*M. phlei* WU-F1 は 0.81 mM の DBT を 90 分で分解し、2,8-ジメチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4-ベンゾ DBT も 8 時間で分解した。GC-MS 分析により、2,8-ジメチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4-ベンゾ DBT の脱硫代謝産物はモノヒドロキシビフェニル構造を含む化合物であることを確認した。

1.2.4. *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 による DBT 脱硫の温度依存性

B. subtilis WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 による DBT 脱硫の温度依存性について休止菌体を用いて検討した。Fig. 1.6A に示すように、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は 50℃ の高温域を含む広範な温度条件下で DBT を効率的に脱硫した。また、*M. phlei* WU-F1 は *B. subtilis* WU-S2B よりはるかに高い DBT 脱硫活性を示し

た。*M. phlei* WU-F1 の休止菌体は 20℃から 50℃の広範な温度条件下で高い DBT 分解活性を示し、50℃で最も高い分解率を示した。2-HBP の生成率は 45℃で最も高い値を示した。*M. phlei* WU-F1 による DBT 脱硫の温度依存性を常温性 DBT 脱硫細菌 *Rhodococcus* sp. IGTS8 および好熱性 DBT 脱硫細菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 と比較したところ、Fig. 1.6B に示すように、*M. phlei* WU-F1 は常温性の *Rhodococcus* sp. IGTS8 と好熱性の *Paenibacillus* sp. A11-2 に跨る広範な温度条件下で DBT 脱硫活性を示すことが明らかとなった。とくに、45℃付近で *M. phlei* WU-F1 はこれらの細菌より高い DBT 脱硫活性を示した。

Table 1.1. Composition of A-2 medium^a.

Ingredients	
Glucose	5.0 g
NH ₄ Cl	2.0 g
KH ₂ PO ₄	6.3 g
K ₂ HPO ₄	8.0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g
Metal solution ^b	2.0 ml
Vitamin mixture ^c	1.0 ml
Distilled water	to 1,000 ml

^a The pH was adjusted to 7.0 with 2 M NaOH.

^b Composition of metal solution is shown in Table 1.3.

^c Composition of vitamin mixture is shown in Table 1.4.

Table 1.2. Composition of AF medium^a.

Ingredients	
Glucose	5.0 g
NH ₄ Cl	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	8.0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g
Metal solution ^b	10.0 ml
Vitamin mixture ^c	1.0 ml
Distilled water	to 1,000 ml

^a The pH was adjusted to 7.5 with 2 M NaOH.

^b Composition of metal solution is shown in Table 1.3.

^c Composition of vitamin mixture is shown in Table 1.3.

Table 1.3. Composition of metal solution.

Ingredients	
NaCl	1.0 g
CaCl ₂	2.0 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5 g
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.5 g
CuCl ₂	0.05 g
ZnCl ₂	0.5 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1 g
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.05 g
10 M HCl	10 ml
Distilled water	to 1,000 ml

Table 1.4. Composition of vitamin mixture.

Ingredients	
NaCl	1.0 g
Calcium pantothenate	400 mg
Inositol	200 mg
Niacin	400 mg
Pyridoxine hydrochloride	400 mg
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	200 mg
Cyanocobalamin	0.5 mg
Distilled water	to 1,000 ml

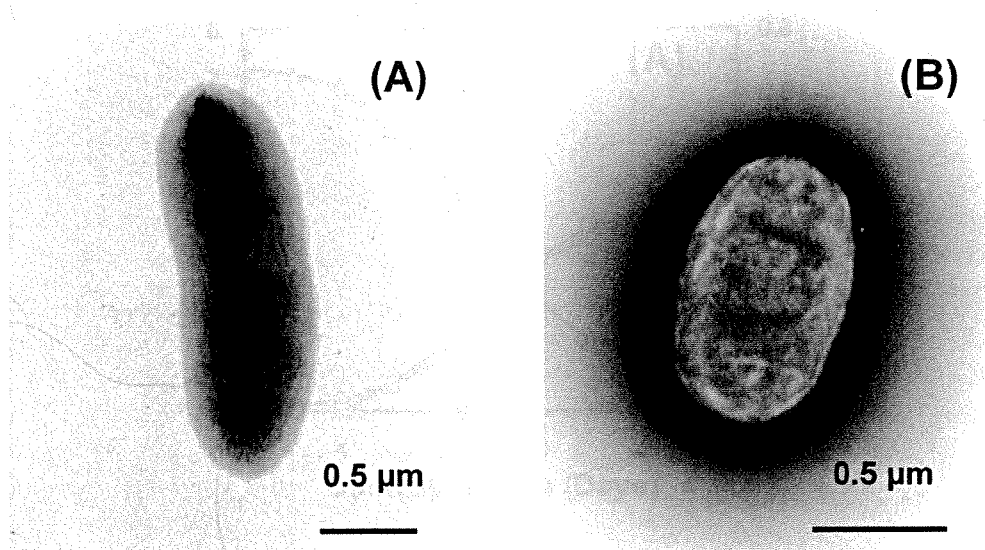


Fig. 1.1. Electron micrographs of a *B. subtilis* WU-S2B cell (A) and a *M. phlei* WU-F1 cell (B). Scale bar, 0.5 μm.

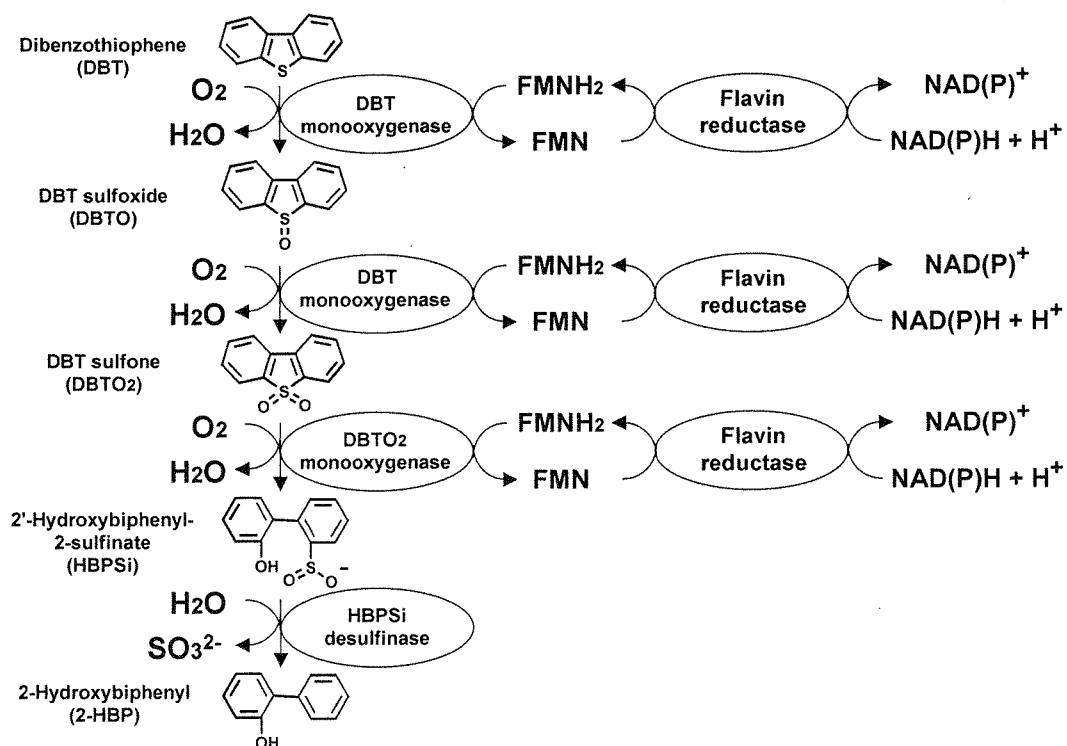


Fig 1.2. The DBT degradation pathway with the selective cleavage of carbon-sulfur bonds in *B. subtilis* WU-S2B and *M. phlei* WU-F1.

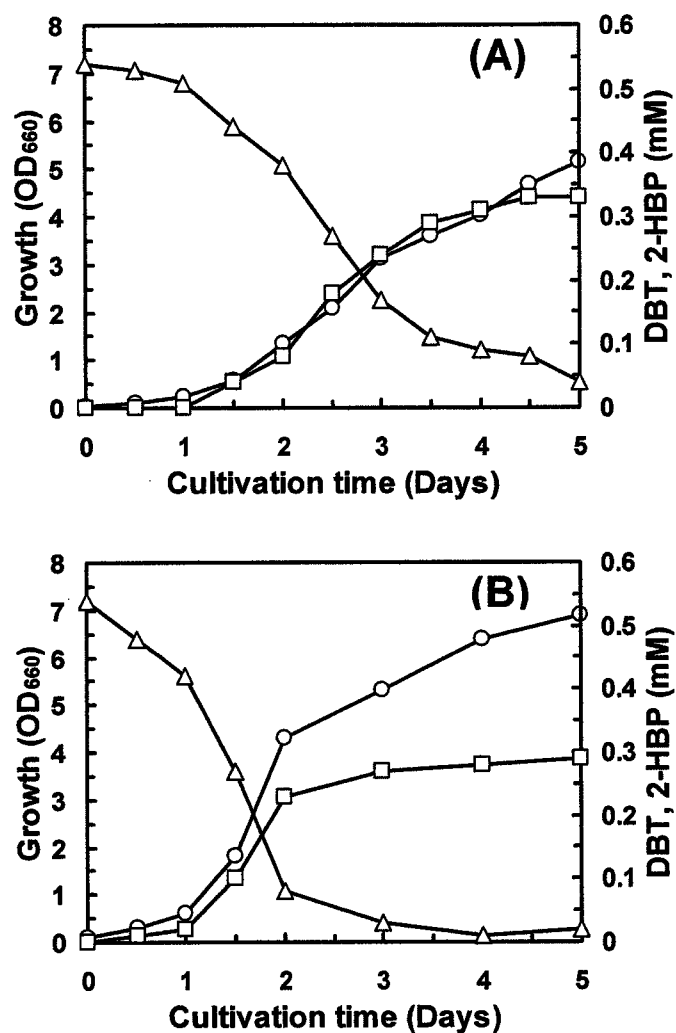


Fig. 1.3. Time courses of DBT desulfurization at 50°C by growing cells of *B. subtilis* WU-S2B (A) and *M. phlei* WU-F1 (B). WU-S2B and WU-F1 were cultivated in A-2 and AF media, respectively, with 0.54 mM DBT as the sole source of sulfur. Symbols: ○, growth; △, DBT; □, 2-HBP.

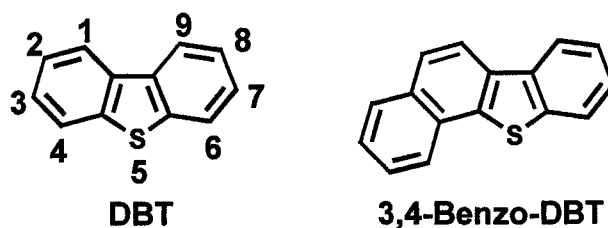


Fig. 1.4. Molecular structures of DBT with ring numbering and 3,4-benzo-DBT.

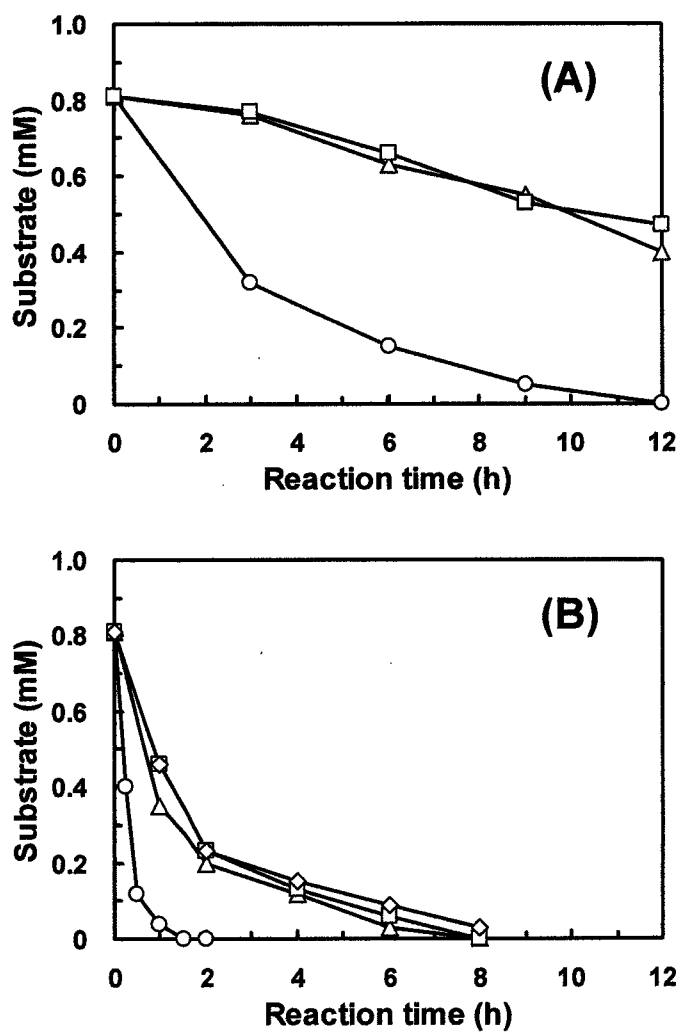


Fig. 1.5. Time courses of degradation of DBT derivatives at 50°C by resting cells of *B. subtilis* WU-S2B (A) and *M. phlei* WU-F1 (B). The reaction mixture contained 0.6 ml of the cell suspension, 0.81 mM DBT or one of its derivatives, and *n*-tridecane. Symbols: ○, DBT; △, 2,8-dimethyl-DBT; □, 4,6-dimethyl-DBT; ◇, 3,4-benzo-DBT.

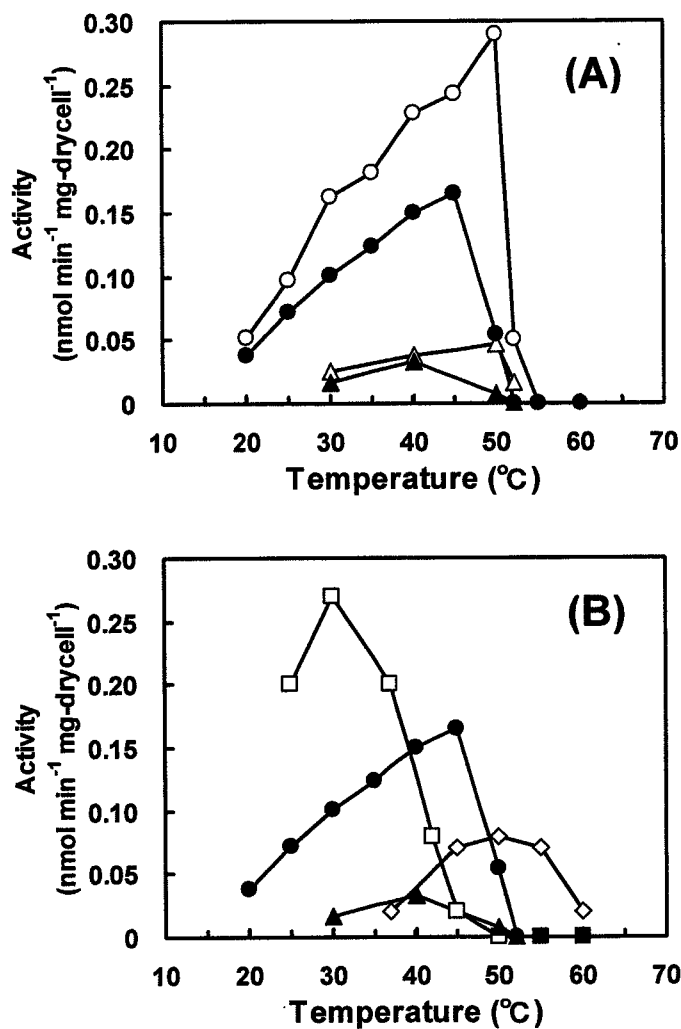


Fig. 1.6. Effects of temperature on DBT-desulfurizing activities of *B. subtilis* WU-S2B and *M. phlei* WU-F1 (A) and comparison of them with those of other bacteria (B). In panel A, the reaction mixture was the same as outlined in the legend to Fig. 3.4. The resting cell reaction was performed at various temperatures over 6 h for WU-S2B and 1 h for WU-F1. DBT-degrading activities (\triangle for WU-S2B and \circ for WU-F1) and 2-HBP-producing activities (\blacktriangle for WU-S2B and \bullet for WU-F1) are shown. In panel B, 2-HBP-producing activities of *Rhodococcus* sp. IGTS8 (\square) and *Paenibacillus* sp. A11-2 (\diamond) were taken from [6].

1.3. 考察

本章では、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌として *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 を単離し、DBT およびその誘導体に対する脱硫活性を評価した。好熱性 DBT 脱硫細菌については *Paenibacillus* sp. A11-2 のみが報告されていたが⁶⁾、本研究において新たに 2 株の当該細菌を取得できたことは意義深い。*Bacillus* 属細菌と *Mycobacterium* 属細菌はともにグラム陽性であるが、これらの属は系統学的に完全に異なる。報告されている常温性 DBT 脱硫細菌のほとんどは *Rhodococcus* 属細菌などのコリネ型細菌であり¹⁾、唯一報告されている好熱性 DBT 脱硫細菌は *Paenibacillus* 属細菌である⁶⁾。*M. phlei* WU-F1 は高温条件下で DBT 脱硫活性を示すコリネ型細菌として最初の報告例である。

B. subtilis WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は炭素－硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫した (Fig. 1.2)。この経路ではエネルギー含量を低下させずに硫黄原子のみを選択的に除去することが可能であり、またアルキル置換基の影響を受けにくいことから、軽油の脱硫に理想的と考えられる。実際に、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は DBT のみならずアルキル置換基を有する 2,8-ジメチル DBT および 4,6-ジメチル DBT も効率的に脱硫した (Fig. 1.5)。

B. subtilis WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 は 50℃ の高温域を含む広範な温度条件下 (20-50℃) で DBT を効率的に脱硫した (Fig. 1.6)。とくに、*M. phlei* WU-F1 は他の DBT 脱硫細菌より高い DBT 脱硫活性を示した。*Mycobacterium* 属細菌の細胞表面はミコール酸に富んでおり疎水性が高いため、*M. phlei* WU-F1 は DBT およびその誘導体などの疎水性化合物を効率的に取り込む可能性がある⁷⁾。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 はバイオ脱硫に対する有望な生体触媒であることが示唆された。*M. phlei* WU-F1 の軽油脱硫への適用可能性については第 2 章で検討する。

1.4. まとめ

本章では、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌として *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 を単離し、DBT およびその誘導体に対する脱硫活性を評価した。水素化脱硫直後の高温状態にある軽油にバイオ脱硫を適用することを想定すると、好熱性 DBT 脱硫細菌の方が常温性のものより実用的である。そこで、50℃の高温条件下で DBT を唯一の硫黄源として増殖可能な微生物を探索し、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌として *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 を単離した。*M. phlei* WU-F1 は高温条件下で DBT 脱硫活性を示すコリネ型細菌として最初の報告例である。これらの細菌は炭素－硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫することを明らかにした。また、DBT 誘導体に対する脱硫活性について検討し、両株とも 50℃で DBT のみならずアルキル置換基を有する 2,8-ジメチル DBT および 4,6-ジメチル DBT も効率的に脱硫可能なことを明らかにした。さらに、DBT 脱硫の温度依存性について検討し、これらの細菌は 50℃の高温域を含む広範な温度条件下 (20-50℃) で DBT を効率的に脱硫可能なことを明らかにした。とくに、*M. phlei* WU-F1 は他の DBT 脱硫細菌より高い DBT 脱硫活性を示した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 はバイオ脱硫に対する有望な生体触媒であることが示唆された。

1.5. 参考文献

1. Ohshiro, T., and Izumi, Y.: Desulfurization of fossil fuels, in: G. Bitton (Eds.), Encyclopedia of environmental microbiology, vol. II, Wiley and Sons, New York, pp. 1041-1051 (2002).
2. McFarland, B. L.: Biodesulfurization. Curr. Opin. Microbiol., 2, 257-264 (1999).
3. Monticello, D. J.: Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. Curr. Opin. Biotechnol., 11, 540-546 (2000).
4. Gray, K. A., Mrachko, G. T., and Squires, C. H.: Biodesulfurization of fossil fuels. Curr. Opin. Microbiol., 6, 229-235 (2003).
5. Oldfield, C., Pogrebinsky, O., Simmonds, J., Olson, E. S., and Kulpa, C. F.: Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. IGTS8 (ATCC53968). Microbiology, 143, 2961-2973 (1997).
6. Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, T., Okumura, K., and Suzuki, M.: Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3164-3169 (1997).
7. Bendinger, B., Rijnaarts, H. H. M., Altendorf, K., and Zehnder, A. J. B.: Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acid. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3973-3977 (1993).

第2章 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 による 水素化脱硫処理された軽油の脱硫

2.1. 緒言

第1章にも述べたように、ディーゼル車の燃料である軽油中には多くの有機硫黄化合物が含まれており、燃焼により硫黄酸化物を生じることから、酸性雨や大気汚染などの深刻な環境問題を引き起こしている。そこで、軽油中の硫黄濃度規制は政策によりますます厳しくなっており、ヨーロッパでは2005年までに50 ppmに、アメリカでは2006年までに15 ppmに硫黄濃度を低減することが計画されている。同様に、日本では2004年末までに現行の500 ppmから50 ppmに硫黄濃度を低減するように規制が強化される。現在、軽油は高温高压条件下（300-350℃、50-100 atm）で金属触媒を用いた水素化脱硫により処理されているが、ジベンゾチオフェン（DBT）誘導体などのヘテロ環硫黄化合物は完全には除去されずに残存している。今後の硫黄濃度規制の強化に対応して水素化脱硫によりこれらの化合物を除去するためには、一段と過酷な反応条件を必要とすることから高い処理コストを伴い、エネルギー消費量および二酸化炭素排出量も増加することが予想される。一方、DBT 脱硫細菌を生体触媒として利用するバイオ脱硫は軽油中の有機硫黄化合物を穏和な条件下で除去可能とする有望な技術であり、超深度脱硫の実現に向けて水素化脱硫を補完する技術として注目されている¹⁾。

これまでに、DBTなどのモデル化合物のバイオ脱硫については多く報告されているが、実際に軽油などの化石燃料の脱硫に応用した例については以下の数種の細菌などにおいて報告されているのみである。油種および初発の硫黄濃度は様々であるが、常温性の *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1²⁾、*Rhodococcus* sp. ECRD-1³⁻⁵⁾、*Gordonia nitida* CYKS1^{6,7)}は25-30℃で軽油を30-90%脱硫したことが報告されている。好熱性 DBT 脱硫細菌については、*Paenibacillus* sp. A11-2の増殖菌体が50℃で軽油を800 ppmから720 ppmに脱硫したことが報告されているが⁸⁾、硫黄濃度の減少はわずか10%であり実用的なレベルに達しているとは言い難い。

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し、油水二相系で水素化脱硫処理された軽油に対する脱硫活性を評価した。

2.2. 結果

2.2.1. *M. phlei* WU-F1 の増殖菌体による軽油の脱硫

M. phlei WU-F1 による軽油脱硫の温度依存性について増殖菌体を用いて検討した。*M. phlei* WU-F1 は水素化脱硫処理された軽油 F-LGO (120 ppm) を唯一の硫黄源として増殖した。Fig. 2.1 に示すように、増殖菌体は 30℃から 50℃の広範な温度条件下で高い軽油脱硫活性を示し、F-LGO の硫黄濃度は 7 日間で 120 ppm から 45 ppm 前後にまで減少した。菌体を接種せずに同様の操作を行った試料については硫黄濃度が変化していないことを確認した。さらに、Table 2.1 に示すように、増殖菌体は 45℃で B-LGO を 390 ppm から 100 ppm に、X-LGO を 34 ppm から 13 ppm にまで脱硫した。このように、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により油種および初発の硫黄濃度にかかわらず軽油中の硫黄濃度が 60-70%減少することが明らかとなった。また、*M. phlei* WU-F1 はこれらのバイオ脱硫後の軽油を唯一の硫黄源として増殖しなかったため（データ省略）、増殖菌体によりそれぞれの軽油から硫黄化合物を限界まで除去するには 1 回の培養で十分なことを確認した。

2.2.2. *M. phlei* WU-F1 の休止菌体による軽油の脱硫

M. phlei WU-F1 の増殖菌体は高温条件下で水素化脱硫処理された軽油を効率的に脱硫可能なことを確認したことから、つぎに、休止菌体を用いて検討した。Fig. 2.2 に示すように、*M. phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し油水二相系 (oil/water = 1/1 (v/v)) でバイオ脱硫を行った場合、F-LGO を 24 時間で 120 ppm から 86 ppm にまで脱硫した。24 時間以降は硫黄濃度が減少しなかったため、24 時間おきに菌体を新しいものに交換して休止菌体反応を繰り返すことにより脱硫率の向上を試みた。Fig. 2.2 に示すように、*M. phlei* WU-F1 は休止菌体反応を 10 回繰り返すことにより F-LGO を 120 ppm から 50 ppm にまで脱硫した。菌体をオートクレーブ処理してから同様の操作を行った試料については硫黄濃度が変化しなかったため（データ省略）、硫黄濃度の減少が硫黄化合物の菌体への吸着などによる非生物的手段に起因するものではないことを確認した。さらに、GC-AED 分析により、4-メチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4,6-トリメチル DBT などのアルキル DBT 類に相当するピークがバイオ脱硫後著しく減少していることを確認した (Fig. 2.3C,D)。また、*M. phlei* WU-F1 は B-LGO を 1 回の休止菌体反応で 390 ppm から 292 ppm に、6 回で 100 ppm

にまで脱硫した (Fig. 2.3A,B)。同様に、X-LGO を 1 回の休止菌体反応で 34 ppm から 23 ppm に、6 回で 15 ppm にまで脱硫した (Fig. 2.3E,F)。一方、GC-AED 分析により、軽油中の炭素成分はバイオ脱硫前後でほとんど変化しなかったため (データ省略)、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫ではエネルギー含量を低下させずに軽油を脱硫可能なことを確認した。

Table 1.1. Desulfurization of hydrodesulfurized LGOs at 45°C by growing cells of *M. phlei* WU-F1^a.

Oil	Growth (OD ₆₆₀)	Initial sulfur (ppm)	Final sulfur (ppm)	Desulfurization (%)
B-LGO	2.6	390	100	74
F-LGO	2.4	120	42	65
X-LGO	0.7	34	13	62

^a WU-F1 was cultivated at 45°C in AF medium with 2% (v/v) of each LGO as the sole source of sulfur for 7 days.

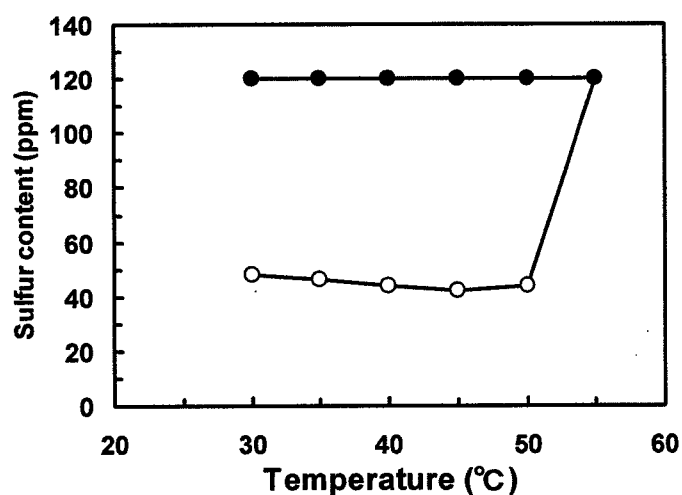


Fig. 1.1. Effects of temperature on LGO-desulfurizing activity of *M. phlei* WU-F1. WU-F1 was cultivated in AF medium with 2% (v/v) of F-LGO (120 ppm S) as the sole source of sulfur at various temperatures for 7 days. Symbols: ○, sulfur content after biodesulfurization; ●, sulfur content for uninoculated samples after treatment under the same conditions as inoculated ones.

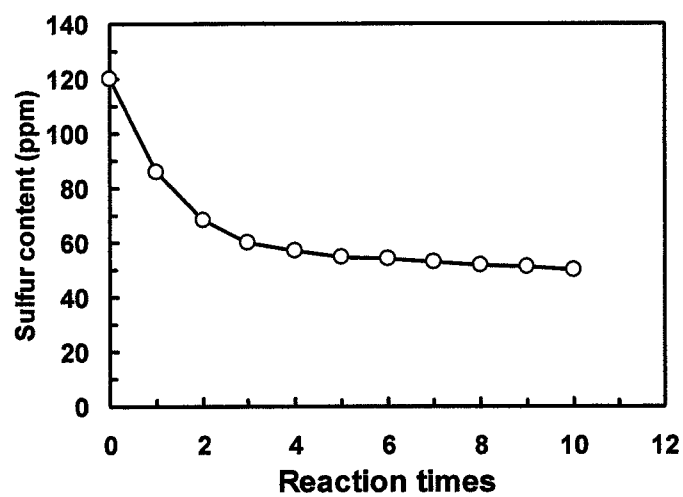


Fig. 1.2. Desulfurization of hydrodesulfurized LGO at 45°C by resting cells of *M. phlei* WU-F1. The reaction mixture contained 5 ml of the cell suspension ($OD_{660} = 50$) and 5 ml of F-LGO (120 ppm S). Resting cell reaction was performed for 24 h and repeated by changing the used cells for fresh ones every 24 h.

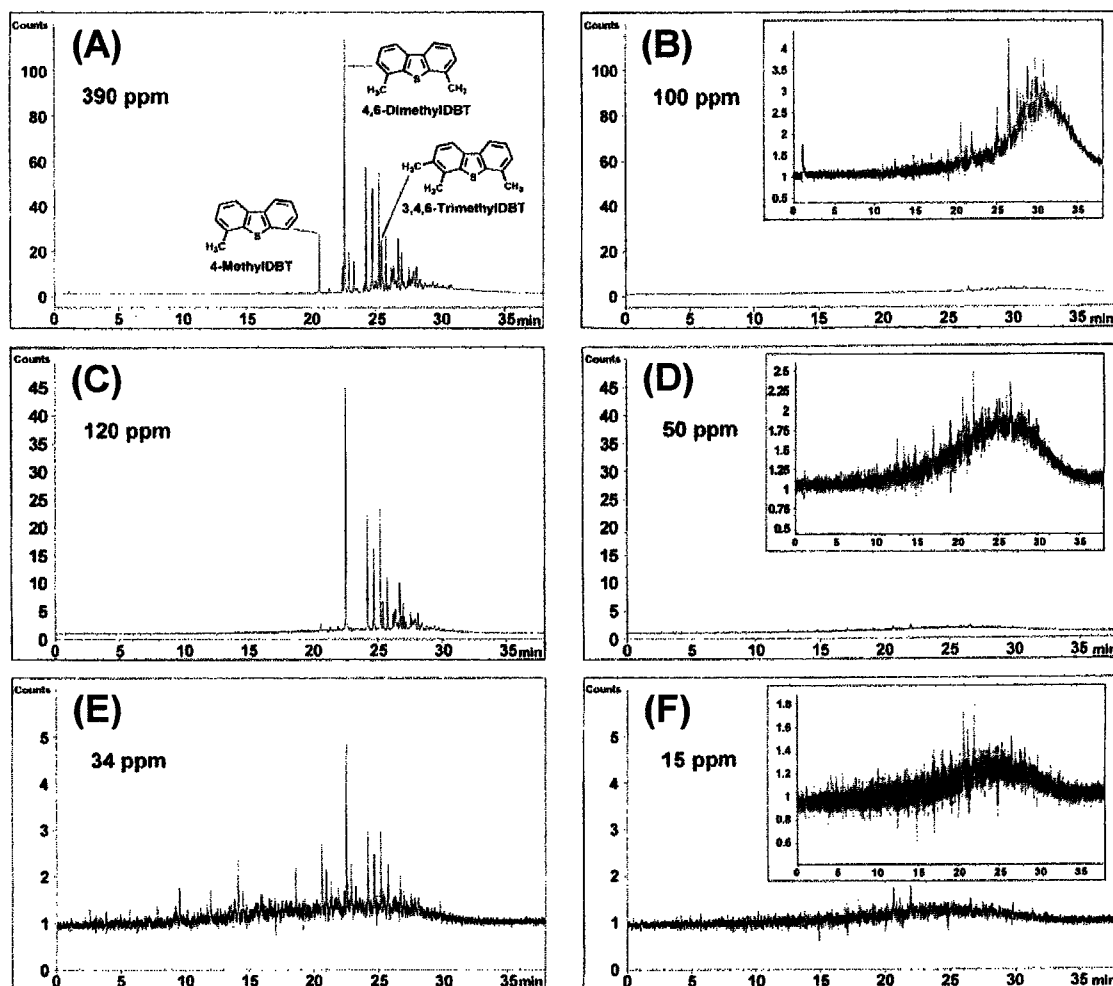


Fig. 1.3. GC-AED chromatograms of sulfur components in hydrodesulfurized LGOs before and after biodesulfurization at 45°C by resting cells of *M. phlei* WU-F1. B-LGO (A), F-LGO (C), and X-LGO (E) were desulfurized by the resting cells, and GC-AED chromatograms after biodesulfurization are shown in B, D, and F, respectively. The sulfur content in each LGO is also shown in each panel. Inset; magnified GC-AED chromatograms after biodesulfurization.

2.3. 考察

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し、油水二相系で水素化脱硫処理された軽油に対する脱硫活性を評価した。*M. phlei* WU-F1 の増殖菌体は 50℃ の高温域を含む広範な温度条件下 (30-50℃) で水素化脱硫処理された軽油を効率的に脱硫した (Fig. 2.1)。第 1 章にも述べたように、*Mycobacterium* 属細菌の細胞表層はミコール酸に富んでおり疎水性が高いため、*M. phlei* WU-F1 が DBT およびその誘導体などの疎水性化合物を効率的に取り込む可能性がある⁹⁾。実際に、*M. phlei* WU-F1 は 4,6-ジエチル DBT、4,6-ジプロピル DBT、さらには 4,6-ジブチル DBT などのアルキル DBT 類を分解可能なため (データ省略)、これらのアルキル DBT 類を菌体内に取り込むことが推定された。常温性 DBT 脱硫細菌 *Mycobacterium* sp. G3 もこれらのアルキル DBT 類を分解し、さらに軽油を 116 ppm から 48 ppm に脱硫したことが報告されている¹⁰⁾。以上の結果より、*Mycobacterium* 属細菌は軽油のバイオ脱硫に対する有望な微生物種であることが示唆された。

M. phlei WU-F1 は水素化脱硫処理された軽油を唯一の硫黄源として増殖し、増殖菌体は 30℃ から 50℃ の広範な温度条件下で高い軽油脱硫活性を示した (Fig. 2.1)。このことは、水素化脱硫直後の高温状態にある軽油を処理する上で、プロセスの温度制御を簡略化できるため有利である。

油種および初発の硫黄濃度が異なる 3 種の水素化脱硫処理された軽油 (B-LGO、F-LGO、X-LGO) は GC-AED クロマトグラムにおいて類似する硫黄化合物成分のスペクトルを示し、水素化脱硫の程度に関わらず 4,6-ジメチル DBT などのアルキル DBT 類を含んでいる (Fig. 2.3A,C,E)。これは、硫黄原子が金属触媒の活性点と接触する際に DBT の 4 位と 6 位のアルキル置換基が立体障害となるためである¹⁾。一方、これらの軽油のバイオ脱硫後、4-メチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4,6-トリメチル DBT などのアルキル DBT 類に相当するピークが著しく減少した (Fig. 2.3B,D,F)。このことは、*M. phlei* WU-F1 は軽油の油種および初発硫黄濃度にかかわらず、アルキル DBT 類を選択的に脱硫可能なことを示している。

M. phlei WU-F1 を用いたバイオ脱硫により油種および初発の硫黄濃度にかかわらず軽油中の硫黄濃度が 60-70% 減少した。しかしながら、GC-AED クロマトグラムにおいて保持時間 25-35 分に検出されるピークに相当する分子種はバイオ脱硫後も残存しており (Fig. 2.3B,D,F inset)、これらの分子種はより構造の複雑なヘテロ環硫

黄化合物であることが推定された。*M. phlei* WU-F1 の増殖菌体および休止菌体はともにこれらの化合物を除去できなかったため、この細菌の脱硫酵素がこれらの化合物を基質として認識できない、または菌体がこれらの化合物を取り込まないなどの可能性が示唆された。

M. phlei WU-F1 を生体触媒として利用し油水二相系 (oil/water=1/1(v/v)) でバイオ脱硫を行った場合、45℃で F-LGO を 120 ppm から 50 ppm に、B-LGO を 390 ppm から 100 ppm に、X-LGO を 34 ppm から 15 ppm にまで脱硫した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により金属触媒を用いた水素化脱硫だけでは到達困難な濃度領域にまで軽油を脱硫可能なことを明らかにした。とくに、日本や欧米では 2006 年前後に軽油中の硫黄濃度規制が 15 ppm 以下にまで強化されることが予想されているため、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により 15 ppm 以下を達成できたことは実用的にも意義深い。

2.4. まとめ

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し、油水二相系で水素化脱硫処理された軽油に対する脱硫活性を評価した。*M. phlei* WU-F1 の増殖菌体は 50℃の高温域を含む広範な温度条件下 (30-50℃) で水素化脱硫処理された軽油を効率的に脱硫可能なことを明らかにした。さらに、*M. phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し油水二相系 (oil/water=1/1(v/v)) でバイオ脱硫を行った場合、45℃で F-LGO を 120 ppm から 50 ppm に、B-LGO を 390 ppm から 100 ppm に、X-LGO を 34 ppm から 15 ppm にまで脱硫可能なことを明らかにした。GC-AED 分析により、4-メチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4,6-トリメチル DBT などのアルキル DBT 類に相当するピークがバイオ脱硫後著しく減少していることを確認した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により金属触媒を用いた水素化脱硫だけでは到達困難な濃度領域にまで軽油を脱硫可能なことを明らかにした。とくに、日本や欧米では 2006 年前後に軽油中の硫黄濃度規制が 15 ppm 以下にまで強化されることが予想されているため、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により 15 ppm 以下を達成できたことは実用的にも意義深い。

2.5. 参考文献

1. Ohshiro, T., and Izumi, Y.: Desulfurization of fossil fuels, in: G. Bitton (Eds.), Encyclopedia of environmental microbiology, vol. II, Wiley and Sons, New York, pp. 1041-1051 (2002).
2. Ishii, Y., Kobayashi, M., Konishi, J., Onaka, T., Okumura, K., and Suzuki, M.: Desulfurization of petroleum by the use of biotechnology. Nippon Kagaku Kaishi, 1998, 373-381 (1998). (in Japanese.)
3. Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garrett, K. K., George, G. N., and Pickering, I. J.: Microbial desulfurization of crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. Appl. Environ. Microbiol., 65, 181-188 (1999).
4. Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Minak-Bernero, V., George, G. N., and Pickering, I. J.: Deep desulfurization of extensively hydrosulfurized middle distillate oil by *Rhodococcus* sp. strain ECRD-1. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1949-1952 (2001).
5. Prince, R. C., and Grossman, M. J.: Substrate preferences in biodesulfurization of diesel range fuels by *Rhodococcus* sp. strain ECRD-1. Appl. Environ. Microbiol., 69, 5833-5838 (2003).
6. Rhee, S.-K., Chang, J. H., Chang, Y. K., and Chang, H. N.: Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordona* strain, CYKS1. Appl. Environ. Microbiol., 64, 2327-2331 (1998).
7. Chang, J. H., Kim, Y. J., Lee, B. H., Cho, K.-S., Ryu, H. W., Chang, Y. K., and Chang, H. N.: Production of a desulfurization biocatalyst by two-stage fermentation and its application for the treatment of model and diesel oils. Biotechnol. Prog., 17, 876-880 (2001).
8. Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, T., Okumura, K., and Suzuki, M.: Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3164-3169 (1997).
9. Bendinger, B., Rijnaarts, H. H. M., Altendorf, K., and Zehnder, A. J. B.: Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to

- the presence and chain length of mycolic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3973-3977 (1993).
10. Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., and Maruhashi, K.: Analysis of substrate specificity of the desulfurizing bacterium *Mycobacterium* sp. G3. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 228-233 (2002).

第3章 好熱性ジベンゾチオフェン (DBT) 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子のクローニング および機能解析

3.1. 緒言

バイオ脱硫は金属触媒を用いた水素化脱硫と比較して、より穏和な条件下でジベンゾチオフェン (DBT) およびその誘導体などの難脱硫性化合物を選択的に除去可能とする有望な技術である¹⁾。これまでに多くの常温性ジベンゾチオフェン (DBT) 脱硫細菌が取得されており¹⁾、とくに、*Rhodococcus* sp. IGTS8 からは DBT 脱硫遺伝子 (*dszABC*) がクローニングされている²⁾。*dszABC* 遺伝子は 3 つの遺伝子 *dszA*、*dszB*、*dszC* からなる 1 つのオペロンを形成しており、DBT 分子中の炭素-硫黄結合を選択的に切断する酵素群をコードしていることが報告されている。さらに、好熱性 DBT 脱硫細菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 からも DBT 脱硫遺伝子 (*idsABC*) がクローニングされている³⁾。

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 からプラークハイブリダイゼーション法により DBT 脱硫遺伝子をクローニングし、脱硫機能を遺伝子レベルで解析した。

3.2. 結果

3.2.1. *B. subtilis* WU-S2B 由来 DBT 脱硫遺伝子のクローニング

DBT 脱硫遺伝子 *dszABC* および *tdsABC* は既に常温性の *Rhodococcus* sp. IGTS8²⁾ および好熱性の *Paenibacillus* sp. A11-2³⁾ からそれぞれクローニングされている。そこで、*dszABC* と *tdsABC* の推定アミノ酸配列の保存領域を検索し、2 つの領域 AEARNFG (*dszA* の開始コドンから 429-447 番目の塩基に相当するアミノ酸配列) と GFDRFWR (*dszC* の終止コドンから 99-116 番目の塩基に相当するアミノ酸配列) を見出した。これらのアミノ酸配列に基づいて、2 つの縮重プライマー 5'-GCI GAR GCI MGI AAY TTY GG-3' と 5'-CGT IGC GCC AIA AGC GGT C-3' (I, イノシン) を設計し、*B. subtilis* WU-S2B の全 DNA を鋳型として PCR を行った。得られた 3.2 kb の PCR 産物を pGEM-T ベクターに連結し塩基配列を解析したところ、この PCR 産物の推定アミノ酸配列は *dszABC* および *tdsABC* と約 60% の相同性を示した。つぎに、増幅された領域の塩基配列に基づいて、2 つのオリゴヌクレオチドプライマー 5'-GCA TGA CAT CCG ATA CG-3' と 5'-TAG TTT GGG TGG GTT CC-3' を設計し、WU-S2B の全 DNA を鋳型として再度 PCR を行った。得られた PCR 産物をジオキシゲニンにより標識し、DNA プローブとして用いた。

B. subtilis WU-S2B の DNA ライブラリーは、全 DNA を *Sau3AI* で消化後、*Bam*HI で消化した lambda DASH II phage ベクターに連結してパッケージングし、大腸菌 XL1-Blue MRA (P2) に感染させることにより作製した。DNA プローブを用いて、約 8,000 プラークから成る *B. subtilis* WU-S2B の DNA ライブラリーに対してプラークハイブリダイゼーションを行った。その結果、3 つのポジティブクローンが得られ、*B. subtilis* WU-S2B 由来 DBT 脱硫遺伝子を保持する候補株として選択した。Fig. 3.1 に示すように、制限酵素消化分析およびサザンハイブリダイゼーション分析により 3 つのポジティブクローンは同じ領域の遺伝子を含んでいることが明らかとなり、ポジティブクローン no.1 の 7.1 kb の *Nhe*I 断片が DBT 脱硫遺伝子の全領域を含んでいることを確認した。そこで、7.1 kb の *Nhe*I 断片を *Xba*I で消化した pUC18 ベクターにサブクローニングし、pU1Nh を構築した。

3.2.2. DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* の塩基配列解析

pU1Nh においてハイブリダイズした領域とその付近の塩基配列を決定し、順方向

に並んでいる3つのオープンリーディングフレーム (ORF) を同定した。Fig. 3.2 に示すように、ORF の塩基配列は *Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 *dszABC* オペロン²⁾ および *Paenibacillus* sp. A11-2 由来 *tdsABC* オペロン³⁾ と高い相同性を示した。そこで、IGTS8 の *dszA*、*dszB*、*dszC* と相同性を示すそれぞれの ORF を *bdsA*、*bdsB*、*bdsC* と命名した。*bdsABC* 全体の塩基配列は *Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 *dszABC* と 61.0%、*Paenibacillus* sp. A11-2 由来 *tdsABC* と 57.8% の相同性を示した。*dszABC* および *tdsABC* オペロンにおいて報告されているように^{2,3)}、*bdsABC* オペロンにおいても *bdsA* の 3' 末端は *bdsB* の 5' 末端と 4 bp 重なっていた。さらに、*bdsB* は *bdsC* と 4 bp 重なっていたが、この重なりは *dszABC* および *tdsABC* オペロンには存在しない。

1 番目の ORF、*bdsA* は 453 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており (Fig. 3.2A)、*bdsA* の推定アミノ酸配列は DBT スルホン (DBTO₂) モノオキシゲナーゼである *Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 DszA と 78.8%、*Paenibacillus* sp. A11-2 由来 TdsA と 64.4% の相同性を示した。さらに、BdsA は数種のフラビン依存性モノオキシゲナーゼと相同性を示した。BdsA は例えば、*Streptomyces pristinaespiralis* のプリスチナマイシン II_A シンターゼ SnaA⁴⁾ と 41.5%、*Chelatobacter heintzii* のニトリロ 3 酢酸モノオキシゲナーゼ NtaA⁵⁾ と 41.2%、EDTA 分解細菌 BNC1 の EDTA モノオキシゲナーゼ EmoA⁶⁾ と 32.2% の相同性を示した。Fig. 3.2A に示すように、BdsA は N 末端約 250 アミノ酸残基および C 末端約 50 アミノ酸残基の領域において DszA および TdsA と高い相同性を示した。BdsA はフラビン依存性モノオキシゲナーゼとも保存領域を共有したが、N 末端約 100 アミノ酸残基の領域においてはほとんど相同性を示さなかった (データ省略)。さらに、Fig. 3.3A に示すように、系統学的解析により DBTO₂ モノオキシゲナーゼはフラビン依存性モノオキシゲナーゼの中で 1 つのクラスターを形成することが明らかとなった。しかしながら、Fig. 3.3B に示すように、*bdsA* は *dszA* クラスター⁷⁾ や *tdsA* とは離れて独立に位置していることを確認した。

2 番目の ORF、*bdsB* は 356 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており (Fig. 3.2B)、*bdsB* の推定アミノ酸配列は 2'-ヒドロキシビフェニル-2-スルフィン酸塩 (HBPSi) デスルフィナーゼである *Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 DszB と 68.1%、*Paenibacillus* sp. A11-2 由来 TdsB と 53.1% の相同性を示した。さらに、BdsB はスルホン酸塩や硫酸エステルの利用に必要とされる SsuA、AsfC、AtsR などの基質結合タンパク質⁸⁾ と約 30% の相同性を示した。

3番目のORF、*bdsC*は415アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており (Fig. 3.2C)、*bdsC* の推定アミノ酸配列は DBT モノオキシゲナーゼである *Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 DszC と 72.9%、*Paenibacillus* sp. A11-2 由来 TdsC と 51.2%の相同性を示した。さらに、BdsC は数種のアシル CoA デヒドロゲナーゼと低い相同性を示した (データ省略)。

3.2.3. *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子のクローニング

B. subtilis WU-S2B と同様の手法により *M. phlei* WU-F1 から DBT 脱硫遺伝子をクローニングした。約 4,000 プラークから成る *M. phlei* WU-F1 の DNA ライブラリーから 2 つのポジティブプラークが得られ、ともに DBT 脱硫遺伝子の全領域を含んでいることを確認した。さらに、塩基配列を決定し、*M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子の塩基配列は *B. subtilis* WU-S2B 由来のものと完全に一致することを明らかにした。そこで、*M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子も *bdsABC* と命名した。

3.2.4. *bdsABC* の大腸菌における発現

bdsABC を pKK223-3 ベクターに連結した pKBDS を大腸菌 JM109 に導入し、DBT 脱硫活性を検討した。pKBDS を保持する組換え大腸菌は DBT を 2-ヒドロキシビフェニル (2-HBP) に脱硫し、*bdsABC* が大腸菌内で発現していることを確認した。さらに、Fig. 3.1 に示すように、*bdsA* のみを含む pKBDSA を保持する組換え大腸菌は DBTO₂ を HBPSi に、*bdsB* のみを含む pKBDSB を保持する組換え大腸菌は HBPSi を 2-HBP に、*bdsC* のみを含む pKBDS C を保持する組換え大腸菌は DBT を DBTO₂ に変換した。これより、*bdsABC* は DBT を DBTO₂ と HBPSi を経由して 2-HBP に脱硫する酵素群をコードしていることが明らかとなった。

3.2.5. 組換え大腸菌による DBT 脱硫の温度依存性

pKBDS を保持する組換え大腸菌 JM109 による DBT 脱硫の温度依存性について休止菌体を用いて検討した。Fig. 3.4 に示すように、組換え大腸菌は 52℃の高温域を含む広範な温度条件下で DBT 脱硫活性を示した。組換え大腸菌の休止菌体は 30℃から 52℃で DBT 分解活性を示し、50℃で最も高い分解率を示した。2-HBP の生成率は 40℃で最も高い値を示した。さらに、組換え大腸菌は DBT 脱硫に対して *B.*

subtilis WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 と類似する温度依存性を示した。

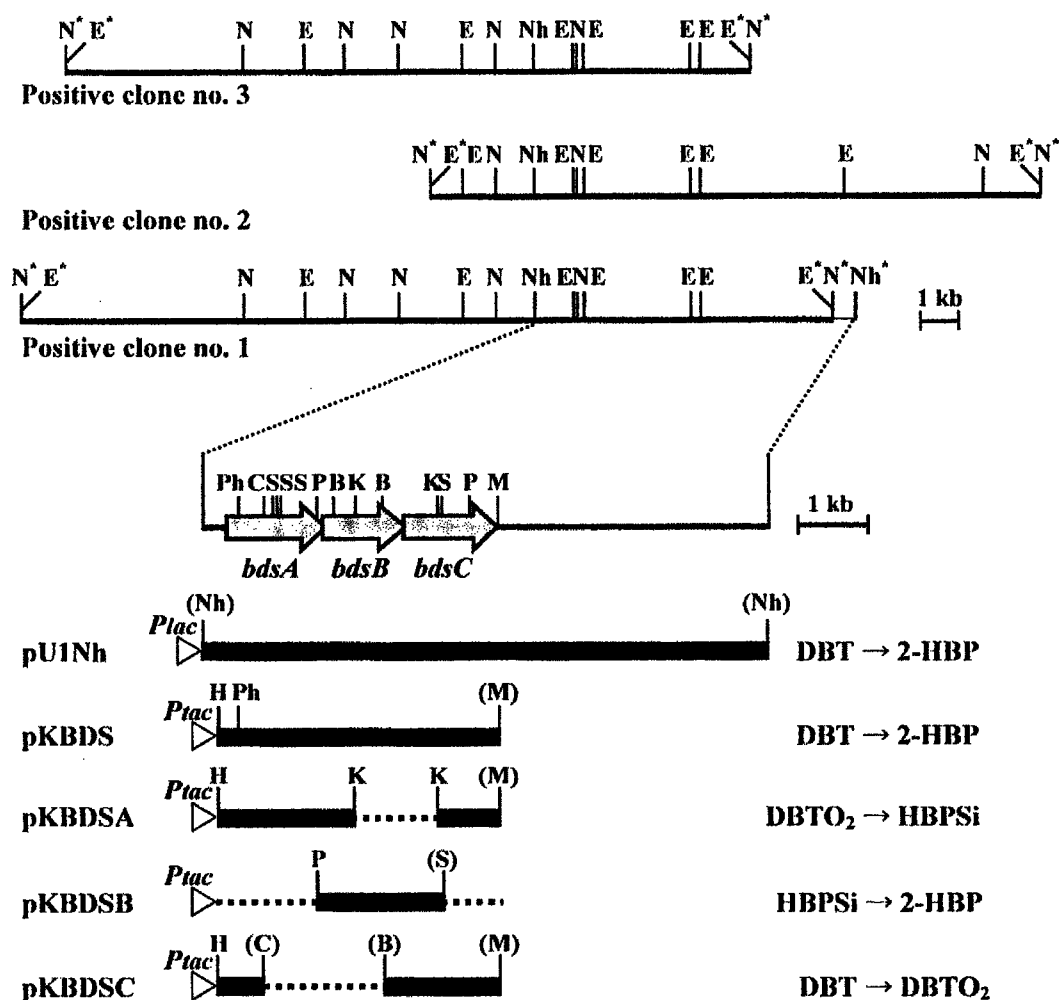


Fig. 3.1. Restriction map of three positive clones and subclones for the *bdsABC* genes from *B. subtilis* WU-S2B. The restriction enzyme sites derived from the phage vector are shown with asterisk and the sites lost by blunting are shown in parenthesis. B, *Bpu1102I*; C, *CpoI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluI*; N, *NotI*; Nh, *NheI*; P, *PstI*; Ph, *PshAI*; S, *SacII*. *Plac* and *Ptac* (triangle) show the directions of *lac* and *tac* promoter in pUC19 and pKK223-3, respectively.

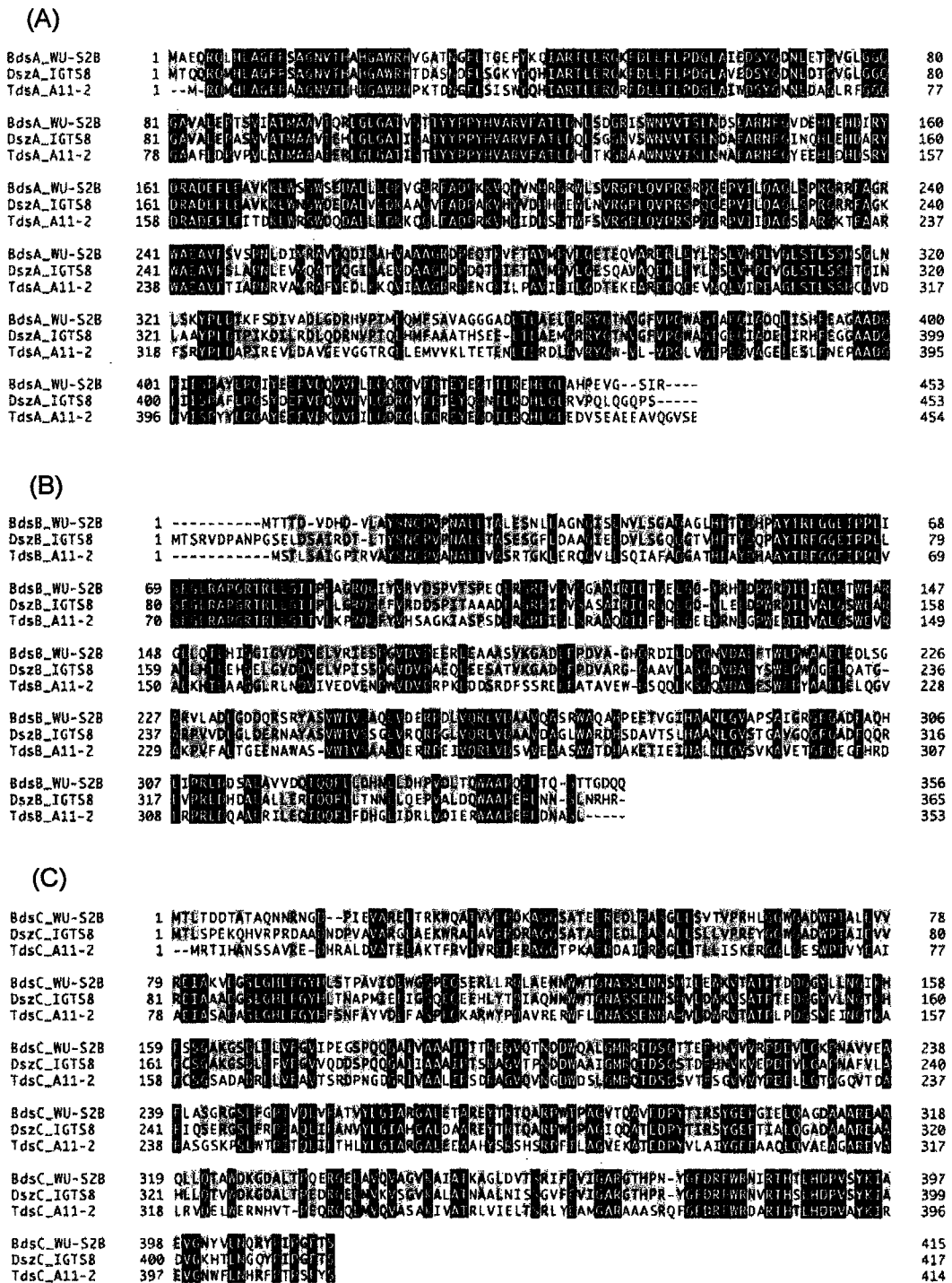


Fig. 3.2. Multiple sequence alignment of the DBT-desulfurizing enzymes. Black shading indicates identical residues in all the members. Gray shading indicates identical residues in two members. The Bds enzymes are from *B. subtilis* WU-S2B (accession number AB076745). The Dsz enzymes are from *Rhodococcus* sp. IGTS8 (L37363). The Tds enzymes are from *Paenibacillus* sp. A11-2 (AB033997). (A), DBTO₂ monooxygenases BdsA, DszA, and TdsA; (B), HBPSi desulfinasen BdsB, DszB, and TdsB; (C), DBT monooxygenases BdsC, DszC, and TdsC.

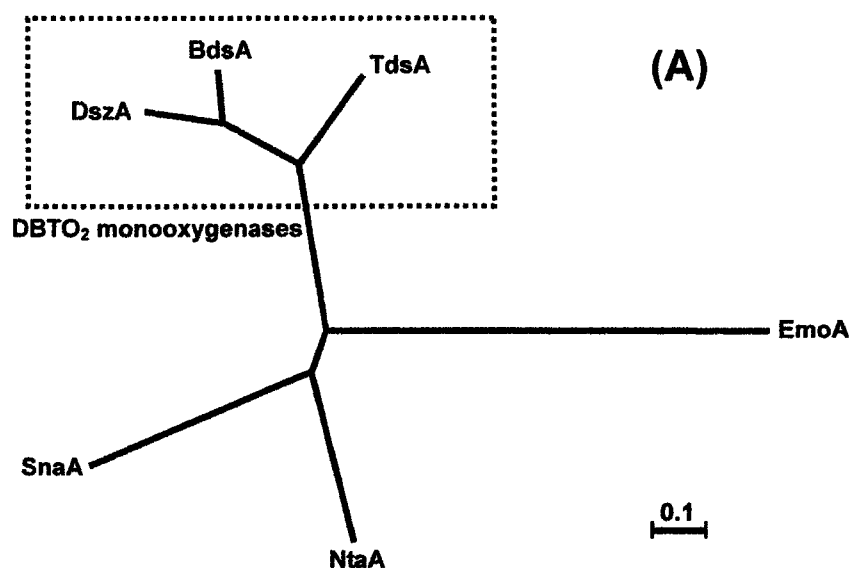


Fig. 3.3A. Phylogenetic tree of the flavin-dependent monooxygenases related to BdsA. Scale bar, 0.1 substitution per site. BdsA, DBTO₂ monooxygenase of *B. subtilis* WU-S2B (accession number AB076745); DszA, DBTO₂ monooxygenase of *Rhodococcus* sp. IGTS8 (L37363); TdsA, DBTO₂ monooxygenase of *Paenibacillus* sp. A11-2 (AB033997); SnaA, pristnamycin II_A synthase subunit A of *Streptomyces pristinaespiralis* (U21215); NtaA, nitrilotriacetate monooxygenase of *Chelatobacter heintzii* (U39411), EmoA, EDTA monooxygenase of a EDTA-degrading bacterium BNC1 (AF176664).

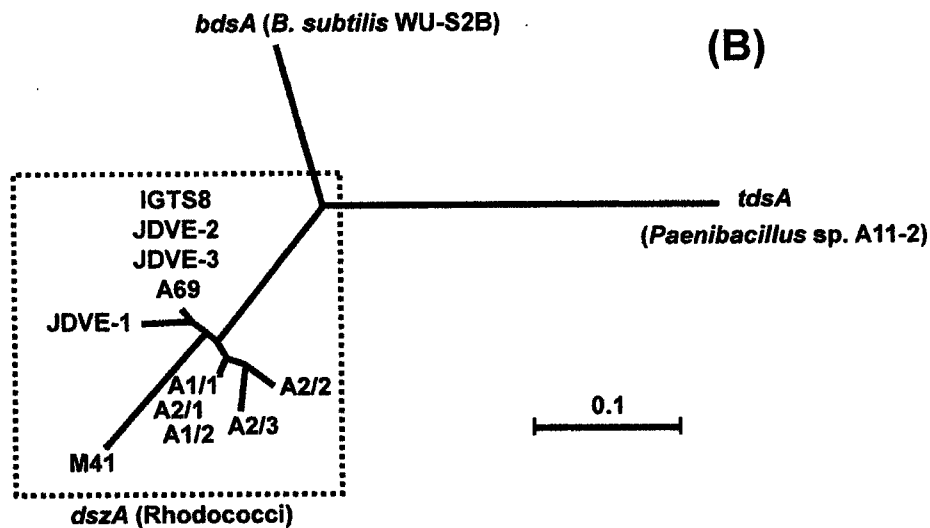


Fig. 3.3B. Phylogenetic tree of the DBTO₂ monooxygenase genes equivalent to *bdsA*. Scale bar, 0.1 substitution per site. *bdsA*, gene encoding DBTO₂ monooxygenase of *Bacillus subtilis* WU-S2B (accession number AB076745); *tdsA*, gene encoding DBTO₂ monooxygenase of *Paenibacillus* sp. A11-2 (AB033997); IGTS8, gene encoding DBTO₂ monooxygenase of *Rhodococcus* sp. IGTS8 (L37363); A1/1, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. A1/1 (AF322033); A1/2, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. A1/2 (AF322034); A2/1, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. A2/1 (AF322036); A2/2, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. A2/2 (AF322035); A2/3, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. A2/3 (AF322037); A69, *dszA*-like gene of *Rhodococcus* sp. A69 (AF322041); JDVE-1, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. JDVE-1 (AF322038); JDVE-2, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. JDVE-2 (AF322039); JDVE-3, *dszA*-like gene of uncultured *Rhodococcus* sp. JDVE-3 (AF322040); M41, *dszA*-like gene of *Rhodococcus* sp. M41 (AF322042).

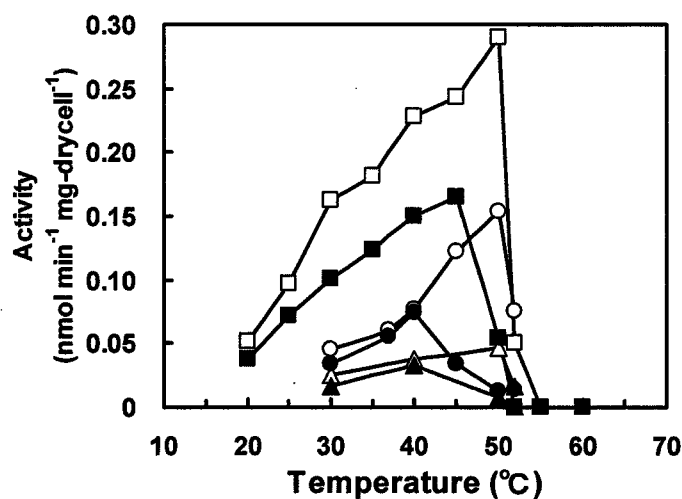


Fig. 3.4. Effects of temperature on DBT-desulfurizing activity of the recombinant *E. coli* carrying *bdsABC*. The reaction mixture contained 50 μ l of a 10 g/l DBT stock solution in *n*-tridecane and 1 ml of the cell suspension in a 10 ml screw-cap test tube to give a final concentration of 0.27 mM DBT. Resting cell reactions were performed with inverted shaking at 50 rpm for 1 h. Symbols: ○ and ●, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of the recombinant *E. coli* carrying pKBDS, respectively; △ and ▲, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of *B. subtilis* WU-S2B, respectively; □ and ■, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of *M. phlei* WU-F1, respectively.

3.3. 考察

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 からプラークハイブリダイゼーション法により DBT 脱硫遺伝子をクローニングし、脱硫機能を遺伝子レベルで解析した。*Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 DBT 脱硫遺伝子 *dszABC*²⁾ と *Paenibacillus* sp. A11-2 由来 DBT 脱硫遺伝子 *tdsABC*³⁾ の推定アミノ酸配列の保存領域をもとに DNA プローブを作製し、プラークハイブリダイゼーション法により DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* を取得した。塩基配列解析により、*B. subtilis* WU-S2B と *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子の塩基配列は完全に一致することを明らかにした。*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子は 3 つの遺伝子 *bdsA*、*bdsB*、*bdsC* からなる 1 つのオペロンを形成しており、大腸菌における発現試験により、*bdsABC* は DBT を DBTO₂ と HBPSi を経由して 2-HBP に脱硫する酵素群をコードしていることを確認した (Fig. 3.1)。

BdsA は活性発現にフラビンレダクターゼを要求するフラビン依存性モノオキシゲナーゼと相同性を示した⁹⁾。フラビンレダクターゼは NAD(P)H により FMN を還元し、生じた FMNH₂ はフラビン依存性モノオキシゲナーゼに供給され酸素分子の活性化に利用される。DBTO₂ モノオキシゲナーゼ (*DszA/TdsA*) とともに DBT モノオキシゲナーゼ (*DszC/TdsC*) も活性発現にフラビンレダクターゼを要求することが報告されている¹⁰⁾。BdsC はフラビン依存性モノオキシゲナーゼと明確な相同性を示さなかったが、この酵素はフラビン依存性の 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼと保存領域を共有することを明らかにした⁹⁾ (データ省略)。また、系統学的解析により、DBTO₂ モノオキシゲナーゼはフラビン依存性モノオキシゲナーゼの中で 1 つのクラスターを形成することが明らかとなった (Fig. 3.3A)。しかしながら、*bdsA* は *dszA* クラスターや *tdsA* とは離れて独立に位置することを確認した (Fig. 3.3B)。一方、塩基配列解析により、*B. subtilis* WU-S2B と *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子の塩基配列は完全に一致することを明らかにし、*bdsABC* 遺伝子が水平伝播により移動した可能性が示唆された。

bdsABC を保持する組換え大腸菌は 52℃ の高温域を含む広範な温度条件下 (30-52℃) で DBT 脱硫活性を示し、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 と類似する温度依存性を示した (Fig. 3.4)。このことは、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 の広範な温度条件下で DBT を脱硫可能な性質は DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* に

より付与されていることを示しており、また、もともと脱硫能力のない大腸菌に *bdsABC* を導入することにより脱硫能力を付与できたことから、*bdsABC* はバイオ脱硫に対する有用な遺伝子資源であることが示唆された。

一方、本研究では外来のフラビンレダクターゼ遺伝子を組換え大腸菌に導入しなかったが、*bdsABC* を保持する組換え大腸菌は DBT を 2-ヒドロキシビフェニル (2-HBP) に脱硫した。これより、フラビン依存性モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子 *bdsA* および *bdsC* の発現産物は、大腸菌内在のフラビンレダクターゼと共役していることが示唆された。組換え大腸菌は *B. subtilis* WU-S2B より高い DBT 脱硫活性を示したが、*M. phlei* WU-F1 より低い活性を示した。*B. subtilis* WU-S2B、*M. phlei* WU-F1 および組換え大腸菌における DBT 脱硫活性の高低は、宿主菌体の能力、例えば、基質 (DBT) の菌体内への取り込み能力、*bdsABC* の発現レベル、フラビンレダクターゼ活性などに依存していることが考えられ、宿主菌体の能力が DBT 脱硫活性に大きく影響を及ぼすことが示唆された。とくに、フラビンレダクターゼ活性と DBT 脱硫活性の関連性については第 4 章、第 5 章で検討する。

3.4. まとめ

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 からブランクハイブリダイゼーション法により DBT 脱硫遺伝子をクローニングし、脱硫機能を遺伝子レベルで解析した。塩基配列解析により、*B. subtilis* WU-S2B と *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子の塩基配列は完全に一致することを明らかにした。*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子は 3 つの遺伝子 *bdsA*、*bdsB*、*bdsC* からなる 1 つのオペロンを形成しており、大腸菌における発現試験により、*bdsABC* は DBT を DBTO₂ と HBPSi を経由して 2-HBP に脱硫する酵素群をコードしていることを確認した。*bdsABC* を保持する組換え大腸菌は 52℃ の高温域を含む広範な温度条件下 (30-52℃) で脱硫活性を示し、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 と類似する温度依存性を示した。このことは、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 の広範な温度条件下で DBT を脱硫可能な性質は DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* により付与されていることを示しており、また、もともと脱硫能力のない大腸菌に *bdsABC* を導入することにより脱硫能力を付与できたことから、*bdsABC* はバイオ脱硫に対する有用な遺伝子資源であることが示唆された。

3.5. 参考文献

1. Ohshiro, T., and Izumi, Y.: Desulfurization of fossil fuels, in: G. Bitton (Eds.), Encyclopedia of environmental microbiology, vol. II, Wiley and Sons, New York, pp. 1041-1051 (2002).
2. Piddington, C. S., Kovachvich, B. R., and Rambosek, J.: Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. Appl. Environ. Microbiol., 61, 468-475 (1995).
3. Ishii, Y., Konishi, J., Okada, H., Hirasawa, K., Onaka, T., and Suzuki, M.: Operon structure and functional analysis of the genes encoding thermophilic desulfurizing enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2. Biochem. Biophys. Res. Commun., 270, 81-88 (2000).
4. Blanc, V., Lagneaux, D., Didier, P., Gil, P., Lacroix, P., and Crouzet, J.: Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin II_B to pristinamycin II_A (PII_A): PII_A synthase and NADH:riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase. J. Bacteriol., 177, 5206-5214 (1995).
5. Knobel, H.-R., Egli, T., and Van der Meer, J. R.: Cloning and characterization of the genes encoding nitrilotriacetate monooxygenase of *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600. J. Bacteriol., 178, 6123-6132 (1996).
6. Bohuslavek, J., Payne, J. W., Liu, Y., Bolton, H. Jr., and Xun, L.: Cloning, sequencing, and characterization of a gene cluster involved in EDTA degradation from the bacterium BNC1. Appl. Environ. Microbiol., 67, 688-695 (2001).
7. Duarte, G. F., Rosado, A. S., Seldin, L., De Araujo, W., and Van Elsas, J. D.: Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1052-1062 (2001).
8. Kertesz, M. A.: Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. FEMS microbial. Rev., 24, 135-175 (2000).
9. Galán, B., Díaz, E., Prieto, M. A., and García, J. L.: Functional analysis of the small

component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. J. Bacteriol., 182, 627-636 (2000).

10. Matsubara, T., Ohshiro, T., Nishina, Y., and Izumi, Y.: Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1179-1184 (2001).

第4章 インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法による

好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B 由来

フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングおよび機能解析

4.1. 緒言

これまでに多くの常温性ジベンゾチオフェン (DBT) 脱硫細菌が取得されており¹⁾、とくに、*Rhodococcus* sp. IGTS8 からは DBT 脱硫遺伝子 (*dszABC*) がクローニングされている²⁾。さらに筆者らは、好熱性 DBT 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 を取得し (第1章)、これらの細菌から DBT 脱硫遺伝子 (*bdsABC*) をクローニングした (第3章)。

DBT 脱硫代謝経路において、DBT、DBT スルホキシド (DBTO)、DBT スルホン (DBTO₂) の酸化反応を触媒する 2 種のフラビン依存性モノオキシゲナーゼ (*DszC/BdsC* および *DszA/BdsA*) の活性発現には、フラビンレダクターゼが不可欠なことが明らかにされている³⁾。フラビンレダクターゼは NAD(P)H により FMN を還元し、生じた FMNH₂ はフラビン依存性モノオキシゲナーゼに供給され酸素分子の活性化に利用される。発光細菌由来ルシフェラーゼはこのような 2 成分型モノオキシゲナーゼの典型であり、最もよく研究されている⁴⁾。スチレンモノオキシゲナーゼ⁵⁾、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼ⁶⁾、ピロール-2-カルボン酸モノオキシゲナーゼ⁷⁾、ニトリロ 3 酢酸モノオキシゲナーゼ⁸⁾、EDTA モノオキシゲナーゼ⁹⁾などの 2 成分型モノオキシゲナーゼはそれぞれの基質の分解経路において見出された。さらに、この種のモノオキシゲナーゼはプリスチナマイシン II_A やバラニマイシンなどの抗生物質生合成系に関与していることも明らかにされている^{10,11)}。

一方、種々のモノオキシゲナーゼおよびジオキシゲナーゼ遺伝子を発現する組換え大腸菌は、インドールを青色色素インジゴに酸化し、固体培地上に青色コロニーを形成することが知られている^{5,12-16)}。また最近、*Rhodococcus* sp. IGTS8 由来 DBT モノオキシゲナーゼ *DszC* はフラビンレダクターゼ (*DszD*) 存在下でインドールをインジゴに変換する反応を触媒することが報告された¹⁷⁾。そこで本研究では、*B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングするために、筆者らはこのインジゴ生成を指標として応用することを試みた。すなわち、Fig. 4.1 に示

すように、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* を保持する組換え大腸菌がフラビンレダクターゼ遺伝子を獲得しこれらの遺伝子が共発現すれば、大腸菌内在の代謝経路により供給されるインドールをインドキシルを経てインジゴに変換し、栄養固体培地上に青色コロニーを形成するとの仮説に基づくものである。

本章では、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法により好熱性 DBT 脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B からフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。

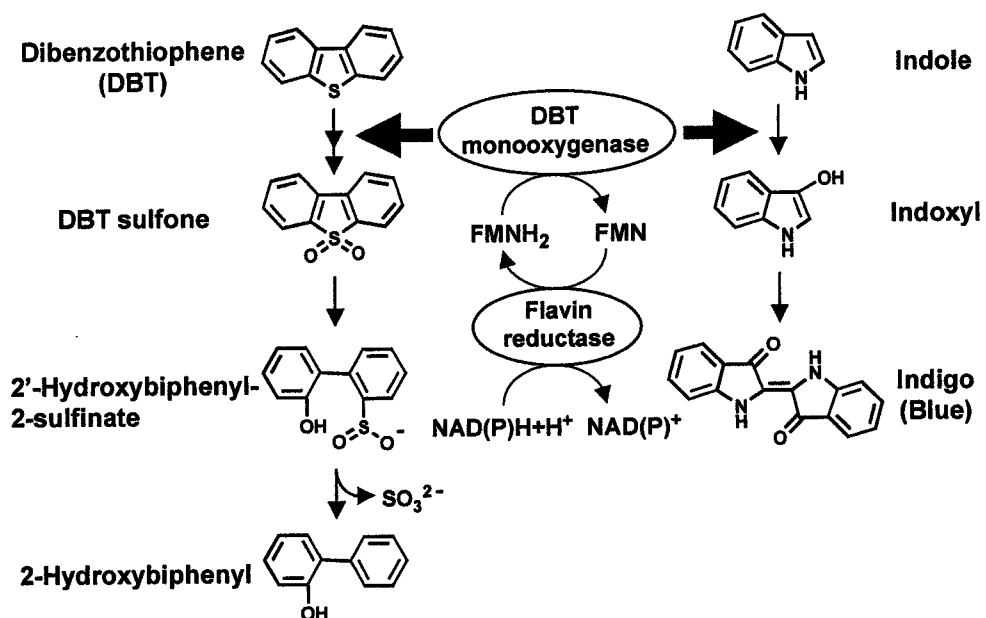


Fig. 4.1. Conversion of indole to indigo by DBT monooxygenase in the presence of flavin reductase. Indole is provided from a natural metabolic pathway(s) in *E. coli*.

4.2. 結果

4.2.1. インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法による *B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニング

Rhodococcus sp. IGTS8 由来 DBT モノオキシゲナーゼ DszC はフラビンレダクターゼ DszD 存在下でインドールをインジゴに変換する反応を触媒することが報告されている¹⁷⁾。さらに、WU-S2B 由来 DBT モノオキシゲナーゼ遺伝子 *bdsC* と好熱性 DBT 脱硫細菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 由来フラビンレダクターゼ遺伝子 *tdsD*¹⁸⁾を共発現する大腸菌は LB 固体培地上に青色コロニーを形成することを確認した（データ省略）。そこで、*B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングするために、当該遺伝子の *bdsC* との共発現によるインジゴ生成を指標として応用することを試みた。

WU-S2B の DNA ライブラリーは、全 DNA を *Sau3AI* で部分消化後、2-4 kb の断片を *Bam*HI で消化した pSTV28 ベクターに連結し、pKBDS (DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* を pKK223-3 ベクターに連結したもの) とともに大腸菌 JM109 に導入することにより作製した。約 5,000 コロニーから成る *B. subtilis* WU-S2B の DNA ライブラリーに対してインジゴ生成を指標とした共発現スクリーニングを行った。その結果、明らかに青色を示す 2 つのコロニーが得られ、*B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼを保持する候補株として選択した。

候補株 2 株を LB 液体培地で 18 時間、37℃で培養し、生じた青色色素をジメチルホルムアミドにより抽出した。薄層クロマトグラフィー分析により、色素成分はインジゴ（青）と少量のインジルビン（赤）であることが確認した。

pSTV28 ベクターに連結された DNA 断片の塩基配列を決定し、2 つのポジティブクローンでインサートの塩基配列が一致することを明らかにした。組換えプラスミド (pSTVfrb) のインサートは約 1.4 kb の完全なオープンリーディングフレーム (ORF) と部分 ORF を含んでいた。完全な ORF は 174 アミノ酸残基からなる分子量 19,663 のタンパク質をコードしており、Fig. 4.2 に示すように、その推定アミノ酸配列は 5-アジリジニル-2,4-ジニトロベンズアミドなどのニトロ化合物およびフラビンの還元を触媒する *B. amyloliquefaciens* のニトロレダクターゼ (YwrO)¹⁹⁾と 61% の相同性を示した。そこで、この ORF を *B. subtilis* WU-S2B のフラビンレダクターゼに対して *frb* と命名した。さらに、Frb の推定アミノ酸配列はゲノム配列プロジェ

クトにより同定されている *B. subtilis* の推定上のタンパク質 (YwrO)²⁰⁾ と 65% の相同性を示した。一方、*frb* の下流に逆方向に並んでいる部分 ORF の推定アミノ酸配列は *Ralstonia solanacearum* の推定上のトランスポータータンパク質²¹⁾ と 81% の相同性を、機能未知の推定上のタンパク質と約 40% の相同性を示した。

4.2.2. *frb* の大腸菌における発現

フラビンレダクターゼ遺伝子 *frb* をサブクローニングして不要な領域 (下流に存在する部分 ORF など) を除去し、T7 プロモーターの支配下で発現させた。すなわち、*frb* を pSTV*frb* から PCR により増幅して pET21-a ベクターに連結し、得られた組換えプラスミド pET*frb* を大腸菌 BL21 (DE3) に導入して IPTG 存在下で高発現させた。Table 4.3 に示すように、pET*frb* を保持する組換え大腸菌の無細胞抽出液を用いて、Frb がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した。組換え大腸菌の比活性は NADH に対して 9.58 U/mg に達し、原株 *B. subtilis* WU-S2B (0.39 U/mg) より約 25 倍高い値となった。これより、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法によりクローニングした遺伝子がフラビンレダクターゼをコードしていることが明らかとなり、仮説の妥当性を支持する結果を得た。また、Frb は FMN の還元で NADH および NADPH をともに利用した。一方、*frb* のみを保持する組換え大腸菌はインジゴを生成しなかったため(データ省略)、*frb* 単独ではインドールのインジゴへの変換活性を示さないことを確認した。

4.2.3. *frb* と *bdsABC* を共発現させた組換え大腸菌の DBT 脱硫活性

frb および DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* をともに含む DNA カセットを構築し、*frb* と *bdsABC* を大腸菌内で共発現させた。すなわち、*frb* を pKBDS に *bdsABC* の下流に順方向に位置するように連結し、得られた組換えプラスミド pKBDS*frb* を大腸菌 JM109 に導入して IPTG 存在下で高発現させた。Fig. 4.3 に示すように、*frb* および *bdsABC* をともに保持する組換え大腸菌 JM109 (pKBDS*frb*) の休止菌体は、20℃ から 55℃ の広範な温度条件下で高い DBT 脱硫活性を示した。組換え大腸菌 JM109 (pKBDS*frb*) の DBT 脱硫活性は 40℃ で最大値 0.75 nmol min⁻¹ mg-drycell⁻¹ に達し、同温度における *bdsABC* のみを保持する組換え大腸菌 JM109 (pKBDS) より約 27 倍高い値となった。これより、*frb* を *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件

下において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。

Table 4.1. Expression of the flavin reductase gene *frb* in *E. coli*.

Strain	Specific activity (U/mg) ^a	
	NADH	NADPH
<i>E. coli</i> (pETfrb)	9.58	12.70
<i>E. coli</i> (pET21-a)	0.57	0.76
<i>B. subtilis</i> WU-S2B	0.39	0.19

^a Flavin reductase activity was determined at 50°C with NADH or NADPH as an electron donor and FMN as an electron acceptor. One unit of activity is defined as the amount of enzyme necessary to oxidize 1 μ mol of NAD(P)H per min ($\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Bs_Frb	1	MKVLVLAEHPNMECSVNNRAFDTLADAPGTLRLQLYCEYPDELTDVCKEOKLCEGHDR	60
Ba_YwrO	1	MKVLVLAEHPDMNSAVNNRAFAELKNEDELTVNELYREYPLGCIIDAKEROLCEONDRI	60
Bs_YwrO	1	MKILVLAEHPHMETSVNNRAFAELLSGHNTVRLYREYPELIDVAKEOKLCEGHDR	60
Bs_Frb	61	VFQFPLYWYSSPPLLKWLDEVLVLYGWANCINGTALRGKEFLVAVSAGAPLLLYQAGGSN	120
Ba_YwrO	61	VFQFPLYWYSAPPLLKIWMDEVLSYGWALCKKCALDGKEFLVAVSVGAGLDLYQAGGSN	120
Bs_YwrO	61	VFQFPLYWYSSPPLLKWDLVLIYGWAFCSGNALLGKEFLVAVSTGSEAKKYQAGGAN	120
Bs_Frb	121	EFATSELLKPFQATSNLIGTLYLEFLVLYQAGTAGKSELAEGATQYREHVLKSF-----	174
Ba_YwrO	121	EFATSELLKPFQAMANTIGTLYLEAFALYGVNGADATDIHDNAKRLAAYTKSF-----	174
Bs_YwrO	121	EYSTSELLKPFQATSNLIGTKYLEFLVLYGVNYAAEDTSHSAKRLAAYTQQPEV-----	175

Fig. 4.2. Multiple sequence alignment of the flavin reductases related to Frb. Black shading indicates identical residues in all the members. Gray shading indicates identical residues in two members. Bs_Frb, flavin reductase of *B. subtilis* WU-S2B (accession number AB125067); Ba_YwrO, nitroreductase of *B. amyloliquefaciens* (AF373598); Bs_YwrO, hypothetical protein of *B. subtilis* (Z99122).

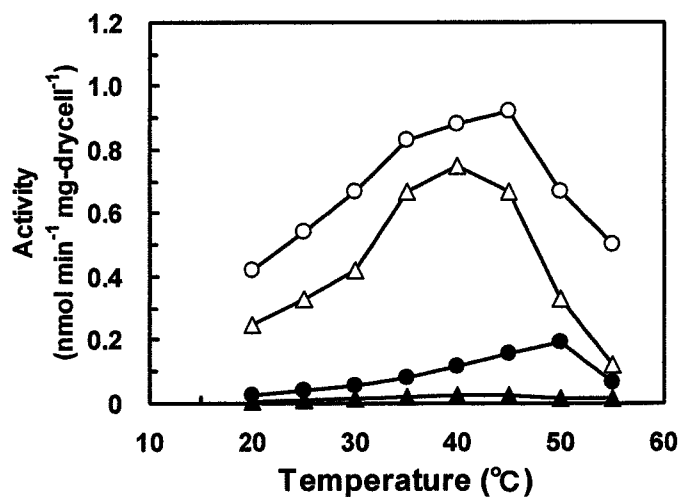


Fig. 4.3. Coexpression of the flavin reductase gene *frb* with the DBT-desulfurization genes *bdsABC* in *E. coli*. The reaction mixture contained 11 μ l of a 10 g/l DBT stock solution in *n*-tridecane and 0.6 ml of the cell suspension in a 10 ml screw-cap test tube to give a final concentration of 0.5 mM DBT. Resting cell reactions were performed with inverted shaking at 50 rpm for 30 min. Symbols: ○ and △, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of the recombinant *E. coli* carrying both *frb* and *bdsABC*, respectively; ● and ▲, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of the recombinant *E. coli* carrying only *bdsABC*, respectively.

4.3. 考察

本章では、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法により好熱性 DBT 脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B からフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。*B. subtilis* WU-S2B 由来 DBT モノオキシゲナーゼ遺伝子 *bdsC* と好熱性 DBT 脱硫細菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 由来フラビンレダクターゼ遺伝子 *tdsD*¹⁸⁾を共発現する大腸菌は LB 固体培地上に青色コロニーを形成することを確認した。そこで、*B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングするために、当該遺伝子の *bdsC* との共発現によるインジゴ生成を指標として応用した (Fig. 4.1)。この方法を用いて、LB 固体培地上にインジゴ生成による青色コロニーを形成する組換え株からフラビンレダクターゼ遺伝子 *frb* を取得し、大腸菌を宿主として発現させることによりこの遺伝子産物 Frb がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した (Table 4.1)。さらに、*frb* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下 (20-55℃) において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした (Fig. 4.3)。 *frb* と *bdsABC* をともに保持する組換え大腸菌の DBT 脱硫活性は 40℃で最大値 $0.75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg-drycell}^{-1}$ に達し、同温度における *bdsABC* のみを保持する組換え大腸菌より約 27 倍高い値となった。第 3 章で述べたように、*bdsABC* のみを保持する組換え大腸菌の低い DBT 脱硫活性は大腸菌内在のフラビンレダクターゼに依存していることが示唆された。

Frб は 5-アジリジニル-2,4-ジニトロベンズアミドなどのニトロ化合物およびフラビンの還元を触媒する *B. amyloliquefaciens* のニトロレダクターゼ YwrO¹⁹⁾と 61%の相同性を示した (Fig. 4.2)。このニトロレダクターゼは FMN の還元を触媒するのに NADH および NADPH をともに利用することが報告されている。本研究において、Frб も FMN の還元を NADH および NADPH をともに利用した。一方、Frб の推定アミノ酸配列はゲノム配列プロジェクトにより同定されている *B. subtilis* の推定上のタンパク質 YwrO²⁰⁾と最も高い相同性を示した (Fig. 4.2)。2 つのタンパク質はともに *B. subtilis* に属する細菌由来だが、Frб はこの推定上のタンパク質 YwrO と 65%の相同性しか示さないことは興味深い。

種々のモノオキシゲナーゼおよびジオキシゲナーゼ遺伝子を発現する組換え大腸菌は、インドールを青色色素インジゴに酸化し、固体培地上に青色コロニーを形成することが知られている。ナフトレンジオキシゲナーゼ¹²⁾などの単核鉄中心によ

り酸素分子を活性化するジオキシゲナーゼ、トルエン¹³⁾、フェノール¹⁴⁾、ジメチルスルフィドモノオキシゲナーゼ¹⁵⁾などの二核鉄中心により酸素分子を活性化するモノオキシゲナーゼ、チトクローム P450¹⁶⁾はインドールをインジゴに変換する反応を触媒することが明らかにされている。2 成分型モノオキシゲナーゼであるスチレンモノオキシゲナーゼ⁵⁾もこの反応を触媒する。さらに、フラボタンパク質オキシゲナーゼである2-ヒドロキシビフェニル3-モノオキシゲナーゼはインドールをインジゴに変換する反応を触媒しないが、進化分子工学的手法により改変した酵素はこの反応を触媒した²²⁾。これより、オキシゲナーゼの反応機構とインドールのインジゴへの変換活性との間には相関性はないものと考えられる。さらに本研究において、*B. subtilis* WU-S2B 由来 DBT モノオキシゲナーゼ BdsC はフラビンレダクターゼ存在下でインドールをインジゴに変換する反応を触媒することを確認した。DBT 分子の硫黄原子を酸化する BdsC がインドール分子の炭素原子に対して酸化活性を示すことは興味深い。芳香族オキシゲナーゼがインドールをインジゴに変換する反応を触媒する傾向があるが、オキシゲナーゼの基質特異性とインドールのインジゴへの変換活性との間には厳密な相関性はないものと考えられる。これより、このインジゴ生成は種々のオキシゲナーゼ遺伝子を発現スクリーニングによりクローニングする際に指標として有用と考えられる。

フラビン依存性モノオキシゲナーゼとフラビンレダクターゼからなる2成分型モノオキシゲナーゼは種々の興味深い酸化反応を触媒する⁴⁻¹¹⁾。フラビン依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子とフラビンレダクターゼ遺伝子は非常に近い位置に存在することが多いが、遠く離れて存在することもある⁶⁾。DBT 脱硫細菌 *Rhodococcus* sp. IGTS8 においてフラビン依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子 *dszA* および *dszC* はプラスミド上に存在するが、フラビンレダクターゼ遺伝子 *dszD* は *dszA* および *dszC* から遠く離れたゲノム上に存在する²⁾。フラビンレダクターゼ遺伝子がフラビン依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子から遠く離れて存在すれば、それぞれの遺伝子を同時にクローニングすることは不可能である。本研究では、*B. subtilis* WU-S2B の *bdsABC* 遺伝子の周辺領域、少なくともその上流域 3.3 kb および下流域 0.4 kb においてフラビンレダクターゼ遺伝子が存在しないことを確認したため、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法により *B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングした。

Vibrio harveyi 由来フラビンレダクターゼは *Rhodococcus* 属細菌由来 DBT モノオキシゲナーゼ DszC および DBTO₂ モノオキシゲナーゼ DszA と共役することが報告されている^{23,24)}。また、*Vibrio fischeri* 由来フラビンレダクターゼは細菌 DSM9103 由来 EDTA モノオキシゲナーゼ⁹⁾ および *Streptomyces viridifaciens* MG456-hF10 由来イソブチルアミン *N*-ヒドロキシラーゼ¹¹⁾ と共役することが報告されている。このことは、フラビン依存性モノオキシゲナーゼの活性発現に不可欠なフラビンレダクターゼは互換性を有することを示している。したがって、本研究において考案した共発現スクリーニング法は、フラビン依存性モノオキシゲナーゼと効率的に共役する新規フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングに広く応用可能と考えられる。さらに、試験管内においてフラビンレダクターゼ活性が低いもしくはないためにその活性の検出が困難な新規フラビン依存性モノオキシゲナーゼを、フラビンレダクターゼ遺伝子との共発現により取得できる可能性が示唆された。

4.4. まとめ

本章では、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法により好熱性 DBT 細菌 *B. subtilis* WU-S2B からフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。*B. subtilis* WU-S2B 由来 DBT モノオキシゲナーゼ遺伝子 *bdsC* と好熱性 DBT 脱硫細菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 由来フラビンレダクターゼ遺伝子 *tdsD* を共発現する大腸菌は LB 固体培地上に青色コロニーを形成することを確認した。そこで、*B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングするために、当該遺伝子の *bdsC* との共発現によるインジゴ生成を指標として応用した。この方法を用いて、LB 固体培地上にインジゴ生成による青色コロニーを形成する組換え株からフラビンレダクターゼ遺伝子 *frb* を取得し、大腸菌を宿主として発現させることによりこの遺伝子産物 Frb がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した。さらに、*frb* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下（20-55℃）において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。本研究において考案した共発現スクリーニング法は、フラビン依存性モノオキシゲナーゼと効率的に共役する新規フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングに広く応用可能と考えられる。さらに、試験管内においてフラビンレダクターゼ活性が低いもしくはないためにその活性の検出が困難な新規フラビン依存性モノオキシゲナーゼを、フラビンレダクターゼ遺伝子との共発現により取得できる可能性が示唆された。

4.5. 参考文献

1. Ohshiro, T., and Izumi, Y.: Desulfurization of fossil fuels, in: G. Bitton (Eds.), Encyclopedia of environmental microbiology, vol. II, Wiley and Sons, New York, pp. 1041-1051 (2002).
2. Denome, S. A., Oldfield, C., Nash, L. J., and Young, K. D.: Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. J. Bacteriol., 176, 6707-6716 (1994).
3. Matsubara, T., Ohshiro, T., Nishina, Y., and Izumi, Y.: Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1179-1184 (2001).
4. Tu, S.-C.: Reduced flavin: donor and acceptor enzymes and mechanisms of channeling. Antioxid. Redox Signal., 3, 881-897 (2001).
5. O'Leary, N. D., O'Connor, K. E., and Dobson, A. D. W.: Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. FEMS Microbiol. Rev., 26, 403-417 (2002).
6. Galán, B., Díaz, E., Prieto, M. A., and García, J. L.: Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. J. Bacteriol., 182, 627-636 (2000).
7. Becker, D., Schrader, T., and Andreessen, J. R.: Two-component flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. Eur. J. Biochem., 249, 739-747 (1997).
8. Uetz, T., Schneider, R., Snozzi, M., and Egli, T.: Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from "*Chelatobacter*" strain ATCC 29600. J. Bacteriol., 174, 1179-1188 (1992).
9. Witschel, M., Nagel, S., and Egli, T.: Identification and characterization of the two-enzyme system catalyzing oxidation of EDTA in the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. J. Bacteriol., 179, 6937-6943 (1997).
10. Thibaut, D., Ratet, N., Bisch, D., Faucher, D., Debussche, L., and Blanche, F.: Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D-proline

- residue of pristinamycin II_B during the last step of pristinamycin II_A biosynthesis. J. Bacteriol., 177, 5199-5205 (1995).
11. Parry, R. J., and Li, W.: Purification and characterization of isobutylamine *N*-hydroxylase from the valanimycin producer *Streptomyces viridifaciens* MG456-hF10. Arch. Biochem. Biophys., 339, 47-54 (1997).
 12. Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Ossulund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., and Gibson, D. T.: Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science, 222, 167-169 (1983).
 13. Pikus, J. D., Studts, J. M., McClay, K., Steffan, R. J., and Fox, B. G.: Changes in the regiospecificity of aromatic hydroxylation produced by active site engineering in the diiron enzyme toluene 4-monooxygenase. Biochemistry, 36, 9283-9289 (1997).
 14. Doukyu, N., Toyoda, K., and Aono, R.: Indigo production by *Escherichia coli* carrying the phenol hydroxylase gene from *Acinetobacter* sp. strain ST-550 in a water-organic solvent two-phase system. Appl. Microbiol. Biotechnol., 60, 720-725 (2003).
 15. Horinouchi, M., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T.: Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. FEMS Microbiol. Lett., 155, 99-105 (1997).
 16. Gillan, E. M. J., Notley, L. A., Cai, H., de Voss, J. J., and Guengerich, F. P.: Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. Biochemistry, 39, 13817-13824 (2002).
 17. Coco, W. M., Levinson, W. E., Crist, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P. T., Squires, C. H., and Monticello, D. J.: DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. Nat. biotechnol., 19, 354-359 (2001).
 18. Ishii, Y., Konishi, J., Suzuki, M., and Maruhashi, K.: Cloning and expression of the gene encoding the thermophilic NAD(P)H-FMN oxidoreductase coupling with the desulfurizing enzymes from *Paenibacillus* sp. A11-2. J. Biosci. Bioeng., 90, 591-599 (2000).
 19. Anlezark, G. M., Vaughan, T., Fashola-Stone, E., Michael, N. P., Murdoch, H., Sims, M. A., Stubbs, S., Wigley, S., and Minton, N. P.: *Bacillus amyloliquefaciens*

- orthologue of *Bacillus subtilis* *ywrO* encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954. *Microbiology*, 148, 297-306 (2002).
20. Kunst, F., et al.: The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256 (1997).
 21. Salanoubat, M., et al.: Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415, 497-502 (2002).
 22. Meyer, A., Würsten, M., Schmid, A., Kohler, H.-P., and Witholt, B.: Hydroxylation of indole by laboratory-evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 277, 34161-34167 (2002).
 23. Xi, L., Squires, C. H., Monticello, D. J., and Childs, J. D.: A flavin reductase stimulates DszA and DszC proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 73-75 (1997).
 24. Ohshiro, T., Aoi, Y., Torii, K., and Izumi, Y.: Flavin reductase coupling with two monooxygenases involved in dibenzothiophene desulfurization: purification and characterization from a non-desulfurizing bacterium, *Paenibacillus polymyxa* A-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 649-657 (2002).

第5章 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 由来 フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングおよび機能解析

5.1. 緒言

これまでに多くのジベンゾチオフェン (DBT) 脱硫細菌が取得されており、これらの細菌は炭素-硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫することが明らかにされている¹⁾。DBT 脱硫反応は2種のフラビン依存性モノオキシゲナーゼによる硫黄原子特異的な酸化反応により開始されるが、これらのフラビン依存性モノオキシゲナーゼの活性発現にはフラビンレダクターゼが不可欠である²⁾。フラビンレダクターゼは NAD(P)H により FMN を還元し、生じた FMNH₂ はフラビン依存性モノオキシゲナーゼに供給され酸素分子の活性化に利用される。筆者らは、好熱性 DBT 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 から DBT 脱硫遺伝子 (*bdsABC*) をクローニングした (第3章)。さらに、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法により好熱性 DBT 脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B からフラビンレダクターゼ遺伝子 (*frb*) をクローニングした (第4章)。

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 からコロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。

5.2. 結果

5.2.1. *M. phlei* WU-F1 由来フラビンレダクターゼの N 末端および内部アミノ酸配列の決定

M. phlei WU-F1 から 6 段階のクロマトグラフィー操作によりフラビンレダクターゼを 2,400 倍に精製した。SDS-PAGE において 1 本のメインバンドと数本のマイナーバンドが検出されたが、各精製段階において比活性の増大に伴ってメインバンドが濃くなることを確認したため、これをフラビンレダクターゼに相当するバンドと推定した。そこで、メインバンドに相当するタンパク質をゲルから切り出して N 末端および内部アミノ酸配列を決定し、それぞれ SAIDLSPSTLREAFGFPSDGV および LRLDPALGISVLGEAHDVAART であることを明らかにした。これらのアミノ酸配列は *M. tuberculosis*³⁾ および *M. leprae*⁴⁾ の推定上のフラビンレダクターゼと約 70% の相同性を示したため、メインバンドに相当するタンパク質がフラビンレダクターゼであることが強く示唆された。

5.2.2. *M. phlei* WU-F1 由来フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニング

決定したアミノ酸配列に基づいて、2 つの縮重プライマー 5'-GCI TTY GGI CAY TTY CC-3' および 5'-GCI ACR TCR TGI GCY TC-3' (I, イノシン; Y, C+T; R, A+G) を設計し、*M. phlei* WU-F1 の全 DNA を鋳型として PCR を行った。得られた 0.2 kb の PCR 産物を pGEM-T ベクターに連結し塩基配列を解析したところ、この PCR 産物の推定アミノ酸配列は *M. tuberculosis*³⁾ および *M. leprae*⁴⁾ の推定上のフラビンレダクターゼと約 80% の相同性を示し、さらに 2 成分型モノオキシゲナーゼ⁴⁾ における数種のフラビンレダクターゼとも相同性を示した。つぎに、増幅された領域の塩基配列に基づいて、2 つのオリゴヌクレオチドプライマー 5'-GGC GTG ATC GCC ATC GCC-3' と 5'-GAG CAC ACT GAT CCC CAG-3' を設計し、*M. phlei* WU-F1 の全 DNA を鋳型として再度 PCR を行った。得られた PCR 産物をジオキシゲニンにより標識し、DNA プローブとして用いた。

M. phlei WU-F1 の DNA ライブラリーは、全 DNA を *Pst*I で消化後、約 1.5 kb の断片を *Pst*I で消化した pUC118 ベクターに連結し、大腸菌 DH5α に導入することにより作製した。DNA プローブを用いて、約 1,200 のコロニーから成る *M. phlei* WU-F1 の DNA ライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションを行った。その結

果、3つのポジティブクローンが得られ、*M. phlei* WU-F1 由来フラビンレダクターゼを保持する候補株として選択した。

pUC118 ベクターに連結された DNA 断片の塩基配列を決定し、3つのポジティブクローンでインサートの塩基配列が一致することを明らかにした。組換えプラスミド (pUCfrm) のインサートは約 1.4 kb の完全なオープンリーディングフレーム (ORF) を含んでいた。この ORF は 162 アミノ酸残基からなる分子量 17,177 のタンパク質をコードしており、Fig. 5.1 に示すように、その推定アミノ酸配列はゲノム配列プロジェクトにより同定されている *M. tuberculosis* の推定上のフラビンレダクターゼ Rv0245³⁾ および *M. leprae* の推定上のフラビンレダクターゼ ML2561⁴⁾ とそれぞれ 79% および 75% の相同性を示した。さらに、2 成分型モノオキシゲナーゼ⁵⁾ における数種のフラビンレダクターゼと約 30% の相同性を示し、保存領域を共有することが明らかとなった。そこで、この ORF を *M. phlei* WU-F1 のフラビンレダクターゼに対して *frm* と命名した。

5.2.3. *frm* の大腸菌における発現

pUCfrm を保持する組換え大腸菌 DH5 α ではフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* の発現は観察されなかった。*M. phlei* WU-F1 のリボソーム結合部位は大腸菌内では認識されにくい可能性があるため、*frm* を T7 プロモーターの支配下で発現させた。すなわち、*Frm* を pUCfrm から PCR により増幅して pET21-a ベクターに連結し、得られた組換えプラスミド pETfrm を大腸菌 BL21 (DE3) に導入して IPTG 存在下で高発現させた。Table 5.3 に示すように、pETfrm を保持する組換え大腸菌の無細胞抽出液を用いて、*Frm* がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した。組換え大腸菌の比活性は 127 U/mg に達し、原株 *M. phlei* WU-F1 (0.16 U/mg) より約 794 倍高い値となった。

5.2.4. *frm* と *bdsABC* を共発現させた組換え大腸菌の DBT 脱硫活性

frm と DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* を別々のプラスミドに連結することにより大腸菌内で共発現された。すなわち、pSTVfrm (*frm* を pSTV28 ベクターに連結したもの) および pKBDS (*bdsABC* を pKK223-3 ベクターに連結したもの) をともに大腸菌 DH5 α に導入して IPTG 存在下で高発現させた。Fig. 5.2 に示すように、*frm* および *bdsABC*

をともに保持する組換え大腸菌 DH5 α (pSTVfrm and pKBDS)の休止菌体は 20°Cから 55°Cの広範な温度条件下で高い DBT 脱硫活性を示した。組換え大腸菌 DH5 α (pSTVfrm and pKBDS)の DBT 分解活性は 50°Cで最大値 1.13 nmol min⁻¹ mg-drycell⁻¹に達し、同温度における *bdsABC* のみを保持する組換え大腸菌 DH5 α (pKBDS)より約 7 倍高い値となった。これより、*frm* を *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。

Table 5.1. Expression of the flavin reductase gene *frm* in *E. coli*.

Strain	Specific activity (U/mg) ^a
<i>E. coli</i> (pETfrm)	127
<i>E. coli</i> (pET21-a)	0.57
<i>M. phlei</i> WU-F1	0.16

^a Flavin reductase activity was determined at 50°C with NADH as an electron donor and FMN as an electron acceptor. One unit of activity is defined as the amount of enzyme necessary to oxidize 1 µmol of NADH per min ($\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Mp_Frm	1	-----MSAIDLSPSTLREAFGHIPSGVIAIAAEVE-GVRVGL	36
Af_FeR	1	-----MDVEAFYKISYGLYIVTISESN-GRKCCQ	27
Mt_Rv0245	1	-----MNSTNNLTPSSLREAFGHIPSGVIAIAAEVD-GVROGL	37
Mt_Rv1939	1	-----MSCTFDMVPETVDHLDEVGLRVFGCTPCGVIAVCAMVD-DQPVOM	45
Mt_Rv3567c	1	-----MSAQIDPRTFISVLGQCTGCTITVITTVHD-DVPVEF	35
Ml_ML2561	1	-----MRAMNSLTPSLLEDAFGHIPSGVIAIAAEVE-GVREGL	37
Re_DszD	1	MSDKPNAVSSHTTPDVPEVAATPELSTGICAGDYIAALRRHPAGVTVVILDSGTG-PVCF	59
Sp_SnaC	1	-----MTGADDPARPVGPQSFIDAMAQLASPTTVVTVLDAARRHCF	43
Sc_ActVB	1	-----MAADQGMLEDA MARVPAGVALVTAHDRGCVPHCF	34
Ec_HpaC	1	-----MQLDEQRLRFIDAMASLSAAVNIITTGDAQ-CEI	35
Ps_StyB	1	-----MTLKKDMAVDIDSTNFOAVALATGIAVLSATTEEGDVHEM	42
Bt_PheA2	1	-----MDDRLEFNAMGKATGTVITITELN-GAVHEM	31

Mp_Frm	37	AASTVVPVSEPPVNSFVQNTETWPKLRDLPALGISVIGLAHDVAARTLAAKTG----	92
Af_FeR	28	IANTVFQLTSKEVQIAVCLNKENDTHNAVKEGSAFGVAVDELETPEMFIGRFGFRKSSEF	87
Mt_Rv0245	38	AASTVVPVSEPPVNSFVQNTETWPKLTGVPMLGISVIGLAHDAAVRTLAAKTG----	93
Mt_Rv1939	46	AASSTVSVVDPPVNSIQVQNCETWPKLRDRPRLGVVLAAGHDAACMSLSRKEG----	101
Mt_Rv3567c	36	ACQSAALAEPPVNSLFPKTVRSWQAEASGRFCNMLTKQKDV SARFGSKEP----	91
Ml_ML2561	38	AASTVVPVSEPPVNSFVQNVETWCLKKAVPMLGISVIGLVHDEVACTLTKHG----	93
Re_DszD	60	TATSSEVSEPPVNSFNIAETSSINALKAAESLVIHLGHHQHLAQRFRSAD----	115
Sp_SnaC	44	TGGSVVAVNDPPVNVGIALTSCHTAMAAAAEFCVITIGDQRAVAKRCATHGA----	99
Sc_ActVB	35	TASSVVAEMEPHALVELARTANSFPVFDSCGEFAPVDRDHTDLAMRFARKSA----	90
Ec_HpaC	36	TATVCAITDTPHSLMVINANAMNPVFQNGKLCMYUNHEQELMARHFGMTGMAME	95
Ps_StyB	43	TVNSTTITLDPPTVMVSL-KSGRMHELLTQGGRFGLILGLSQKVFSAFFSKRAM----	97
Bt_PheA2	32	TANA MGVSLNEKIVLVSIGEKAKMLEKIQQSKKYAVNIISQDKVLSMNFAGQL----	86

Mp_Frm	93	IRFAGLETVSRDS-CALFIEGTSVWLES-SVEQLVPAGDHTIVILRLDITMNEVAVIV	150
Af_FeR	88	EKPDGVEYKTGKT-GVPLVTOHAVAVIEAKVKECDVETHTLFVGEAVDAEVLKDAEVLIT	146
Mt_Rv0245	94	IRFAGLETVSNDACAVFIKGTSLWLESA-IEQLVPAGDHTIVVLRINQVKVDPNVAVIV	151
Mt_Rv1939	102	NRFAGVFWSELSS-CGVVIAAGAWLDC-RPYAEIPAGDHTILALLEICAVRADPETPLV	159
Mt_Rv3567c	92	IRFAGID-WRPSELASTIEGSLAYIDC-TVASVHDGSDHFVVFGEESLSEVPAVKER-	148
Ml_ML2561	94	IRFAGLETVSNDTCAVFIKGTSLWLESA-IEQLIPAGDHTIVVLRISQVTVDPDVAVIV	151
Re_DszD	116	QVVADESILWAVLDTIEVVLHGTPSWMRV-KVDQLIPVAGDHTLVIGLITRVHAEEDDESAA	174
Sp_SnaC	100	IRFAGGEFAAWDGTVPYLPDAKVILRC-RTTDVVRAAGDHLVLGTVEIRTGDPAKPEPL	158
Sc_ActVB	91	IRFAGGEFVRT-ARGATVLDCAVAVVEC-TIHERYPAGDHTIILLGEVQSVHVEEKGVAV	148
Ec_HpaC	96	IRFSLSC-WQKGPLAQVVKSLASLEG-EIRDVQAITHLVYLVEIKNIILSAEGHGLI	153
Ps_StyB	98	EDTPPPAFTIQA-GLPTLQAMAWFEC-EVESTVQVHGHILFIARVSACGTPEANAFQ-	153
Bt_PheA2	87	EKPVVDVQFEELG-GLFVIKDALAQISC-QVNEVQAGDHTLFIGETDIKITEQD----	139

Mp_Frm	151	FHRSTERRLGTA-----	162
Af_FeR	147	YADYHLMKKGKTERTATVYFESK-----	169
Mt_Rv0245	152	FHRSVLRRLGV-----	162
Mt_Rv1939	160	FHGSRERRLESR-----	171
Mt_Rv3567c	149	-PLLFYRGDYTGIEPEKTTPAHWRDDLEAFLLITTTQDTWL-----	187
Ml_ML2561	152	FHRSMERRLGF-----	162
Re_DszD	175	APLLYHEGKYRPTPLGQ-----	192
Sp_SnaC	159	LWYRRDFHTPTPTPALA-----	176
Sc_ActVB	149	YVDRRTAALCSAAGACPSATGRGVPAHAG-----	177
Ec_HpaC	154	YFKRRHPVMLEMEAAI-----	170
Ps_StyB	154	-PLLFTASRYHSNPLPLN-----	170
Bt_PheA2	140	-PLLFTSGKYHQLAQNEKVTSS-----	161

Fig. 5.1. Multiple sequence alignment of the flavin reductases related to Frm. Black shading indicates identical residues in all the members. Gray shading indicates identical residues in more than seven members. Asterisk indicates the position of the cysteine residue of Frm. Mp_Frm, flavin reductase involved in DBT desulfurization from *M. phlei* WU-F1 (accession number AB125068); Af_FeR, ferric reductase of *Archaeoglobus fulgidus* (AE001047); Mt_Rv0245, hypothetical flavin reductase of *M. tuberculosis* (AL021929); Mt_Rv1939, hypothetical flavin reductase of *M. tuberculosis* (Z84498); Mt_Rv3567c, hypothetical flavin reductase of *M. tuberculosis* (Z92774); Ml_ML2561, hypothetical flavin reductase of *M. leplae* (AL583926); Re_DszD, flavin reductase involved in DBT desulfurization from *Rhodococcus erythropolis* (AB051429); Sp_SnaC, flavin reductase involved in pristinamycin II_A biosynthesis from *Streptomyces pristinaespiralis* (U21216); Sc_ActVB, flavin reductase involved in actinorhodin biosynthesis from *S. coelicolor* (X63449); Ec_HpaC, flavin reductase component of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *E. coli* (Z29081); Ps_StyB, flavin reductase component of styrene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. (AJ000330); Bt_PheA, flavin reductase component of phenol hydroxylase from *Bacillus thermoleovorans* (AF140605).

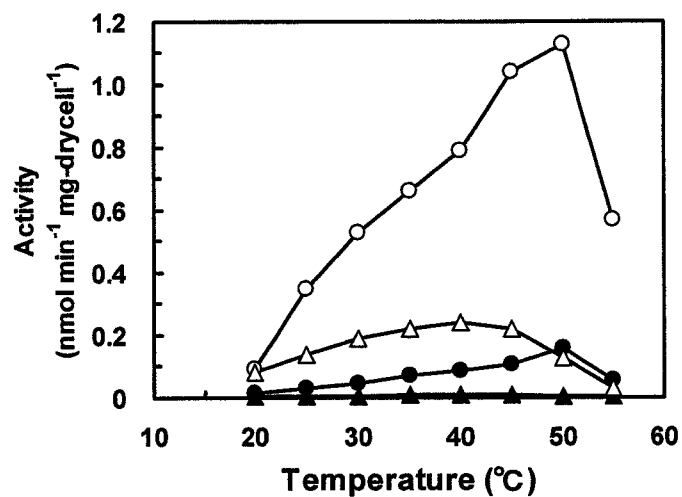


Fig. 5.2. Coexpression of the flavin reductase gene *frm* with the DBT-desulfurization genes *bdsABC* in *E. coli*. The reaction mixture contained 11 μ l of a 10 g/l DBT stock solution in *n*-tridecane and 0.6 ml of the cell suspension in a 10 ml screw-cap test tube to give a final concentration of 0.5 mM DBT. Resting cell reactions were performed with inverted shaking at 50 rpm for 30 min. Symbols: ○ and △, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of the recombinant *E. coli* carrying both *frm* and *bdsABC*, respectively; ● and ▲, DBT-degrading and 2-HBP-producing activities of the recombinant *E. coli* carrying only *bdsABC*, respectively.

5.3. 考察

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 からコロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。*M. phlei* WU-F1 から部分精製したフラビンレダクターゼの N 末端および内部アミノ酸配列をもとに DNA プローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を取得した。さらに、大腸菌を宿主として発現させることによりこの遺伝子産物 Frm がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した (Table 5.1)。

Frm の推定アミノ酸配列は HpaC⁶⁾、StyB⁷⁾、PheA2⁸⁾、SnaC⁹⁾などの 2 成分型モノオキシゲナーゼにおける数種のフラビンレダクターゼと約 30%の相同性を示し、保存領域を共有することが明らかとなった (Fig. 5.1)。また、Frm は超好熱性始原菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 3 価鉄還元酵素 FeR^{10,11)}とも保存領域を共有することが明らかとなった (Fig. 5.1)。FeR は NAD(P)H を電子供与体として Fe³⁺-EDTA の還元を触媒し、反応には FMN または FAD を要求する。さらに、この酵素は Fe³⁺-EDTA 非存在下で NAD(P)H を電子供与体として FMN および FAD の還元を触媒したことが報告されている¹⁰⁾。最近、組換え大腸菌由来 FeR が結晶化され 3 次元構造が明らかにされた¹²⁾。FeR の His126 は Fig. 5.1 に示すすべてのホモログで保存されているが、His126 は NADP⁺と相互作用することが明らかにされており、このことから Frm の His130 は NADP⁺との結合に関与していることが示唆された。

一方、Frm はただ 1 つのシステイン残基 Cys54 を含んでいるが、Frm の活性はチオール試薬により強く阻害されることから (データ省略)、Cys54 が活性に関与している可能性がある。さらに、Frm の Cys54 は FeR の Cys45 は対応するが、Cys45 は FMN と相互作用することが明らかにされており、このことから Frm の Cys54 は FMN との結合に関与していることが示唆された。

frm を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下 (20-55°C) において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした (Fig. 5.2)。*frm* と *bdsABC* をともに保持する組換え大腸菌の DBT 分解活性は 50°C で最大値 1.13 nmol min⁻¹ mg-drycell⁻¹ に達し、同温度における *bdsABC* のみを保持する組換え大腸菌より約 7 倍高い値となった。第 4 章で、フラビンレダクターゼ遺伝子 *frb* を *B. subtilis* WU-S2B からクローニングし、*frb* を *bdsABC* と共発現させることによ

り、広範な温度条件下（20-55℃）において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。しかしながら、*frm* の推定アミノ酸配列は *frb* と相同性を示さず、これらの酵素は異なるフラビンレダクターゼのファミリーに属していることが示唆された。以上の結果より、広範な温度条件下で高い脱硫活性を実現するためには、*bdsABC* および *frm*（または *frb*）の両方が不可欠なことを明らかにした。もともと脱硫能力のない大腸菌に *bdsABC* および *frm*（または *frb*）を導入することにより高い脱硫能力を付与できたことから、*bdsABC* とともに *frm*、*frb* はバイオ脱硫に対する有用な遺伝子資源であることが示唆された。

5.4. まとめ

本章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 からコロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。*M. phlei* WU-F1 から部分精製したフラビンレダクターゼの N 末端および内部アミノ酸配列をもとに DNA プローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を取得した。さらに、大腸菌を宿主として発現させることによりこの遺伝子産物 Frm がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した。Frm の推定アミノ酸配列は 2 成分型モノオキシゲナーゼにおける数種のフラビンレダクターゼと約 30% の相同性を示し、保存領域を共有することが明らかとなった。さらに、*frm* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下 (20-55°C) において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。また、*frm* の推定アミノ酸配列は *B. subtilis* WU-S2B 由来 *frb* と相同性を示さず、これらの酵素は異なるファミリーのフラビンレダクターゼに属していることが示唆された。以上の結果より、広範な温度条件下で高い脱硫活性を実現するためには、*bdsABC* および *frm* (または *frb*) の両方が不可欠なことを明らかにした。もともと脱硫能力のない大腸菌に *bdsABC* および *frm* (または *frb*) を導入することにより高い脱硫能力を付与できたことから、*bdsABC* とともに *frm*、*frb* はバイオ脱硫に対する有用な遺伝子資源であることが示唆された。

5.5. 参考文献

1. Ohshiro, T., and Izumi, Y.: Desulfurization of fossil fuels, in: G. Bitton (Eds.), Encyclopedia of environmental microbiology, vol. II, Wiley and Sons, New York, pp. 1041-1051 (2002).
2. Matsubara, T., Ohshiro, T., Nishina, Y., and Izumi, Y.: Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1179-1184 (2001).
3. Cole, S. T., et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, 393, 537-544 (1998).
4. Cole, S. T., et al.: Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature, 409, 1007-1011 (2001).
5. Tu, S.-C.: Reduced flavin: donor and acceptor enzymes and mechanisms of channeling. Antioxid. Redox Signal., 3, 881-897 (2001).
6. Galán, B., Díaz, E., Prieto, M. A., and García, J. L.: Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. J. Bacteriol., 182, 627-636 (2000).
7. O'Leary, N. D., O'Connor, K. E., and Dobson, A. D. W.: Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. FEMS Microbiol. Rev., 26, 403-417 (2002).
8. Kirchner, U., Westphal, A. H., Müller, R., and van Berkel, W. J. H.: Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7: a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. J. Biol. Chem., 278, 47545-47553 (2003).
9. Thibaut, D., Ratet, N., Bisch, D., Faucher, D., Debussche, L., and Blanche, F.: Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D-proline residue of pristinamycin II_B during the last step of pristinamycin II_A biosynthesis. J. Bacteriol., 177, 5199-5205 (1995).
10. Vadas, A., Monbouquette, H. G., Johnson, E., and Schröder, I.: Identification and characterization of a novel ferric reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. J. Biol. Chem., 274, 36715-36721 (1999).

11. Schröder, I., Johnson, and de Vries, S: Microbial ferric ion reductases. FEMS Microbiol. Rev., 27, 427-447 (2003).
12. Chiu, H.-J., Johnson, E., Schröder, I., and Rees, D. C.: Crystal structures of a novel ferric reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus* and its complex with NADP⁺. Structure, 9, 311-319 (2001).

第6章 好熱性ジベンゾチオフエン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 の 遺伝子増幅による活性の強化

6.1. 緒言

バイオ脱硫は金属触媒を用いた水素化脱硫と比較して、より穏和な条件下でジベンゾチオフエン (DBT) およびその誘導体などの難脱硫性化合物を選択的に除去可能とする有望な技術である¹⁾。筆者らは、好熱性 DBT 脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 を取得し、50℃の高温域を含む広範な温度条件下で DBT およびその誘導体を効率的に脱硫可能なことを明らかにした (第1章)。さらに、*M. phlei* WU-F1 から DBT 脱硫遺伝子 (*bdsABC*、第3章) およびフラビンレダクターゼ遺伝子 (*frm*、第5章) をクローニングした。

M. phlei WU-F1 は高温条件下で水素化脱硫処理された軽油も効率的に脱硫可能であるが (第2章)、バイオ脱硫では水素化脱硫に匹敵する反応速度が望まれるため、実用化へ向けて脱硫活性を強化することが不可欠である^{2,3)}。

本章では、*M. phlei* WU-F1 の形質転換系を確立し、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を *M. phlei* WU-F1 に新たに導入して遺伝子増幅により脱硫活性を強化した。

6.2. 結果

6.2.1. *Mycobacterium-Escherichia coli* シャトルベクターの構築

M. phlei WU-F1 の形質転換に選択マーカーとして利用可能な抗生物質を検討し、この細菌はハイグロマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンに対して十分な感受性を示したため、これらの抗生物質を選択マーカーとして用いた。そこで、*M. phlei* WU-F1 の形質転換に利用可能な *Mycobacterium-E. coli* シャトルベクターを構築した。Table 6.1 に示すように、*Rhodococcus* 属細菌由来のプラスミド複製領域を利用したシャトルベクター pRHH、pRHKT、pRH45Ω、pRH45Ωhyg、および *Mycobacterium* 属細菌由来のプラスミド複製領域を利用したシャトルベクター pUALS、pUALH を構築し、これらを用いてエレクトロポレーション法により *M. phlei* WU-F1 の形質転換を試みた。その結果、Fig. 6.1 に示す pUALS を用いた場合に形質転換体を得られ、その形質転換効率は約 40 cfu/μg DNA であった。得られた形質転換体からアルカリ SDS 法等によりプラスミドの抽出を試みたが、アガロースゲル電気泳動においてプラスミドは検出されなかった。そこで、*E. coli* とのエレクトロダクション法により間接的にその存在を確認し、エレクトロダクション後の *E. coli* から抽出したプラスミドの大きさおよび制限酵素切断パターンが pUALS と一致したことから、pUALS を用いて *M. phlei* WU-F1 を形質転換可能なことが明らかとなった。

6.2.2. *M. phlei* WU-F1 の遺伝子増幅による脱硫活性の強化

M. phlei WU-F1 の脱硫活性を遺伝子増幅により強化するため、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を構築した *Mycobacterium-E. coli* シャトルベクター pUALS に連結して WU-F1 に導入し、各遺伝子のコピー数を増大させた。pUALS に *bdsABC*、*frm*、および *bdsABC* と *frm* の両方を連結した組換えプラスミド（それぞれ pUALSABC、pUALSD および pUALSABCD）を用いて *M. phlei* WU-F1 を形質転換し、得られた組換え株の DBT 脱硫活性を休止菌体反応により検討した。Fig. 6.2 に示すように、45℃の高温条件下で、*bdsABC* のみを導入した組換え株 WU-F1/pUALSABC は原株 *M. phlei* WU-F1 の 2.1 倍、*frm* のみを導入した組換え株 WU-F1/pUALSD は 1.9 倍、さらに *bdsABC* と *frm* の両方を導入した組換え株 WU-F1/pUALSABCD は 2.2 倍の DBT 脱硫活性を示した。

Table 6.1. Vectors used for this study.

Plasmids	Relevant properties	Source
pRHK1	<i>Rhodococcus-E. coli</i> shuttle vector, pRC4 ori, ColE1 ori, Km ^r , 5.3 kb	JCCP
pRHH	pRHK1 derivative, Hyg ^r , 6.1 kb	JCCP
pRHKT	pRHK1 derivative, Tc ^r , 8.3 kb	This work
pHP45Ω	pHP45 derivative, carries ΩSm ^r cassette, Amp ^r , 4.4 kb	NIG
pHP45Ωhyg	pHP45 derivative, carries ΩHyg ^r cassette, Amp ^r , 4.7 kb	NIG
pRH45Ω	pRHK1 derivative, Sm ^r , 6.8 kb	This work
pRH45Ωhyg	pRHK1 derivative, Hyg ^r , 7.2 kb	This work
pMSC1	<i>Mycobacterium-E. coli</i> shuttle cosmid vector, pAL5000 ori, Km ^r , Amp ^r , 13.1 kb	NCIMB
pUC19	ColE1 ori, Amp ^r , 2.7kb	Takara Bio
pUALS	pAL5000 ori, ColE1 ori, Sm ^r , 6.5 kb	This work
pUALH	pAL5000 ori, ColE1 ori, Hyg ^r , 6.1 kb	This work

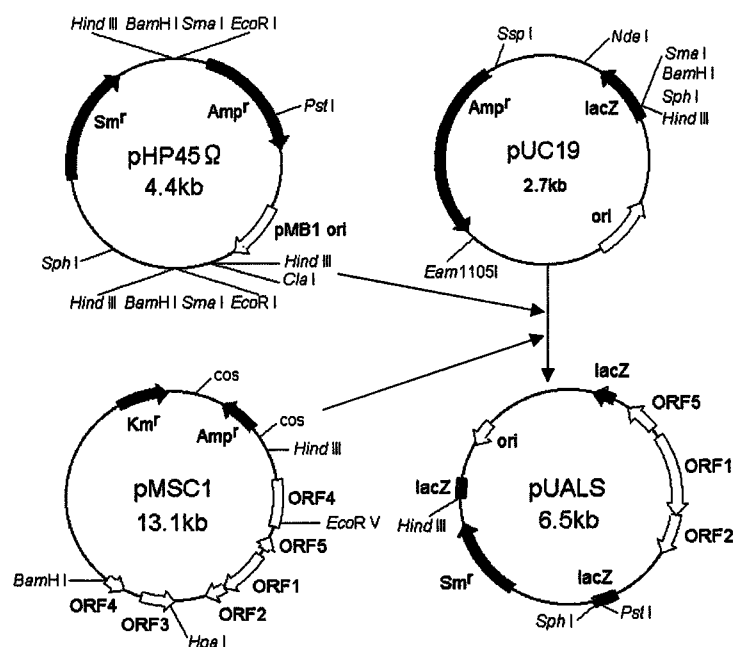


Fig 6.1. Construction of a *Mycobacterium-E. coli* shuttle vector, pUALS.

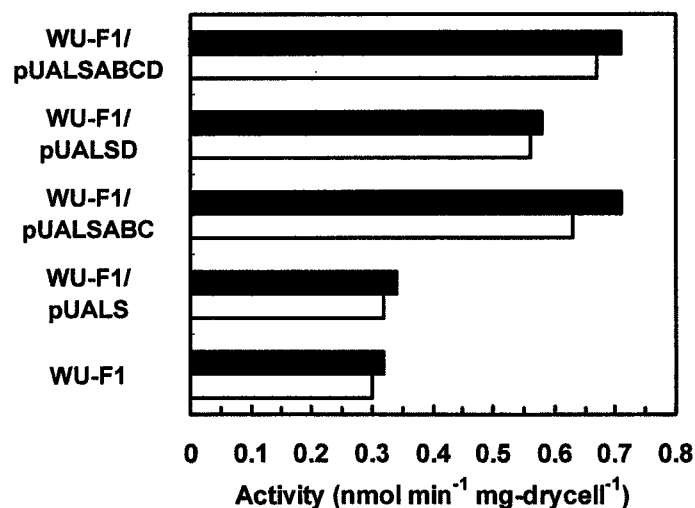


Fig. 6.2. DBT-desulfurizing activities of recombinant *M. phlei* WU-F1 strains. The reaction mixture contained 0.6 ml of the cell suspension, 0.81 mM DBT, and 9 μ l *n*-tridecane. The resting cell reaction was performed at 45°C. Closed bars, DBT-degrading activities; open bars, 2-hydroxybiphenyl-producing activities.

6.3. 考察

本章では、*M. phlei* WU-F1 の形質転換系を確立し、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を WU-F1 に新たに導入して遺伝子増幅により脱硫活性を強化した。*Rhodococcus* 属細菌由来のプラスミド複製領域を利用したシャトルベクター pRHH、pRHKT、pRH45Ω、pRH45Ωhyg、および *Mycobacterium* 属細菌由来のプラスミド複製領域を利用したシャトルベクター pUALS、pUALH を構築し、これらを用いてエレクトロポレーション法により *M. phlei* WU-F1 の形質転換を試みた (Table 6.1)。その結果、pUALS を用いた場合に形質転換体を得られた (Fig 6.1)。他のプラスミドを用いた場合には形質転換体を得られなかったが、その理由として抗生物質耐性遺伝子またはプラスミド複製領域が機能しなかったことが考えられる。得られた形質転換体からアルカリ SDS 法等により pUALS の抽出を試みたが検出できなかったため、*E. coli* とのエレクトロダクション法により間接的にその存在を確認した。これより、pUALS は *M. phlei* WU-F1 内において低コピーで存在することが示唆された。

M. phlei WU-F1 の脱硫活性を遺伝子増幅により強化するため、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を構築した *Mycobacterium-E. coli* シャトルベクター pUALS に連結して WU-F1 に導入し、各遺伝子のコピー数を増大させた。45℃の高温条件下で、*bdsABC* のみを導入した組換え株は原株 *M. phlei* WU-F1 の 2.1 倍、*frm* のみを導入した組換え株は 1.9 倍、さらに *bdsABC* と *frm* の両方を導入した組換え株は 2.2 倍の DBT 脱硫活性を示した (Fig 6.2)。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 の脱硫活性を *bdsABC* および *frm* の遺伝子増幅により強化可能なことを明らかにした。しかしながら、*bdsABC* と *frm* の両方を導入することによる相乗効果は見られなかった。これより、脱硫活性の強化にはこれらの遺伝子の発現のバランスが重要なこと、また、DBT の菌体内への取り込み、酸素の供給、補酵素の再生などが律速となっている可能性が示唆された。これまでに、*Rhodococcus* 属細菌等の常温性 DBT 脱硫細菌の脱硫活性を遺伝子増幅により強化した例は報告されているが^{4,5)}、本研究は好熱性 DBT 脱硫細菌の遺伝子工学による育種に関する最初の報告例である。

6.4. まとめ

本章では、*M. phlei* WU-F1 の形質転換系を確立し、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を WU-F1 に新たに導入して遺伝子増幅により脱硫活性を強化した。DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を構築した *Mycobacterium-E. coli* シャトルベクター pUALS に連結して WU-F1 に導入し、各遺伝子のコピー数を増大させた。45℃の高温条件下で、*bdsABC* のみを導入した組換え株は原株 *M. phlei* WU-F1 の 2.1 倍、*frm* のみを導入した組換え株は 1.9 倍、さらに *bdsABC* と *frm* の両方を導入した組換え株は 2.2 倍の DBT 脱硫活性を示した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 の脱硫活性を *bdsABC* および *frm* の遺伝子増幅により強化可能なことを明らかにした。本研究は好熱性 DBT 脱硫細菌の遺伝子工学による育種に関する最初の報告例である。

6.5. 参考文献

1. Ohshiro, T., and Izumi, Y.: Desulfurization of fossil fuels, in: G. Bitton (Eds.), Encyclopedia of environmental microbiology, vol. II, Wiley and Sons, New York, pp. 1041-1051 (2002).
2. McFarland, B. L.: Biodesulfurization. Curr. Opin. Microbiol., 2, 257-264 (1999).
3. Monticello, D. J.: Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. Curr. Opin. Biotechnol., 11, 540-546 (2000).
4. Folsom, B. R., Schieche, D. R., DiGrazia, P. M., Werner, J., and Palmer, S.: Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. Appl. Environ. Microbiol., 65, 4967-4972 (1999).
5. Hirasawa, K., Ishii, Y., Kobayashi, M., Koizumi, K., and Maruhashi, K.: Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 239-246 (2001).

本研究では、現行の石油精製工程を補完する新規な技術の開発を目的として、バイオ脱硫に関する研究を実施した。すなわち、石油（とくに軽油）の脱硫に使用可能な生体触媒を開発するために2種類の好熱性脱硫細菌を単離し、それぞれの脱硫機能を細胞レベルならびに遺伝子レベルで解析するとともに、実際の軽油に対する脱硫試験を行い、性能評価を行った。

第1章では、新規な好熱性ジベンゾチオフェン（DBT）脱硫細菌として *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 を単離し、DBT およびその誘導体に対する脱硫活性を評価した。水素化脱硫直後の高温状態にある軽油にバイオ脱硫を適用することを想定すると、好熱性 DBT 脱硫細菌の方が常温性のものより実用的である。そこで、50℃の高温条件下で DBT を唯一の硫黄源として増殖可能な微生物を探索し、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌として *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 を単離した。*M. phlei* WU-F1 は高温条件下で DBT 脱硫活性を示すコリネ型細菌として最初の報告例である。これらの細菌は炭素－硫黄結合を選択的に切断する代謝経路で DBT を脱硫することを明らかにした。また、DBT 誘導体に対する脱硫活性について検討し、両株とも 50℃で DBT のみならずアルキル置換基を有する 2,8-ジメチル DBT および 4,6-ジメチル DBT も効率的に脱硫可能なことを明らかにした。さらに、DBT 脱硫の温度依存性について検討し、これらの細菌は 50℃の高温域を含む広範な温度条件下（20-50℃）で DBT を効率的に脱硫可能なことを明らかにした。とくに、*M. phlei* WU-F1 は他の DBT 脱硫細菌より高い DBT 脱硫活性を示した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 はバイオ脱硫に対する有望な生体触媒であることが示唆された。

第2章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し、油水二相系で水素化脱硫処理された軽油に対する脱硫活性を評価した。*M. phlei* WU-F1 の増殖菌体は 50℃の高温域を含む広範な温度条件下（30-50℃）で水素化脱硫処理された軽油を効率的に脱硫可能なことを明らかにした。さらに、*M. phlei* WU-F1 を生体触媒として利用し油水二相系（oil/water=1/1(v/v)）でバイオ脱硫を行

った場合、45℃で F-LGO を 120 ppm から 50 ppm に、B-LGO を 390 ppm から 100 ppm に、X-LGO を 34 ppm から 15 ppm にまで脱硫可能なことを明らかにした。GC-AED 分析により、4-メチル DBT、4,6-ジメチル DBT、3,4,6-トリメチル DBT などのアルキル DBT 類に相当するピークがバイオ脱硫後著しく減少していることを確認した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により金属触媒を用いた水素化脱硫だけでは到達困難な濃度領域にまで軽油を脱硫可能なことを明らかにした。とくに、日本や欧米では 2006 年前後に軽油中の硫黄濃度規制が 15 ppm 以下にまで強化されることが予想されているため、*M. phlei* WU-F1 を用いたバイオ脱硫により 15 ppm 以下を達成できたことは実用的にも意義深い。

第 3 章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 からプラークハイブリダイゼーション法により DBT 脱硫遺伝子をクローニングし、脱硫機能を遺伝子レベルで解析した。塩基配列解析により、*B. subtilis* WU-S2B と *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子の塩基配列は完全に一致することを明らかにした。*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 由来 DBT 脱硫遺伝子は 3 つの遺伝子 *bdsA*、*bdsB*、*bdsC* からなる 1 つのオペロンを形成しており、大腸菌における発現試験により、*bdsABC* は DBT を DBTO₂ と HBPSi を経由して 2-HBP に脱硫する酵素群をコードしていることを確認した。*bdsABC* を保持する組換え大腸菌は 52℃の高温域を含む広範な温度条件下 (30-52℃) で脱硫活性を示し、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 と類似する温度依存性を示した。このことは、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 の広範な温度条件下で DBT を脱硫可能な性質は DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* により付与されていることを示しており、また、もともと脱硫能力のない大腸菌に *bdsABC* を導入することにより脱硫能力を付与できたことから、*bdsABC* はバイオ脱硫に対する有用な遺伝子資源であることが示唆された。

第 4 章では、インジゴ生成を指標とした共発現スクリーニング法により好熱性 DBT 細菌 *B. subtilis* WU-S2B からフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。*B. subtilis* WU-S2B 由来 DBT-モノオキシゲナーゼ遺伝子 *bdsC* と好熱性 DBT 脱硫細菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 由来フラビンレダクターゼ遺伝子 *tdsD* を共発現する大腸菌は LB 固体培地上に青色コロニーを形成することを確認した。そこで、*B. subtilis* WU-S2B 由来フラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングするために、当該遺伝子の *bdsC* との共発現によるインジゴ生成を指標

として応用した。この方法を用いて、LB 固体培地上にインジゴ生成による青色コロニーを形成する組換え株からフラビンレダクターゼ遺伝子 *frb* を取得し、大腸菌を宿主として発現させることによりこの遺伝子産物 Frb がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した。さらに、*frb* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下（20-55℃）において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。本研究において考案した共発現スクリーニング法は、フラビン依存性モノオキシゲナーゼと効率的に共役する新規フラビンレダクターゼ遺伝子のクローニングに広く応用可能と考えられる。さらに、試験管内においてフラビンレダクターゼ活性が低いもしくはないためにその活性の検出が困難な新規フラビン依存性モノオキシゲナーゼを、フラビンレダクターゼ遺伝子との共発現により取得できる可能性が示唆された。

第5章では、好熱性 DBT 脱硫細菌 *M. phlei* WU-F1 からコロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を遺伝子レベルで解析した。*M. phlei* WU-F1 から部分精製したフラビンレダクターゼの N 末端および内部アミノ酸配列をもとに DNA プローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーション法によりフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を取得した。さらに、大腸菌を宿主として発現させることによりこの遺伝子産物 Frm がフラビンレダクターゼ活性を示すことを確認した。Frm の推定アミノ酸配列は 2 成分型モノオキシゲナーゼにおける数種のフラビンレダクターゼと約 30% の相同性を示し、保存領域を共有することが明らかとなった。さらに、*frm* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させることにより、広範な温度条件下（20-55℃）において DBT 脱硫活性が飛躍的に向上することを明らかにした。また、*frm* の推定アミノ酸配列は *B. subtilis* WU-S2B 由来 *frb* と相同性を示さず、これらの酵素は異なるファミリーのフラビンレダクターゼに属していることが示唆された。以上の結果より、広範な温度条件下で高い脱硫活性を実現するためには、*bdsABC* および *frm*（または *frb*）の両方が不可欠なことを明らかにした。もともと脱硫能力のない大腸菌に *bdsABC* および *frm*（または *frb*）を導入することにより高い脱硫能力を付与できたことから、*bdsABC* とともに *frm*、*frb* はバイオ脱硫に対する有用な遺伝子資源であることが示唆された。

第6章では、*M. phlei* WU-F1 の形質転換系を確立し、DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を WU-F1 に新たに導入して遺伝子増幅により

脱硫活性を強化した。DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* およびフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を構築した *Mycobacterium-E. coli* シャトルベクター pUALS に連結して WU-F1 に導入し、各遺伝子のコピー数を増大させた。45℃の高温条件下で、*bdsABC* のみを導入した組換え株は原株 *M. phlei* WU-F1 の 2.1 倍、*frm* のみを導入した組換え株は 1.9 倍、さらに *bdsABC* と *frm* の両方を導入した組換え株は 2.2 倍の DBT 脱硫活性を示した。以上の結果より、*M. phlei* WU-F1 の脱硫活性を *bdsABC* および *frm* の遺伝子増幅により強化可能なことを明らかにした。本研究は好熱性 DBT 脱硫細菌の遺伝子工学による育種に関する最初の報告例である。

本研究で得られた成果は、バイオ脱硫の分子基盤となる研究成果であり、生物工学をはじめとして応用生物化学の分野において基礎と応用の両面にわたる新規かつ独創的な内容と確信している。