

Sphingopyxis 属細菌によるポリエチレングリコール (PEG) 分解機構

谷 明生*・河合富佐子

ポリエチレングリコール (PEG) は潤滑油や非イオン性界面活性剤として大量に用いられている他、身近なところでは口紅やシャンプー、洗剤に使用されている。また、医薬品として軟こう、錠剤、酵素薬剤、インターフェロンなどの修飾剤として利用されている。PEG は水・オクタノール分配係数では疎水性物質に分類されるが、水に易溶性である。特別な閉鎖系で用いられる場合を除いて排水に含まれ、下水や自然水系に流出する。自然界で PEG の蓄積が問題になることはほとんどなく、比較的速やかに分解されていると考えられるが、利用量が膨大であるために看過できない問題である。ここでは PEG 分解菌や詳細な分解機構についての研究知見をまとめた。

PEG 分解菌の性質

Pseudomonas, *Alcaligenes*, *Enterobacter* など多くの細菌が PEG1000 までの比較的短鎖の PEG を資化する。しかし PEG4000 以上では分解菌は限定され、我々の研究では *Sphingomonas* 属細菌に限定された。PEG400 を含む nonylphenol polyethoxylate は *Ensifer* sp. や *Pseudomonas* sp. が分解菌として単離されたが、PEG 鎖の分解が先行し基本的には PEG の分解と同様であった¹⁾。

PEG は末端アルコール基が順次酸化されてアルデヒド、カルボン酸を経てエーテル結合が切断され、1 ユニットずつ短くなる *exo* タイプの分解を受ける²⁾。この点は *endo* タイプの分解を受けるポリビニルアルコール (PVA) とは異なっている。興味深いことに、PEG や PVA など人工高分子を分解する微生物には *Sphingomonas* 属細菌が多い。これは、分解遺伝子をプラスミドに保持し、環境に適応しやすくしている同属微生物の生存戦略と考えられている。

私たちの PEG 分解菌のコレクションから *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103, 203 株および *S. terrae* を選んだ。(i) 103, 203 株は単一菌で PEG に生育可能であるが、*S. terrae* のみが共生菌 (*Rhizobium* 属細菌) の共存下でのみ PEG に生育する。この理由は PEG 分解で生成するグリオキシル酸の分解に共生菌が必要であるからと考えられている³⁾。(ii) 203 株においてのみ、PEG 脱水素酵素

(PEGDH) の発現が構成的である。(iii) *S. terrae* は PEG20,000 までに生育するが 103 株および 203 株は PEG4000 までしか資化できない。この分子量の差は PEG 基質の取り込み機構の違いから来るものと考えられる⁴⁾。

PEG 分解遺伝子群の存在

S. terrae から PEGDH が精製され、部分アミノ酸配列情報をもとに PEGDH 遺伝子 (*pegA*) がクローニングされた。*pegA* 遺伝子の上下流のクローニングを上記 3 株について行った。*pegA* はオペロンと考えられる遺伝子群 *pegBCDAE* に含まれ、その下流には逆向きに *pegR* が存在した。上記 3 株についてこの構造は保存され、各遺伝子の相同性も 99% 以上であった。構造上の相違点として 203 株にのみ、*pegA* のプロモーター領域にトランスポゾンが挿入されていた。3 株には相違点があるが、遺伝子構造は保存されている点が興味深い。これら 3 株はそれぞれ 150 ~ 450 kb の巨大プラスミドを保持し、*peg* 遺伝子群はこれらの巨大プラスミドにコードされていた。このことから、*peg* 遺伝子群はプラスミドを担体として、適応進化・伝播してきたものと考えられる。PEGDH と相同性のある遺伝子はデータベースにも多数登録されているが、*peg* 遺伝子群は他の菌には見つかっていない。また *Sphingomonas* 属細菌に *peg* 遺伝子群の存在を求め、PCR によって検出を試みたが、*S. terrae*, *S. macrogoltabida* からのみ検出された。これらのことから、*peg* 遺伝子群は *S. terrae*, *S. macrogoltabida* にのみ特異的かつ高度に保存されて存在する。なぜ *peg* 遺伝子群がこれらの菌に制限されているのかは不明であるが、プラスミドのホスト特異性が関与しているのかもしれない⁴⁾。

単一菌で PEG に生育する 103 株をモデルとして用い、転写制御解析や各遺伝子がコードするタンパク質の生化学的解析を行った。*pegBCDAE* および *pegR* は PEG の存在下で誘導される。さらに *pegBCDAE* はオペロンであることを RT-PCR 法を用いて確かめた⁵⁾。*pegBCDAE* の下流には FAD-linked oxidoreductase, glutathione-S- transferase 遺伝子が存在し、この構造も 3 株において保存され

* 著者紹介 岡山大学資源生物科学研究所 (助教) E-mail: atani@rib.okayama-u.ac.jp

特 集

ていた。この2つの遺伝子は構成的に発現するが、PEGの分解に関与している可能性がある(未発表)。

PEG分解遺伝子と分解酵素の性質

PEGは天然に存在しない人工ポリマーであるため、分解に関与する遺伝子は他の相同遺伝子とは異なった機能を保持していたり、本来の基質とは異なる基質に適応していると考えられる。*peg* 遺伝子クラスターの構造と、PEGの細胞内への取り込みおよび分解経路を図1に示した。以下に各遺伝子、酵素がPEG分解に果たす役割と性質をまとめる。

PegA (PEG-dehydrogenase, PEGDH)

PEGDHはglucose-methanol-choline oxidoreductaseファミリーに属し、alcohol dehydrogenaseとoxidaseに相同性をもつハイブリッド型酵素である。FADを含み、ペリプラズムに局在する二量体で、PEGの末端アルコール基をアルデヒドに酸化する。電子受容体はcoenzyme Qである。本酵素については部位特異的変異を用い、活性残基の同定を行った⁶⁾。

PegC (PEG-aldehyde dehydrogenase, PEG-AIDH)

PEG-AIDHはペリプラズム酵素であり、PEG-aldehydeを酸化してPEG-carboxylateへと変換する。興味深いことに本酵素はNADPを補酵素として保持するnicotino-proteinであることを、私たちが初めて発見した⁷⁾。

PegE (PEG-carboxylate-CoA ligase)

本酵素はPEG-carboxylateにCoAを付加する。局在性解析から、細胞内膜の内側に局在する。トンネルのよう

な構造を持ち、CoAを付加しながら細胞内膜から細胞質への基質の輸送を行っている可能性がある(未発表)。

PegB (TonB-dependent receptor)

本タンパク質は一般的に、細胞外膜に局在してシデロフォア(細胞自身が合成して細胞外へ分泌し、鉄をキレートする物質)を取り込む機構とされている。しかしシデロフォア以外にもアルギン酸やアルキル硫黄エステルなどに対して、この種のタンパク質が取り込み機構として関与している可能性があることから^{8,9)}、細胞外膜における巨大分子の取り込み機構としてPEGの取り込みに関与している可能性がある。

PegD (permease)

本タンパク質はglucitol permeaseなどと相同性があり、細胞内膜に局在するトランスポーターである。PEG分解産物や低分子化されたPEGを細胞質へと輸送している可能性がある。

PegR (AraC-type regulator)

本制御タンパク質は大腸菌のアラビノース分解オペロンの制御タンパク質であるAraCと相同性がある。本タンパク質は*pegB*遺伝子のプロモーターに結合して*peg*オペロンの転写を正に制御する⁵⁾。

GalR-type regulator

*pegA*プロモーター特異的結合タンパク質として同定した。本タンパク質はヒストン様タンパク質(HU)と共に*pegA*、*pegR*のプロモーターに結合して負に制御するが、PEGの存在により抑制解除される⁵⁾。本タンパク質をコードする遺伝子は未同定である。

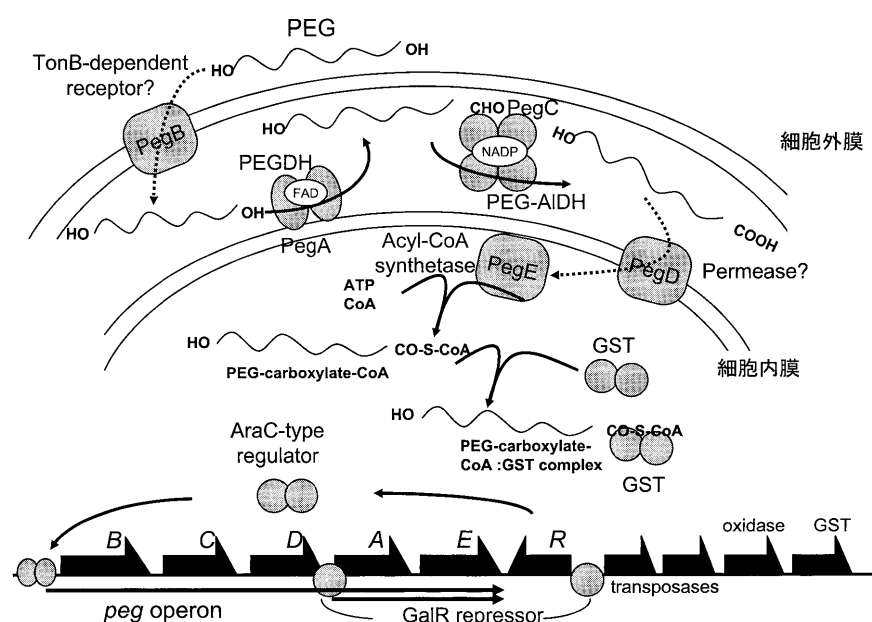


図1. *Sphingomonas*属細菌におけるPEG分解機構

Transposase A, B

peg オペロンの上下流には A, B 2 つのセットで働く transposase 遺伝子がそれぞれ存在する. *peg* オペロンの伝播に関わっている可能性があるが, 2 組の相同性は 34~38% であり, 別のカウンターパートが存在する可能性もある⁴⁾.

PegF (transposase)

本遺伝子は *peg* オペロンを保持する *Sphingopyxis* 3 株の中で, *S. macrogoltabida* strain 203 の *pegA* プロモーター領域にのみ存在する. このトランスポゾンの挿入によって 203 株では *pegA* の発現が構成的となっている⁴⁾.

FAD-containing oxidoreductase

本遺伝子は乳酸脱水素酵素, グリオキシル酸オキシダーゼと相同性がある. また, 真核細胞由来 alkylidihydroxyacetone phosphate synthetase (ADAPS) にも相同性がある. PEG の分解経路ではグリオキシル酸が生成することから, 切断された PEG の分解に関与するか, ADAPS のようにエーテル結合とエステル結合の交換反応によって PEG のエーテル結合を切断することに関与しているのかもしれない (未発表).

Glutathione-S-transferase (GST)

GST は一般的には求核性物質にグルタチオンを結合する酵素である. アシル CoA と結合して, 界面活性作用を持つアシル CoA の細胞内濃度を減少させることに関わるという報告もあることから, PEG-carboxylate-CoA との結合試験を行った. その結果, 有意に GST 活性が阻害されたことから, PEG-carboxylate-CoA と相互作用して何らかの形で PEG 代謝に関わっていると考えられる (未発表).

おわりに

PEG が利用され始めてからほぼ 30 年後に *Sphingopyxis* 分解菌が分離されている. その間に *Sphingomonas* 属細菌内在性または他の菌から伝播や組換えなどを通じて PEG に特異性を持つように適応進化した遺伝子が集まり, 制御系に至るまで構築されたと考えられる. 一般に多くの *Sphingomonas* 属細菌には巨大プラスミドが存在するため¹⁰⁾, 遺伝子の進化や伝播の機会が多く, 人工物である PEG を分解する遺伝子構造を構築できたと考えるのが妥当であろう. しかしながら *peg* オペロンはまだ PEG の完全分解にはまだ十分ではない. たとえば PEG-carboxylate にまで変換後, エーテル結合を切断する酵素がオペロン中には見いだされない. PEG 分離菌が得られたのは現在から 30 年前であり, 現在ならば異なった構造を持つ, またはさらに進化した PEG 分解オペロンが自然界に存在するかもしれない.

文 献

- 1) Liu, X. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 552 (2006).
- 2) Kawai, F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 679 (1978).
- 3) Kawai, F. and Yamanaka, H.: *Arch. Microbiol.*, **146**, 125 (1986).
- 4) Tani, A. *et al.*: *Microbiology*, **153**, 338 (2007).
- 5) Charoenpanich, J. *et al.*: *Microbiology*, **152**, 3025 (2006).
- 6) Ohta, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4388 (2006).
- 7) Ohta, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 639 (2005).
- 8) Hashimoto, W. *et al.*: *Biochemistry*, **44**, 13783 (2005).
- 9) Kahnert, A. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **4**, 225 (2002).
- 10) Basta, T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **186**, 3862 (2004).