

リグニン分解酵素遺伝子導入シロイヌナズナを用いた ダイオキシン類のファイトレメディエーション

Phytoremediation of dioxins using the transgenic Arabidopsis thaliana genetically engineered by lignin-degrading enzyme genes.

其木茂則, 佐俣哲郎, 堂ヶ崎知格

環境保健学研究科

Shigenori Sonoki, Samata tetsurou and chikaku Douglasaki

Graduate School of Environmental Health Science

Abstract. It has been of great concern that halogenated aromatic hydrocarbons cause the disruption in the endocrine system of animals. Among them, the serious toxicity of dioxin-related compounds is becoming more severe especially in Japan. To clean up the polluted environment, biological remediation system using plants, so-called phytoremediation, is expected to solve the environmental pollution problem. The degradation of dioxin-related compounds by white-rot fungi has been extensively studied in the process of lignin degradation. As a result unique extracellular oxidative enzymes, lignin peroxidase (LiP), manganese-dependent peroxidase (MnP) and laccase (Lac) were found to be responsible for degrading a wide variety of organic recalcitrant. Thus, these enzymes are thought to be useful in bioremediation of dioxin-related compounds.

In this study, the cloning of the genes of lignin-degrading enzymes was tried to construct the transgenic *Arabidopsis thaliana* involving these genes in the genome.

According to the sequence data base, specific primers for cloning of genes for lignin-degrading enzymes were constructed, and then full-length cDNAs were prepared using the RT-PCR system with full-length mRNAs from white-rot fungi as templates. The nucleotide sequence of each mRNA of lignin-degrading enzymes was determined using the DNA sequencer and the homology searching was carried out in the DNA library of NCBL-BLAST. As a result, mRNA for each LiP and MnP, and Lac was captured from *Phanerochaete chrysosporium* UAMH 3641, and *Trametes versicolor* UAMH 8272, respectively with about 95 % homology. Therefore, cloning for each gene was tried using a universal cloning method based on the site-specific recombination system of bacteriophage lambda, Gateway technology (Invitrogen). As a result, the PCR band equivalent to the full base length for each enzyme was cloned with the homology of 95 % or 97 % for base sequence or amino acid alignment, respectively. The expression of cloned gene for each lignin-degrading enzyme was investigated using protein-expression vector system in *E. coli*, and then the protein band equal to the size for each LiP, MnP and Lac was detected with SDS-PAGE. The vector for transformation of plant, pPDB-GB that involves each lignin-degrading enzyme gene was constructed to apply this kind of vector for creating the transgenic plant.

1. 目的

近年, 内分泌攪乱物質としてのダイオキシン類の

環境汚染が社会問題となっており, 汚染の有効的な除去法として環境に対して低負荷なバイオレメディエーションが注目を集めている (1)。そこで,

本研究では、従来からダイオキシン類の生分解についての報告の多い白色腐朽菌の産生するリグニン分解系酵素に着目し、これらの酵素群をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック植物体を作成し、これを用いたダイオキシン類の環境浄化、いわゆるファイトレメディエーションを行うことを目的とし、まずは酵素遺伝子のクローニングに取り組んだ(2-5)。

2. 方法

遺伝子導入する植物体として、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた。リグニン分解酵素群の中でも有害汚染物質の分解に関する報告の多い、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、ラッカーゼ (Lac) の3種類の酵素をコードする遺伝子に着目し、そのクローニングを行った。まず、これまでに報告のあったリグニン分解系酵素群をコードするcDNAの塩基配列を参考に、数種類のプライマーを作製し、白色腐朽菌、*Phanerochaete chrysosporium* (UAMH 3641) および *Trametes versicolor* (UAMH 8272) のcDNAをプレートとしてRT-PCR法を行い、数種類の増幅産物を得た。これらの増幅産物のcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーで解析し、得られた配列につ

いてNCBI-BLASTのDNAライブラリで相同性の検索を行った。その結果、*P. chrysosporium*のLiP及びMnP、*T. versicolor*のLacのそれぞれcDNA中に、ライブラリ中の配列と高い相同性を有するものが見い出された。そこで、バクテリオファージラムダと部位特異的組換え反応を応用した遺伝子クローニングシステム (Gateway Technology / Invitrogen) (Fig. 1, 2) を用いて、LiP、MnPおよびLacをコードする完全長cDNAのクローニングを試みた結果、それぞれの完全長cDNAのクローンを得ることができた(6)。

3. 結果と考察

目的とするLiP、MnPおよびLacの完全長cDNAを得るために、白色腐朽菌*P. chrysosporium*および*T. versicolor*の産生するmRNA中からRT-PCR法により、それぞれの酵素のcDNAと思われるPCRフラグメントを調製し、塩基配列を決定した。この塩基配列をもとに、DNAデータベースを用いてホモロジー検索を行った結果、LiPは*P. chrysosporium*由来のcDNA (NCBI accession No. Y00262)、MnPは同じく*P. chrysosporium*由来のcDNA (J04980)、Lacは*T. versicolor*由来のcDNA (U44431) がスクリーニングできた。しかし、いずれの酵素とも数%の相違が見られ、今回見い出されたLiP、MnPおよびLacとも

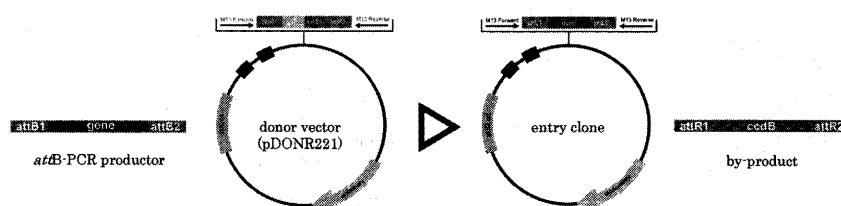


Fig. 1. BP Reaction: BP reaction facilitates recombination of an attB substrate (attB-PCR product) with an attP substrate (donor vector, pDONR221) to create an attL-containing entry clone. This reaction is catalyzed by BP Clonase enzyme mix.

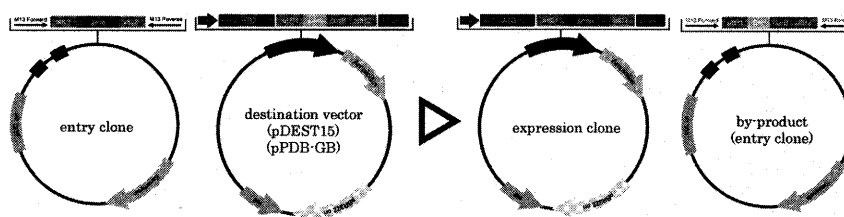


Fig. 2. LR Reaction: LR reaction facilitates recombination of an attL substrate (entry clone) with an attR substrate (destination vector, pDEST15, pPDB-GB) to create an attB-containing expression clone. This reaction is catalyzed by LR Clonase™ enzyme mix.

Primers for LiP (5'→3')
 1.attB1_PP_LiP_F melting temperature : 76.3 °C , 79 mer (first annealing temperature : 62.2 °C , 24mer)
 ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcCTGGAAAGTTCTGTCCAGGGGCCATGGCCTCAAGCAGCTCTTCGCA
 2.attB2_LiP_R melting temperature : 73.8 °C , 53 mer (first annealing temperature : 62.2 °C , 23mer)
 ggggACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTtTCATTAAAGCACCCGGAGGCGGA

Primers for MnP (5'→3')
 3.attB1_PP_MnP_F melting temperature : 76.7 °C , 77 mer (first annealing temperature : 62.3 °C , 22 mer)
 ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcCTGGAAAGTTCTGTCCAGGGGCCATGGCCTTCGGTTCTCTCCTCG
 4.attB2_MnP_R melting temperature : 73.3 °C , 55 mer (first annealing temperature : 62.1 °C , 25 mer)
 ggggACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTtTTAGGCAGGGCCATCGAACTGAACA

Primers for Lac (5'→3')
 5.attB1_PP_Lac_F melting temperature : 75.2 °C , 85 mer (first annealing temperature : 61.9 °C , 30 mer)
 ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcCTGGAAAGTTCTGTCCAGGGGCCATGGGCAAGTTTCACTCTTTTGTGAACGTC
 6.attB2_Lac_R melting temperature : 73.8 °C , 53 mer (first annealing temperature : 62.2 °C , 23 mer)
 ggggACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTtTCAGAGGTCGGACGAGTCCAAAG

Fig. 3. The nucleotide sequence of primers for each LiP, MnP and Lac to obtain attB-PCR product. The underlined sequence shows PreScission Protease recognition site.

に新規なアイソザイムである可能性が高いと思われる (7, 8)。

Fig. 3 に示した attB 配列を有するプライマーを用いて, *P. chrysosporium* および *T. versicolor* 由来の cDNA を鋳型とした PCR を行った結果, *P. chrysosporium* から LiP (約 1,300 bp) および MnP (約 1,300 bp), *T. versicolor* から Lac (約 1,700 bp) のバンドが得られた (Fig. 4)。これらの PCR 産物を精製し Gateway の BP 反応に用いた。その後, 大腸菌 DH5 α を形質転換し, Gateway によりクローニングした LiP, MnP, および Lac の各酵素の完全長 cDNA の塩基配列をシーケンシングにより明らかにした。またこれらの塩基配列を NCBI-BLAST でホモロジー検索を行った結果, LiP については *P. chrysosporium* の NCBI accession No. Y00262 との相同性が 98.3 % であった (Table 1)。また X12698 との相同性も高く 97.8 % であった (Table 1)。この塩基配列を, 遺伝子解析ソフト, GENETYX Mac Version 8.0 (SOFTWARE DEVELOPMENT) を用いて解析したところ, LiP の配列は Y00262 の配列と比較して, 後半に 1 塩基の付加が見られることが判明した。これに対して X12698 では, 後半の塩基数が同一であった。しかし X12698 には開始コドンを含む Forward プライマーの部分の配列が見られないため, 最初の部分の相同性は無かった。MnP については *P. chrysosporium* の J04980 との相同性が 98.3 % であった (Table 2)。LiP のような塩基の付加や欠失は見られなかった。Lac については *T. versicolor* の U44431 との相同性が 95.6 % であった。Lac についても, LiP

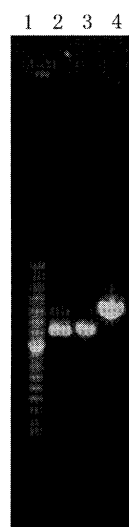


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products using cDNAs from white-rot fungi as templates. These PCR Products have attB arrangement, needed for BP reaction. 1: 100 bp DNA ladder markers. 2: Full-length cDNA of LiP from *P.chrysosporium*. 3: Full-length cDNA of MnP from *P.chrysosporium*. 4: Full-length cDNA of Lac from *T.versicolor*.

のような塩基の付加や欠失は見られなかった (Table 3)。

3 種の酵素をコードする完全長 cDNA の塩基配列をアミノ酸配列に変換し, 上述のライブラリの塩基配列を, 同じくアミノ酸配列に変換したものと相同性について比較検討した (Table 1-3)。LiP のアミノ酸配列は Y00262 のアミノ酸配列と 95.8 %, X12698 のアミノ酸配列と 98.0 % の相同性を示した。解析の結果, LiP のアミノ酸配列は Y00262 のアミノ酸配列と比較して, 塩基配列で後半に 1 塩基の付加が見ら

Table 1. Sequence homology of LiP found in *P. chrysosporium* UAMH 3641 to those in the library.

Accession number	Origin	Homology (%)	
		Nucleotide	Amino acid
X12698	<i>P. chrysosporium</i>	97.8	98.0
Y00262	<i>P. chrysosporium</i>	98.3	95.8
L08963	<i>P. chrysosporium</i>	85.1	89.4
AB158478	<i>C. versicolor</i>	68.2	60.8
Z31011	<i>T. versicolor</i>	69.9	62.1
L29039(MnP)	<i>P. chrysosporium</i>	59.0	45.4

Table 2. Sequence homology of MnP found in *P. chrysosporium* UAMH 3641 to those in the library.

Accession number	Origin	Homology (%)	
		Nucleotide	Amino acid
J04980	<i>P. chrysosporium</i>	98.3	99.2
L29039	<i>P. chrysosporium</i>	98.7	99.5
J04624	<i>P. chrysosporium</i>	80.0	82.7
AV217670	<i>C. subvermispora</i>	76.5	82.5
X12698(LiP)	<i>P. chrysosporium</i>	58.5	47.0

Table 3. Sequence homology of Lac found in *T. versicolor* UAMH 8272 to those in the library.

Accession number	Origin	Homology (%)	
		Nucleotide	Amino acid
U44431	<i>T. versicolor</i>	95.6	97.9
D84235	<i>C. versicolor</i>	96.0	97.9
AF414808	<i>T. pubescens</i>	91.9	96.0
U44430	<i>T. versicolor</i>	68.4	70.0
AF176231	<i>P. ciliatus</i>	71.7	71.1

れる影響でフレームシフトが起こり、それ以降のアミノ酸配列の相同性は無くなることが判明した。対してX12698では後半の塩基数が同一なのでフレームシフトも起こらず、アミノ酸配列の相同性も高かった。しかしX12698にはメチオニン（開始コドン）を含むアミノ酸残基の配列が欠失しており、アミノ酸配列の最初の部分の相同性は無かった。また、他のライブラリ配列との比較では、*P. chrysosporium*由来のアミノ酸配列との相同性は高く、コンセンサスな配列を示す部分が多かった。さらに、LiPの由来となる菌種が異なると相同性も低くなる傾向が確認された。

MnPのアミノ酸配列はJ04980のアミノ酸配列と99.2%の相同性があった。他のライブラリ配列との比較では、*P. chrysosporium*由来のJ04624との相同性が82.7%、他の菌種との比較では*C. subvermispora*由来のAV217670との相同性が82.5%であった。また、LiPで見い出されたX12698との相同性を比較した結果、部分的なコンセンサス配列がMnP中にも認

められた。

Lacのアミノ酸配列はU44431のアミノ酸配列と97.9%の相同性があった。他のライブラリ配列との比較では、菌種が異なってもLacのアミノ酸配列の相同性は高かった。また、LiP、MnP中に見い出されたコンセンサス配列はLac中には認められなかった。

デンマーク大学内のThe Center for Biological Sequence Analysisが提供する、シグナルペプチド予測サーバーである、SignalPV2.0.b2を利用して、3種類の酵素のアミノ酸配列から、シグナルペプチドを予測した。その結果、3種類のアミノ酸配列には、共通してシグナルペプチドが含まれており、LiPでは21-22番目、MnPでは18-19番目、Lacでは23-24番目のアミノ酸に切断部位があると予測された。

LiP、MnPおよびLacについて、エントリークローンとデスティネーションベクターpDEST15をLR反応させて得た発現クローンで大腸菌BL21 Starを形質転換し、この形質転換体が産生するタンパク質の電

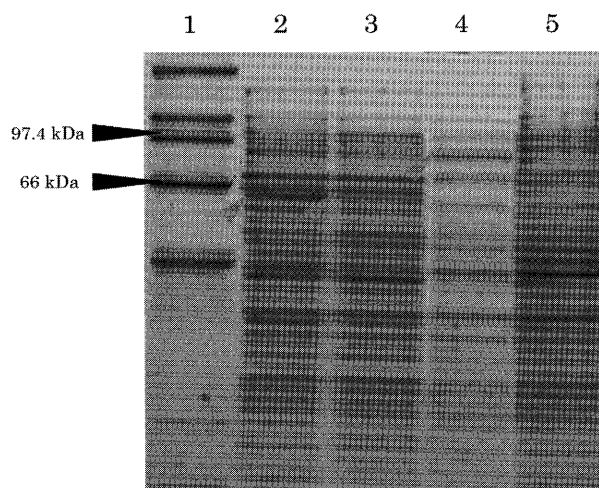


Fig. 5. SDS-PAGE of GST fusion proteins of LiP, MnP and Lac expressed in *E. coli* (BL21). 1: Markers for molecular weights. 2: GST-LiP fusion protein expressed in *E. coli* with molecular weight of 68444 Da. 3: GST-MnP fusion protein expressed in *E. coli* with molecular weight of 68811 Da. 4: GST-Lac fusion protein expressed in *E. coli* with molecular weight of 84853 Da. 5: As a control, native proteins from non-transformed *E. coli* (BL21).

気泳動を10%アクリルアミドゲルを用いて行った (Fig. 5)。

エントリークローンと pDEST15 を LR 反応させて得たタンパク質発現クローンの場合、N 末端側に GST (Glutathione-S-transferase) タグが融合タンパク質として付加されるよう設計されているので、発現させたタンパク質は GST との融合タンパクとなる。このタンパク質の質量は、GENETYX Mac で解析した結果、LiP は 68444 Da、MnP は 68811 Da、Lac は 84853 Da であった。泳動像ではこのサイズと一致する部分にバンドが認められ、大腸菌 BL21 Star 中でそれぞれ LiP、MnP および Lac の酵素タンパク質が合成されていることが証明された。

4. 要約

近年、内分泌攪乱物質としてのダイオキシン類の環境汚染が社会問題となっており、汚染の有効的な除去法として従来の方法より低コストのバイオレメディエーションが注目を集めている。そこで、本研究では、従来からダイオキシン類の生分解についての報告の多い白色腐朽菌の産生するリグニン分解系酵素に着目し、これらの酵素群をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックシロイヌナズナ

を作成するためのクローニングに取り組んだ。

リグニン分解酵素群の中でも有害汚染物質の分解に関する報告の多い、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、ラッカーゼ (Lac) の3種類の酵素をコードする遺伝子に着目し、そのクローニングを行った。まず、これまでに報告のあったリグニン分解酵素群をコードする cDNA の塩基配列を参考に、数種類のプライマーを作製し、白色腐朽菌、*P. chrysosporium* (UAMH 3641) および *T. versicolor* (UAMH 8272) の cDNA をテンプレートとして RT-PCR 法を行い、数種類の増幅産物を得た。これらの増幅産物の cDNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーで解析し、得られた配列について NCBI-BLAST の DNA ライブラリで相同性の検索を行った。その結果、*P. chrysosporium* の LiP 及び MnP、*T. versicolor* の Lac のそれぞれ cDNA 中に、ライブラリ中の配列と高い相同性を有するものが見い出された。そこで、バクテリオファージラムダと大腸菌ゲノム間の類似組み換え反応を応用した遺伝子クローニングシステム (Gateway Technology / Invitrogen) を用いて、LiP、MnP および Lac をコードする完全長 cDNA のクローニングを試みた結果、それぞれの完全長 cDNA のクローンを得ることができた。これらの cDNA の塩基配列は、ライブラリ上の配列と 95% 以上の高い相同性を有していた。また、3種の完全長 cDNA の塩基配列をアミノ酸に変換し、上述のライブラリの塩基配列を同じくアミノ酸に変換したものと比較したところ、97% 以上の高い相同性を示した。しかし、今回同定したアミノ酸配列は、どのライブラリ配列とも数%の差が見られ、これらの結果からは、今回塩基配列を決定した3種類の酵素をコードする cDNA は、これまでに報告されている対象遺伝子の変異体である可能性が考えられた。さらに、LiP と MnP のアミノ酸配列中に約 10 アミノ酸残基からなる共通の配列が見られ、この配列部位がペルオキシダーゼとしての酵素活性に必要な触媒ドメイン、あるいは基質結合ドメインである可能性が示唆された。また、今回同定した Lac は、他菌種由来の Lac のアミノ酸配列との相同性も高かったことから、異菌種由来の Lac タンパク質間で構造が類似していると考えられた。

これらの遺伝子を、タンパク質発現用ベクター

pDEST15 に組換え反応し、大腸菌細胞中での酵素遺伝子の発現を試みた。その結果、LiP, MnP および Lac について、GST 融合タンパク質として予想されるサイズのバンドを SDS-PAGE で確認することができた。さらに、植物形質転換用 Ti プラスミドベクターであり、なおかつ Gateway に対応したベクター pPDB-GB を作成した。

文 献

- 1) Ohsaki, Y., Matsueda, T., Kurokawa, Y., *Environmental Pollution* 96, 79-88 (1997).
- 2) Bumpus, JA., Tien, M., Wright, D., Aust, SD., *Science* 228, 1434-1436 (1985).
- 3) Lee, A. B., Stephen, D., Phillip, M. F., Owen, P. W., Michael A. P., *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2020-2025 (1998).
- 4) Mackova, M., Macek, T., Ocenaskova, J., Burkhard, J., Demnerova, K., Pazlarova, J., *International Biodeterioration and Biodegradation* 39, 317-325 (1997).
- 5) Iimura, Y., Ikeda, S., Sonoki, T., Hayakawa, T., Kajita, S., Kimbara, K., Tatsumi, K., Katayama, Y., *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 246-251 (2002).
- 6) James, L., Hartley, F., Gary, F., Temple, G., Michael, A., *Genome Research* 10, 1788-1795 (2000).
- 7) Johansson, T., Nyman, PO., *Gene* 170, 31-38 (2001).
- 8) Ko, EM., Leem, YE., Choi, HT., *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 98-102 (2001).