

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3477515号
(P3477515)

(45)発行日 平成15年12月10日(2003.12.10)

(24)登録日 平成15年10月3日(2003.10.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 9/00
9/00		C 1 2 P 1/00 A
C 1 2 P 1/00		C 1 2 R 1:145
// (C 1 2 N 9/00		C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1:145)		

請求項の数1(全 14 頁)

(21)出願番号 特願2000-202729(P2000-202729)

(22)出願日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(65)公開番号 特開2002-17358(P2002-17358A)

(43)公開日 平成14年1月22日(2002.1.22)

審査請求日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(73)特許権者 391012257
岐阜大学長
岐阜県岐阜市柳戸1番1

(72)発明者 高見澤 一裕
岐阜県岐阜市岩井380-32

(72)発明者 発 正浩
岐阜県岐阜市雄総柳町1丁目60 コンフ
オートウィロ C-3

(74)代理人 100072051
弁理士 杉村 興作

審査官 植原 克典

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1由来パークロロエチレン脱ハロゲン化酵素、当該酵素のポリペプチド、当該酵素をコードする遺伝子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)(b)または(c)に示す塩基配列からなることを特徴とする遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1の上段に示す、塩基番号1-2117で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(b) 配列表の配列番号1の下段に示す、アミノ酸番号1-366で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードすることを特徴とする、遺伝子。

(c) テトラクロロエチレンの脱塩素反応を触媒するポリペプチドをコードし、(a)の塩基配列の10個以下が欠失、置換若しくは付加された、遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、クロストリジウム

・ピフェルメンタンスDPH-1由来パークロロエチレン脱ハロゲン化酵素、及び当該酵素のポリペプチドとそれをコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】テトラクロロエチレン等のパークロロエチレン(perchloroethylene:PCE)、トリクロロエチレン(trichloroethylene:TCE)、ジクロロエチレン(dichloroethylene:DCE)のアイソマー類(cis-1,2-DCE、trans-1,2-DCE、1,1-DCE)及び塩化ビニルの様なクロロエチレン類や他の塩素化脂肪族化合物は、産業上使用する事に伴い、環境中にかなりの濃度で発生する。PCEやTCEは優れた溶剤であるために、特にドライクリーニングや織物産業において、機械を洗浄したり、脂肪を抽出した

り、塗料を剥がしたりする目的に使用される。これらの化学物質は公衆衛生に重大な問題を引き起し、汚染された場所や水路を改善する事は地球レベルにおける緊急の問題である。この汚染を改善することは、物理化学研究と生物学研究を刺激している。生物学的な方法は、比較的成本が安くて環境適合性が良いために、しばしば魅力的な選択となり得る。

【0003】PCEは、ハロゲン含量が高くて毒性が強いために、塩素化した脂肪族化合物の生物分解の研究対象として、重要なモデルとなる。PCEは酸化され易い性質を有しているために好気的条件下では分解されにくい、嫌気的条件下ではいくつかの微生物によって還元的に脱塩素化される。そこで、PCEを除染するために、嫌気的な生物学的システムに関心が向けられている。嫌気的な混合培養物が、PCEを還元的に脱塩素化する効果を有することが、しばしば報告されてきた。しかし、脱ハロゲン化の特性が詳細に解析された単一培養物はほんの少数であり、その例としてDehalospirillum multivorans、Desulfomonile tiedjei、Dehalobacter restrictus、Dehalococcoides ethenogenes株195、Desulfitobacterium種PCE-Sがある。

【0004】シアノコバラミン(ビタミンB12)は、PCEの非生物学的な脱塩素化に有効であると、報告されてきた。D. multivorans、D. ethenogenes株195、Desulfitobacterium種PCE-Sの様なPCE分解性嫌気性微生物は、コリノイド(蛋白質が結合したシアノコバラミン)補因子を含んでいることが示されており、それらはPCEの異化に重要な役割を果たす可能性がある。

【0005】嫌気的なPCEデハロゲナーゼの精製と特性解析に注目した研究は少ないが、嫌気的な還元的PCEデハロゲナーゼの遺伝子に関しての情報は僅かにある。近年、D. multivoransのPCEデハロゲナーゼの遺伝的な決定因子であるpceAとpceBがクローン化され、特性解析された。これら、pceAとpceBの2つの遺伝子は、オペロン構造中に構成され、それぞれ501アミノ酸と74アミノ酸の蛋白質をコードしている。しかし、pceAを機能を有して大腸菌中に発現させることは成功しなかった。

【0006】多くの嫌気的なデハロゲナーゼは、PCEを分解して主としてcis-DCEを生成するが、D. ethenogenes 195由来の新規なデハロゲナーゼは、還元的にPCEを脱塩素化してエチレンを生成して、毒性を分解する(図1)。Rhodococcus rhodochrousとNitrosomonas europaeaによる、cis-DCEの好気的な分解が報告されてきた。そこで、嫌気的なシステムで蓄積したcis-DCEを、その様な好気的なデハロゲ

ナーゼを用いて更に分解する事により、除くことができる。これらの菌株に由来する嫌気的なデハロゲナーゼを用いた反応は、DCEで停止してしまう。よって、DCE以降の分解は、好気性微生物に頼らなければならず、TCEの完全分解には嫌気的微生物と好気的微生物の両者が必要である。

【0007】ところで、D. ethenogenes 195株由来の新規なデハロゲナーゼは、還元的にPCEを脱塩素化してエチレンを生成する事が知られている(図1)。即ち、この菌株はPCEを完全分解して、毒性を分解するという特質を有する。この様に種々のデハロゲナーゼが存在しており、それぞれによって利用する基質や酵素としての特性は異なっている。塩素化脂肪族化合物で汚染される状況を考えて、多くの場合PCE、TCEやDCE異性体の混合物が存在している。よって、基質とする塩素化脂肪族化合物のスペクトル範囲が広いデハロゲナーゼが得られたら、塩素化脂肪族化合物による汚染に対する有効なツールとなると思われる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、環境中に存在する有害な塩素化脂肪族化合物を分解して解毒することが可能な、新規な嫌気性の還元的PCEデハロゲナーゼを得ることである。より特異的には、これまでの嫌気性菌株由来のデハロゲナーゼでは分解が困難であったDCEを含めて、広い範囲の塩素化脂肪族化合物を分解できるPCEデハロゲナーゼを得ることである。更に本発明の課題は、得られた酵素のアミノ酸配列とそれをコードする遺伝子の塩基配列を提供する事である。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、水路の汚泥より単離されたクロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1(Clostridium bifermens)DPH-1がPCEを脱ハロゲン化することを見出し、当該菌株から新規なPCEデハロゲナーゼを得る事を試みた。即ち、クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1由来のデハロゲナーゼを単離精製し、その特性解析を行った。この酵素は基質として、PCEとTCEのみならず、cis-1,2-DCE、1,1-DCEを含む、広範囲の塩素化脂肪族化合物を分解した。これまで、これほど広範囲の塩素化された脂肪族化合物を基質として分解する、嫌気性の還元的PCEデハロゲナーゼが得られた例はない。

【0010】更に精製した酵素のアミノ末端のアミノ酸配列を決定し、その配列より遺伝子クローニングのためのプローブを構築した。ゲノミックDNAライブラリーからクローニングを行うことにより、遺伝子配列を決定し、更に推定アミノ酸配列を決定した。得られた配列は既知のPCEデハロゲナーゼと相同性を有さず、これまでにない型のPCEデハロゲナーゼであると考えられる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明は、クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1に由来する、新規なパークロロエチレン脱ハロゲン化酵素（PCEデハロゲナーゼ）である。当該酵素は、以下の性質を有する。

(1) テトラクロロエチレンからトリクロロエチレンを生成する脱ハロゲン化反応を触媒する。

(2) 分子量が35kDaである2つのサブユニットから成る二量体である。

(3) 至適温度は35℃である。

(4) 至適pHは7.5である。

(5) 金属イオン、EDTA、NADH又はシアノコバラミンの添加により酵素活性は影響されない。

(6) 酸素の存在により酵素活性が抑制される。

【0012】更に、本発明の酵素により、塩素化脂肪族化合物を分解する方法もまた、本発明の範囲内である。上述した様に、本発明の酵素は基質スペクトルの範囲が広いために、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエタン、1,1-ジクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、1,1,2-トリクロロエタン等の、種々の塩素化脂肪族化合物を分解する事が可能である。

【0013】更に本発明は、クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1由来のPCEデハロゲナーゼのポリペプチドである。このポリペプチドは、配列表の配列番号1の下段に示す、アミノ酸番号1-366で示されるアミノ酸配列により特定される。このアミノ酸配列は、配列表の配列番号1の上段に記載されている塩基配列の、オープンリーディングフレーム（読み枠）部分によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列である。配列番号1の下段に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号1の下段に示すアミノ酸配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換されたポリペプチドである。また、その様なポリペプチドと配列番号1の下段に示すアミノ酸配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する。その様なポリペプチドも、テトラクロロエチレンの脱塩素反応を触媒するというPCEデハロゲナーゼの特徴を有する限り、本発明の範囲内である。

【0014】更に本発明は、配列表の配列番号1の上段に示す、塩基番号1-2117で示される塩基配列からなることを特徴とする、クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1由来のPCEデハロゲナーゼ遺伝子である。配列表の配列番号1の上段に示す塩基配列のうち塩基番号514-1614で示される部分が読み枠であり、上述したPCEデハロゲナーゼのポリペプチドをコードしている。

【0015】遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。即ち、配列表の配列番号1の上段に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号1の上段に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換された遺伝子である。また、その様な遺伝子と配列番号1の下段に示す塩基配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する。その様な遺伝子も、テトラクロロエチレンの脱塩素反応を触媒するというPCEデハロゲナーゼの特徴を有するポリペプチドをコードしている限り、本発明の範囲内である。

【0016】

【実施例】（微生物と培養条件）クロストリジウム・ピフェルメンタンス（*Clostridium bifermentans*）DPH-1は、岐阜の電気会社の、屑が混ざった水路の汚泥より単離した。MY培地上で、一週間毎に継代培養することにより、培養を維持した。そのMY培地の組成は、 K_2HPO_4 が7.0g/l、 KH_2PO_4 が2.0g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ が0.1g/l、 $(NH_4)_2SO_4$ が1.0g/l、クエン酸ナトリウムが0.5g/l、酵母抽出液が2.0g/lであり、pHが7.2であった。26mlの血清ボトル中で10mlの培地をオートクレーブした後に、0.1mlのフィルター滅菌したビタミン溶液（1リットルあたり、p-アミノ安息香酸が1g、ビオチンが1mg）と0.1mlの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ （2g/l）を添加した。ヘッドスペースを純粋窒素で置き換え、テフロン（登録商標）で裏打ちしたゴムセブタムとアルミニウムのクリンキャップで密封した。その後PCEを添加して、最終濃度を12μMとした。酵素を調製するために、100mlのMY培地を含むボトル中で、PCEのピークが分解するまで（46から56時間）30で細胞を生育した。*C. bifermentans*細胞を、ジチオスレイトール（DTT）を最終濃度が2mMになるまで添加した後、遠心（12000g、15分）により回収した。クローニングと形質転換に用いた宿主株は、大腸菌DH5であり、Luria-Bertani培地中において37℃で培養を行った。必要に応じて、アンピシリン（100μg/ml）を添加した。プラスミド類と、その関連した特性を表1に要約する。

【0017】

【表1】

プラスミド	特 徴	由 来
pT7Blue	Ap ^r 、lacZ	ノバゲン
PATS81	PCR産物を含むpT7Blue、Ap ^r	本研究
pBluescript I IKS	Ap ^r 、lacZ	ストラタジーン
pDEHAL5	5 kbのC. bifermentans ゲノミックDNAをClaIで含む、pBluescript I IKS (-) Ap ^r	本研究
pDEHAF1	BamHI-BamHIにおいて、pDEHAL5の1 kbの BglII-BglII断片を含む、pBluescript I IKS (-)、Ap ^r	本研究
pDEHAF2	XhoI-BamHIにおいて、pDEHAL5の1.5 kbの XhoI-BglII断片を含む、pBluescript I IKS (-)、Ap ^r	本研究

【0018】(酵素の調製) C. bifermentans 細胞(およそ1.6 g)を、2 mMのDTTと5%のグリセロールを添加した20 mMのトリス塩酸バッファー(pH 8.2) 6 ml中に再懸濁し、TOMYウルトラソニック破碎機UD-201を用いて、30秒間のフラッシュで5分間、氷冷バス中で溶菌した。非破碎細胞と破片を遠心分離(17000 × g、20分、4℃)で分離し、非破碎細胞と破片について抽出過程を繰り返した。2つの上清画分を混合し、0.22 μmのミリポアフィルターを通した。得られた濾液を、無細胞酵素抽出に用いた。

【0019】(酵素アッセイ) デハロゲナーゼのアッセイは、Neumanの方法(Neuman, A. et al. (1996) Biol. Chem. 271: 16515-16519)とMagnuson(Magnuson, J. K. et al. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 64: 1270-1275)の方法を用いた。酵素アッセイ(この後、標準アッセイ方法と言う)を、テフロンゴムのストッパーとアルミニウムのクリンブキャップで密封した、血清ボトル中で行った。4 mlのアッセイ溶液には、100 mMのトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、1.5 mMのメチルピオロゲン、1.5 mMのクエン酸チタニウム、500 μlの酵素と12 μMのPCEが含まれていた。コントロールのアッセイ溶液では、酵素溶液をトリス塩酸緩衝液に置きかえた。全ての溶液のヘッドスペースを、5分間窒素で置き換えた。30分間で30分間、インキュベーションを行った。5 MのMgSO₄を0.4 ml添加して反応を停止した。クエン酸チタニウム溶液を、ZehnderとWuhrmannの方法(Zehnder, A. J. B. and Wuhrmann

K. (1976) Science 194: 1165-1166)により調製した。反応生成物と残存したPCEを、ガスクロマトグラフィーにより定量した。酵素活性の1ユニットを、そのアッセイ条件下で生成したトリクロロエチレン(TCE)とcis-ジクロロエチレン(DCE)の全nmolである、と定義した。比活性を計算するために、バイオラッドのプロテインアッセイ試薬(バイオラッド)を用いて、標準的なBradford法により、蛋白質濃度を定量した。

【0020】(塩素化した脂肪族化合物のガスクロマトグラフィー解析) 塩素化した脂肪族化合物を、ヘッドスペース法(Gossett J. M. (1987) Environ. Sci. Technol. 21: 202-208)で定量した。ヘッドスペースサンプル(10 μl)を、電子捕獲検出器(ECD)とガラスカラム(シリコンDC-550 20%クロモゾープW[AWDMCS] 80/100)を備えた、GC-14B型ガスクロマトグラフ(シマズ)を用いて解析した。担体ガスには、流速50 ml/分の純粋窒素を用いた。炎イオン化検出器(FID)とガラスカラム(シリコンDC-550 20%クロモゾープW[AWDMCS] 80/100)を備えた、GC-9A型ガスクロマトグラフ(シマズ)を用いて、高濃度のパークロロエチレン(PCE)のクロマトグラフィー解析を行った。

【0021】(酵素の精製) 無細胞酵素抽出液を、限外濾過膜セントリプレップYM-50(アミコン: 50 kDaの限界分子量)を通して、およそ1.5 mlまで濃縮した。濃縮物をDEAE-Toyopearlアニオン交換カラム(12 × 1.5 cm)にかけた。予め2 mMのDTTを添加した20 mMのトリス塩酸緩衝液(pH 8.2)で、そのカラムを平衡化しておいた。同じ緩

衝液に、0から0.5MのNaClを溶解したリニアグラジエントを用いて、1ml/分の流速で蛋白質を溶出した。45の画分を5mlづつ、4で収集してハロゲナーゼ活性を評価した。

【0022】活性画分を貯蔵し、下記に述べるサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。貯蔵した画分を、YM-50超濾過膜を用いて約1.5mlまで濃縮した。予め溶出緩衝液(20mMのリン酸カリウムバッファー(pH7.5)に溶解した150mMのKCl)で平衡化しておいたSuperdex pg-75カラム(70×1.5cm)に、濃縮物をかけた。0.36ml/分の流速で、同じ緩衝液により蛋白質を溶出した。画分(2.7ml)を4で収集し、デハロゲナーゼアッセイにかけた。

【0023】シマズSPD-7AV紫外/可視分光検出器、シマズSCL-6Bシステムコントローラー、シマズCR4Aコンピューターデータ解析機と1mlのインジェクションループを備えた、シマズLC-7Aバイオ液体クロマトグラフを用いて、多孔性HQアニオン交換カラム(4.6×100mm)上で、イオン交換高速液体クロマトグラフィー(IEX-HPLC)により、更なる精製を行った。20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を用いた、アイソクラティック(10分)な溶出(1ml/分)をまず行った。その後、20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH8.2)に、0-1MのNaClを添加した濃度リニアグラジエント(20分)により溶出を行った。20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.2)に添加した1MのNaCl(10分)と、20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.2)(10分)で、順次にカラムを洗浄した。

【0024】500mlのインジェクションループを備えた同じHPLCシステムを用いて、Superdex R200HR10/30(1×30cm)により、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)を行った。20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に150mMのNaClを添加して、0.5ml/分の流速でアイソクラティックな溶出を行った。

【0025】(分子量の測定)天然型酵素の分子量は、Superdex200HR10/30上におけるSE-HPLCにより測定した。分子量キット(MW-GF-200-KIT:シグマ)を用いて、製造業者が指示した方法によりカラムを校正した。蛋白質サンプルの純度と分子量は、10%のアクリルアミドを用いて、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により試験した。17201から200000ダルトンの範囲の分子量マーカー(第一化学)を用いた。ゲルをクマシーブリリアントブルーG250により染色した。

【0026】(MALDI-TOF/MS解析)Matrix-Assisted Laser Desorp

tion Ionization-Time of Flight/Mass spectrometry(MALDI-TOF/MS)を用いて、精製された蛋白質の正確な分子量を測定した。限界分子量10kDaであるポリスルホン膜(ミリポア)を用いた限外濾過により、精製された蛋白質サンプルを脱塩し、滅菌したミリQ水(滅菌脱イオン水、ミリポア)に懸濁した。簡単にいうと、そのマトリックスはミリQ水に溶解した0.1%のトリフルオロ酢酸と30%のアセトニトリルから構成され、シナピン酸で飽和されている(1%)。正確に1μlのマトリックスと1μlの蛋白質サンプルをサンプルプレート上で混合し、5分間風乾し、ボイジャーRPワークステーション(パースペクティブバイオシステムズ、アブライドバイオシステム)を用いて、製造業者に指示に従い解析した。

【0027】(酵素の性質の測定)標準的なアッセイ方法を用いて、アッセイを行った。20、25、30、35、40と45でインキュベートすることにより、温度活性のプロファイルを測定した。それぞれの温度で1時間インキュベートして、その後に残った活性を測定する事により、温度安定性を検討した。pH活性プロファイルについては、トリス-塩酸(pH7.5、8.0、8.5、9.0)およびリン酸緩衝液(pH6.0、6.5、7.0)のいずれかを用いることにより検討した。酵素をそれぞれのpH値で1時間、室温で同じ緩衝液を用いてインキュベートして、残った活性を測定することにより、pH安定性を検討した。金属イオン(Co²⁺、Fe³⁺、Mg²⁺、Na²⁺、Mn²⁺、Hg²⁺)、EDTA-Na、NADHとシアノコバラミンの影響は、最終濃度5mMにおいて検討した。基質濃度の影響は、異なった濃度のPCE(5-30μM)を用いて測定した。酸素感受性の測定は、Millerらの方法(Miller, E. et al. (1998) Arch. Microbiol. 169:497-502)を用いた。

【0028】(PCEと他の塩素化した脂肪族化合物の比較分解性)標準アッセイプロトコルを用いた。全ての塩素化脂肪族化合物のストック溶液をメタノール溶液として調製し、アッセイ混合液中でのそれらの最終濃度は12μMであった。30で30分間インキュベートした後、塩素化した脂肪族化合物の残存量を、ガスクロマトグラフィーで測定した。

【0029】(PCE分解と生成物産生の経時変化)PCEの開始濃度を12μMとして、標準アッセイ方法により検討した。PCEの生物学的分解と分解生成物(TCEとcis-DCE)を、ガスクロマトグラフィーで連続的に検出した。

【0030】(アミノ末端配列決定)蛋白質サンプルのSDS-PAGEを行った後、蛋白質をポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜(イモビロンPSQ、ミリ

ポア)へ、電気プロット装置(バイオラッド)を用いて電氣的に転写した。PROCI SE™1.1aデータ解析ソフトウェアを備えた、アプライドバイオシステムズ491プロテインシーケンサーを用いて、自動エドマン分解によりアミノ末端配列を解析した。

【0031】(組み換えDNA技術) *C. bifermens*を一晩培養した物から、ゲノミックDNAを調製した。ハイピュアプラスミドアイソレーションキット(ベーリンガー・マンハイム)を用いて、製造業者の指示に従って、プラスミドDNAを細胞から単離した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物と制限酵素分解断片を、QIAEXIIゲル抽出キット(キアゲン)により、アガロースゲルから精製した。DNAライゲーションキットver.2(タカラ)を用いて、製造業者の指示に従ってライゲーションを行った。プラスミドDNAによる大腸菌DH5の形質転換を、製造業者の指示に従って標準方法により行った。100µg/mlのアンピシリンと5-ブromo-4-クロロ-3-インドイル-D-ガラクトピラノース(X-Gal)を含むプレート上での生育により、コロニーの選抜とスクリーニングを行った。制限酵素はタカラから購入し、製造業者に推奨された方法で使用した。

【0032】(DNA配列決定)DNAの配列決定は、ABIプリズムビッグダイターミネーターキット(パーキンエルマー)とアプライドバイオシステムABI310ジェネティックアナライザーを用いて、サイクルシーケンシングにより行った。両鎖の配列決定された領域を、プライマーウォーキングにより伸長した。

【0033】(遺伝子クローニングのためのプローブの構築)デハロゲナーゼのアミノ末端配列に基づき、2つのプライマーを設計し、コードされる遺伝子の、先に決定されたアミノ末端領域のPCR増幅に用いた。用いたプライマーは、5'-GCI-GAR-GTI-TAY-AAI-AAR-GA-3'と3'-GTR-ATR-AAR-ISI-TTR-CTR-TG-5'である(IはイノシンRはアデニン又はグアニン、Yはシトシン又はチミン、Sはグアニン又はチミン)。Ready.To.GoPCRビーズ(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて、PCRを行った。およそ100ngの*C. bifermens*ゲノミックDNAを、鋳型として用いた。DNA増幅は、以下の様にして35PCRサイクル行われた。即ち、最初の変性(95、5分)、引き続いての変性(95、1分)、アニーリング(43、1.5分)、そして伸長(72、2分)というサイクルである。1.5%アガロースゲル上で可視化した後、予期したバンド(81bp)を精製し、pT7Blue(ノバゲン)のT-クローニング部位へクローン化し、pATS81プラスミドを作製した。挿入物をDNA配列解析にかけて、その配列を翻訳し、精製蛋白質の既知のアミノ末端と比較した。

【0034】(サザンハイブリダイゼーションとDNA

ラベル化)ゲノミックDNAを、BglII、ClaI、EcoRI、HindIIIとPstIにより分解した。DNA断片をアガロースゲル上で分離し、ゼータプローブナイロン膜(バイオラッド)上に、0.4NのNaOHを用いた毛細管プロットングにより転写した。アガロースゲルより精製したプローブ(PCR産物)を、マルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて、³²P dATPによりラベル化した。プロットしたフィルターをプレハイブリダイズして、55でハイブリダイズし、その後に洗浄して展開した。

【0035】(関連断片のクローニング)サザンハイブリダイゼーションにより得られた、およそ5kbのCbaIバンドを、ミニDNAライブラリーを調製する目的で選抜した。この領域中の断片をアガロースゲルから精製し、pBluescriptSK(-)のポリリンカー中の同様の部位へライゲーションした。ライゲーション反応液により、コンピテントな大腸菌DH5を形質転換した。全部で1728個の形質転換体を、上記にプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。およそ5kbのCbaI断片を含む陽性クローンが同定された。pDEHAL5プラスミドが、このクローンから単離された。

【0036】デハロゲナーゼ遺伝子の位置を決定するために、pDEHAL5をXhoIとBglIIで分解した。およそ1.5kbのXhoI-BglII断片とおよそ1kbのBglII-BglII断片を単離し、pBluescriptSK(-)のポリリンカー中の、XhoI-BamHIとBamHI-BamHI適合部位上にサブクローン化し、pDEHAF1プラスミドとpDEHAF2プラスミドを作製した。両プラスミドの挿入物を、完全に配列決定した。データベース検索は、BLASTにより行った。Clustal Wプログラムを用いて、相同性解析を行った。DNAステューダープログラムを用いて、カイトドローライト法により、ハイドロパシープロットを行った。

【0037】(ヌクレオチド配列アクセッション番号)デハロゲナーゼ遺伝子のヌクレオチド配列とそのフランキング領域を、EMBLヌクレオチド配列データベースに、AJ277528のアクセッション番号で登録した。

【0038】(PCEデハロゲナーゼの抽出と精製)DTTとグリセロールを含むトリス塩酸緩衝液中で細胞を超音波破碎することにより、この酵素を容易に抽出できる。抽出緩衝液に0.1%トライトン-Xを添加しても、酵素の抽出は改善されなかった。残った細胞破片を、0.1%のトライトンX-100を含む同じ緩衝液又は抽出緩衝液に懸濁しても、PCE分解活性を示さなかった。これは、その酵素が膜貫通蛋白質ではなく、膜表面の蛋白質であることを示している。

【0039】*C. bifementans* DHP-1の還元型PCEデハロゲナーゼは、クルードな細胞抽出液より、TCEを経由してPCEから*cis*-DCEへ変換することを確認することにより、精製された。出発の精製スキームは、Superdex pg-75ゲル濾過の後に、PCEデハロゲナーゼが13.2倍精製されるという結果となり(表2)、酵素活性はおよそ42%回収された。比活性は、6.5から86.1U/mg蛋白質へ増加した。この段階では、酵素サンプルは明らかな不純物を2つ含んでいた(図2A: Superde

精製段階	全活性(U)	収率(%)	比活性(U/mg蛋白質)	精製(倍)
細胞抽出液	154.8	100	6.5	1.0
DEAE-トヨパール650Sイオン交換	102.5	66.2	30.2	4.6
Superdex pg-75ゲル濾過	65.4	42.2	86.1	13.2

【0041】(分子量)天然型PCEデハロゲナーゼの分子量を、分子サイズ排除高速液体クロマトグラフィーにより測定すると、およそ70kDaであった(図3)。SDS-PAGE解析により、モノマーの分子量はおよそ35kDaであることが判り(図2B)、その結果より、二量体蛋白質構造を有していることが示される。MALDI-TOF/MSより決定されたモノマーの正確な分子量は、35.7kDaであった(図4)。

【0042】(酵素活性の性質及び反応速度論的パラメーター)デハロゲナーゼはPCEの脱塩素化を触媒する至適温度は35であった。20から35の温度範囲内で、酵素は安定であった。最大活性はpH7.5で記録され、pH7.5から8.0で酵素は最も安定であった。酵素活性は、金属イオンに依存せず、EDTA-Na、NADHやシアノコバラミンを添加することは、PCEの分解に大きな影響を及ぼさなかった。空気の下でインキュベーションしている間、酵素は酸素感受性を有していた。アルキル化試薬(プロピルイオダイド)と還元試薬(クエン酸チタニウム)の混合液と、暗所でインキュベーションにより、酵素活性は抑制された。引き続き光に露光することにより、活性は回復した。プロピルイオダイドが存在しない場合にはクエン酸チタニウムは阻害活性を有しておらず、プロピルイオダイドを単独で添加した場合には阻害活性は全く記録されなかった。

【0043】PCEの脱塩素化と産物生成の反応速度論を、経時変化の実験で検討した。デハロゲナーゼにより、TCEを経由して、PCEはDCEへと迅速に変化した。反応速度論のパラメーターであるVmaxとKmを、Lineweaver-Burk二重逆数プロットからコンピューターで求めたところ、それぞれ73nmol/mg蛋白質と12μMであった。

x pg-75ゲル濾過後のSDS-PAGEの写真)。プールして透析したサンプルから、イオン交換HPLCとサイズ排除HPLCにより、酵素を更に完全に精製した(図2B:分子排除クロマトグラフィー後のSDS-PAGEの写真)。しかしながら、HPLCの精製条件下では不安定であるために、これにより比活性の顕著な低下が生じた。

【0040】

【表2】

【0044】(分解された塩素化脂肪族化合物のスペクトル)PCEデハロゲナーゼによる他のハロゲン化塩素化脂肪族化合物の分解を、検討した。*C. bifementans*のデハロゲナーゼは、種々の塩素化脂肪族化合物を顕著に分解した。PCEとTCEにおいて観察された分解速度は、他の環境上重要な塩素化脂肪族化合物における分解速度より、全般的に高かった。PCE、TCE、*cis*-1,2-DCE、1,1-DCE、1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンと1,1,2-トリクロロエタンによりそれぞれ、一時間あたりおよそ25±4.9%、16±4%、6±1%、8±0.8%、8±1.6%、9±0.4%、8±0.2%の分解を達成することができた。ビニルクロライドは分解を受けにくかった。無細胞系酵素抽出液を用いたとき、分解速度は顕著に高くなった。

【0045】(アミノ末端解析、プライマーとプローブ構築物の設計)精製したPCEデハロゲナーゼのアミノ末端配列解析により、下記の配列が明らかになった。即ち、AEVYNKDGKLDLYGKVDGLHYFSNDTという配列である。BLAST解析を行ったところ、既知のPCEデハロゲナーゼとは相同性を示さなかった。しかし、配列決定したアミノ末端領域中の3つのアミノ酸残基(KVD)は、*Desulfitobacterium*種のPCE-Sと同一であった(図5)。図5に、3種のPCEデハロゲナーゼのアミノ末端配列のアラインメントを示す。アミノ末端配列の両端より設計した2つの宿重プライマーにより、*C. bifementans*のPCEデハロゲナーゼの81bp推定領域を増幅することに成功した。翻訳されたプローブのDNA配列は、先に決定されたアミノ末端蛋白配列と一致した。

【0046】(PCEデハロゲナーゼのクローニングと

遺伝子配列決定)PCRの生成物を、DNA塩基配列の決定により確認し、遺伝子クローニングのためのプローブとして使用した。*C. bifermentans*のゲノミックDNAを種々の制限酵素で開裂し、[³²P]dATPラベル化したプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、BglII、ClaI、EcoRI、HindIIIとPstI制限酵素断片による異なったバンドが検出された(図6)。図6(A)に、*C. bifermentans*のゲノミックDNAの、制限酵素断片のアガロースゲル電気泳動の写真を、図6(B)にサザンプロット/ハイブリダイゼーション解析の写真を示す。図6において、(B)はBglII断片を、(C)はClaI断片を、(E)はEcoRI断片を、(H)はHindIII断片を、(P)はPstI断片を示す。また、図6の矢印は、サブライブラリーの構築に用いた5kbのClaI断片を示す。

【0047】1720個の大腸菌DH5⁺のコロニーを、ゲノミックサブライブラリー(およそ4.5から5.5kbのClaI断片により構築されている)からスクリーニングした後、5kbの、ClaI挿入部位を含んでいると思われるクローン(pDEHAL5)が単離された。サザンハイブリダイゼーションの解析データ(図6)に基づき、1.4kb以下のBglII制限断片は、デハロゲナーゼ遺伝子を有していることが予測される。pDEHAF1とpDEHAF2(表1)の、2つのサブクローンの挿入物の完全な塩基配列を決定し、先に決定したアミノ末端配列を用いてその遺伝子を同定した。その遺伝子は、内在性のBglII部位を有していることが見出された(図7)。図7に、制限酵素部位を示す、pDEHAL5の制限酵素地図を示す。PCEデハロゲナーゼをコードしている部位を、陰影で示す。ATG開始コドンから、その遺伝子の97bpがpDEHAF1中に同定され、1004bpがpDEHAF2中に同定された。

【0048】ここで得られたPCEデハロゲナーゼ遺伝子(以下pceCと称する)の完全な核酸配列を、図8に示す。図8において、転写プロモーター部位を四角で囲み、リボソーム結合部位を下線で示し、転写終結部位の反転繰り返しを両方向の矢印で示す。pceCの読み枠は514番の塩基から1614までである(終止コドンを含めて367アミノ酸、成熟蛋白質で39.67kDa)。ハイドロパシープロットにより、認識可能なシグナルペプチドの存在が示され(図9)、また先に決定されたアミノ末端配列からメチオニンが欠けており、これは翻訳後にプロセッシングを受けることを示している。コード領域は21アミノ酸のシグナルペプチドから始まり、先に決定されたアミノ酸配列がそれに続く(図5)。そこで、プロセスされた蛋白質(346アミノ酸)の分子量を計算すると、およそ37.40kDaで

あり、これはマスペクトル解析により決定された分子量と一致している(図4)。リボソームに結合するであろうと思われる部位(AAAGGA)が、ATG開始コドンの8塩基上流に見出された。典型的な-10から-35のプロモーター配列が、コード領域の上流に見出された。TGA終止コドンの39bp下流に、非依存的な終結部位を示す反転繰り返しが存在していた(図8)。

【0049】BLASTの検索によると、pceCの塩基配列及び推定アミノ酸配列は、*serratia marcescens*と大腸菌ポリンの配列と相同性を示した。Clustal Wプログラムを用いたところ、pceCの塩基配列は、大腸菌のポリンと*serratia marcescens*のポリンの塩基配列と、それぞれ63.7%と60%の相同性を示した。推定アミノ酸配列のハイドロパシープロファイルを検討したところ(図9:ハイドロパシープロット)、これまで知られたリーダーペプチドに典型的なことに、アミノ末端領域において大きな疎水性領域が示された。

【0050】毒性の生体異物分子の嫌気性還元脱ハロゲン化は、近年ますます注意をひいている。本発明において、新たに単離された*C. bifermentans*菌株DPH1に由来する、PCEデハロゲナーゼを精製し、特性解析し、遺伝子配列を解析した。pceCは、細胞に結合した細胞外酵素(膜表層蛋白質)であると考えられ、細胞膜に緩く結合しており、水性緩衝液で容易に抽出される。更に、先に決定されたアミノ末端アミノ酸配列はアラニンより始まり、pceCの推定アミノ酸配列には、認識し得るシグナル配列が含まれており、これはプロセスされた膜表層蛋白質である事を示している。

【0051】*C. bifermentans*デハロゲナーゼの至適温度(35[°])は、*D. multivorans*において報告された温度である42[°]に近い温度であり、*Desulfitobacterium*種菌株PCE-Sにおいて報告された50[°]とは完全に異なっている。*C. bifermentans*デハロゲナーゼの至適pHは、*D. multivorans*と*Desulfitobacterium*のPCE-Sの至適pHと似通っており、それらはpH8.0とpH7.2において最大活性を示す。PCEデハロゲナーゼ活性は、試験した金属イオンによって刺激されず、抑制される事も無かった。良く知られた二価金属イオンのキレーターであるEDTAもまた、効果を奏しなかった。この現象は、コリノイドデハロゲナーゼの置換基であるコバラミン(CO²⁺)が遊離型でないために、EDTAによるキレーションを受けない事で説明される。この状態において、EDTAの様な二価金属イオンキレーターは、コバルトを固定化しないであろう。

【0052】pceCはホモダイマーであり、他の報告

されたデハロゲナーゼと分子サイズが異なっている。D e h a l o s p i r i l l i u m m u l t i v o r a n s、D e s u l f i t o b a c t e r i u m 菌株 Y - 51、D e h a l o c o c c o i d e s e t h e n o g e n e s 菌株 195 の P C E デハロゲナーゼは、モノマーの蛋白質であり、見かけの分子サイズが 57 k D a、60 k D a、と 51 k D a であると報告されている。しかし、P C E - S 株由来の P C E デハロゲナーゼはおそらくホモトリマーであり、モノマーと天然型における見かけの分子量は、およそ 65 k D a と 200 k D a である。

【0053】12 μ M という Km 値は、D . m u l t i v o r a n s デハロゲナーゼにおいて観察された 200 μ M と比較して低い値であるが、D e s u l f i t o b a c t e r i u m P C E - S のデハロゲナーゼで記録された 10 μ M と類似している。そこで、P C E の親和性が高いという点において、D e s u l f i t o b a c t e r i u m P C E - S と C . b i f e r m e n t a n s のデハロゲナーゼは似通っている様であるが、D . m u l t i v o r a n s の精製した酵素の P C E 親和性は低かった。低い濃度の P C E や、他の塩素化した脂肪族化合物は、汚染された場所における微生物分解の基質として分解されにくく、利用することができない。そのため、低い Km 値の微生物デハロゲナーゼは、そのような場所において非常に重要であると思われる。しかし、C . b i f e r m e n t a n s デハロゲナーゼの V_{max} (73 nmol/mg 蛋白質) は、D . m u l t i v o r a n s と D e s u l f i t o b a c t e r i u m P C E - S で報告された、2650 nkat/mg 蛋白質と 2650 nkat/mg 蛋白質という値と比較して、低い値であった。

【0054】アルキル化試薬（プロピルイオダイド）と還元試薬（クエン酸チタニウム）の混合物により活性抑制が引き起こされ、この抑制は光により回復した。この観察は、この酵素はコリノイド補因子を含んでいるかもしれない可能性を示唆している。多くの嫌気性生物より得られるこのような蛋白質は、同じように P C E を分解する。コリノイド蛋白質による P C E 脱ハロゲン化について、正確な機構は殆ど知られていないが、過還元された状態のコリノイド (Co^{+}) は、ハロゲン化した炭化水素又はプロピルイオダイドの様なアルキル化試薬のアルキル残基に結合可能であり、脱塩素化又は酵素活性の抑制を達成する。M a r s h と H o l l o w a y により、コバラミン結合蛋白質において D X H X X G の残基が保存されていることが報告された (M a r s h , E . N . G , a n d D . E . H o l l o w a y (1992) F E B S L e t t . 310:167-170)。コバラミン結合部位であろうと思われるアミノ酸残基 (G K D L G V N G S D) が、p r e C のカルボキシ末端において見出された。この配列は、C l o s t r i d i u m

t e t a n o m o r p h u m とマウスのムターゼのコバラミン結合領域中に見られる、G S D C H A V G N K と G K D K H D R G A K という配列と類似していた。そこで、3つの蛋白質中で不変である、G X D X X X G はコリノイドモチーフであると考えられるが、この推定を実験で評価する必要がある。

【0055】ハロゲン - 炭素結合の酵素的開裂（脱ハロゲン化）は、微生物による変換及びハロゲン化した脂肪族化合物の無機化における重要なステップである。脱ハロゲン化により普通は毒性が低下し、ハロゲン化した分子の感受性が増加して、更に分解される。P C E と T C E による汚染を生物処理の方法として、2つの戦略が提案されている。それは、還元的脱塩素化による完全な分解と、好氣的システムと嫌氣的システムを組み合わせる事による完全な分解である。後者のシステムにおいて、P C E と T C E は嫌氣的な還元的脱塩素化により c i s - D C E に変換され、ひき続いて c i s - D C E は好氣的に完全に代謝される。P C E デハロゲナーゼ (P c e C) が P C E を素早く脱塩素化することは、嫌氣的な生物処理および好氣的な生物処理から成る 2段階処理方法において、非常に重要である。

【0056】塩素化された脂肪族化合物基質の混合液は、汚染された環境中でしばしば見られる。しかし、塩素化された炭化水素の嫌氣的変換は殆ど知られていなかった。C . b i f e r m e n t a n s のデハロゲナーゼは、多くの塩素化された脂肪族化合物分子において作用する嫌氣的な還元的デハロゲナーゼである、という点で特異であり、本発明はその様な酵素を初めて特性解析したものである。驚くべき事に、c i s - D C E を出発物質として添加しても分解が行われた。c i s - D C E を分解した際の生成物が何であるか、また中間生成物である c i s - D C E がなぜ分解され難いのか、について説明されていない。c i s - D C E 分解の、機構と生成物を理解するために、この観点からの更なる検討が必要である。

【0057】P C E デハロゲナーゼ遺伝子 (p c e C) の DNA 配列とフランキング領域の配列を決定した。両鎖の配列は全体的が一致していたので、正確であった。シャインダルガノ (A A A G G A) 推定配列は開始コドンから 8 塩基上流に見られ、それは A T G 開始コドンから 7 塩基という標準的な間隔と近いものである。構造遺伝子に加えて、結合したフランキング DNA 配列は、原核細胞の転写制御領域の典型的な構造であった。即ち、-10 から -35 のプロモーターコンセンサス配列と、r h o に非依存的なターミネーターに類似した配列を有していた (図 8)。推定アミノ末端配列の特徴は、良く知られたリーダーペプチド配列と一致していた。プロセスされた蛋白質におけるアミノ末端領域中の 3つのアミノ酸残基 (K V D) は、D e s u l f i t o b a c t e r i u m 種の P C E - S と一致しており、その中でリジン

(K)は3つのデハロゲナーゼにおいて共通している(図5)。しかし、この相同性の重要性とは明らかでなく、3つの細菌が脱ハロゲン化する能力との関係もまた明らかではない。

【0058】BLASTの検索において、pceCと他のPCEデハロゲナーゼ遺伝子の間において、明確な配列の相同性は見られなかった。同じように、pceAはいかなる既知のデハロゲナーゼとも、相同性を示さなかった。そこで、嫌気的なPCEデハロゲナーゼは異なった祖先の遺伝子から、生体異物汚染と環境条件の変化に反応して進化した可能性がある。驚くべき事に、塩基配列及びコードされた蛋白質の推定アミノ酸配列は、ポリリンと明らかな相同性を示した。これらの遺伝子間の進化における関係は、この段階では明らかでなく、更に検討する必要がある。しかし、*Rhodococcus erythropolis*と*Corynebacterium glutamicum*の様な、いくつかのグラム陽性細菌より得た抽出液は、チャンネル形成蛋白質(ポリリン)を含んでいることが示された。

【0059】本発明者らは、新規なPCEデハロゲナーゼを精製してクローン化し、そのPCEデハロゲナーゼ

は広範囲のスペクトルの塩素化脂肪族化合物を分解することができた。*C. bifermentans*のデハロゲナーゼは、過去に報告された嫌気的PCEデハロゲナーゼの間では特異であり、pceCの分子データは、微生物で分解されるデハロゲナーゼの新たなグループが存在するかもしれない可能性を示している。得られた結果は、*C. bifermentans*のデハロゲナーゼは、ハロゲン化された物質の混合液で汚染された場所において、PCEと他の塩素化された脂肪族化合物の、最初の分解に何らかの重要な役割を果たしているかもしれない可能性を示している(図1)。

【0060】

【発明の効果】本発明により、クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1由来のパークロロエチレン脱ハロゲン化酵素、及び当該酵素のアミノ酸配列と遺伝子塩基配列が与えられた。当該酵素は、広範囲のスペクトルの塩素化された脂肪族化合物を基質として分解するという特徴を有する。

【0061】

【配列表】

<110>出願人氏名：岐阜大学長

<120>発明の名称：クロストリジウム・ピフェルメンタンスDPH-1由来パークロロエチレン脱ハロゲン化酵素、当該酵素のポリペプチド、当該酵素をコードする遺伝子

<160>配列の数：1

<210>配列番号：1

<211>配列の長さ：核酸2117、アミノ酸366

<212>配列の型：核酸、アミノ酸

<213>起源：*Clostridium bifermentans*DPH-1

<400>配列

```

cctccaaca ttttaacgt acaggcttc gtgctaatg caacaagcca aagtcagaag 60
tttggaaaga cgcacatcg ttttgcaaaa cggtagcact ttccatgcag ttgctgaaaa 120
agcggaaaaa gagcggtaacc gagtaatgag ttatctcagt attaacctgg aacccaaaaa 180
aaagcccga cgggtgttc gggctgtca atttattcgc tggctaatta ataatagta 240
tcaatcgtc aacgaaaaat aaacgtgaca ataaaggcat ataacacgcg cagaatagcc 300
cgaacacact tcacttgtat aatttttatt ttatatattt accattccat acattacca 360
caattatcat catttccgta gaattattcc ttaaggttt tacttaaggc gtaacaattc 420
atatttatcc ctttacgaa ctttcccttt agcatgcttt tactccctac atgggtagtc 480
acaggttaat aaaaaaacta aaggattatt tca 513
ATG AAC AGA AAA GTA CTG GCT CTC GTA ATT CCT GCC CTG CTG GCT GCA 561
M N R K V L A L V I P A L L A A 16
GGC GCT GCT CAC GCG GCT GAA GTT TAT AAT AAA GAC GGC AAC AAA TTA 609
G A A H A A E V Y N K D G N K L 32
GAT CTC TAT GGC AAA GTA GAC GGC CTG CAT TAT TTC TCT GAT GAC GCT 657
D L Y G K V D G L H Y F S D D A 48
AAC AGT GAT GGC GAT CAG ACT TAT ATG CGT ATG GGC TTC AAA GGC GAA 705
N S D G D Q T Y M R M G F K G E 64
ACT CAG GTT AAC GAT ATG ATC ACC GGT TAC GGC CAG TGG GAA TAT CAG 753

```

T Q V N D M I T G Y G Q W E Y Q 80
 GTT CAG GCT AAC GGC ACC GAA GGT GAT AAA GGC GAC TCC TGG ACT CGT 801
 V Q A N G T E G D K G D S W T R 96
 CTG GCA TTC GCA GGT ATT AAA GTC GGC GAC TAC GGC TCA TTC GAC TAC 849
 L A F A G I K V G D Y G S F D Y 112
 GGC CGT AAC TAC GGC GTA ATG TAC GAC GTT GAA GGC TGG ACC GAT ATG 897
 G R N Y G V M Y D V E G W T D M 128
 CTG CCG GAA TTC GGT GGC GAC TCT TAC ACC AAA GCA GAC AAC TTC ATG 945
 L P E F G G D S Y T K A D N F M 144
 ACC GGT CGT GCG AAC GGC GTG GCG ACC TAC CGT AAT ACC GAC TTC TTT 993
 T G R A N G V A T Y R N T D F F 160
 GGT CTG GTT GAC GGT CTG AAC GTG GCG TTG CAG TAT CAG GGC GCG AAC 1041
 G L V D G L N V A L Q Y Q G A N 176
 GAA AAT CAG TCA CCA GAG CAG GAA GGC ACC AAT AAC GGT GGC GAC GAT 1089
 E N Q S P E Q E G T N N G G D D 192
 CGT AAC ATG AAG AAC TCT AAC GGT GAC GGC TTC GGT ATC TCC TCG ACC 1137
 R N M K N S N G D G F G I S S T 208
 TAC GAT TTG GGT ATG GGT GTA AGC TTC GGT GCA GCA TAC ACC TCT TCT 1185
 Y D L G M G V S F G A A Y T S S 224
 GAC CGT ACT AAC GAG CAG GTT AAC GAT TCT ACC GCG GGT GGT GAT AAA 1233
 D R T N E Q V N D S T A G G D K 240
 GCT GAC GCG TGG ACA GTC GGT CTG AAA TAC GAC GCG AAC AAC ATC TAC 1281
 A D A W T V G L K Y D A N N I Y 256
 CTG GCA ACC ATG TAC TCC GAA ACC CGC AAC ATG ACC CCT TAT GGT GGC 1329
 L A T M Y S E T R N M T P Y G G 272
 TCA AAC GGT AGT GAT AAT ACG ATT GCC AAC AAA ACT CAG AAC TTT GAA 1377
 S N G S D N T I A N K T Q N F E 288
 GTG ACT GCG CAA TAC CAG TTC GAC TTC GGT CTG CGT CCG GAA GTT TCT 1425
 V T A Q Y Q F D F G L R P E V S 304
 TTC CTG ATG TCT AAA GGT AAG GAT CTG GGT GTA AAC GGA TCT GAT GGC 1473
 F L M S K G K D L G V N G S D G 320
 GAC CAG GAT CTG GTG AAA TAC GCA TCC GTA GGC GCT ACT TAC TAC TTC 1521
 D Q D L V K Y A S V G A T Y Y F 336
 AAC AAA AAC TTC TCC ACC TAC GTT GAT TAC AAA ATC AAC CTG CTG GAT 1569
 N K N F S T Y V D Y K I N L L D 352
 GAA GAT AAA AAC TTC TAC AGC CAA AAA CGA CAT CTC TAC CGA TGA 1614
 E D K N F Y S Q K R H L Y R 366
 cgtagtagca ctgggt 1630
 atggtttacc agttctaate cgtcagcccg ctggcaacag cgggctctct ttatgttcta 1690
 acaattctgt tttatccaga tcaaacatt atatctgttg cactaaaaca catctctgat 1750
 agatgatatac ttgcattaag acctgtagta gaggatacct gcaatgaatc atcatctctgt 1810
 aaaatcatcc cgtattgcat cgtcggcta tgacgaatcc tcccgcacgc tagaaattcg 1870
 ctttcaccag ttgtctactc tgcaatatca gcatgtccct gctcgtattt ttcgtgattt 1930
 cctgagcgtc gtttctaag gtcgatttta cgatggagta ataaaaggaa agtttctga 1990
 aataaaaata aagtgatgcc aaaatgtgat ctttgtcatt gtacataaag tgccattacg 2050
 cggtaagcct tgggtggata cttaaacagg aggttttatg aacagaacga ttctgtacc 2110
 catcgtat 2117

c 【図面の簡単な説明】

【図1】 PCEの微生物による分解の経路を示した図である。

【図2】 *C. bifermentans*由来PCEデハロゲナーゼの精製過程における、SDS-PAGEの結果を示した写真である。

【図3】 分子排除クロマトグラフィーで天然型のC. bifermentans由来PCEデハロゲナーゼの分子量を決定するための、検量線のグラフである。

【図4】 MALDI-TOF/MSを用いて、C. bifermentans由来PCEデハロゲナーゼの分子量を解析した結果を示した図である。

【図5】 3種のPCEデハロゲナーゼの、アミノ末端アミノ酸配列を比較した図である。

【図6】 種々の制限酵素によりC. bifermentans由来PCEデハロゲナーゼのゲノミックDNA

を分解し、アガロースゲル電気泳動及びサザンブロッティングを行った結果の写真である。

【図7】 pDEHAL5の制限酵素地図を示した図である。

【図8】 C. bifermentans由来PCEデハロゲナーゼの塩基配列及び推定アミノ酸配列を示した図である。

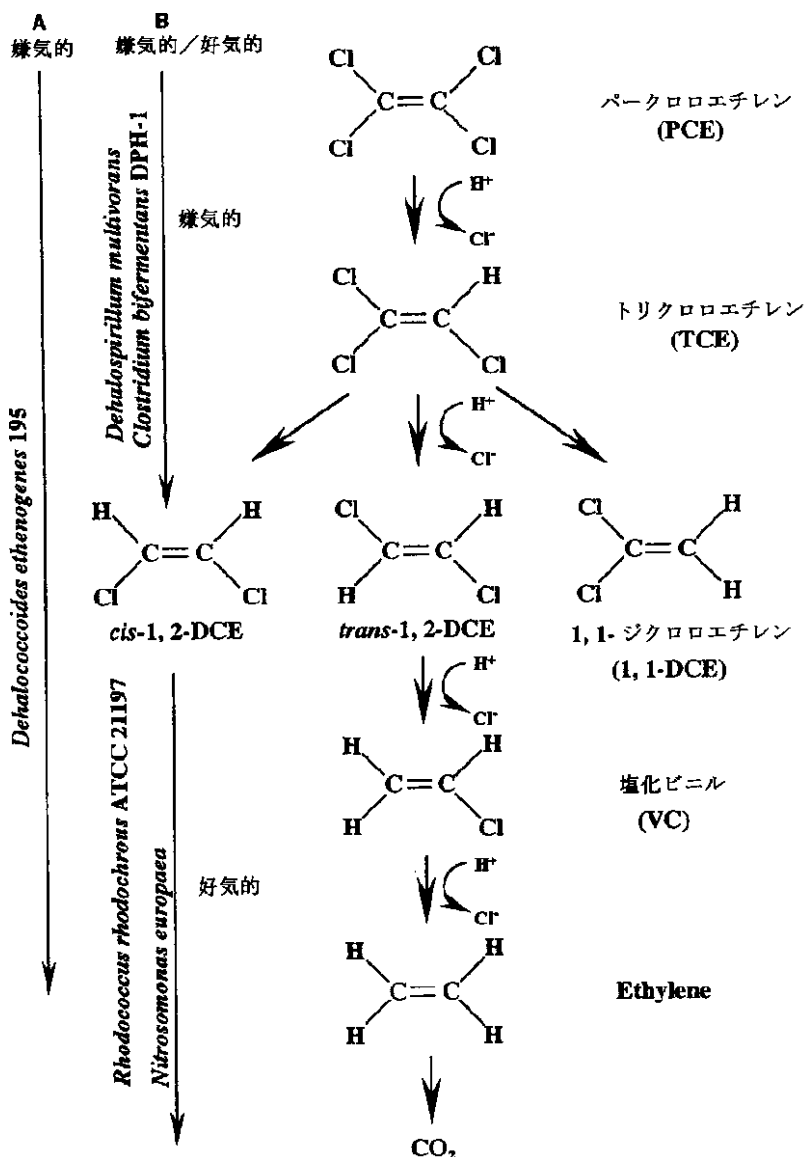
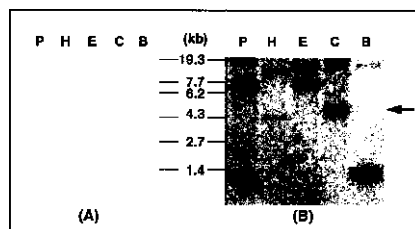
【図9】 C. bifermentans由来PCEデハロゲナーゼの推定アミノ酸配列の、ハイドロパシープロットを示したグラフである。

【図5】

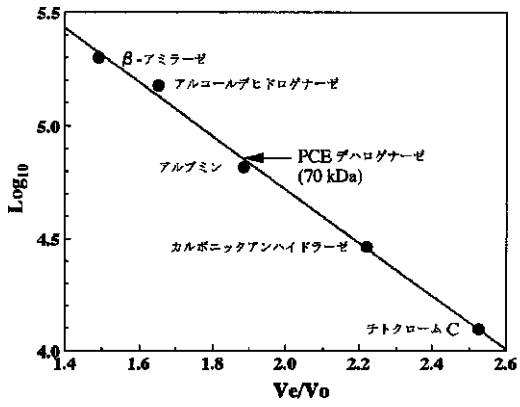
【図6】

AEVYNKDGNKLDLYC...GLHYFSNDT- *Clostridium bifermentans* DPH-1
 ADIVAPITETSEFF...VDAY- *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S
 MEKKKKPELSRRDF...IGGGAAATIAPF- *Dehalospirillum multivorans*

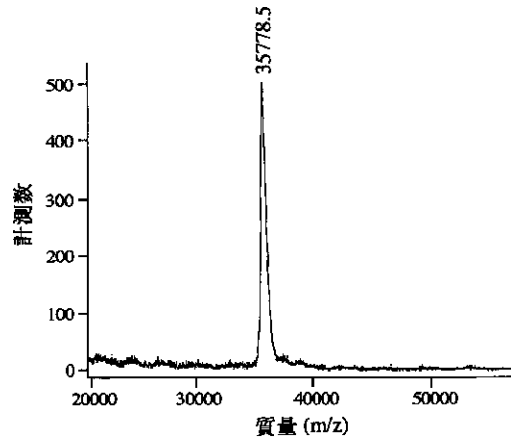
【図1】



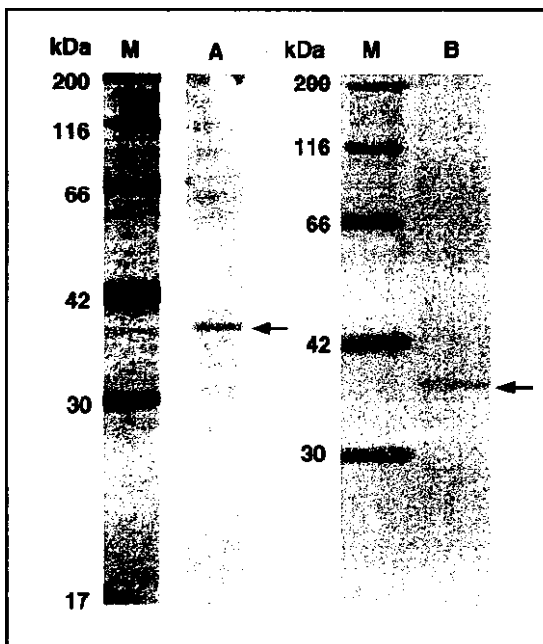
【図3】



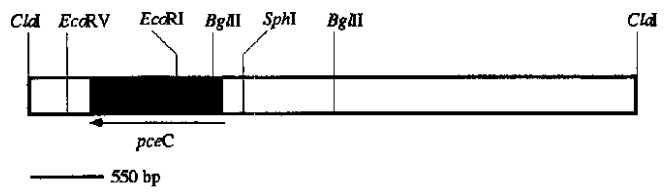
【図4】



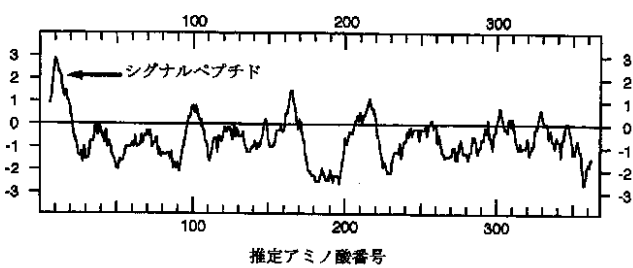
【図2】



【図7】



【図9】



【図8】

```

1 cctccaaacatttttaangtaoaggetttcgtgotaatgaaacagocaaagtcagaagtgttggaagagccaccatcgttttgcaaaocggtacgact 100
101 ttccctgcagctgtgaaaaagcggaaagagcggtaacggatgtaagtggttatctcagttataacotggaaacccaaaaaaagcccggaagcgggtgttc 200
201 gggcttctcaattttattcgtggctaaataatagotatcaatcogtcaacgaaataacacgtgacaataaaggcatataaacacgocgagaatagcc 300
301 -gaacacacttaoattgataattttttatattatatttaccattccatcaccacaattatcatcatttcogtagaattattcetttaaggttt 400
401 tacttaagcgtaacattcatattttatccotttaaggaacttctcctttagcatgcttttaacccctacaaagggtagtcacaggttcaataaanaacta 500
501 aagggtattttca ATG AAC AGA AAA GTA CTG GCT CTC GTA ATT CCT GCC CTG CTG GCT GCA GGC GCT GCT CAC GCG 576
1 N N R K V L A L V I P A L L R A G A A H A 21
577 GCT GAA GTT TAT AAT AAA GAC GGC AAC AAA TTA GAT CTC TAT GGC AAA GTA GAC GGC CTG CAT TAT TTC TCT GAT 651
22 A E V Y N K D G N K L D L Y G K V D G L H Y F S D 46
652 GAC GCT AAC AGT GAT GGC GAT CAG ACT TAT ATG COT ATG GGC TTC AAA GGC GAA ACT CAG GTT AAC GAT ATG ATC 726
47 D A N S D G D Q T Y M R N G F X G E T Q V N D M I 71
727 ACC GGT TAC GGC CAG TGG GAA TAT CAG GTT CAG GCT AAC GGC ACC GAA GGT GAT AAA GGC GAC TCC TGG ACT CGT 801
72 T G Y G Q W E Y Q V Q A N G T E G D K G D S M T R 96
802 CTG GCA TTC GCA GGT ATT AAA GTC GGC GAC TAC GGC TCA TTC GAC TAC GGC CGT AAC TAC GGC GTA ATG TAC GAC 876
97 L A F A S I K V G D Y G S F D Y G R H Y G V M Y D 121
877 GTT GAA GGC TGG ACC GAT ATG CTG CCG GAA TTC GGT GGC GAC TCT TAC ACC AAA GCA GAC AAC TTC ATG ACC GGT 951
122 V E G M T D H L P E F G G D S Y T K A D N F M T G 146
952 CGT GCG AAC GGC GTG GCG ACC TAC COT AAT ACC GAC TTC TTT GGT CTG GTT GAC GGT CTG AAC GTG GCG TTG CAG 1026
147 R A N G V A T Y R N T D F F G L V D G L N V A L Q 171
1027 TAT CAG GGC GCG AAC GAA AAT CAG TCA CCA GAG CAG GAA GGC ACC AAT AAC GGT GGC GAC GAT CGT AAC ATG AAG 1101
172 Y Q Q A N E N Q S Y E Q E G T N N G G D D R N M K 196
1102 AAC TCT AAC GGT GAC GGC TTC GGT ATC TCG ACC TAC GAT TTG GGT ATG GGT GTA ACC TTC GGT GCA GCA TAC 1176
197 N S N G D G F G I S S T Y D L G M G V S F G A A Y 221
1177 ACC TCT TCT GAC COT ACT AAC GAG CAG GTT AAC GAT TCT ACC GCG GGT GGT GAT AAA GCT GAC GCG TGG ACA GTC 1251
222 T S S D R T N E Q V N D S T A G G D K A D A W T Y 246
1252 GGT CTC AAA TAC GAC GCG AAC AAC ATC TAC CTG GCA ACC ATG TAC TCC GAA ACC CCG AAC ATG ACC CCT TAT GGT 1326
247 G L R Y D A N N I Y L A T N Y S E T R N M T P Y G 271
1327 GGC TCA AAC GGT AGT GAT AAT ACG ATT GCC AAC AAA ACT CAG AAC TTT GAA GTG ACT GCG CAA TAC CAG TTC GAC 1401
272 G S N G S D N T I A N K T Q N F E V T A Q Y Q P D 296
1402 TTC GGT CTG CPT CCG GAA GTT TCT TTC CTG ATG TCT AAA GGT AAG GAT CTG GGT GTA AAC GGA TCT GAT GGC GAC 1476
297 F G L R P E V S F L M S K G K D L G V N G S D G D 321
1477 CAG GAT CTG GTG AAA TAC GCA TCC GTA GGC GCT ACT TAC TAC TTC AAC AAA AAC TTC TCC ACC TAC GTT GAT TAC 1551
322 Q D L V K Y A S V G A T Y Y F N K N F S T Y V D Y 346
1552 AAA ATC AAC CTG CTG GAT GAA GAT AAA AAC TTC TAC ACC CAA AAA CGA CAT CTC TAC CGA TGA cgtagtagcaactgggt 1630
347 K I N L L D Z D X N F Y S Q K R H L Y R . 367
1631 atggtttaccagtttaactccgtcagocgctggcaadaggggtctctttatgtttotaacaattctgttttatoagatcaaaacattatctgttg 1730
1731 cactaaacacactctctgatagatgatattcatttaagacotgtagtagaggtatccctgcaatgaatcctcctcctgtaaaatcctocgtattgcat 1830
1831 ccgtcgtctatgacgaactcctccgcacgtagaaattcgttttaccagttgtctactctgcaatcagcagatgctcctgctcgtattttttcgtgatt 1930
1931 cctgagcgtcgtttctaaaggctgattttacagatggagtaataaaggaaagttctcgtgaataaaataaaggtagccaaaatgtagcttttctgctcatt 2030
2031 gtacataaagtgccattacgggttaagccttgggtgatacttaaacaggaggttttatgaacagaacgattctctgtaccatcogat 2117

```

フロントページの続き

(56)参考文献 CHANG Young C et al., Isolation and Characterization of a Tetrachloroethylene Dechlorinating Bacterium, Clostridium biferme, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000年, vol. 89, no. 5, 489 - 491

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)
C12N 15/09 ZNA
C12N 9/00
C12P 1/00
BIOSIS/MEDLINE/WPI/D
S(STN)
CAOLD(STN)
CAPLUS(STN)