

環境微生物の新機能探索と分子育種

古川謙介 Kensuke Furukawa
(旧微生物工業技術研究所)

要旨

微生物は酒類、食品、医薬などさまざまな‘ものづくり’に利用されているが、もう一つの重要な役割は環境浄化、ひいては地球レベルでの物質循環、元素循環への寄与である。筆者は工業技術院微生物工業技術研究所において地球規模で深刻な環境汚染を引き起した有害物質を分解する微生物の研究に従事した。水俣病の原因物質である有機水銀、カネミ油症事件を引き起こし、広く生物を汚染したポリ塩化ビフェニル (PCB)、土壌、地下水を汚染した塩化エチレン類 (パークレン、トリクレン) の三大環境汚染物質を分解する微生物の探索と機能解明、遺伝子工学を活用した環境微生物の新規な機能開発研究を行った。

はじめに

筆者が大学を出た 1960 年代はわが国の高度経済成長期とも相俟って日本列島のあちこちで公害問題が発生していた。関門トンネルをぬけて北九州に入ると工業地帯、七色の煙を観光宣伝する市の広告を憶えている。公害の原点とされる有機水銀による水俣病、カドミウム汚染によるイタイイタイ病、四日市ぜんそくなどに代表される大気汚染、水質汚染、土壌汚染が大きな社会問題となっていた。筆者は 1967 年、当時、千葉の稲毛にあった工業技術院発酵研究所 (後の微生物工業技術研究所、現産業技術総合研究所) に勤務、合成有機系微生物研究室に配属された。外村健三室長 (大阪府立大学名誉教授) のもとで水銀耐性菌の研究を開始した。その後、ポリ塩化ビフェニル (PCB)、トリクロロエチレン (TCE)、テトラクロロエチレン (PCE) など、世界的に大きな環境問題となった難分解性有害化学物質の微生物分解が筆者のライフワークとなった。1981 年から 10 年間 (微工研では 8 年間) に渡って展開された「次世代産業基盤技術研究開発制度」で携わったバイオテクノロジー研究プロジェクト「組換え DNA 利用技術」についても、研究の一端を記述したい。

水俣病と有機水銀分解菌

筆者は高校まで熊本市に住んでいたが、小学生の頃、父親がたびたび水俣に連れていってくれた。水俣の海はきれいで、魚は新鮮、美味だった。水俣病が発生する少し前である。水俣病は新日本窒素肥料 (現在のチッソ) 水俣工場でアセトアルデヒドの生産工程で触媒として使用した無機水銀がメチル水銀に変換され生物濃縮、食物連鎖を経て発生した。発酵研究所で外村先生により発見された *Pseudomonas* sp. K62 株は水銀に超耐性で、フェニル水銀、塩化第二水銀に対して数百 ppm の高濃度に耐性を示した。当時、水銀農薬は非選択性殺菌剤と考えられていた。K62 株の発見は大きな関心をよび、論文が *Nature* 誌に掲載された¹⁾。筆者に与えられた研究テーマは K62 株の水銀耐性の“からくり”を調べることであった。²⁰³Hg でラベルしたフェニル水銀と

塩化第二水銀を K62 株の培養液にいれると ^{203}Hg が短時間に培養液から消失した。これが揮散性の高い金属水銀への還元反応であることが判明したのは、研究を開始して1年程経った 1968 年の年末であった。 ^{203}Hg ラベルしたフェニル水銀を入れて K62 株を生育させると、培養基の底に僅かな鉛色沈殿物が認められた。これをガンマシンチレーションカウンターで測定すると、検出器の針が瞬時に振り切れた。次いで ^{14}C でラベルしたフェニル水銀を合成し、K62 株に作用させると ^{14}C -ベンゼンが活性炭に回収された。また、メチル水銀からメタン、フェニル水銀からベンゼンがガスクロマトグラフで検出された。このことから K62 株は有機水銀の炭素と水銀を切断し、炭化水素が生成すること、水銀は二価水銀イオンとなり、これがさらに金属水銀へ還元されることが判明した²⁾ (図1)。ついで細胞抽出液をゲル濾過 (セファデックス G150)、イオンクロマトグラフィーにかけ、それぞれの溶出画分についてフェニル水銀の分解を検討した。その結果、2つの溶出画分を混合するとフェニル水銀から金属水銀が生じた^{3,5)}。この二つの画分に存在する酵素は、ひとつは C-Hg 結合を切って二価の無機水銀を生じる酵素 (mercurial lyase、MerB)、もうひとつは二価の無機水銀を金属水銀に還元する酵素 (mercury reductase、MerA) であった。この二つの酵素を精製し、メチル水銀に作用させるとメタンと金属水銀が生じた。C-Hg 結合を切断する酵素(MerB)は分子量が約一万程度でチトクローム C と重なって溶出するので当初、このチトクロームが関与していると考え論文を発表したが、その後同僚の手塚敏幸氏によって訂正され MerB の本体が明らかにされた⁶⁾。外村研で展開された *Pseudomonas* sp. K62 株の有機水銀分解研究は、世界初の業績として NHK 科学番組「恐怖の水銀」で水俣病とともに紹介された。



図1. 酢酸フェニル水銀の微生物分解

有機水銀の C-Hg 結合を切るリアーゼ (MerB) と無機水銀イオンを還元する酵素 (MerA) により酢酸フェニル水銀はベンゼンと金属水銀に分解する²⁾。

我々の有機水銀分解の生化学的研究の後に、当時米国ミズリー州ワシントン大学の Simon Silver 教授と共同研究者によって水銀分解 *mer* 遺伝子の研究が精力的に行われた。*mer* 遺伝子はその分解に関与する上記二つの MerA と MerB の遺伝子以外に調節遺伝子、水銀結合、水銀輸送などに関与する遺伝子がクラスターを形成して存在することが明らかにされた。K62 株の水銀耐性遺伝子は当時、摂南大学の清野正子氏 (現北里大学教授) と芳生秀光教授によって明らかにされた^{7,8)}。K62 株には6つのプラスミドが存在し、その内の 26-kb と 68-kb の二つのプラスミドに *mer* 遺伝子クラスターが乗っていた。26-kb のプラスミドには一つの *merA* 遺伝子と二つの *merB* 遺伝子が存在した。環境省水俣病総合研究所の中村邦夫博士は水俣湾に棲息する水銀耐性菌の生態学的研究を行っていた。氏の調査によると高濃度水銀で汚染された 1983 年に採取した水俣湾底泥細菌の 58%が 20ppm の塩化第二水銀に耐性を示した。熊本県は 1976 年から 1990 年の 14 年間、高濃度水銀を含むヘドロをくみ上げ埋め立てた。浚渫後の 2003 年に採取したヘド

ロの水銀耐性菌は 1.1%にまで減少していた。中村氏とは水俣湾の水銀耐性海洋細菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* M1 株を分離し、共同研究を行った。M1 株では *merA* と *merB* 遺伝子が染色体上の異なる場所に他の *mer* 遺伝子と共にクラスターを形成して存在していた⁹⁾ (図2)。外村研では有機水銀の分解と並行して微生物による無機水銀の有機化の研究が行われた。山田勝氏がこの研究を担当したが、偏性嫌気性菌である *Clostridium cochlearium* T2 株の培養液に無機水銀を入れるとメチル水銀が生成した。この細菌が体内でつくるメチルコバラミンのメチル基が水銀イオンと反応してメチル水銀が生成することが明らかとなった。

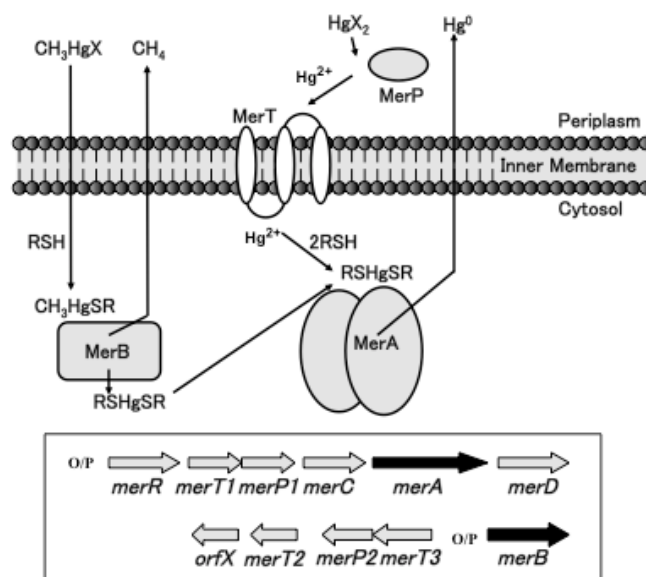


図2. 水俣湾海洋細菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 の有機水銀分解機構と遺伝子クラスター

この細菌には *merA* 遺伝子と *merB* 遺伝子が染色体上に別々に存在する⁹⁾。

わが国の高度成長期に発生した公害の原点とされる水俣病は、新潟県阿賀野川下流域でも発生し、「第二の水俣病」や「新潟水俣病」と呼ばれた。水俣病問題は被害者が原因企業や県、国を相手取って訴訟、損害賠償を求めた。2010 年、原告と被告の国、熊本県、チッソが和解することで一応の決着がついたが、その後も行政訴訟が起されるなど、完全決着には至っていない。水銀による環境汚染、公害問題は世界各地で発生しており、2013 年 10 月、140 カ国の政府関係者が集合、水銀によるリスクの削減のため法的拘束力のある「水俣条約」を採択した。

PCB 分解菌の探索分離、分解経路、酵素、遺伝子

有機水銀分解の研究をまとめて、1973 年、博士号を取得し、同年 10 月、米国ウィスコンシン大学松村文夫教授の研究室に留学する機会を得た。最初の 3 ヶ月は無機水銀のメチル化の研究に従事した。ハワイ沖でとれたキハダマグロの肝臓をすり潰して無機水銀を入れるとメチル水銀が大量に生成した¹⁰⁾。マグロ肝臓中に存在するメチルコバラミンが無機水銀と反応してメチル水銀ができたのである。松村研究室は昆虫学科 (Entomology) であったが、昆虫毒性の研究以外に

も土壌中のダイオキシン分解の研究が行われていた。松村教授からは水銀の研究と並行して PCB (ポリ塩化ビフェニル) 分解菌を探すよう言われた。当時、PCB は世界中で深刻な環境汚染を引き起していた。日本では福岡を含む西日本でカネミ油症事件が発生した。これはライスオイルの製造過程で熱媒体に使用していた PCB が混入、被害者は 1 万 4,320 人、死亡者 50 人を出した事件である。PCB はベンゼン環が二個連結したビフェニルに塩素ガスを直接吹き込んで製造される。そのため塩素が 1 から最高 10 個まで置換した PCB 化合物が理論的に 209 種類できる (図 3)。

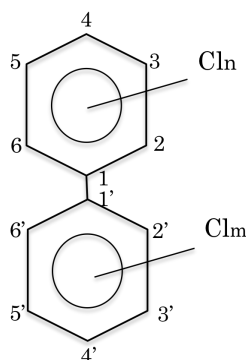


図 3. PCB の構造と塩素置換位置¹⁷⁾

1929 年製造が開始され、1970 年代に製造中止になるまで、世界で約 120 万トン、わが国では 5.8 万トンが製造、輸入された。塩素数が少ない PCB は液体であるが、塩素数が増えると固体となる。物理的、化学的性質がきわめて安定であるため、変圧器油、絶縁油、熱媒体油、潤滑油、可塑剤、農薬展着剤など広範囲に使用された。PCB の環境汚染がはじめて報告されたのは 1966 年である。スウェーデンで死んだ海鳥から数百 ppm の高濃度の PCB が検出され、その後ヨーロッパ、米国、日本と次々と PCB による環境汚染が明らかとなった。わが国でもメディアが連日大きく報道した。厚生省は一週間に食べる魚を二匹までに制限する行政指導を行った。PCB は水には難溶性であるが、高い脂溶性があり生物の脂肪組織に蓄積する。製造された PCB の 40% 程が環境中に流出、食物連鎖によりあらゆる生物を汚染した。安定な PCB を分解する微生物が本当にいるのか、研究開始当初は疑心暗鬼で探索した。ウィスコンシン州のメンドータ湖は諏訪湖ほどの湖であるが、大学の排水口の近くから土壌を採取、最初は PCB を単一の炭素源として生える菌を探したが、釣れてこなかった。しかし、ビフェニルを炭素源として利用する菌は数株見つける事ができた。このビフェニル資化菌が PCB を共代謝 (コメタボリズム) することが分かった。ビフェニルで培養した *Alcaligenes* sp. Y42 株と *Rhodococcus* sp. P6 株の菌体を ¹⁴C でラベルした PCB (2,5,2'-trichlorobiphenyl) に作用させると瞬時に細胞に吸着し、ついで放射能を含む多くの中間代謝物が認められた¹¹⁻¹²⁾ (図 4)。すなわち、ビフェニルを分解する酵素が共代謝によって PCB を塩化安息香酸へ酸化分解することが分かった。前述したように PCB は 209 種類の化合物が存在する。そこで、塩素数の異なる諸種の PCB を購入し、その生分解性 (biodegradability) を調べた。その結果、以下のことが明らかとなった。(1) PCB の微生物分解は塩素数が多い程分解されにくい、(2) 片方のリングのみに塩素置換した PCB は同じ数、両リングに置換したものより分解されやすい、(3) ビフェニル環の 2,6-位に塩素が置換した PCB は極めて分解が困難になる (図 5)、(4) 各種ビフェニル資化菌の間で PCB 分解能力が大きく異なる¹³⁾。

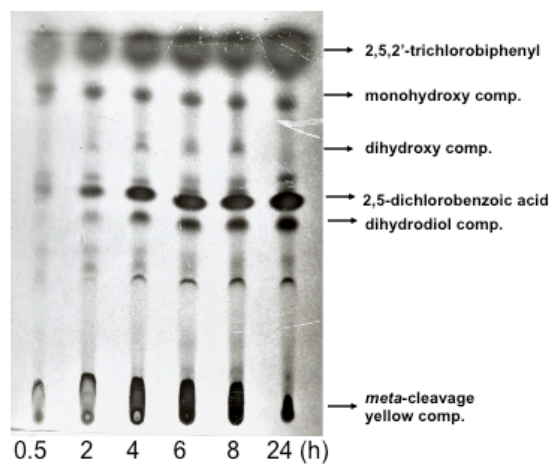


図4. *Alcaligenes* sp. Y42 株による ^{14}C -2,5,2'-トリクロロビフェニルの分解と中間代謝物質反応液を経時的に溶媒抽出、濃縮後薄層クロマトグラフィーを行い、代謝産物の放射能を検出した¹¹⁾。

1年3ヶ月のウィスコンシンでの研究生活の後、微工研に戻った。当時の微工研にはガスクロマトグラフ・質量分析機 (GC-MS) が無かったが、運良く予算がついて日本電子 (株) から新しく出たばかりの磁場型 GC-MS (モデル D300) を値切って購入した。塩素置換の異なる PCB が微生物によってどのように分解するのか、 γ 線照射施設を改造した窓の無い部屋にこもって実験を繰り返した。

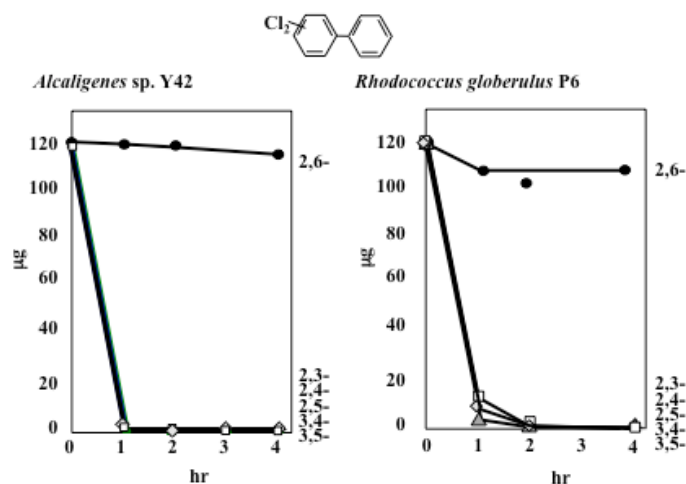


図5. *Alcaligenes* sp. Y42 株と *Rhodococcus globerulus* P6 株による片方のリングに2個塩素置換した PCB の分解
2,6-位に塩素が置換するときわめて分解されにくい¹³⁾。

ビフェニル資化菌のビフェニル代謝は安息香酸への酸化分解である（図5）。PCBの分解も基本的には同じで、主経路は塩素置換の無いあるいは塩素が1個ついたリングの2,3-位への酸素分子の導入に始まり、ジヒドロジオール、フェニルカテコール、環開裂を経て、塩化安息香酸へ分解される。この過程で脱塩素化は生じない。この分解に関与する酵素はビフェニル酸素添加酵素（BphA）、ジヒドロジオール脱水素酵素（BphB）、環開裂酸素添加酵素（BphC）、加水分解酵素（BphD）の4つの酵素である。しかし、PCB成分の塩素の置換数と置換位置の違いにより、ジヒドロジオールやジヒドロキシ化合物で反応が止まったり、環開裂黄色物質が蓄積したりする。また、ビフェニル資化菌の違い、すなわちビフェニル資化菌の酵素の特異性の違いで代謝経路が異なる場合も認められた¹⁴⁻¹⁸。例えば、*Alcaligenes* sp. Y42株では2,4,6-trichlorobiphenylを全く分解できないが、*Rhodococcus* sp. P6株は同化合物を速やかにジヒドロキシ化合物に変え、さらにトリヒドロキシ化合物を蓄積する¹⁹。*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株は2,5,4'-trichlorobiphenylをメタ開裂黄色化合物に分解するが、*Burkholderia xenovorans* LB400株は同化合物を3,4-dihydroxy-2,5,4'-trichlorobiphenylへと変換し、この化合物がdead end化合物となる。



写真1. イリノイ大学チャクラバーティ研究室（1980年）後列右端がChakrabarty教授

これらの研究をまとめたころ、周りは遺伝子工学が大きなブームとなった。東大の矢野圭司先生のもとで2ヶ月間勉強した後、1980年からイリノイ大学シカゴ校で一年半、環境微生物のバイオテクノロジーを勉強する機会を得た。A.M.Chakrabarty教授は、インドのカルカッタ大学でPh.Dを取得後、米国に渡りゼネラルエレクトリック（GE）社における研究で複数の分解系プラスミドを*Pseudomonas putida*株に導入した。トルエン、オクタン、ナフタレン、サリチル酸等を同時に分解、資化する分解菌の特許申請した。遺伝子工学によって作製した微生物が特許になり得るかが問題とったが、1980年、最終的に米国大審院でこの石油分解菌の特許が認められた。日本でもチャクラバーティ裁判として話題となった（写真1）。裁判の直後の研究室はメディアが押しかけて騒然としていた。研究室では、ベトナム戦争で使用した枯れ葉剤2,4,5-Tを資化する菌が分離されていた。この菌は塩素のついていないフェノキシ酢酸は資化せず、塩素が3個ついた2,4,5-Tを好んで食べる変わりものである。この研究室で筆者は100-kbを超える巨大な分解系プラスミドの抽出に苦労した。トルエン資化菌とサリチル酸資化菌を混合培養するとト

ルエンにもサリチル酸にも生育する株が得られた。調べてみるとこの株には TOL プラスミドの一部 (57-kb) が SAL プラスミドに融合した巨大プラスミド (pKF439; 138-kb) が存在した²⁰⁾。後に津田氏らの研究からこれがトルエン代謝遺伝子を含むトランスポゾン Tn4651(56-kb)であることが判明した²¹⁾。環境汚染物質の微生物分解の研究は 1980 年代、90 年代盛んに行われ、“Biodegradation”を主題にしたゴードン会議やキーストンシンポジウムが頻繁に開催され講演を行う機会を得た (写真 2)。



写真 2. “Biodegradation”ゴードンカンファレンス (1980 年)

ビフェニル (PCB) 分解遺伝子はシカゴでの留学が終わり、つくばに帰ってからクローニングに成功した。当時、新日鉄化学 (株) からバイオ研修に派遣されていた宮崎寿次氏 (現長瀬産業 (株)) と実験を開始した。北九州にあるビフェニル製造工場の土壌から分離した *Pseudomonas*

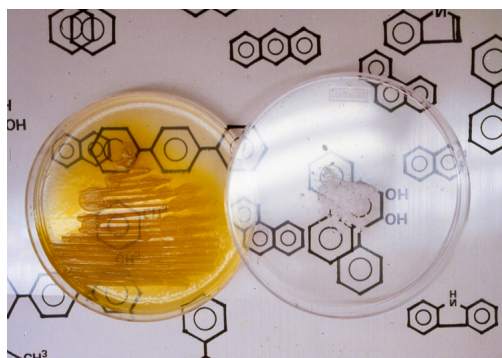


写真 3. ビフェニルを環開裂黄色物質へと分解する組換え緑膿菌²²⁾

pseudoalcaligenes KF707 株の染色体 DNA からショットガンクローニングを行った。ドイツで開発された広宿主域ベクター pKT230 (12.6kb) を使用し、宿主株 *Pseudomonas aeruginosa*

PAO1161 株を形質転換した。トライ&エラーを繰り返した後、運良くビフェニルを環開裂黄色物質へと変換する遺伝子クラスターと調節遺伝子を含む 6.8-kb DNA を得ることができた(写真3)。大きな組換えプラスミド 19.4-kb がよく宿主の緑膿菌に入ってくれたものである。この世界初の遺伝子を *bph* と命名した²²⁾。この成果は 1986 年にスイスのジュネーブで Timmis 教授と原山重明氏(現中央大学教授)らが主催した第一回国際シュドモナスシンポジウムで発表した。その後、KF707 株の全 *bph* 遺伝子を取得し、塩基配列、関与する酵素の解析を行った²³⁻⁴⁰⁾(図6)。

酸素添加酵素酸素添加酵素の進化分子工学

我々の成果を基に 1990 年から 2010 年にわたり PCB 分解菌としてさまざまなグラム陰性菌とグラム陽性菌が世界各地で分離され、それぞれの *bph* 遺伝子が単離され、研究が広まり深化していった。この中で我々が競合したのはゼネラルエレクトロクス (GE) 社の *Burkholderia xenovorans* LB400 株である⁴¹⁾。GE 社は発明王エジソンが設立に関わった世界一の電気会社であるが、PCB を含む変圧器などをハドソン川に投棄したため、米国の環境修復法律である通称スーパーファンド法により厳しく処理が義務づけられた。そのため 1980 年頃から PCB の化学処理と並行して分解菌の研究を始めた。ニューヨーク州スケネクタディにある 2000 人を超える研究

bph gene cluster

<i>bphR</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>orf3</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>X0</i>	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X3</i>	<i>D</i>
-------------	-----------	-----------	-------------	-----------	-----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

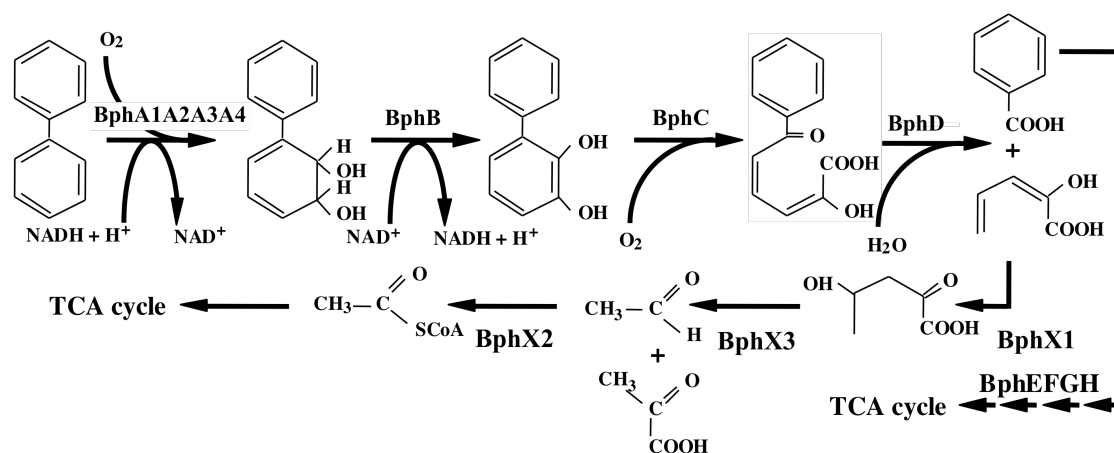


図6. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニル代謝経路、酵素および *bph* 遺伝子クラスター^{23) 32)}

BphA1A2A3A4: ビフェニル酸素添加酵素 (4つのサブユニットから成る)、BphB: ジヒドロジオール脱水素酵素、BphC: 環開裂酸素添加酵素、BphD: 環開裂物質加水分解酵素、BphEFGH: 安息香酸分解酵素、BphX1X2X3: ビフェニル下流代謝物分解酵素

所は人口ダイヤモンドの研究などさまざまな研究が行われていたが、10 名ほどの研究員が PCB 分解菌の研究に従事していた。彼らとはイリノイ大学留学時代に数回セミナーを行い、議論を深めた。その過程で分離されたのが、LB400 株である。我々の KF707 株は主に塩素数 1~3 の PCB を良く分解するのに対して、LB400 株は塩素数 1~6 の PCB を広範囲に分解した。そこでこの

両菌株の *bph* 遺伝子は大きく異なるであろうというのが、大方の予想であった。我々は 1992 年、KF707 株 *bph* 遺伝子の塩基配列を米国生化学会誌、J.Biol.Chem. に発表³⁸⁾、GE 社は少し遅れ

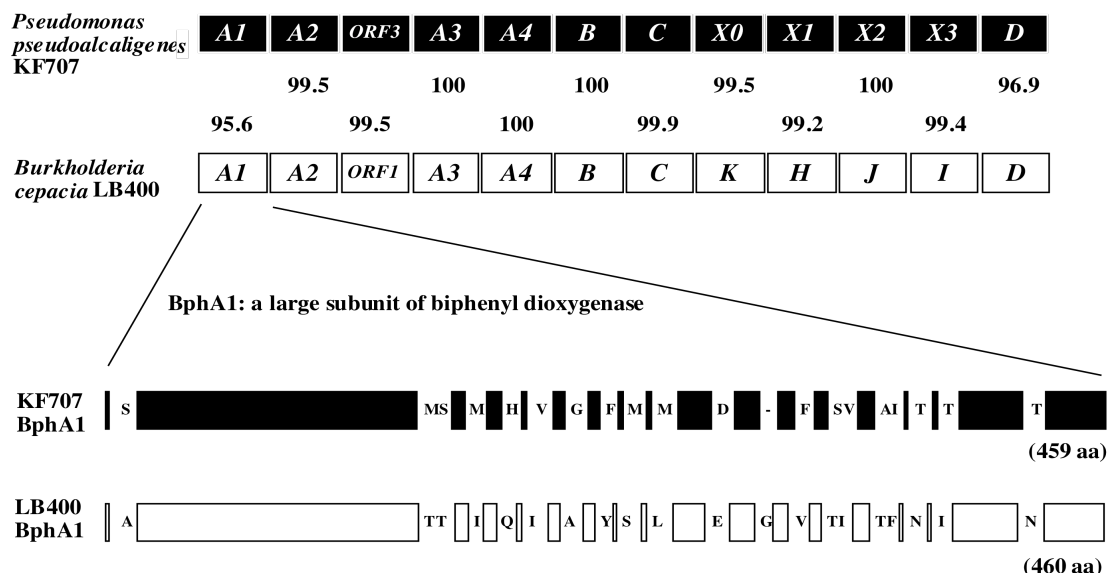


図 7a. *P. pseudoalcaligenes* KF707 株と *Burkholderia xenovorans* LB400 株の *bph* 遺伝子クラスターの比較とビフェニル酸素添加酵素大サブユニット (BphA1) のアミノ酸配列の比較⁴⁴⁾ KF707 株 BphA1 (459 アミノ酸) と LB400 株の BphA1 (460 アミノ酸) の間で異なるアミノ酸を示す。この 20 のアミノ酸の違いが両菌株の PCB 分解特性の違いに関係する。

て LB400 株のそれを米国微生物学会誌、J. Bacteriol. に発表した⁴¹⁾。ビフェニル酸素添加酵素は 4 つのサブユニットからなる多成分酵素である (図 6)。直接酸素分子を基質に導入する末端酸素添加酵素は大サブユニット (BphA1) と小サブユニット (BphA2) が $\alpha 3 \beta 3$ のヘテロヘキサマーの構造、この大サブユニットは触媒領域に非ヘム二価鉄を有する。フェレドキシン (BphA3) とその還元酵素 (BphA4) は NADH からの電子伝達に関与し、末端酸素添加酵素を還元する。これらのサブユニットのうち、我々は大サブユニット (BphA1) が基質認識、基質特異性に関与することを明らかにした。驚いたことに、KF707 株と LB400 株の *bph* 遺伝子の塩基配列は極めて類似していた。KF707 株と LB400 株の大サブユニット (BphA1) はそれぞれ 459 と 460 のアミノ酸からなり、両者で 95.6% の同一性 (identity) を示す。すなわち、両菌株の PCB 分解能の違いは BphA1 のアミノ酸のうち僅か 20 のアミノ酸の違いによって生起することが分かった⁴²⁾ (図 7a)。1989 年、筆者はつくばの微工研から出身講座である九大農学部発酵学教室に助教授として赴任し、*bph* 遺伝子について研究を続行した。

1994 年、米国 Maxygen 社の Stemmer 博士は Nature 誌に DNA シャフリング法による酵素の分子進化工学に関する最初の論文を発表した⁴³⁾。我々はこの論文に興味をもち、KF707 株と LB400 株の *bphA1* 遺伝子間でシャフリングを行った (図 7b)。結果は思った以上にうまくいき、親酵素を凌駕するさまざまな機能をもつ酸素添加酵素が取得できた。この中には親酵素が分解できないベンゼン、トルエン、ダイオキシシン (塩素置換無) に対して新たな分解能を獲得した酵素

	237	238	247	255	258	277	268	283	285	303	313	320	325	326	335	336	338	341	376
KF707	M	S	M	H	V	G	F	M	M	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
LB400	T	T	I	Q	I	A	Y	S	L	E	G	V	T	I	T	F	N	I	N
pSHF1029	T	T	I	H	V	A	F	M	M	E	G	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1039	M	S	I	Q	I	A	F	M	M	E	G	V	T	I	A	I	T	T	T
pSHF1043	T	T	I	Q	I	G	F	M	M	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1045	M	S	M	Q	I	G	Y	M	M	E	-	F	S	V	A	I	T	T	N
pSHF1049	M	S	I	Q	I	A	F	M	M	E	G	F	T	I	A	I	T	T	N
pSHF1065	T	T	I	Q	I	A	F	S	L	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1072	M	S	M	Q	I	A	Y	M	M	D	-	F	S	V	A	I	T	T	T
pSHF1075	T	T	M	H	V	G	Y	S	L	E	-	V	T	I	T	F	N	I	N

図 7b. 進化酸素添加酵素大サブユニット(BphA1)のアミノ酸配列
KF707-BphA1 と LB400-BphA1 間で異なる 20 アミノ酸のシャフリングを示す。

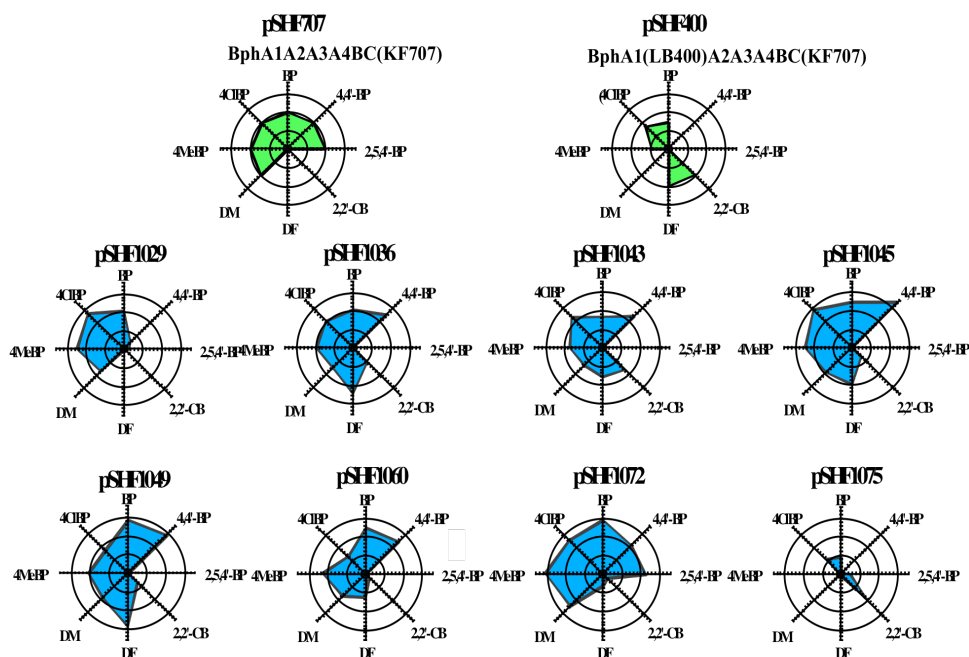


図 8. 進化酸素添加酵素によるビフェニル関連化合物の分解特性⁴⁴⁾

進化BphA1-BphA2A3A4-BphB-BphCを発現する *E. coli* 株による環開裂黄色化合物の生成を測定 BP: ビフェニル、4ClBP: 4-クロルビフェニル、4MeBP: 4-メチルビフェニル、DM: ジフェニルメタン、DF: ジベンゾフラン、2,2'-CB: 2,2'-ジクロロビフェニル、2,5,4'-BP: 2,5,4'-トリクロロビフェニル、4,4'-BP: 4,4'-ジクロロビフェニル

や、親酵素がほとんど分解できない2,2'-ジクロロビフェニルのみに高い分解能を示す酵素が得られた⁴⁴⁻⁴⁵⁾ (図8)。また、ランダムプライミング組換え手法によって BphA1 タンパク質の 376 番目のトレオニンバリンを置換したビフェニル酸素添加酵素はダイオキシン (塩素置換なし) を分解した (図9)。ついで進化した *bphA1* 遺伝子を相同組換えにより野生株 KF707 染色体の同遺伝子と入れ替えることに成功した⁵⁰⁾。すなわち、染色体上の *bphA1* をテトラサイクリン (*tet*) 耐性遺伝子と置換し、ついで *tet* 遺伝子を進化 *bphA1* で置き換えた。これらの進化株は諸種の芳香族化合物の資化能を獲得、ワイドな PCB 分解能を示した。

上記のビフェニル酸素添加酵素進化株は KF707 株と LB400 株の大サブユニットのアミノ酸を DNA シャフリングにより相互に変える事で造成されたが、この研究の前にビフェニル酸素添加酵素とトルエン酸素添加酵素のサブユニットを相互に交換したハイブリッド酸素添加酵素を構築した⁵²⁻⁵⁴⁾。トルエン酸素添加酵素はビフェニル酸素添加酵素と同様、4つのサブユニットから構成されている (図10)。このうち大サブユニットのみがトルエン酵素由来 (TodC1)、小サブユニット (BphA2) 及びフェレドキシン (BphA3)、還元酵素 (BphA4) がビフェニル酵素由来のハイブリッド酸素添加酵素 (TodC1-BphA2-BphA3-BphA4) (図11) は環境汚染物質であるトリクロロエチレン (TCE) や *cis*-ジクロロエチレン (*cis*-DCE) に対して極めて高い分解能を示した⁵⁵⁻⁵⁹⁾。ついで、トルエン酵素の大サブユニット遺伝子 (*todC1*) をビフェニル資化菌 KF707 株の染色体 *bphA1* と入れ替えた。このハイブリッド進化株はベンゼン、トルエンなどの単環化合物を資化し、速やかに TCE を分解した⁶⁰⁻⁶²⁾ (図12)。

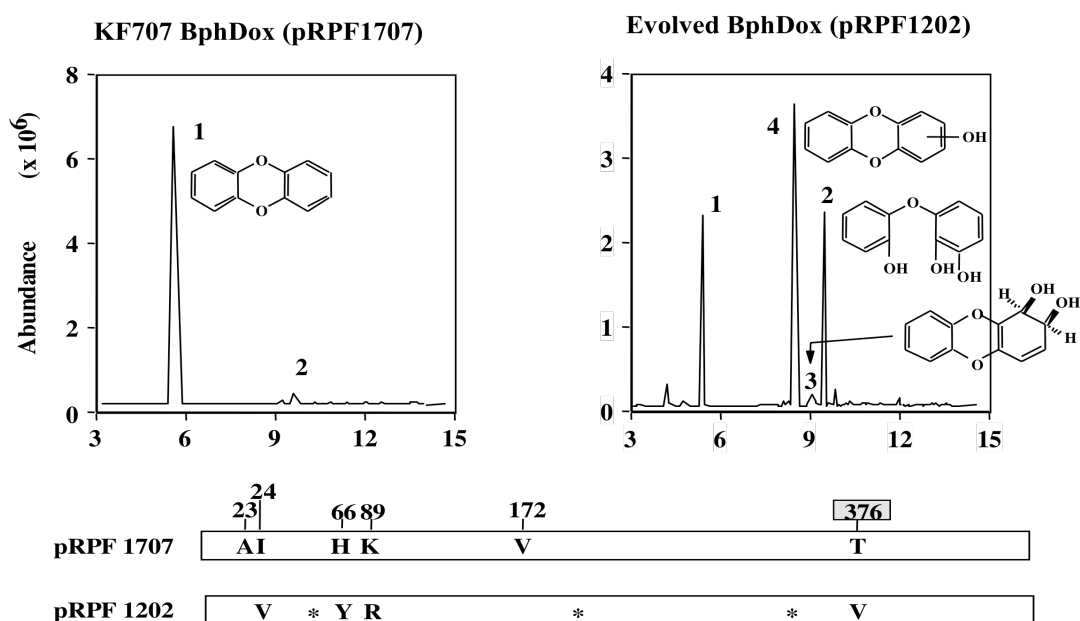


図9. ランダムプライミング組換え手法によって得られた T376V 変異酸素添加酵素によるダイオキシンの分解⁴⁷⁾

T376V のみの変異でダイオキシン分解活性が生じた。これ以外のアミノ酸変異はこの分解に影響しなかった。

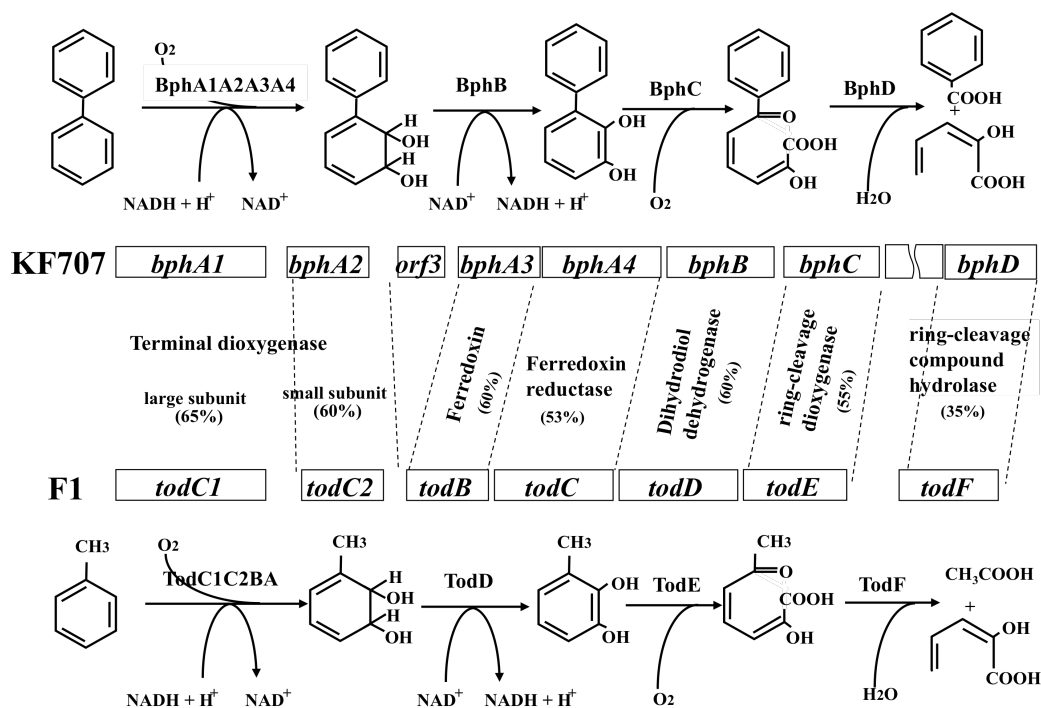


図 10. *P. pseudoalcaligenes* KF707 株のビフェニル代謝と *bph* 遺伝子群と *P. putida* F1 株のトルエン代謝と *tod* 遺伝子群⁵³⁾

TodC1C2BC: トルエン酸素添加酵素（4つのサブユニットから成る）、TodD: ジヒドロジオール脱水素酵素、TodE: 環開裂酸素添加酵素、TodF: 環開裂物質加水分解酵素

	Terminal dioxygenase large subunit	Terminal dioxygenase small subunit	Ferredoxin	Ferredoxin reductase
pJHF108	<i>bphA1</i>	<i>bphA2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>
pJHF3051	<i>todC1</i>	<i>todC2</i>	<i>todB</i>	<i>todA</i>
pJHF101	<i>todC1</i>	<i>bphA2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>
pJHF201	<i>bphA1</i>	<i>todC2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>
pJHF301	<i>todC1</i>	<i>todC2</i>	<i>bphA3</i>	<i>bphA4</i>

図 11. ビフェニル酸素添加酵素とトルエン酸素添加酵素のサブユニット遺伝子間の相互置換によるハイブリッド酸素添加酵素の構築⁵³⁾

E. coli (pJHF101) 株 (TodC1-BphA2-BphA3-BphA4 を発現) はトリクロロエチレン (TCE) を効率よく分解した。

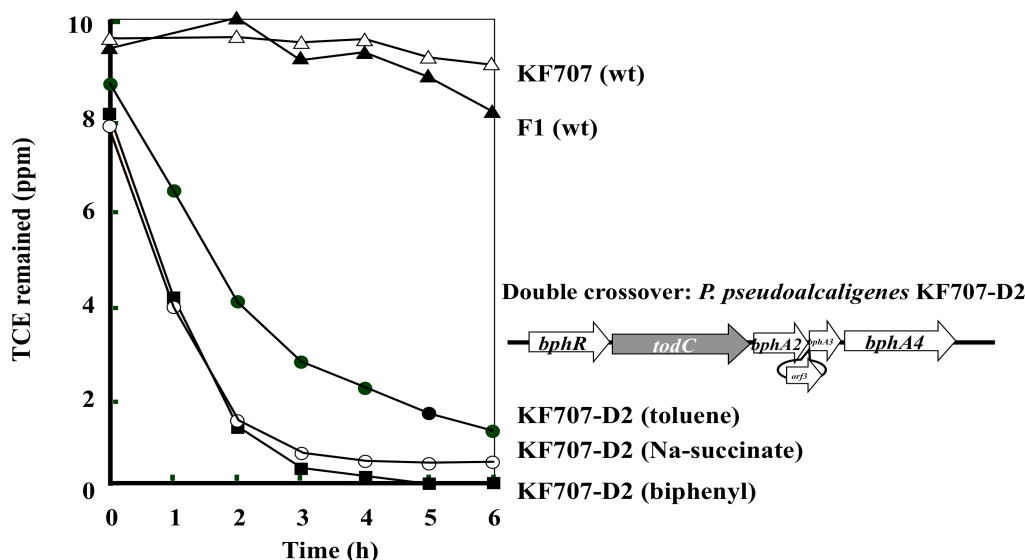


図1 2. TodC1-BphA2-BphA3-BphA4 ハイブリッド酸素添加酵素を発現する KF707 進化株によるトリクロロエチレン (TCE) の分解⁵⁷⁾

todC1 遺伝子を KF707 株染色体 *bphA1* と置換したハイブリッド株 KF707-D2 株はトルエン、コハク酸、ビフェニルにそれぞれ生育させた。KF707(wt): ビフェニル資化菌 *P. pseudoalcaligenes* KF707 野生株、F1(wt): トルエン資化菌 *P. putida* F1 野生株

進化酸素添加酵素による新規芳香族化合物の生合成

取得した進化酸素添加酵素を使って、さまざまな芳香族化合物へ水酸基の導入を試みた⁶³⁻⁷²⁾。当時キリンビール (株) の三沢典彦氏 (現富山県立大学教授) と新藤一敏氏 (現日本女子大学教授) との共同研究である。芳香族化合物への水酸基の導入は一般的に化学合成では困難であるばかりでなく、多くの反応を経由するため収率が極めて悪い。進化酸素添加酵素 (進化 BphA1-BphA2-BphA3-BphA4) を発現する大腸菌をさまざまなベンゼン環や複素環を分子内にもつ芳香族化合物に作用させると、ジヒドロジオール化合物が高収率で得られた。(図1 3)。ついで、進化酸素添加酵素とジヒドロジオール脱水素酵素を発現する大腸菌 (進化 BphA1-BphA2-BphA3-BphA4-BphB) により、上記ジヒドロジオール化合物から脱水素したジヒドロキシ化合物が得られた。さらに、環開裂酸素添加酵素遺伝子を加えた *E. coli* (進化 BphA1-BphA2-BphA3-BphA4-BphC) を用いるとジヒドロキシ化合物は環開裂するが、この反応にアンモニアを過剰添加すると環が閉環し、ピコリン酸が生成した (図1 4)。これらの一連の技術は三沢氏らによりセルコンビケムと命名され、医薬品や生理活性化合物、さらに各種化学合成中間体としての利用が期待できる。

PCB 分解菌のゲノム解析と巨大な動く遺伝子群 *bph-sal* エレメントの発見

二度目の米国留学から帰った 1982 年、バイオブームにあやかろうと多くの企業が研究所に研修生を送り込んできた。新日鉄化学 (株) から来ていた宮崎寿次氏 (現長瀬産業) と北九州市の同社工場へ出かけ、ビフェニル資化菌を採取した。15 株を分離したが、この中に前述した *P.*

pseudoalcaligenes KF707 株も存在する。その多くは *Pseudomonas* 属細菌であるが、*Comamonas* や *Cupriavidus* なども存在した。このうち *P. putida* KF715 株のゲノムは極めて不安定でビフェニル、サリチル酸を資化できない変異株が高頻度に生じた。さらに興味あることにビフェニル／サリチル酸資化能が他の *P. putida* 株に高頻度で移ることが判明した。当時、*bph* 遺伝子と *sal* 遺伝子 (*bph-sal* エLEMENTと命名) が約 90-kb の接合型トランスポゾンとして機能すると報告した⁴⁰⁾。近年、次世代 DNA シーケンサーが開発され、驚異的なスピードでゲノム配列を読むことが可能となり、NITE (製品評価技術基盤機構) で我々の PCB 分解菌 15 株の全ゲノム塩基配列を決めてくれた。九大でこの分野の博士号を取得した廣瀬導氏 (宮崎大学准教授)、木村信忠氏 (産総研)、渡邊崇人氏 (京都大学助教)、末永光氏 (産総研)、藤原秀彦氏 (別府大学准教授)、二神泰基氏 (鹿児島大学准教授)、後藤正利氏 (佐賀大学教授) とともにゲノム解析を行った⁷³⁻⁸¹⁾。その結果、KF715 株の *bph-sal* エLEMENTは通常は染色体に存在するが、ある条件で 483-kb の巨大なプラスミドとして切り出され、接合伝達により別の *P. putida* 菌に高頻度で移ることが判明した。このビフェニルとサリチル酸代謝をコードする *bph-sal* エLEMENTは他の PCB 分解菌菌の染色体上にも ICE (integrative conjugative element) として存在し、そのサイズはおよそ 120-kb であった。ICE_{bph-sal} と命名したゲノムELEMENTはすべてグリシンを運ぶトランスファーRNA (tRNA^{Gly}) の末端に位置し、両末端には 18-bp の繰返し配列が存在した。ICE_{bph-sal} 内にはインテグラーゼ酵素遺伝子があり、この酵素によって染色体から切り出され両末端の 18-bp が対合して環状となり、供与菌から受容菌へ接合伝達し、再度インテグラーゼによ

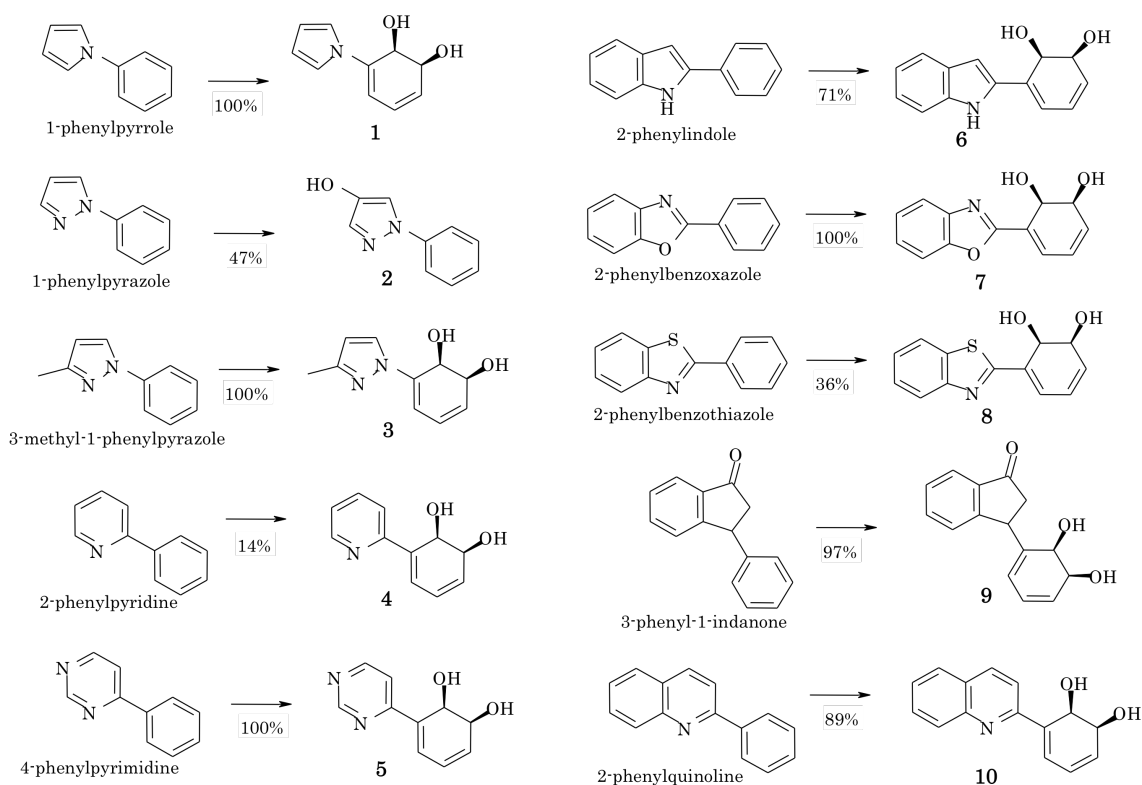


図 1-3. 進化酸素添加酵素 (進化 BphA1-BphA2-BphA3-BphA4) を発現する *E. coli* 株による諸種芳香族化合物からのジヒドロジオールの生成⁶⁴⁻⁶⁶⁾

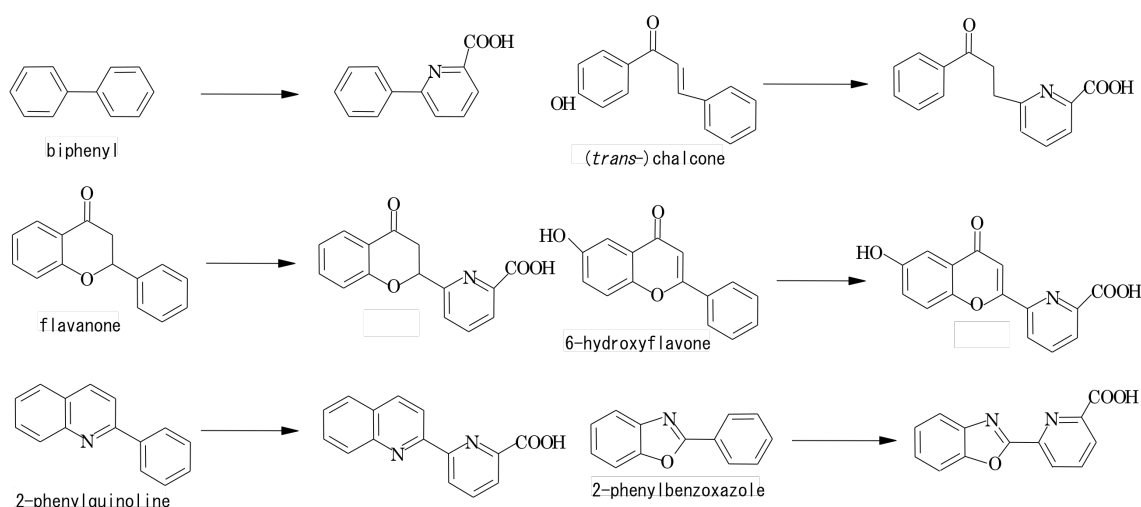


図 1 4. 進化 BphA1-BphA2-BphA3-BphA4-BphB-BphC を発現する *E. coli* 株による諸種芳香族化合物からのピコリン酸の生成⁷²⁾

り受容菌の染色体に入り込まれる。ICE_{bph-sal} は新しいタイプの巨大な動くゲノムの島 (genomic islands) である。また、KF715 株のゲノムの不安定さは *bph-sal* エLEMENTの前後に多くの挿入配列 (IS) やレトロンが存在し、そのためゲノムの欠失、挿入、逆位などのダイナミックな再編成が生起することがわかった。ビフェニルや関連する芳香族化合物は元来植物リグニン中に存在している。リグニンが白色腐朽菌によって分解される過程でさまざまな芳香族化合物が土壤中に放出される。然るにビフェニル/PCB 分解菌はリグニンの末端分解者として位置づけることができる。ICE_{bph-sal} のような巨大な動くゲノムクラスターの存在は微生物が如何に新規な分解機能を獲得するのか、すなわち微生物の環境適応、進化を考える上で重要な知見を提供する。

クロロエチレンで呼吸する偏性嫌気細菌の探索、脱ハロゲン酵素と遺伝子群

トリクロロエチレン (TCE) やテトラクロロエチレン (PCE) による土壤、地下水汚染が大きな環境問題になって久しい。これらの低沸点有機塩素溶剤は親油性で脱脂洗浄効果が高いことから、半導体の洗浄剤やドライクリーニングなどに多用された。その多くが環境中に放出され、土壤、地下水を汚染した。TCE や PCE は環境で徐々に脱塩素化され、シス-ジクロロエチレン (*cis*-DCE) やビニルクロライド (VC) へと変換するが、これらは TCE や PCE に比べて発がん性が高まる。TCE はある種の好気性菌により酸化分解されるが、PCE を分解する好気性菌は分離されていない。脱ハロゲン呼吸細菌は偏性嫌気性で有機塩素化合物を最終電子受容体として ATP の生産を伴いながら脱塩素化する。この種の細菌は広く環境中に存在するが、中でも *Dehalococcoides* 属細菌には PCE をエチレンまで完全に脱塩素化する株が見出されている。我々は 1995 年、福岡県環境衛生研究所と共同研究を開始、*Desulfitobacterium hafniense* Y51 株を分離した⁸²⁾。Y51 株は PCE、TCE、クロロエタン類から *cis*-DCE を生成した。この PCE 脱塩素酵素は空気中で急速に失活するため、精製は困難を極めた。低温で窒素ガスを吹き込みながら精製した結果、最終収率 0.2% で僅かに活性のある酵素が得られた。このアミノ酸配列情報か

ら *pceA* 遺伝子をクローニングし、次いでその下流に存在する遺伝子クラスター *pceBCT* が得られた⁸³⁻⁸⁴⁾ (図15)。*PceB* は細胞膜に局在し、*PceA* を細胞壁と細胞膜の間にあるペリプラスムにつなぎ止める。*PceT* は未成熟 *PceA* の折りたたみに関与するシャペロンとして働く。*PceC* の機能は未だ不明である。この *pceABCT* クラスターの上流と下流は同一の挿入配列 (IS) によって挟まれていた。従って IS に挟まれた *pceABCT* はトランスポゾンとして機能する一方、*pce* 遺伝子群は不安定で高頻度にゲノムから欠失した⁸⁵⁻⁹¹⁾。*Y51* 株の全ゲノム配列は地球環境産業技術研究機構(RITE)の湯川英明博士との共同研究で同機構の野中寛博士らを中心に決定された⁹⁰⁾。ゲノム解析から *Y51* 株はエネルギー代謝系に関与する遺伝子がきわめて多く、脱ハロゲン呼吸のみならず、フマル酸呼吸、硝酸呼吸、硫酸呼吸、鉄呼吸、DMSO 呼吸などの遺伝子が存在する。これらの多彩なエネルギー獲得系を利用して *Y51* 株は嫌気環境下で棲息していることが明らかとなった。

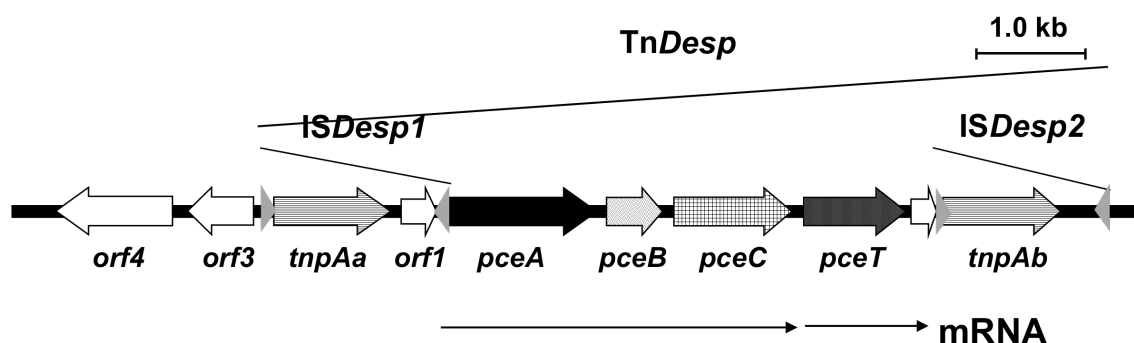


図15. 脱ハロゲン呼吸細菌 *Desulfitobacterium hafniense* *Y51* 株の *pce* 遺伝子クラスター
pceA: PCE 脱塩素酵素をコード、*pceB*: 膜アンカータンパク質をコード、*pceC*: 未知遺伝子、*pceT*: シャペロン遺伝子、*tnpA*: トランスポザアーゼをコード、IS: 挿入配列。ISDesp1 と ISDesp2 により囲まれた *pceABCT* は動く遺伝子、トランスポゾンとして機能する。

化学処理+微生物を活用したダイオキシンと PCB の完全分解

有機塩素化合物の微生物分解をやっていると、何とか効率よく塩素がとれないかと長い間考えていた。そういう時に樫原宏博士 (国際創造化学研究所) に出会った。氏は塩化ベンゼンを常温常圧で瞬時に脱塩素化する方法を開発していた。塩化ベンゼンをテトラヒドロフランに溶解し、水素化リチウムアルミニウムを加えて超音波照射すると瞬時に塩素がとれるという。そこで早速、PCB について実験するとほとんどの PCB 成分はビフェニルに脱塩素化され、一塩化物と二塩化物が若干認められた (図16)。これらの低塩化物を PCB 分解菌で処理すると容易に分解された。新ミレニアムを迎えた頃、世間ではダイオキシンが大きな社会問題となっていた。焼却炉から出る排煙中のダイオキシンが飛散し、環境を汚染しているというニュースが飛び交っていた。我々は、飛灰中のダイオキシンの分解を上記の方法で化学処理すると略完全に塩素がとれることを見いだした。農薬の DDT やドリリン系農薬に対してもこの化学処理は極めて有効であった。また、地球温暖化ガスとして使用が禁止されたフロンガスからもハロゲンがとれて炭化水素が生成し

た。この研究で開発した処理法は、過激な高温高压での物理処理、化学処理に比べて、常温、常圧、短時間処理が可能である。いくつかの会社がこの技術に興味を示したが、未だ実用化には至っていない。保管されている PCB、DDT、ドリン系農薬など、わが国はもとより欧米諸国、そして中国、インドを含む発展途上国に存在する有機塩素化合物の処理には極めて有用な技術であると確信している。

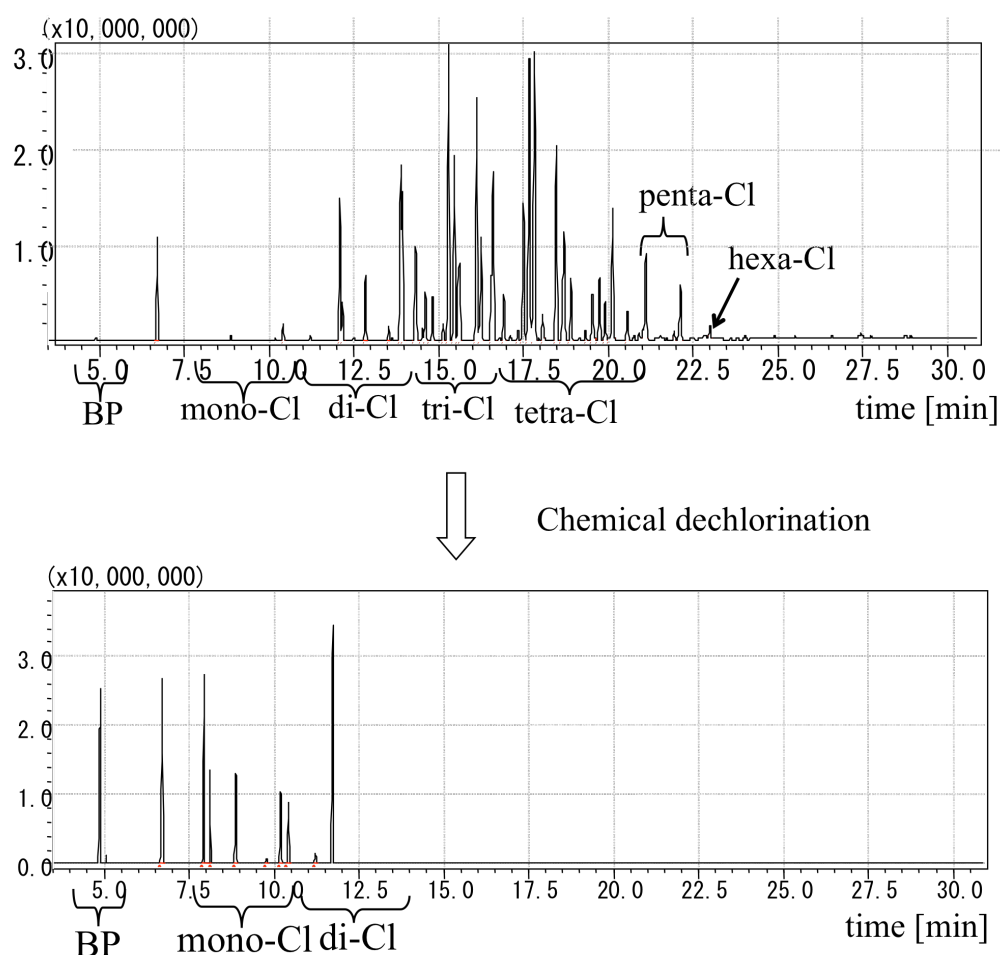


図16. 水素化リチウムアルミニウム／超音波処理による PCB(KC400) の脱塩素化
KC400 をテトラヒドロフランに溶解し (20,000 ppm)、室温で一分間超音波処理した。ほとんどの高塩化 PCB はビフェニル、一塩化物、二塩化物に脱塩素化した。

(平成13年度即効型地域新生コンソーシアム開発事業「常温瞬間脱ハロゲン化反応を利用した有害物質処理システムの開発」成果報告書)

高度好熱菌の宿主ベクター系の開発（次世代産業基盤技術研究開発）

通産省大型プロジェクト、次世代産業基盤技術研究開発制度が発足したのは1981年であった。新規な技術の芽を育てる研究開発を推進するために1,201億円の巨費が約10年に渡って新材料、

新機能素子、バイオテクノロジー、超伝導など次世代産業への基盤技術開発のために投じられた。バイオテクノロジーの要素技術として細胞大量培養技術、組換え DNA 利用技術、機能性蛋白質集合体、応用技術、複合糖質生産利用技術が取り上げられた。筆者はイリノイ大学留学から帰った翌年、富塚登氏（当時微生物育種室長）の後を受けて組換え DNA 利用技術の研究に携わった。

組換え DNA は 1973 年、米国のボイヤーとコーエンが開発した技術で生物の‘種’を破る技術として米国を先頭に、わが国でも大ブームが沸き起こった。いわゆる‘ニューバイオテクノロジー’としてもはやされた。工業技術院からは微工研、化技研、織高研の 3 機関と民間から三菱生命研、三井東圧化学、住友化学が参入した。当時、DNA 組換え技術は大腸菌と酵母で先行していたが、さまざまな微生物を対象に宿主・ベクター系を開発する事が求められていた。この研究に実際に従事したのは星野貴行氏（現筑波大学教授）と小山良典氏で好熱菌の宿主ベクター系の開発を行った。好熱菌は高い温度を好んで生育する微生物で、65℃以上で生育できる中等度好熱菌、75℃以上の高度好熱菌、90℃以上の超好熱菌に分類できる。本研究では中等度好熱菌である *Bacillus stearothermophilus* と高度好熱菌である *Thermus* 菌を選択した。この研究で最もインパクトのあった最初の成果は *Thermus* 属細菌の極めて高い自然形質転換能の発見であった。形質転換とは微生物が外来の DNA を体内に取込む現象である。DNA 組換え技術では試験管内でベクターにつないだ外来遺伝子を宿主細胞に導入する必要があるが、大腸菌では塩化カルシウムで細胞を処理して組換えプラスミドを押し込む方法が一般的であった（現在は電気パルスで物理的に DNA を押し込むエレクトロポレーションが主流）。小山氏らは *Thermus thermophilus* HB27 株からさまざまなアミノ酸要求株を取得した。これらの変異株の培養液に野生株の DNA を入れると 1~10%という驚異的な高頻度でアミノ酸を要求しない形質転換体が得られることが明らかになった⁹²⁻⁹³⁾。このような自然形質転換をもつ微生物は *Acinetobacter* や *Bacillus subtilis* などで知られていたが、形質転換の頻度は高いものでも 10⁶程度である。この *Thermus* 菌の自然形質転換能は種間を超えて可能であり、増殖のどの段階でもすべての細胞が外来 DNA を受容するコンピテンスの状態にある。300-kb の大きな DNA も取込み可能であったが、プラスミドの取込み効率はやや低かった。

Thermus 菌ではこの高頻度形質転換能を利用して例えばプロリン要求株の DNA をロイシン要求株に導入するとプロリンとロイシンの両アミノ酸を要求する二重変異株が容易に得られる。また、ストレプトマイシン耐性株の DNA を形質転換するとストマイ耐性株が得られる。この *Thermus* 属細菌の示す自然形質転現象は高く評価され、その後世界でその現象解明が行われた。HB27 株の全ゲノムが解読されると形質転換に関与する性絨毛遺伝子、DNA との結合、DNA 取込み、運搬に関与する遺伝子、さらにそれらの蛋白質の構造と機能が明らかにされた⁹⁴⁻⁹⁶⁾。この研究のもう一つの成果は *Thermus* 菌の宿主ベクター系を利用したタンパク質の耐熱化の研究であろう。例えば *Staphylococcus aureus* 由来のカナマイシン耐性遺伝子は DNA シャフリング手法により 19 カ所のアミノ酸置換を導入し、81℃まで使用可能に耐熱化されて *Thermus* 菌ベクターの選択マーカーとして利用された。小山氏らは更にハイグロマイシン遺伝子に対して DNA シャフリングを施して 81℃に耐える耐熱性ハイグロマイシン遺伝子を取得した。高度好熱菌や超好熱菌からは高温に耐性な各種の酵素が利用できる。DNA の増幅 (PCR 法) に汎用される DNA ポリメラーゼはそのほとんどが *Thermus* 菌や超好熱菌由来である。

次世代産業基盤技術研究開発で実施されたバイオ関連の研究プロジェクトは産学官で実施されたが、わが国のバイオテクノロジーの基盤開発と発展に大いに寄与したと考えている。

おわりに

地球誕生は 45 億年前、生命が誕生して 40 億年、ホモサピエンスは 5～10 万年前に地球に登場し、21 世紀に入り 70 億人を超えた。現在地球の生物圏は多くの環境問題に瀕している。温暖化、酸性雨、砂漠化、オゾン層破壊、そして化学物質や放射線物質による環境汚染問題である。これらの環境問題は食糧問題、水問題とともに地球にホモサピエンスが増えすぎたために生じた。18 世紀半ば～19 世紀の産業革命以前には地球環境問題は存在しなかった。微生物は極限環境を含む地球の至る所に棲息し、環境の清掃屋、分解屋として機能していた。地球上で生産された物質は自然の摂理に従って循環されていた。現在、世界で生産、使用されている化学物質は 10 万種類、その中には天然自然には存在しない人工化合物が多数を占めている。中でも塩素を含む物質はその有益性故に工業材料や農薬などとして大量に生産、使用された。有機塩素化合物は極めて難分解で長期にわたり汚染物質として環境に留まる。筆者は 40 余年間、環境汚染物質の微生物分解の研究を行ってきた。この間、取り扱った主要な微生物は環境に普遍的に存在する分解屋 *Pseudomonas* 属細菌とその関連細菌である。*Pseudomonas* 菌の研究を通して、この菌の多彩な分解機能とその機能を獲得するための遺伝子のダイナミックな再編成、結果形成される分解遺伝子の多様性に驚かされる。現在、自然界の微生物のほんの 1% 程度が培養可能であると言われている。微生物はさまざまな地球環境に棲息するばかりでなく、植物、動物、そして人体にも共生、あるいは寄生しながら棲みついている。未知の微生物を探索し新規な機能を解明、ものづくり、環境保全に活用していくことはわが国がこれまでも、そしてこれからも世界に誇れる重要なテクノロジーである。

謝辞

微生物工業技術研究所では多くの上司、同僚にめぐまれ、楽しく研究生活を送ることができました。入所当時研究室長であった外村健三先生には研究のイロハからご指導いただきました。故上林明部長には公私ともに大変お世話になりました。留学先のウィスコンシン大学松村文夫教授のもとで PCB 分解の研究を開始しました。米国流の研究スタイルを学びました。イリノイ大学 A. M. Chakrabarty 教授には環境バイオテクノロジーの手ほどきを受けました。ここに深甚なる謝意を表します。九大では林田晋策先生、緒方靖哉先生に多大なるご指導を賜りました。助手（助教）を務めていただいた後藤正利氏（現佐賀大学教授）、熱心に研究に取り組んでくれた研究室の学生諸君に感謝いたします。

参考文献

「有機水銀の微生物分解に関する文献」

- 1) Tonomura, K., K. Maeda, F. Futai, T. Nakagami, and M. Yamada. 1968. Stimulative vaporization of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria. *Nature* 217:644-646.
- 2) Furukawa, K., T. Suzuki, and T. Tonomura. 1969. Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 33:128-130.

- 3) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1971. Enzyme system involved in the decomposition of phenylmercuric acetate by mercury-resistant *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 35:604-610.
- 4) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1972. Metallic mercury releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 36: 217-226.
- 5) Furukawa, K. and K. Tonomura. 1972. Induction of metallic mercury-releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 36, 2441-2448.
- 6) Furukawa, K., and K. Tonomura. 1973. Cytochrome c involved in the reductive decomposition of organic mercurials. Biochim. Biophys. Acta 325:413-423.
- 7) Kiyono, M., T. Omura, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1995. Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids. Arch. Microbiol. 163:242-247.
- 8) Kiyono, M., T. Omura, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1995. Lack of involvement of *merT* and *merP* in methylmercury transport in mercury resistant *Pseudomonas* K-62. FEMS Microbiol. Letts, 128:301-306.
- 9) Iohara, K., R. Iyama, S. Silver, K. Nakamura, and K. Furukawa. 2001. The *mer* operon of a mercury-resistant marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 isolated from Minamata Bay, Japan. Appl. Microbil. Biotechnol. 56: 736-741.

「PCB の微生物分解に関する文献」

- 10) Matsumura, F., Y. G. Doherty, K. Furukawa, and G. B. Boush. 1975. Incorporation of ²⁰³Hg into methylmercury in fish liver; studies on biochemical mechanism *in vitro*. Environ. Res. 10:224-235.
- 11) Furukawa, K. and F. Matsumura. 1976. Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alcaligenes* sp. J. Agric. Food Chem. 24: 251-256.
- 12) Furukawa, K., F. Matsumura. and K. Tonomura. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. Agric. Biol. Chem. 42: 543-548.
- 13) Furukawa, K., K. Tonomura, and A. Kamibayashi. 1978. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 35: 223-227.
- 14) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1979. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 38: 301-310.
- 15) Furukawa, K. and A. M. Chakrabarty. 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyl. Appl. Environ. Microbiol. 44: 619-626.
- 16) Furukawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1983. Metabolic breakdown of Kaneclors (polychlorinated biphenyls) and their products by *Acinetobacter* sp. Appl. Environ. Microbiol. 46: 140-145.
- 17) Furukawa, K. 1982. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). pp. 34-57. In: Chakrabarty, AM (ed.) Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 18) Furukawa, K. 1986. Modification of PCBs by bacteria and other microorganisms. pp.89-100. In: Waid, JS (ed.) PCBs and the Environment vol II , CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 19) Suenaga, H., A. Nishi, T. Watanabe, M. Sakai, and K. Furukawa. 1999. Engineering a hybrid pseudomonad acquired 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. J. Biosci. Bioeng. 87: 430-435.
- 20) Furukawa, K., T. Miyazaki, and N. Tomizuka. 1985. SAL-TOL *in vivo* recombinant plasmid pKF439. J. Bacteriol. 162:1325-1328.

- 21) Tsuda, M. and T. Iino. 1988. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on TOL plasmid pWW0. *Mol. Gen. Genet.* 213:72-77.
- 22) Furukawa, K. and T. Miyazaki. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166:392-398.
- 23) Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1992. Analysis of *bph* operon from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267: 4844-4853.
- 24) Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes coding for biphenyl/PCB catabolism: Some soil bacteria possess highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* 171: 5467-5472.
- 25) Furukawa, K., N. Hayase, and K. Taira. 1990. Biphenyl/PCB Catabolic gene (*bph* operon): Organization, function, and molecular relationship in various pseudomonads. pp. 111-120. In: Silver, S., Chakrabarty, AM, Iglewski, B, and Kaplan S (ed) *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 26) Furukawa, K., S. Hayashida, and K. Taira. 1991. Gene specific transposon mutagenesis of the biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation controlling *bph* operon in soil bacteria. *Gene*, 98, 21-28.
- 27) Furukawa, K., S. Hayashida, K. Taira. 1992. Biochemical and genetic basis for the degradation of polychlorinated biphenyls in soil bacteria. pp.259-267. In: Galli E, Simon S, and Witholt B (ed) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 28) Furukawa, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 5: 289-300.
- 29) Furukawa, K. 1994. Genetic systems in soil bacteria for the degradation of polychlorinated biphenyls. pp.33-46. In: Chaudhry GR (ed) *Biological Degradation and Bioremediation Technologies of Toxic Chemicals*, Dioscorides Press, Portland, Oreg.
- 30) Kimura, N., H. Kato, A. Nishi, and K. Furukawa. 1996. Analysis of substrate range of biphenyl-catabolic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 220-223.
- 31) Furukawa, K. 2000. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCB). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 283-296.
- 32) Furukawa, K., and H. Fujihara. 2008. Microbial degradation of PCB: Biochemical and molecular features. *J. Biosci. Biotechnol.* 105: 433-449.
- 33) Furukawa, K. and N. Arimura. 1987. Purification of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying cloned *bph* gene. *J. Bacteriol.* 169: 924-927.
- 34) Furukawa, K., N. Arimura, and T. Miyazaki. 1987. Nucleotide sequence of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.*, 169: 427-429.
- 35) Watanabe, T., R. Inoue, N. Kimura, and K. Furukawa. 2000. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 275: 31016-31023.
- 36) Watanabe, T., H. Fujihara, and K. Furukawa. 2003. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bacteriol.* 185: 3575-3582.
- 37) Fujihara, H., T. Matsunaga, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Cross-regulation of biphenyl- and salicylate-catabolic genes by two regulatory systems in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bacteriol.* 188: 4690-4697.
- 38) Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, and K. Furukawa. 1988. Cloning and nucleotide

sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry* 27: 3990-3996.

39) Hayase, N., K. Taira, and K. Furukawa. 1990. *Pseudomonas putida* KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 1160-1164.

40) Nishi, A., K. Tominaga, and K. Furukawa. 2000. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J. Bacteriol.* 182: 1949-1955.

41) Erickson, B. D. and F. J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174: 2903-2912.

42) Kimura, N., A. Nishi, M. Goto, and K. Furukawa. 1997. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but functionally different. *J. Bacteriol.* 179: 3936-3943.

「進化分子工学に関する文献」

43) Stemmer, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.

44) Kumamaru, T., H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe, and K. Furukawa. 1998. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nature Biotechnology* 16: 663-666.

45) Suenga, H., M. Goto, and K. Furukawa. 2004. DNA shuffling. pp.13-24. In: Brakmann S and Schwienhorst A (ed) *Evolutionary Method in Biotechnology* Wiley-VCH Verlag GmbH & KgaA, Weinheim.

46) Suenaga, H., M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, and K. Furukawa. 2001. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene and alkylbenzene. *J. Bacteriol.* 183: 5441-5444.

47) Suenaga H., M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Active site engineering of biphenyl dioxygenase: Effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:168-176.

48) Suenaga, H., M. Sato, M. Goto, M. Takeshita, M., and K. Furukawa. 2006. Steady-state kinetic characterization of evolved biphenyl dioxygenase, which acquired novel degradation ability for benzene and toluene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1021-1025.

49) Suenaga, H., M. Goto, K. and Furukawa. 2001. Emergence of multifunctional oxygenase activities of biphenyl dioxygenase by random-priming recombination. *J. Biol. Chem.* 276: 22500-22506.

50) Suenaga, H., T. Watanabe, Ngadiman, and K. Furukawa. 2002. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active site engineering. *J. Bacteriol.* 184: 3682-3688.

51) Suenaga, H., K. Nonaka, H. Fujihara, M. Goto and K. Furukawa. 2000. Hybrid pseudomonads engineered by two-step homologous recombination acquire novel degradation abilities toward aromatics and polychlorinated biphenyls. *App. Microbial Biotechnol.* 88: 915-923.

52) Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki, and S. Hayashida. 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the catabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon). *J. Bacteriol.* 175: 5224-5232.

53) Hirose, J., A. Suyama, S. Hayashida, K. and Furukawa. 1994. Construction of hybrid biphenyl (*bph*) and toluene (*tod*) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases. *Gene* 138: 27-33.

54) Furukawa, K., N. Kimura, A. Nishi, and A. Suyama. 1996. Construction of hybrid operons conferring expanded

degradation capability for aromatic hydrocarbons and chlorinated compounds. pp. 81-93. In: Nakazawa T, Furukawa K, Haas D and Simon S (ed) Molecular biology of *Pseudomonas*. American Society for Microbiology, Washington DC.

55) Furukawa, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Nakamura. 1994. Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase. *J. Bacteriol.* 176: 2121-2123.

56) Maeda, T., Y. Takahashi, H. Suenaga, A., A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. 2001. Functional analyses of Bph-Tod hybrid dioxygenase which exhibits high degradation activity toward trichloroethylene. *J. Biol. Chem.* 276: 29833-29838.

57) Suyama, A., R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, and K. Furukawa. 1996. Engineering hybrid pseudomonads capable of utilizing a wide range of aromatic hydrocarbons and of efficient degradation of trichloroethylene. *J. Bacteriol.* 178: 4039-4046.

58) Furukawa, K., A. Nishi, T. Watanabe, A. Suyama, and N. Kimura. 1998. Engineering microorganisms capable of efficient degradation of chlorinated environmental pollutants. *Review in Toxicology* 2: 179-187.

59) Suyama, A., T. Futagami, M. Takeshita, M. Goto, and K. Furukawa. 2004. Molecular breeding of various *bph-tod* hybrid strains for efficient degradation of trichloroethylene. *J. Environ. Biotechnol.* 3: 95-100.

60) Furukawa, K. 2003. Super bugs for bioremediation. *Trends in Biotechnology* 21:187-190.

61) Furukawa, K. 2000. Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 244-249.

62) Furukawa, K., H. Suenaga, and M. Goto. 2004. Biphenyl dioxygenase: Functional diversity and directed evolution. Mini-review. *J. Bacteriol.* 186: 5189-5196.

「進化オキシゲナーゼを利用した新規化合物の生産に関する文献」

63) Shindo, K., Y. Ohnishi, H.-K. Chun, H. Takahashi, M. Hayashi, A. Saito, K. Iguchi, K. Furukawa, S. Harayama, S. Horinouchi, and N. Misawa. 2001. Oxygenation reaction of various three fused aromatic compounds using *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* transformants carrying several arene dioxygenase genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2472-2481.

64) Misawa, N., K. Shindo, H. Takahashi, H. Suenaga, K. Iguchi, H. Okazaki, S. Harayama, and K. Furukawa. 2002. Hydroxylation of various molecules including heterocyclic aromatics using recombinant *Escherichia coli* cells expressing modified biphenyl dioxygenase genes. *Tetrahedron* 58: 9605-9612.

65) Shindo, K., R. Nakamura, I. Chinda, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, H. Takahashi, K. Iguchi, S. Harayama, K. Furukawa, and N. Misawa. 2003. Hydroxylation of ionized aromatics including carboxylic acid or amine using recombinant *Streptomyces lividans* cells expressing modified biphenyl dioxygenase genes. *Tetrahedron*, 59:1895-1900.

66) Shindo, K., Y. Shindo, T. Hasegawa, A. Osawa, O. Kagami, K. Furukawa, and N. Misawa. 2007. Synthesis of highly hydroxylated aromatics by evolved biphenyl dioxygenase and subsequent dihydrodiol dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1063-1069.

67) Misawa, N., R. Nakamura, Y. Kagiya, H. Ikenaga, K. Furukawa, and K. Shindo. 2005. Synthesis of vicinal diols from various arenes with a heterocyclic group, amino group, or carboxylic acid by using recombinant *Escherichia coli* cells expressing modified biphenyl dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes. *Tetrahedron* 61: 195-204.

68) Shindo, K., R. Nakamura, A. Osawa, O. Kagami, K. Furukawa, and N. Misawa. 2005. Biocatalytic synthesis of monocyclic arene-dihydrodiols and -diols by *Escherichia coli* cells expressing hybrid toluene/biphenyl dioxygenase and

dihydrodiol dehydrogenase genes. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic 35: 134-141.

69) Chun, H.-K., Y. Ohnishi, K. Shindo, N. Misawa, N., K. Furukawa, S. Horinouchi. 2003. Biotransformation of flavone and flavonone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biphenyl dioxygenase genes. J. Mol. Catalysis 21: 113-121.

70) Shindo, K., Y. Kagiya, R. Nakamura, A. Hara, H. Ikenaga, K. Furukawa, K., and N. Misawa. 2003. Enzymatic synthesis of novel antioxidant flavonoids by *Escherichia coli* cells expressing modified metabolic genes involved in biphenyl catabolism. J. Mol. Catalysis 23:9-16.

71) Kagami, O., K. Shindo, A. Kyojima, K. Takeda, H. Ikenaga, K. Furukawa, and N. Misawa. 2008. Protein engineering on biphenyl dioxygenase for conferring activity to convert 7-hydroxyflavone and 5,7-dihydroxyflavone (chrisin). J. Biosci. Biotechnol. 106: 121-127.

72) Shindo, K., A. Osawa, R. Nakamura, Y. Kagiya, S. Sakuda, Y. Shizuri, K. Furukawa, and N. Misawa. 2004. Conversion from arenes having a benzene ring to those having a picolinic acid by simple growing cell reactions using *Escherichia coli* that expressed the six bacterial genes involved in biphenyl catabolism. J. Am. Chem. Soc. 126:15042-15043.

「PCB 分解菌のゲノム解析に関する文献」

73) Hirose, J., A. Yamazoe, A. Hosoyama, N. Kimura, H. Suenaga, T. Watanabe, H. Fujihara, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* KF716 (NBRC 110668). Genome Announc. 2015 Oct 22;3(5).

74) Suenaga, H., A. Yamazoe, A. Hosoyama, N. Kimura, J. Hirose, T. Watanabe, H. Fujihara, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Pseudomonas putida* KF703 (NBRC 110666) isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2). PMID:

75) Fujihara, H., A. Yamazoe, A. Hosoyama, H. Suenaga, N. Kimura, J. Hirose, T. Watanabe, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* KF702 (NBRC 110665), a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announc. 2015 May 21;3(3).

76) Suenaga, H., A. Yamazoe, A. Hosoyama, N. Kimura, J. Hirose, T. Watanabe, H. Fujihara, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Cupriavidus basilensis* KF708 (NBRC 110671) isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2).

77) Suenaga, H., A. Yamazoe, A. Hosoyama, N. Kimura, J. Hirose, T. Watanabe, H. Fujihara, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Complete genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Pseudomonas putida* KF715 (NBRC 110667) isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announc. 2017 Feb 16;5(7).

78) Fujihara, H., A. Yamazoe, A. Hosoyama, H. Suenaga, N. Kimura, J. Hirose, T. Watanabe, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of *Pseudomonas abietaniphila* KF701 (NBRC110664), a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announc. 2015 May 14;3(3).

79) Kimura, N., A. Yamazoe, A. Hosoyama, J. Hirose, T. Watanabe, H. Suenaga, H. Fujihara, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of *Pseudomonas abietaniphila* KF717 (NBRC 110669), isolated from biphenyl-contaminated soil in Japan. Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2).

- 80) Watanabe, T, A. Yamazoe, A. Hosoyama, H. Fujihara, H. Suenaga, J. Hirose, T. Futagami, M. Goto, N. Kimura, and K. Furukawa. Draft Genome sequence of *Pseudomonas toyotomiensis* KF710, a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil. *Genome Announc.* 2015 Apr 2;3(2).
- 81) Hirose, J., A. Yamazoe, A. Hosoyama, N. Kimura, H. Suenaga, T. Watanabe, H. Fujihara, T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Comamonas testosteroni* KF712 (NBRC 110673). *Genome Announc.* 2015 Oct 15;3(5). pii: e01214-15.

「脱ハロゲン細菌に関する文献」

- 82) Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera, and K. Furukawa. 2001. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 65: 1474-1481.
- 83) Suyama, A., K. Kai, M. Yamashita, and K. Furukawa. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* 184: 3419-3425.
- 84) Furukawa, K., A. Suyama, Y. Tsuboi, T. Futagami, and M. Goto. 2005. Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium* sp. strain Y51: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:534-541.
- 85) Futagami, T., M. Goto, and K. Furukawa. 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *Chemical Records* 8:1-12.
- 86) Futagami, T., F. Okamoto, H. Hashimoto, K. Furukawa, H. Higashi, K. Nazir, E. Wada, A. Suyama, K. Takegawa, M. Goto, K. Nakamura, and K. Furukawa. 2011. Enrichment and characterization of a trichloroethene-dechlorinating consortium containing multiple *Dehalococcoides* strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75:1268-1274.
- 87) Futagami, T., Y. Tsuboi, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halorespiring *Desulfitobacterium* sp. Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:720-728.
- 88) Morita, Y., T. Futagami, M. Goto, and K. Furukawa. 2009. Functional characterization of the trigger factor protein PceT of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 775-781.
- 89) Futagami, T., T. Yamaguchi, S. Nakayama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Effect of chloromethanes on growth of and deletion of *pce* gene cluster in *Desulfitobacterium hafniense* strain Y51. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5998-6003.
- 90) Nonaka, H., Y. Shinoda, G. Keresztes, Y. Ikenaga, M. Abe, K. Naito, K. Inamoto, K. Furukawa, M. Inui, and H. Yukawa. 2006. Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J. Bacteriol.* 188: 2262-2274.
- 91) Futagami, T. and Furukawa, K. 2016. Chapter 9. *Desulfitobacterium*. pp.173-207. In: Adlean, L. and Lofler, F (eds.) “Organohalide Respiration”, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

「高度好熱菌の宿主ベクター開発に関する文献」

- 92) Koyama, Y., T. Hoshino, N. Tomizuka and K. Furukawa. 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* 166: 338-340.
- 93) Hidaka, Y., M. Hasegawa, T. Nakahara, and T. Hoshino. 1994. The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:

1338-1339.

94) Mather, M. W., and J. A. Fee. 1992. Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* HB8: expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyltransferase gene. *App. Environ. Microbiol.* 58:421-425.

95) de Grado, P. Castan, and J. Berenguer. 1999. A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* 42:241-245.

96) Rumszauer, J., C. Schwarzenlander, and B. Averhoff. 2006. Identification, subcellular localization and functional interactions of *pilMNOWQ* and *pilA4* involved in transformation competency and pilus biogenesis in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.* 273:3261-3272.

略歴

昭和41年 3月 九州大学農学部農芸化学科卒業

昭和42年 3月 同農学研究科前期博士課程中退

昭和48年10月 農学博士（九州大学）

昭和42年 4月 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

昭和58年11月 同微生物育種研究室長

平成元年11月 九州大学農学部助教授に転任

平成6年 6月 同教授（農芸化学科発酵学講座）

平成11年 4月 九州大学大学院生物資源環境科学研究科教授

平成12年 4月 九州大学大学院・農学研究院・生物機能科学部門教授

平成19年 3月 九州大学定年退職

平成19年 5月 九州大学名誉教授

平成19年 4月 別府大学食物栄養科学部教授

平成23年 4月～現在 同客員教授

（この間、昭和48年10月～50年1月 米国ウィスコンシン大学 博士研究員

昭和55年12月～57年6月 米国イリノイ大学 客員准教授）

授賞

昭和47年9月 醗酵協会賞

昭和62年4月 科学技術功績賞

平成4年3月 次世代産業基盤技術研究功績賞

平成17年3月 日本農芸化学会功績賞

平成24年6月 環境バイオテクノロジー学会賞

受理日：2017年4月25日
