

2,4-D を分解する細菌の大型プラスミド

国立研究開発法人
農研機構 農業環境変動研究センター
物質循環研究領域

酒井 順子

はじめに

農業は一定期間環境中に滞留し、役目を終えた後は速やかに分解することが望ましい。戦後初期に盛んに用いられた農薬の多くは非常に有効であったが、残留性や環境毒性を理由に、現在では使用が禁止されている。ジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT)、 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン (γ -HCH, 別名リンデン) やドリノ類がその例としてよく知られる。微生物は農薬の分解に大きな役割を担っており、特に土壤中ではその寄与率が高いと考えられる。土壤中の微生物による農薬の分解しやすさは、農薬の土壤溶液への溶解性が大きな要因ではあるが、微生物の持つ分解能も問題となる (Arias-Estevez *et al.* 2008)。微生物が農薬を分解するためには分解酵素が必要で、その酵素をコードした遺伝子を持たなければ分解できない。よって人類が新規合成した自然界に存在しない物質は、微生物は全く分解できないか分解の効率が悪い場合がある。しかしそのような物質に対しても、時間が経つと分解できる微生物が出現することがある。これは、微生物が自身の持つ遺伝情報を変化させたためと考えられている。生物が遺伝子を変化させる方法の一つとして、突然変異が知られるが、突然変異による遺伝子の変化のスピードはそれほど早くない。また、農薬の完全分解には通常複数の遺伝子が必要とされるが、保有していない遺

伝子を突然変異で新たに作り出すのは難しい。微生物が、自身が保有しない遺伝子を素早く獲得する際に最も貢献しているのは、トランスポゾンやプラスミドといった遺伝子伝達因子と考えられている。本稿では、微生物の農薬分解能の獲得を、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 分解菌を通して考察する。

トランスポゾンとプラスミド

トランスポゾンは DNA 鎖に組み込まれている外来性の遺伝子断片で、DNA 鎖の一部を別の場所に移動したり、コピーを作ったりするため「動く遺伝子」とも呼ばれる。プラスミドは、細胞内に染色体とは別に存在する環状 DNA のことで (図-1)、伝達性プラスミドの場合、別の個体へ自身のコピーを受け渡すことができる。プラスミド上に農薬分解遺伝子が存在する場合、このプラスミドを獲得した微生物は農薬分解菌になり得る。なり得ると表現したのは、DNA を持つだけでは農薬を分解することができず、DNA

を鋳型に RNA を合成し (転写)、さらに酵素を作る (発現) 必要があるため、遺伝子と微生物の組み合わせによって発現できる場合とできない場合がある。突然変異やトランスポゾンで生じる遺伝子の変化は細胞内で起こるため、親から子へのみ受け渡される (遺伝子の垂直伝播)。これに対して伝達性プラスミドは別の個体に遺伝子を移すことが可能で、このような遺伝子の動きを「遺伝子の水平伝播」と呼ぶ。トランスポゾンは染色体とプラスミドの間を移動できるため、染色体の遺伝子をプラスミドに移し、水平伝播が可能な状態にできる。院内感染のニュースで多剤耐性菌という単語をよく耳にするが、病原菌がトランスポゾンやプラスミドを介して複数の抗生物質耐性遺伝子を獲得した結果、生じていることが知られる。

2,4-D と遺伝子伝達因子

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は有機合成除草剤としては最も古く、1940 年代に開発された。双子葉

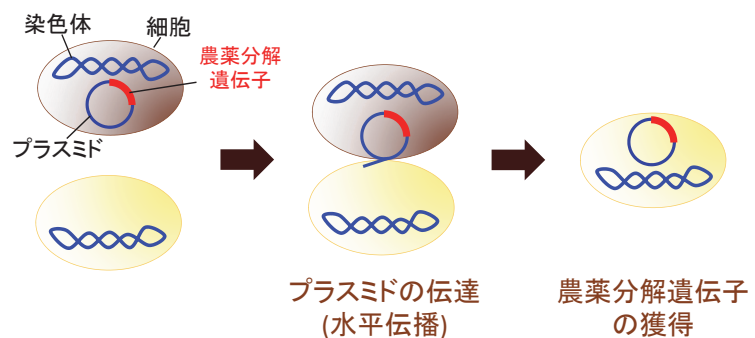


図-1 細菌における伝達性プラスミドを介した遺伝子獲得の一例

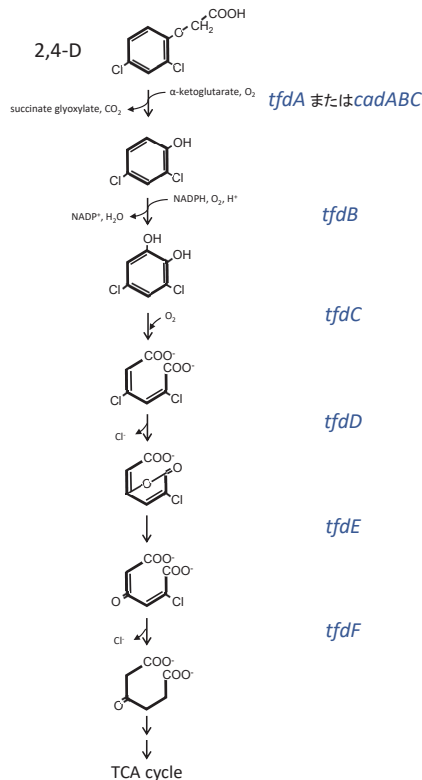


図-2 2,4-D の分解経路と分解遺伝子の略称 (主に Perkins *et al.* 1990 から作図)

植物のみに作用するホルモン型の除草剤で、主食とされるムギ類、イネ、およびトウモロコシ等に有効なため世界的に大量に使用されてきた (農薬ハンドブック 2011)。環境中での使用が始まって数年の後に、土壤中で速やかに分解する現象が見出され、微生物による有機化合物分解能の獲得モデルとして精力的に研究が進められてきた。1950 年には 2,4-D 分解菌の分離が報告され (Audus 1950), 1977 年には 2,4-D 分解遺伝子が伝達性プラスミドに存在することが Nature 誌に掲載された (Pemberton & Fisher 1977)。よく知られる 2,4-D の好氣的な分解には複数の遺伝子が必要とされ (Perkins *et al.* 1990), 図-2 の経路で分解される。これまでに 100 株以上の様々な 2,4-D 分解菌 (主に細菌) が世界各地で分離され多くの研究が行われてきたが、その中でも β -プロテオバクテリアの *Cupriavidus pinatuboensis* JMP134

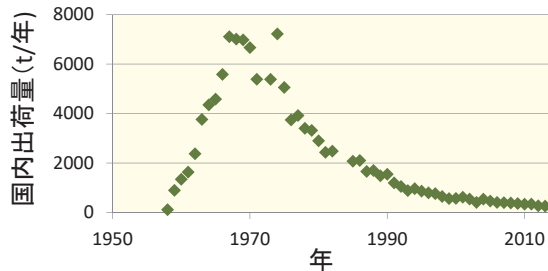


図-3 2,4-PA 粒剤 (2,4-D 粒剤) の国内出荷量の推移 (農薬要覧より作図, 輸出分は含まない。酒井 2015 一部改変)

株 (Don & Pemberton 1981) は代表株として有名である。JMP134 株は分解遺伝子群を MOB_p グループの伝達性プラスミド上に保有する。MOB_p グループのプラスミドは宿主範囲が広く伝達頻度も高いため、細菌間の遺伝子伝播に重要な役割を果たすと考えられている。実際、これまでに報告された 2,4-D 分解菌の多くもこのグループのプラスミド上に 2,4-D 分解遺伝子を保有する。

国内の水田に分布する 2,4-D 分解菌

日本では 1950 年代後半から水田除草剤として 2,4-D が大量に使用され (図-3), 戦後の食糧増産に貢献した。2,4-D の現在の使用量は当時に比べ

ば大きく減少したが、現在でも使用されている。2,4-D は好氣的条件で分解しやすいが、水田においても数週間程度で分解するため (農薬ハンドブック 2011), 水田にも 2,4-D 分解菌が存在すると考えられた。しかし、水田からの分解菌の分離の報告は見当たらず、どのような微生物が分解を担っているのかは不明であった。そこで国内水田の 2,4-D 分解菌の種類とその遺伝子獲得機構を明らかにするために、8 ケ所の水田 (図-4a) から 2,4-D を唯一の炭素源として増殖する微生物を収集し、代表株 14 株の解析を行った (Sakai *et al.* 2007)。得られた微生物はいずれも細菌で、16S rDNA 配列に基づいて *Burkholderia* 属菌, *Cupriavidus* 属菌, あるいは *Sphingobium* 属菌に同定された (図-4b)。さらにそれぞれ

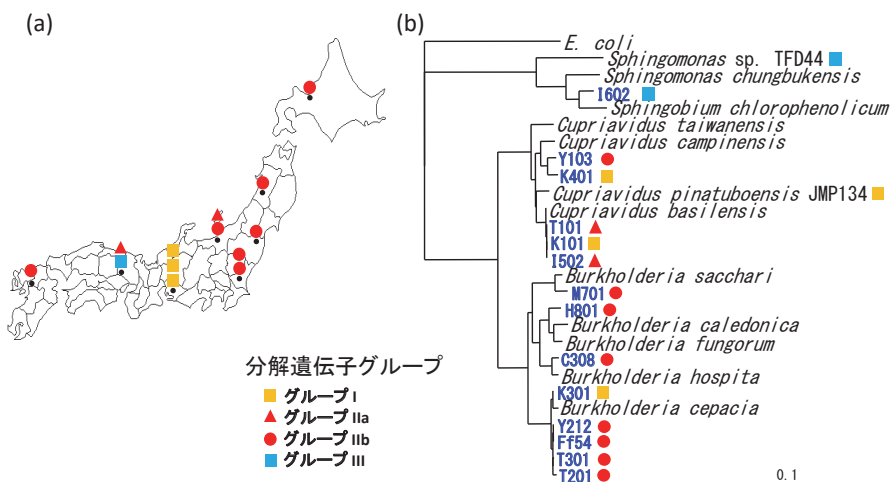


図-4 2,4-D 分解菌の分離場所とそれぞれの分解菌が保有する分解遺伝子グループ (a) および 16S rDNA 部分塩基配列の系統樹 (b) 青字は国内分離株, TFD44 株と JMP134 株は既知の 2,4-D 分解菌。Sakai *et al.* 2007 一部改変)

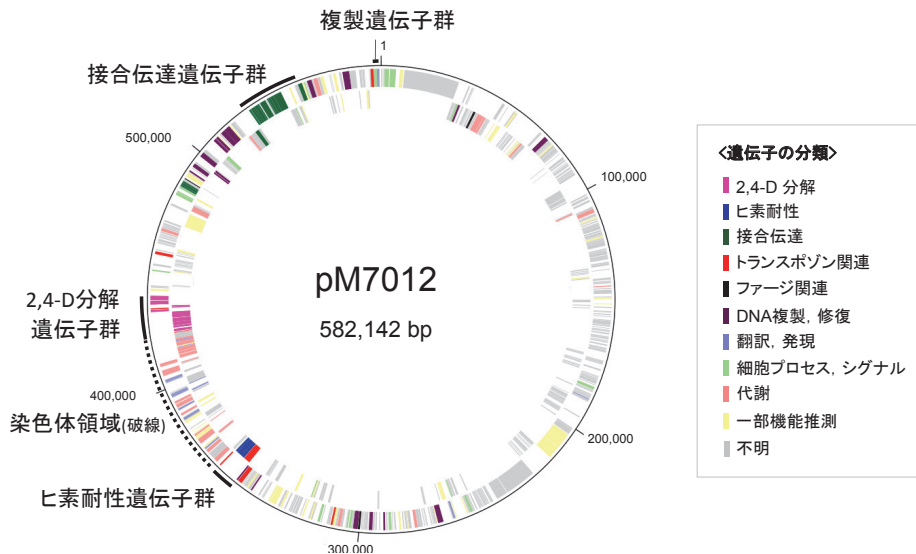


図-5 2,4-D分解遺伝子保有大型プラスミド pM7012 の全塩基配列の解析結果 (Sakai *et al.* 2014 一部改変)

子に加えて、発現を調節する遺伝子 *tfdR* と 2,4-D の膜透過に関与する遺伝子 *tfdK* も存在した。また、一部の分解遺伝子は重複して存在した。このような分解遺伝子の集合は、グループ I や IIa の分解遺伝子群でも報告されている (Trefault *et al.* 2004; Vedler *et al.* 2004)。分解遺伝子群の一部のみを保有する微生物も見つかっていることから、別々に存在していた遺伝子が、プラスミドやトランスポゾンの働きで集積し、より効率よく 2,4-D を分解できる微生物が生き残った結果、このような遺伝子群が構築されたと考えられている。

(3) プラスミドの分類

伝達性プラスミドは基本構成要素として、プラスミド複製遺伝子群と伝達遺伝子群を持ち、それ以外に様々な遺伝子群が挿入されている。よって同じ基本構成要素を持つプラスミドでも、挿入されている機能遺伝子が抗生物質耐性遺伝子の場合もあれば農薬分解遺伝子の場合もある。伝達性プラスミドの分類は基本構成要素に基づいて行われ、近年までは培養法で分類されてき

の分解菌が保有する分解遺伝子の配列を調べたところ、世界各地で見出されている 3 グループに分類され、国内水田にも世界各地と同様の分解遺伝子の存在することが明らかになった。

興味深いことに、複数種類の *Burkholderia* 属菌と *Cupriavidus* 属菌に分類される 8 株が、塩基配列が互いに 98% 以上相同な分解遺伝子 (グループ IIb) を保有していた (図-4b)。すなわちこのタイプの遺伝子が、細菌間に水平伝播したことが示唆された。グループ I と IIa の分解遺伝子は MOB_p グループのプラスミドで水平伝播することが報告されているが (Trefault *et al.* 2004; Vedler *et al.* 2004)、グループ IIb の分解遺伝子では詳細な報告はされていなかった。そこで、この分解遺伝子を保有するプラスミドの調査を行った。

分解遺伝子保有プラスミド (pM7012) の全塩基配列を解析した (図-5)。プラスミド pM7012 は 582 kb の大きさで、一般的な伝達性プラスミド (数十 kb) や、既知の MOB_p グループの 2,4-D 分解プラスミド (100 kb 前後) に比べて非常に大型であった。pM7012 に見出された主要な遺伝子群として、2,4-D 分解遺伝子群の他、プラスミド複製遺伝子群、接合伝達遺伝子群、ヒ素耐性遺伝子群、および *Burkholderia* 属菌の染色体の一部を取り込んだと思われる領域が見出された。

(2) 2,4-D 分解遺伝子群

2,4-D 分解遺伝子群 (図-6) は 2,4-D を分解する各段階の酵素 (図-2) で構成されていた。分解を直接担う遺伝

2,4-D 分解遺伝子保有大型プラスミドの解析

(1) 全体像

グループ IIb の分解遺伝子を持つ *Burkholderia* 属菌 M701 株を用いて、

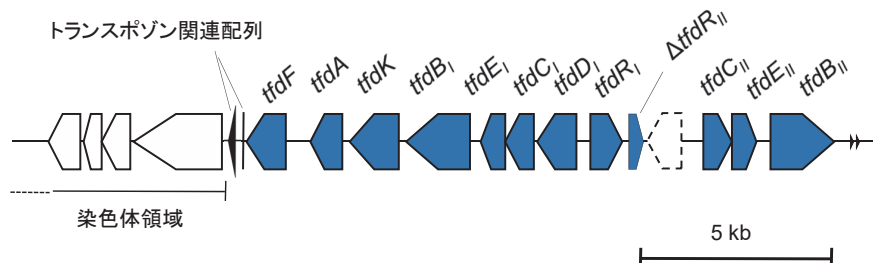


図-6 プラスミド pM7012 の 2,4-D 分解遺伝子群 (Sakai *et al.* 2014 一部改変)

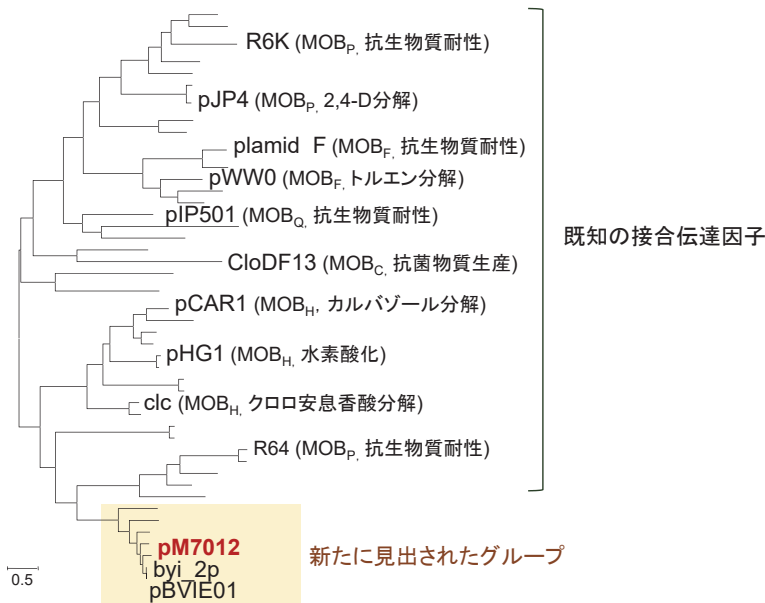


図-7 プラスミドの接合伝達遺伝子のアミノ酸配列に基づいた系統樹 (カッコ内はプラスミドグループと保有する機能遺伝子を表す。Sakai *et al.* 2014 一部改変)

た。しかし培養困難な微生物も多く、膨大なゲノム情報が明らかにされている現在は、遺伝子配列（アミノ酸配列）を用いた分類法が提唱されている (Garcillan-Barcia *et al.* 2009)。この分類に基づくと、*Burkholderia* 属菌の保有するいくつかの数百 kb のプラスミドは MOB_H グループに分類されるため、本研究で見出された大型プラスミドも同グループに属すると予想した。ところが、接合伝達遺伝子のアミノ酸配列に基づいた系統解析を行った結果 (図-7)、既知の伝達性プラスミドグループのいずれにも属さないことが明らかになった。

(4) 大型プラスミド pM7012 の伝達性

プラスミドの伝達性を示すためには、図-1 で示したようにプラスミドを持つ株と持たない株を混合培養し、プラスミドの伝達を示す必要がある。しかしこれまでのところ、プラスミド pM7012 の伝達性は培養法では確認されていない。その原因として、接合伝達に必要なとされる遺伝子の一部が

変異して働かなくなっている可能性や、他の大型プラスミドでよく見られるように、伝達頻度が低く検出限界以下である可能性が考えられた。しかし以下の実験結果より、プラスミド pM7012 は、少なくとも過去には細菌間に伝播したと考えている。

プラスミド pM7012 と同様の、グループ IIb の分解遺伝子を持つ国内水田由来の 7 株 (図-4b) とアメリカの

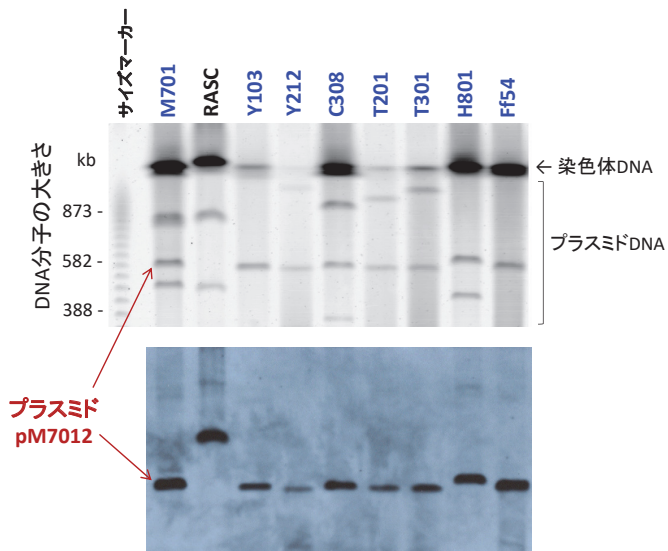


図-8 ゲノム DNA の電気泳動像 (上) とサザンハイブリダイゼーション法による 2,4-D 分解遺伝子配列の検出 (下) (青字は国内水田由来株、Sakai *et al.* 2014 一部改変)

下水汚泥由来 *Burkholderia* 属菌 RASC 株 (Cavalca *et al.* 1999) について、分解遺伝子を保有するプラスミドを調査した (Sakai *et al.* 2014)。パルスフィールドゲル電気泳動法で細胞内の DNA 分子を大きさ別に分離した結果 (図-8 上)、それぞれの株で 1 から数個のプラスミドが検出された。このゲル内の DNA をナイロンメンブレンにトランスファーし、特定の配列を光らせ、その光を X 線フィルムで検出した (サザンハイブリダイゼーション法)。図-8 下の写真は 2,4-D 分解遺伝子の部分配列を X 線フィルムで検出した結果を表すが、プラスミド複製開始遺伝子、接合伝達遺伝子、およびヒ素耐性遺伝子の部分配列でも同様の結果が得られた。さらにそれぞれの部分塩基配列をシーケンスした結果、いずれも M701 株の配列に 98% 以上相同で

あった。よって、これらの細菌の保有する pM7012 様のプラスミドは、同一のプラスミドが起源であることが強く示唆され、過去に細菌間に伝播したと考えられた。

(5) 国境を越える遺伝子

2,4-D 分解大型プラスミド pM7012 のヒ素耐性遺伝子群はトランスポゾンとして挿入されていた。このトランスポゾンは、南アフリカの鉱山で分離されたヒ素耐性菌の持つトランスポゾンと相同性が高く、同じトランスポゾンに由来すると考えられた。両細菌は分類群も大きく異なることから、微生物の地理的な移動と遺伝子の水平伝播の結果を反映していると考えられる。このような遺伝子の移動は、抗生物質耐性遺伝子や各種分解遺伝子でも見出されてきた。微生物は、動物、人や物の移動、あるいは海流や大気の流れに乗って地理的に移動できる。地理的に移動した微生物は、移動先の環境が合わなければ定着しないが、保有される遺伝子は、移動先の微生物に水平伝播することで新たな環境に定着できる。新たな環境がその遺伝子を持つ微生物にとって有利な環境であれば、遺伝子の定着はより確かなものになる。現在は使用が禁止されている有機ヒ素農薬は 2,4-D と同時期に国内で多用されており、そのような環境が、2,4-D 分解遺伝子とヒ素耐性遺伝子を共に水平伝播するプラスミドの構築を促した可能性がある。

おわりに

国内水田の 2,4-D 分解菌を調べた結果、分解遺伝子は世界各地で見出された遺伝子と類似していたが、分解遺伝子を伝達するプラスミドの種類は大きく異なり、見出されたプラスミドは、これまでに報告例のない伝達性プラスミドグループに属すると考えられた。このグループのプラスミドは、水分の多い環境由来の細菌が保有している傾向があり、水田環境の遺伝子伝播に重要な役割を果たしている可能性がある。

これまでに述べたように、微生物は自身の持つ遺伝情報を改変し、新しい能力を獲得することができる。この微生物の能力は、バイオレメディエーションへの活用有望な一方、農薬の過度な分解や、農薬への耐性をもたらす危険性がある。微生物の遺伝情報の伝達にはまだ未解明な部分も多く、さらなる研究が必要とされる。

参考文献

- Arias-Estevez, M. *et al.* 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123, 247-260.
- Audus, L.J. 1950. Biological detoxication of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil: Isolation of an effective organism. *Nature* 166, 356.
- Cavalca, L. *et al.* 1999. Diversity of *tfdC* genes: Distribution and polymorphism among 2,4-dichlorophenoxyacetic

acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 45-58.

Don, R.H. and J.M. Pemberton, 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145, 681-686.

Garcilla 'n-Barcia, M.P. *et al.* 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 657-687.

日本植物防疫協会 2011. 「農業ハンドブック」. 日本植物防疫協会, 東京, 689pp.

Pemberton, J.M. and P.R. Fisher 1977. 2,4-D plasmids and persistence. *Nature* 268, 732-733.

Perkins, E.J. *et al.* 1990. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172, 2351-2359.

Sakai, Y. *et al.* 2007. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading genes from bacteria isolated from soil in Japan: Spread of Burkholderia cepacia RASC-type degrading genes harbored on large plasmids. *Microbes Environ.* 22, 145-156

Sakai, Y. *et al.* 2014. A 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid pM7012 discloses distribution of an unclassified megaplasmid group across bacterial species. *Microbiology*, 160, 525-536

Trefault, N. *et al.* 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ. Microbiol.* 6, 655-668.

酒井順子 2015. 水田土壌から分離した 2,4-D 分解菌由来の分解遺伝子および大型プラスミドに関する研究. 筑波大学博士論文.