

末端リグニン分解菌と位置づけられる微生物*

渡邊 崇人**

1. はじめに

水、空気、土壌等の自然環境とそこに住む様々な生物は、太陽エネルギーを命の源として互いに密接に関わり合っている。生物やそれを取り巻く環境を生態系と呼んでいる。植物（生産者）は太陽エネルギーを取り込んで成長し、それを動物（消費者）が利用し、その死骸や排泄物を微生物（分解者）が分解するという「食物連鎖」については学校の理科の時間で学ばれたかと思う。その際、生産者が取り込んだエネルギーは消費され、そして、生物を構成していた物質は無機化（水と二酸化炭素に変換）されるが、それらは再び植物等へと取り込まれる。このような流れを物質循環と呼んでいる。物質循環がうまく回っている場合は、以前と変わらない豊かな自然が保たれるが、これまで生物が会うことのなかった物質（異物：xenobiotics）については物質循環に入ることができずに環境中に残留することになる。

本稿では、食物連鎖の分解者である微生物、特に、20 世紀後半に入り環境中に放出され、残留する深刻な環境汚染物質の分解菌に注目する。主に、その分解菌が持つ環境汚染物質分解系について、また、その起源や利用について紹介する。

2. 夢の化学物質から深刻な環境汚染物質に

当時、合成化合物の中で 20 世紀最大の発明品とも言われたものの、その毒性が社会問題化し、一転して深刻な環境汚染物質として烙印を押された化合物にポリ塩化ビフェニル (PCB) がある。

2.1 ポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl: PCB)

PCB の構造を図 1 に示す。理論的には、塩素が 1 から最高 10 まで置換した 209 種類の化合物が合成可能である。1929 年に製造が開始され、1970 年代半ばに製造が中止となった。なお、Aroclor（アメリカ）、Clophen（ヨーロッパ）、カネクロール（日本）等の商品名で販売されていた。

PCB の総生産量は世界中で 120 万トンと見積もられ、日本でも 5 万トン以上製造された。塩素置換の違いで物理的・化学的性質が異なり、その化学的安定性（酸、アルカリ、熱により分解されない。金属を腐食させない）、不燃性、絶縁性、高脂溶性（水に溶けにくい）、低揮発性（高沸点）などの優れた性質により工業的に広く使用された¹⁾。日本においては、PCB の製造・使用・輸入については、1972 年にこれらを中止とする行政指導、その翌年に法的に禁止となった。ただし、具体的な対策ができるまで廃棄物も含め保管となった。しかしながら、2001 年に「ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法」が公布・施行、2012 年に改正され、処理期間が 2027 年 3 月末日までとされたものの、可能な限り当初予定された 2016 年 7 月までに行う

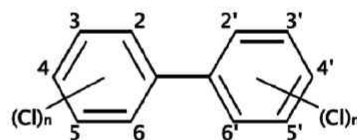


図 1: PCB の一般構造式。ベンゼン環が 2 個結合したビフェニルに塩素が置換した化合物。

* 2014 年 7 月 20 日作成 本稿は第 10 回生存圏研究所公開講演会（2013 年 10 月 26 日開催）講演要旨「生存圏を守る小さな生き物たち」の表題の変更及び内容の加筆・修正を行ったものである。

** 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所バイオマス変換分野

E-mail: takahito@rish.kyoto-u.ac.jp

こととされている。国際的には、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs 条約）が 2004 年 5 月発効され、(日本は 2002 年に本条約を締結)、PCB に関し、2025 年までの使用の全廃、2028 年までの適正な処分を求めている²⁾。

2.2 カネミ油症事件

1968 年に福岡を中心に西日本一帯で被害者約 1 万数千人、死亡者 50 人を出した健康被害事件である。カネミ倉庫株式会社における米油の製造過程で PCB が漏れて混入し、その油を摂取した人々に吹き出物、手足のしびれ、肝機能障害等を引き起こした (PCB は、高い脂溶性から生物の脂肪組織に蓄積する性質がある)。当時、被害女性から生まれた赤ちゃんの皮膚に色素沈着があり、「黒い赤ちゃん」と報道されて大きな社会問題になった。

2.3 コプラナー PCB とダイオキシン

PCB は、置換する塩素の位置によっては共平面構造 (コプラナリティ: coplanarity) を取るものがあり (コプラナー PCB と呼ぶ)、その毒性のうち発癌性、催奇性がダイオキシン類 (ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン, ポリ塩化ジベンゾフラン) に似ているとされている。そのため、ダイオキシン様 PCB (dioxin-like PCB) と呼ばれ、ダイオキシン類に加えることがある。なお、カネミ油症事件の原因物質は、21 世紀に入り、PCB の加熱によって生じたダイオキシン類の一種であるポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) とコプラナー PCB であると確定した (図 2)。

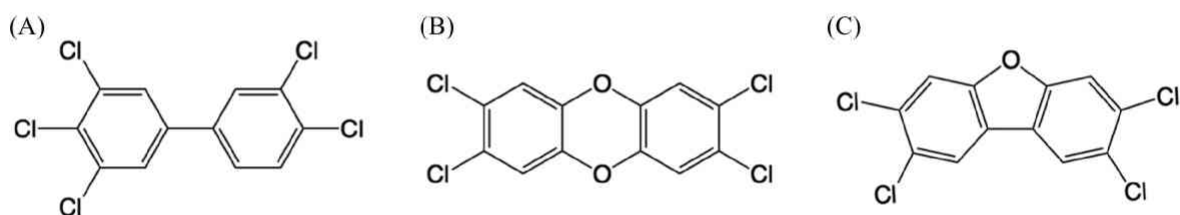


図 2: ダイオキシン類の構造式. (A) 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (コプラナー PCB の一種); (B) 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-1,4-ジオキシン (代表的なポリ塩化ジベンゾパラジオキシン: PCDD); (C) 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン (代表的なポリ塩化ジベンゾフラン: PCDF)

3. 環境汚染物質分解菌から微生物の適応・進化を見る

環境中に放出された PCB は食物連鎖を通じて最終的には海洋のイルカやアザラシなどの大型哺乳動物の脂肪組織に高濃度で蓄積する。もちろん、我々人間においても同様に体内で分解されず、蓄積し、重大な健康被害が出る。従って、物理的・化学的に安定な PCB を分解する生物はこの世に存在しないと思われたが、1973 年に低塩素 PCB (置換している塩素の数が少ない PCB) を分解する微生物 (分解菌) の報告が初めてされた³⁾。それ以降、1980 年代から PCB だけでなく難分解性芳香族化合物分解菌が次々と発見され、その諸性質が報告されるようになってきた¹⁾。

3.1 ビフェニル/PCB 分解菌の単離、分解特性、分解遺伝子のクローニング

現在、著者が研究に用いている、そして、世界的にも有名なビフェニル/PCB 分解菌を紹介したい。その分解菌は、シュードモナスというグラム陰性細菌の一種で⁴⁾、正式名は、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株である。本菌は、北九州市のビフェニル工場付近の土壌から単離され、ビフェニルを資化できる (ビフェニルを分解し、唯一の炭素源として生育できる)。PCB に対しては、ビフェニル/PCB 分解酵素の構造や機能、特に、基質特異性に大きく依存し、置換する塩素の数や位置によって「良く分解できる」「ある程度分解できる」「ほとんど分解できない」「全く分解できない」等その分解特性が大きく異なっていた⁵⁻⁶⁾。

一方, KF707 株の単離後, ビフェニル/PCB 分解遺伝子の取得も試みられ, 1986 年に KF707 株より世界で初めてビフェニル/PCB 分解遺伝子がクローニングされ, *bph* (ビフと呼ぶ) と命名された⁷⁾. その後, *bph* 遺伝子の構造, 機能, そして, 転写制御について詳細に解析されている (図 3)⁸⁻¹⁰⁾.

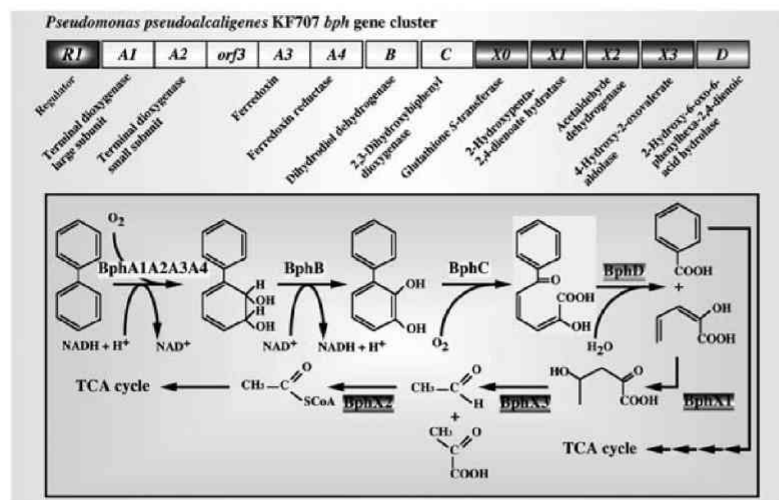


図 3: KF707 株のビフェニル/PCB 分解遺伝子クラスターの構造と分解経路。

図には, ビフェニルの分解経路を示しているが, PCB についてもこれら分解酵素の共代謝 (co-metabolism) を受ける。ただし, 置換する塩素の位置によっては分解経路の途中までで分解が停止してしまう場合もある。各遺伝子の下に斜めの英数字は酵素名。

3.2 菌から菌へ接合伝達因子としての *bph* 遺伝子群

KF707 株を単離した際, 同じ場所 (土壌) から, 同じ細菌でも属, 種が異なるビフェニル/PCB 分解菌が数多く単離された^{5, 11)}。ところが, これらのビフェニル/PCB 分解菌の染色体 DNA に対し, KF707 株の *bph* 遺伝子を用いて Southern 解析をした結果, これらの分解菌の多くは KF707 株が持つ *bph* 遺伝子と非常に良く似た構造の遺伝子群を自身の染色体 DNA 上に保有していた¹¹⁾。この事実は, 染色体上の *bph* 遺伝子群が他の菌へ転移する機能を備えているか, 以前にその機能を保有していたことを意味し, 微生物の生態や環境適応を探る上でも非常に興味深い。

あるビフェニル/PCB 分解菌においては, *bph* 遺伝子群及びサリチル酸分解 (*sal*) 遺伝子群が接合型トランスポゾンと呼ばれる巨大な動く遺伝子 (*bph-sal* エレメント) 上に存在していることが分かっている¹²⁾。この *bph-sal* エレメントは, 通常, 染色体 DNA に組込まれているが, 切り出されて環状となり, 他の菌に伝達され, 受容菌の染色体 DNA に挿入されると予想されている (図 4)。実験室レベルでは, *bph-sal* エレメントを有するビフェニル/PCB 分解菌 (供与菌) と *bph-sal* エレメントを有さずビフェニル/PCB を分解しない菌 (受容菌) とが接合という現象を介して受容菌の染色体 DNA へ *bph-sal* エレメントを容易に転移 (接合伝達) させることが再現できている¹²⁾。

ビフェニル/PCB を始め難分解性芳香族化合物分解系遺伝子群は染色体 DNA, 伝達性のプラスミド (環状の DNA) やトランスポゾンと呼ばれる「動く遺伝子」上に存在していることが多い。微生物同士の相互作用が密な (土壌) 環境中では, 接合伝達により菌から菌へとこれらプラスミドやトランスポゾンが伝達され, 伝達された方の菌 (受容菌) に分解系遺伝子が一時的に保持されたり, 染色体 DNA に組込まれたりすることが頻繁に起きているものと考えられる。このような現象を水平伝播 (horizontal gene transfer) と呼んでいる¹³⁻¹⁴⁾。

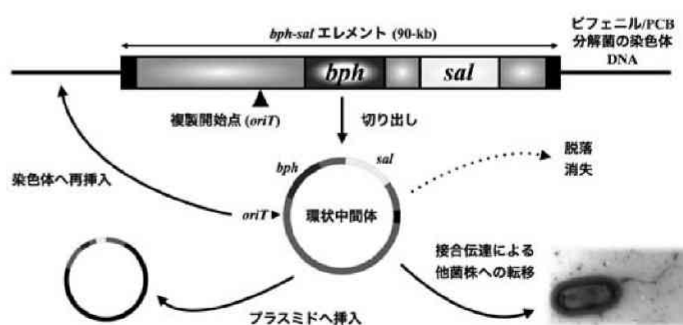


図 4: 分解系遺伝子の水平伝播 (*bph-sal* エレメントの転移機構モデル)。様々な種類のビフェニル/PCB 分解菌が自然界に広く分布すること, しかも, 非常に良く似た *bph* 遺伝子群を保持していることが説明できる。

一方、難分解性芳香族化合物分解系遺伝子群が菌（供与菌）から菌（受容菌）へ転移されても、その受容菌が供与菌と同じような振る舞いをするとは限らない。すなわち、転移した遺伝子群（外来性の遺伝子）は転移先（新しい宿主）の異なる転写制御系で制御を受ける可能性がある^{1, 9-10)}。

3.3 PCB 分解菌の由来は？

PCB を含め人為的に合成された化合物が大量に環境中へ放出され、深刻な環境問題として騒がれ始めたのはここ 50～60 年くらいの間と考えられる¹⁵⁾。従って、それ以前は、生物が PCB 等に出会うことはなく、図 3 に示したような *bph* 遺伝子群や PCB 分解経路が存在したとは考えにくい。それでは、環境汚染物質である PCB を始めとする難分解性芳香族化合物を分解する微生物は一体どこから来たのか？

そもそも自然界の芳香族化合物がどこから供給されるのかを考えると、その答えは、植物（樹木）から、特に、リグニンという高等植物の木化に関与する高分子のフェノール性化合物からとなる。リグニンは樹木の構成成分の 20～30% を占め、ベンゼン環の豊富な非常に複雑な構造をしている。リグニンは天然物であるものの難分解性高分子で容易には分解できないが、唯一リグニン分解性担子菌（白色腐朽菌）と呼ばれるキノコの仲間によって分解され、多くの芳香族化合物（低分子化されたリグニン）が土壌中に供給される（図 5）。そのリグニン由来の芳香族化合物（ベンゼン環を 1～2 個含む）をさらに分解・利用する細菌は既に知られている¹⁶⁻¹⁷⁾。従って、ビフェニル/PCB 分解菌として今回紹介している KF707 株もこのようなリグニン由来の芳香族化合物の末端分解に関与する菌「末端リグニン分解菌」の一種、さらには、末端リグニン分解菌から由来し、自らが置かれている環境（汚染場所）で生存できるように適応・進化した種とも考えられる。

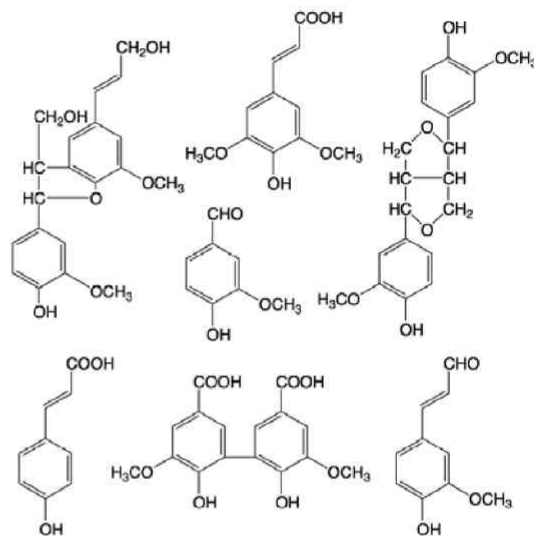


図 5. リグニン由来の芳香族化合物の構造の一部。自然界から供給される芳香族化合物の多くは植物リグニン由来でその構造には、ベンゼン環があり、PCB の基本骨格となるビフェニル環を持つものもある。

3.4 環境汚染物質分解系遺伝子の進化

末端リグニン分解菌の適応・進化によって PCB 等の環境汚染物質の分解ができるようになるためには、結局、菌（宿主）が分解系遺伝子を獲得し、何とか使いこなす（制御する）ことができないといけない。しかしながら、分解系遺伝子がある日突然獲得するわけではない。そこで次に、環境汚染物質（難分解性芳香族化合物）分解系遺伝子の起源について考えてみたい。

まず、次の 2 点を整理しておく必要がある。1 点目は、「芳香族化合物を供給する植物、そして、植物リグニン由来の芳香族化合物を分解する末端リグニン分解菌は、PCB 等の環境汚染物質が合成される以前から既に地球上に存在していた」ということ、もう 1 点目は、「そもそも生物の進化では、新しい機能はすでに存在していた材料（遺伝子）を改変し、必要な成分をつきはぎして作られ、無から生み出されることはあり得ない」ということである。これらを踏まえると、まず末端リグニン分解菌が元々持っていた様々な分解経路（例えば、植物リグニンから供給される芳香族化合物の分解経路）を担う遺伝子（群）が組み合わせたり、新規な芳香族化合物分解系遺伝子群の原型（先祖遺伝子群）が形成されると考えられる。そして、これらが雛形となり、改変（突然変異、重複、融合等）、或いは、トランスポゾンや伝達性のプラスミドを介して様々な菌に転移しては、転移先でさらに遺伝子の改変や再編成が起り、進化を加速させる¹⁵⁾。その最終的な結果として環境汚染物質（難分解性芳香族化合物）分解系遺伝子群として環境中から単離されるのではないだろうか。

さて、現在までに分かっている微生物の主な芳香族化合物の分解経路を図6に示した。ぼんやりとだが、一定の法則が見え隠れする。すなわち、これらの環境汚染物質の分解は初期の段階でカテコールやプロトカテク酸（最初の化合物に塩素が置換しているのならば、これらの塩化物）のようにベンゼン環がジヒドロキシル化された少数の中間体化合物に収束する。その後、ベンゼン環がメタ開裂、或は、オルト開裂し、TCA 回路に入る。従って、分解経路を①ジヒドロキシル化中間体への変換過程（上流代謝経路）と②ベンゼン環開裂反応以降の過程（下流代謝経路）の2段階に分けると、様々な環境汚染物質を分解できるようになったのは①の過程が多様化した結果と考えられている¹⁵⁾。

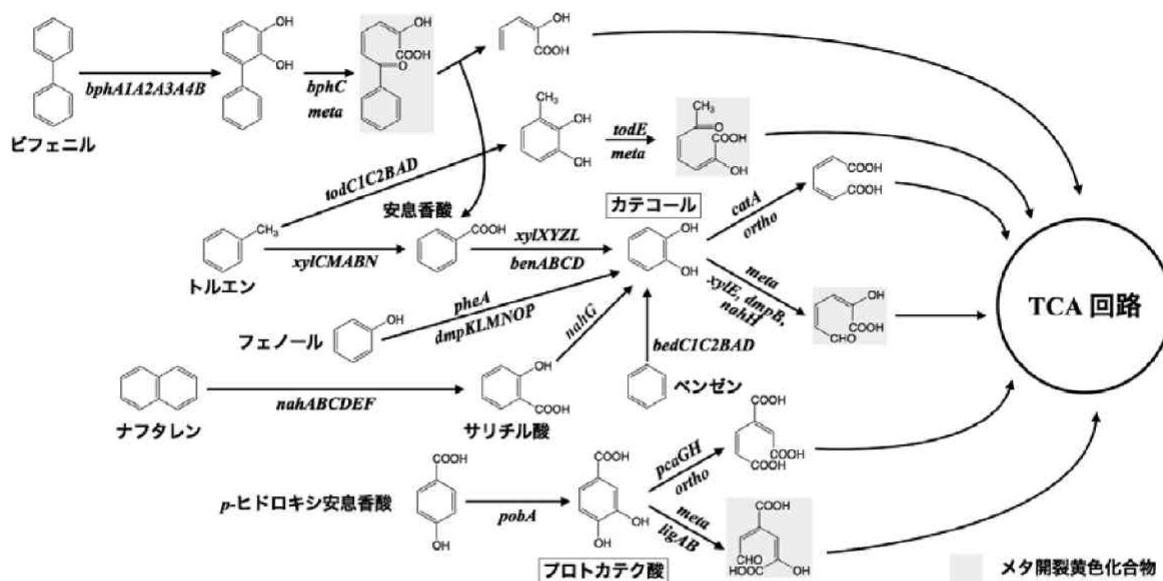


図6. 主な難分解性芳香族化合物の分解経路（文献15を改変）。環境汚染物質分解系遺伝子は末端リグニン分解菌が元々持っていた遺伝子が改変や再編成した結果ではないだろうか？

4. 進化分子工学を用いて強力な分解菌を育種する

生物の進化は遺伝子の変異や組換えなどから生じる。また、生物における様々な反応の多くは、酵素が担っている。酵素は、20種類のアミノ酸が一つにつながって、正しい折り畳まれ方をしてできた特有の構造を有するタンパク質である。その構成するアミノ酸配列の違いによって多様な機能が生み出される。生物の進化には非常に長い年月がかかる印象があるが、実験室内で短時間に進化を起こすことにより、優れた機能を持つ酵素を人工的に構築する手法「進化分子工学」が発表され、現在までに様々な進化分子工学の手法が開発されてきた。

4.1 DNA シャフリング (DNA shuffling)

図7に進化分子工学の手法の先駆けとなったDNA シャフリング法を示した¹⁸⁾。まず、進

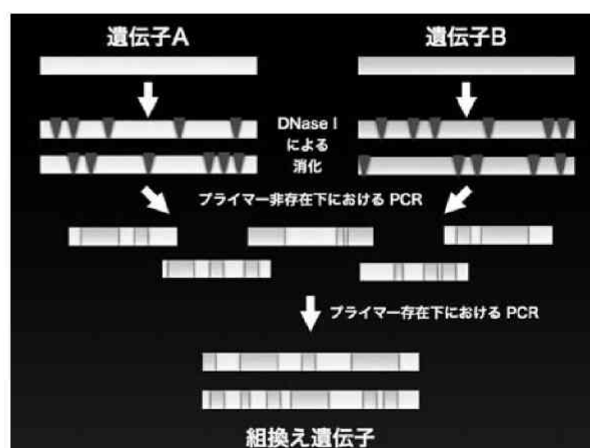


図7: DNA シャフリングで新規な機能を持った酵素を作る。

化させたい遺伝子を2種類用意する(図7では、遺伝子A及び遺伝子Bと表記)。この時、ある程度DNAの相溶性が高い者同士の方が望ましい。次に、それぞれの遺伝子をDeoxyribonuclease I (DNase I) で短時間処理し、細くなったDNA断片を回収後、両者を混合する。次に、PCR (polymerase chain reaction: 極めて微量なDNAからでも選択的に目的のDNAを増幅する技術) を用いると相溶性の高い配列がある領域で組換えが起こり、PCRを行っている過程で様々な変異(正確には点突然変異)が導入された多数の変異DNAを調製できる。その調製できたDNAと遺伝子A、或いは、遺伝子Bの両端の配列と相同な短い一本鎖のDNA(プライマー)を加えて、再度PCRを行うと、図7の遺伝子Aと遺伝子B由来の多種多様な組換え遺伝子が調製できる。

4.2 ビフェニルジオキシゲナーゼの進化分子工学

このDNAシャフリング法をビフェニル/PCB分解遺伝子に適用する、すなわち、分解遺伝子を進化させることで新規な機能を持ったビフェニル/PCB分解酵素を作ることを試みた。PCBの分解を効率良く行うためには、分解酵素の基質であるPCBの認識及び基質特異性に関与する酵素が重要であることから、それらに関与するKF707株のビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニットの遺伝子(*bphA1*)に注目した(図3)。それとDNAシャフリングをする相手としては、アメリカのハドソン川のPCB汚染底土より単離されたPCB分解菌 *Burkholderia xenovorans* LB400株(以後、LB400株)の*bphA1*遺伝子を選んだ。驚くべきことにLB400株のビフェニル/PCB分解遺伝子群は、図3に示したKF707株のものと*bph*遺伝子の数や並び方が全く同じである。また、個々の*bph*遺伝子の相溶性も非常に高く、両菌株の*bphA1*酵素(BphA1)のアミノ酸配列の相溶性は95.6%である。しかしながら、もっと驚くべきこととしては、アミノ酸レベルで両菌株のBphA1がわずか4.4%(BphA1の460個のアミノ酸の内、わずか20個程度)しか変わらないのにもかかわらず、PCBの分解能が異なっているということである⁶⁾。

実際、KF707株及びLB400株の*bphA1*遺伝子を用いてDNAシャフリング法を行い、得られた組換え*bphA1*遺伝子を多数得ることができた。その後、大腸菌を用いて得られた組換えBphA1の発現を行い、PCB及び関連化合物に対する分解特性を調べた(図8)。その結果、それぞれの親酵素の分解特性を合わせ持つ、或いは、それを凌駕する様々な機能を持つビフェニルジオキシゲナーゼの構築に成功した¹⁹⁾。また、組換えBphA1の中には、親酵素が分解できないベンゼン、トルエン、ダイオキシン(塩素置換無)に対して新たな分解能を獲得した組換えBphA1、同じく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に対してのみ高い分解能を示す組換えBphA1等が得られた。その後、以上によって得られた「進化*bphA1*遺伝子」をKF707株の染色体上に存在する*bphA1*遺伝

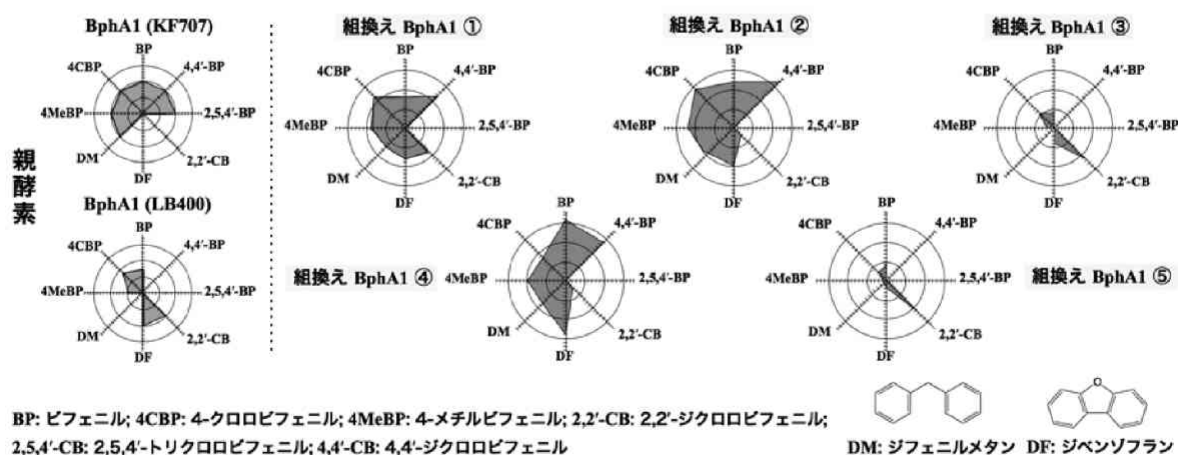


図8: 組換え BphA1 の PCB 及び関連化合物に対する分解特性. DNA シャフリング法で得られた組換え *bphA1* を大腸菌で発現させ、その分解特性を調べた。

子と入れ換えることに成功している。その進化 *bphA1* 遺伝子が組み込まれた KF707 株は様々な芳香族化合物に対しても資化・分解でき、幅広い PCB 分解能を示すことが明らかになっている²⁰⁻²¹⁾。

5. バイオレメディエーション

有用な環境汚染物質分解菌を発見した、或は、強力な分解菌を構築した際に、実際の汚染場所に分解菌を撒いて汚染を浄化したいという気持ちが強くなる。微生物等の働きを利用して土壌や地下水等を浄化する技術であるバイオレメディエーションについて簡単ではあるが最後に紹介したい。

5.1 バイオレメディエーションの種類・利点・欠点

バイオレメディエーションには、外部で培養した微生物を導入することにより浄化を行う「バイオオーグメンテーション」と窒素やリン等の栄養分や酸素、そして、炭素源にメタン等を加えて汚染場所に生息している微生物を活性化することにより浄化を行う「バイオスティミュレーション」がある。さらに、植物を利用して土壌の浄化などを行う技術「ファイトレメディレーション」も含まれる。これらのバイオレメディエーションが汚染浄化法として選択・利用されるのは、自然環境における広範囲かつ低濃度での汚染では、処理施設を建設し、汚染地域の土壌や地下水をすべて汲み上げて物理的・化学的な方法で浄化するのが極めて困難なためである。従って、バイオレメディエーションの利点としては、物理化学的処理法と比較して費用・エネルギーの消費が少ないことがまず挙げられる。また、多様な汚染物質に対して適用できる可能性を有することや生物を利用するということから手法が穏和であるため環境に負荷を与えないことも挙げられる。一方で、浄化に時間がかかる、高濃度の汚染物質浄化に向いていない、さらには、分解除去能には限界があるという欠点もある。特に、実験室では強力な分解活性を示す分解菌であることが分かっているにもかかわらず実際の汚染現場では、その分解菌の菌体濃度や生育条件等が実験室のように再現できないため、実験室で得られる同様な汚染除去効果を発揮させることが難しいとされている。

5.2 有望な技術の課題と期待

我が国日本においては、バイオオーグメンテーションを対象に 2005 年に「微生物によるバイオレメディエーションの利用指針」が設けられた。本指針では、浄化事業計画が指針に適合しているか経済産業大臣や環境大臣に確認できるようになっているが、その事業計画や生態系等への影響評価書の作成、そして、緊急時の対応及び事故対策、安全管理体制の整備、記録等の保管、周辺住民等への情報提供等、実施の際の準備や評価等のやるべきことが多い。これらが事業者等の相当な負担にもなり、本指針の課題となっている。一方で、2010 年 4 月 1 日に「土壤汚染対策法の一部を改正する法律」が施行されて以来、土壤汚染の除去、特に掘削除去は可能な限り抑制的に取り扱うこととされ、低コストで on-site で浄化の可能性があるバイオレメディエーションの期待が高まっている²²⁻²³⁾。その期待に答えるために、また、我が国のバイオレメディエーション促進のためにも、例えば、浄化事業者の負担軽減を含めた利用指針の運用の見直し等が必要と思われる。

6. おわりに

現在、KF707 株を始めとするビフェニル/PCB 分解菌においては、次世代シーケンサーによるゲノム解析が進行している。得られたゲノム情報は、環境汚染物質分解菌の環境適応・進化のメカニズムを解明する上で非常に有用である。一方、著者は、「環境汚染物質分解菌は、末端リグニン分解菌を祖先として進化してきた種」と考えており、天然の芳香族化合物分解代謝系とは異なる新規な環境汚染物質分解代謝系を木質バイオマスの生物変換に適用し、主にリグニン由来の芳香族化合物から付加価値の高い化合物を作ること为目标にゲノム情報を利用して研究を試みている。

参考文献

- 1) 末永光, 渡邊崇人, 藤原秀彦, 西哲人, 古川謙介. 微生物によるポリ塩化ビフェニル (PCB) の分解: 最近の遺伝生化学的研究. 「環境バイオでなにができるのかー環境調和社会形成のためのバイオテクノロジーー」 環境バイオテクノロジー学会編, pp. 19-30, 2006.
- 2) 環境省パンフレット「ポリ塩化ビフェニル (PCB) 廃棄物の適正な処理に向けて」 [2012 年 12 月版]
- 3) Ahmed, M., and Focht, D. D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* **19**, 47-52, 1973.
- 4) 古川謙介. *Pseudomonas* 物語. 生物工学 **89**, 549-552, 2011.
- 5) Furukawa, K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* **5**, 289-300, 1994.
- 6) Mondello, F. J., Turcich, M. P., Lobos, J. H., and Erickson, B.D. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3096-3103, 1997.
- 7) Furukawa, K., and Miyazaki, T. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**, 392-398, 1986.
- 8) Taira, K., Hirose, J., Hayashida, S., and Furukawa, K. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* **267**, 4844-4853, 1992.
- 9) Watanabe, T., Inoue, R., Kimura, N., and Furukawa, K. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* **275**, 31016-31023, 2000.
- 10) Watanabe, T., Fujihara, H., and Furukawa, K. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bacteriol.* **185**, 3575-3582, 2003.
- 11) Furukawa, K., Hayase, N., Taira, K., and Tomizuka, N. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* **171**, 5467-5472, 1989.
- 12) Nishi, A., Tominaga, K., and Furukawa, K. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J. Bacteriol.* **182**, 1949-1955, 2000.
- 13) Top, E. M., and Springael, D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 262-269, 2003.
- 14) Springael, D., and Top, E. M. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol.* **12**, 53-58, 2004.
- 15) 新井博之, 工藤俊章. 進化的観点から見た環境汚染物質分解微生物について. バイオサイエンスとインダストリー **55**, 87-91, 1997.
- 16) Masai, E., Katayama, Y., and Fukuda, M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1-15, 2007.
- 17) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 環境細菌ゲノムの構造と可塑性 難分解性化合物の総合職と専門職の場合. 化学と生物 **47**, 35-42, 2009.
- 18) Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391, 1994
- 19) Kumamaru, T., Suenaga, H., Mitsuoka, M., Watanabe, T., and Furukawa, K. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by direct evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat. Biotechnol.* **16**, 663-666, 1998.
- 20) Suenaga, H., Nonaka, K., Fujihara, H., Goto, M., and Furukawa, K. Hybrid pseudomonads engineered by two-step homologous recombination acquire novel degradation abilities toward aromatics and polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 915-923, 2010.
- 21) 古川謙介. 環境バイオ 分解菌の新機能を探る. 化学と生物 **51**, 46-51, 2013.
- 22) 須藤学. バイオレメディエーション指針の概要. 化学と生物 **49**, 121-124, 2011.
- 23) 福田雅夫. 微生物によるバイオレメディエーション利用指針における微生物の生態系への影響評価. 化学と生物 **49**, 199-203, 2011.