

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高 見 和 孝

環境汚染物質であるトリクロロエチレン (TCE) は、現在までにメタン資化性細菌や芳香族化合物資化性細菌が共酸化により分解されることが報告されている。しかし、従来の野生型の分解菌を用いる方法では10 ppm以上の高濃度のTCEを分解することは困難であるため、高濃度のTCE汚染水を処理するには分解性を向上させた微生物を用いる必要がある。本論文は、TCEの分解性を向上させるために、TCE分解酵素遺伝子を組み込んだ組換え体を構築し、組換え体によるTCEの分解性の検討および連続培養法によるTCEの分解について検討を行った結果をまとめたもので、6章より構成されている。

第1章は、研究の背景と目的を述べた緒論から構成されている。

第2章では、TCE分解能を有した新規微生物の探索結果が述べられている。探索の結果、ジメチルスルフィド (DMS) 資化性細菌 *Acinetobacter* sp. 20B 株、クメン資化性細菌 *Pseudomonas fluorescens* IP01 株、およびジベンゾフラン資化性細菌 *Terrabacter* sp. DBF63 株がTCE分解能を有していることを見出し、各菌株のTCE分解性についての検討を行った。これらの菌株は各々の資化基質に生育させた場合にのみTCE分解性を示したことから、TCE分解には各々の基質で誘導される酸化酵素が関与していることが示唆された。

第3章では、これらの菌株が有する各資化物質酸化酵素遺伝子を用いて、大腸菌 *E. coli* JM109 株を形質転換させた組換え体によるTCE分解検討結果が述べられている。この結果 *Acinetobacter* sp. 20B 株のDMSモノオキシゲナーゼ遺伝子、又はクメン資化性細菌 *Pseudomonas fluorescens* IP01 株のクメンジオキシゲナーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体によるTCE分解での V_{max} 値は、野生株のそれと比べて100倍以上高くなることを見出され、組換え体は野生株よりも高いTCE分解性を示すことを明らかにした。更にDMSモノオキシゲナーゼ遺伝子とクメンジオキシゲナーゼ遺伝子を同時に組み込んだ組換え体の V_{max} 値は、それぞれのオキシゲナーゼ遺伝子単独で組込んだ組換え体よりも2倍高く75 ppmのTCEを20時間で90%分解し、更に各オキシゲナーゼの基質特異性を併せ持つことを明らかにした。

第4章では、DMSモノオキシゲナーゼ、及びクメンジオキシゲナーゼのTCE以外の塩素化オレフィン類に対する基質特異性についての検討結果が述べられている。DMSモノオキシゲナーゼは炭素数が2から4個で構成される塩素化オレフィン類に酸化活性を示し、同定された酸化生成物の構造から一酸素原子添加反応のみを触媒することを明らかにした。クメンジオキシゲナーゼの場合も同様に各塩素化オレフィン類に対する酸化活性を有しており、同定された酸化生成物の構造からクメンジオキシゲナーゼは基質の構造によって一酸素原子添加、及び二酸素原子添加反応を触媒するなど多彩な酸化反応を触媒する

ことを明らかにした。

第5章では組換え体の連続培養によるTCE分解性の検討結果を述べている。組換え体の薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子を組み込んだ組換え体の連続培養では、アンピシリン共存下でも培養中にプラスミドの脱落が生じ、TCE分解活性が低下することを明らかにした。しかし薬剤耐性遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ組換え体の連続培養では、プラスミドの脱落もなく安定してTCE分解活性が長時間持続することを明らかにした。更にこの組換え体のTCE分解活性は、連続培養の培養条件により影響を受けることも明らかになり、高TCE分解活性発現のための最適培養条件も検討した。

第6章では、論文全体の総括及び組換え体によるTCE分解システムの可能性を中心に今後の展望について考察されている。

以上、本論文は、TCE分解酵素遺伝子を組み込んだ組換え体によるTCE分解性の検討を行うとともに、各酸化酵素の基質特異性、酸化反応機構の解析、及び組換え体の連続培養法におけるTCE分解性の評価を行うことで、組換え体によるTCE分解システムの構築の可能性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。