

論文の内容の要旨

論文題目 PCB 分解性極限環境微生物の探索とその遺伝学的解析に関する研究

氏名 太田 嘉則

序章

芳香族化合物分解菌は自然界に広く分布し、進化の過程で様々な基質特異性を獲得してきた。それらの中には PCB などの人為起源の難分解性物質を分解する微生物も存在する。構造的に類似した化合物の代謝に共通点が見い出され、分解遺伝子群が共通の祖先から進化してきたことが示唆されている。

異なる菌株間で相同性の高い分解遺伝子群が検出され、さらに遺伝子群の一部が欠失しているものや、構成順番が異なるものが発見された。進化の過程で、遺伝子群が形成及び再編成され、微生物は新機能を獲得してきたことが示唆されている。

特殊環境下で生存可能な微生物は、その環境に適応するために独自の進化を辿ってきた結果、これまでとは異なる代謝分解系を有することが予想される。さらに、特殊環境のみならず通常的环境でも生育可能な微生物には、自然環境の急激な変化に迅速に対応し、様々な条件下で生育を可能にするための独特の進化のメカニズムをもっている可能性がある。

そこで極限環境に生育可能な PCB 分解微生物のもつ分解遺伝子群を研究することにより、分解遺伝子の進化の過程に対する環境の影響について新たな知見や、新規な進化のメカニズムを見出せることが期待される。また、微生物をもちいたバイオレメディエーションの確立にも寄与すると思われる。

以上の様な背景の下に、本研究において、微生物進化及びその応用のモデル系として、極限環境に適応した PCB 分解菌の探索及びその分解遺伝子群の解析を行った。

第 1 章 有機溶媒耐性 PCB 分解菌の探索及びその解析

有機溶媒耐性 PCB 分解菌のスクリーニングを行なった。その結果、*Pseudomonas putida* CE2010 株、*Alcaligenes xylosoxydans ssp. denitrificans* YO129 が単離された。またアルカリ耐性 *Alcaligenes denitrificans* A41 株が有機溶媒存在下でビフェニルを資化することが判明した。

CE2010 株、A41 株及び YO129 株の有機溶媒耐性能は、ビフェニルを単一炭素源とした最少培地ではサイクロヘキサン、ヘキサン、サイクロオクタンであった。また他の 6 種の既存の芳香族分解菌(*P. putida* F1 株、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株、*Pseudomonas sp.* LB400 株、*A. eutrophus* H850 株、*Rhodococcus. globerulus* P6 株、*R. erythropolis* TA421 株)の有機溶媒耐性能を上記 3 株と比較したところ、CE2010 株が最も高い耐性能を示し、A41 株がこれに続いた。CE2010 株は、トリクロロビフェニルをほぼ完全に分解し、テトラクロロビフェニルに対しても分解能を示した。

第 2 章 アルカリ耐性 PCB 分解菌の探索及びその解析

好アルカリ性 PCB 分解菌のスクリーニングを行った。その結果、*Alcaligenes denitrificans* A41 株、*Rhodococcus spp.* HA99 株、*Rhodococcus spp.* K37 株、*Dietzia spp.* TA1 株が単離された。これらの菌株は pH7-9 で生育した。A41 株は 4 株の内、もっとも生育が早く、2,3-DHBD 活性が高かった。K37 株、HA99 株はアルカリ耐性で、ビフェニル/ PCB を分解することの出来る新しい種であることがわかった。TA1 株は、ビフェニルや PCB は分解せず、benzoate を分解することがわかった。PCB やビフェニルを分解する微生物が TA1 株に benzoate を供給することが示唆された。これらの結果から、芳香族分解における微生物間の相互作用が、自然界に存在することが予想される。

スクリーニングの結果、グラム陰性よりもグラム陽性の菌株が多く単離された。アルカリ耐性で芳香族化合物分解菌のなかでは、*Rhodococcus* やその近縁属がグラム陰性細菌より多く存在することが示唆された。A41 株は、トリクロロビフェニルをほぼ完全に分解し、テトラクロロビフェニルに対しても分解能を示した。

第3章 有機溶媒耐性 PCB 分解菌 *Pseudomonas putida* CE2010 株の PCB 分解経路遺伝子の 遺伝学的解析-1

CE2010 株から、メタ開裂遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、CE2010 株はトルエン資化菌 *P. putida* F1 株のもつトルエン分解経路の *todE* 及びクメン分解経路の *cmtC* 遺伝子と 100% のホモロジーを示す 2 つの遺伝子を有することがわかった。

P. putida CE2010 株から 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2, 4-dienoic acid に対する加水分解活性をもつ酵素を単離精製し、その N 末端アミノ酸配列を決定したところ、F1 株の CmtE の N 末端アミノ酸配列と 100% のホモロジーを示した。CE2010 株の *cmtE* 遺伝子に Tc^r 遺伝子を挿入し破壊株を作成したところ、ビフェニル資化性が失われ、ビフェニル資化において CmtE が関与することが明らかになった。*rrnB* terminator 遺伝子を *tod* 及び *cmt operon* に挿入したところ、両破壊株ともビフェニルに対する資化性が失われた。*cmt operon* 破壊株に *cmtE* 遺伝子を形質転換すると、ビフェニル資化性が回復した。これらの結果から CE2010 株ではビフェニル資化には *tod operon* 及び *cmtE* が必要であり、*tod* 及び *cmt operon* から成るモザイク分解経路を用いていることが分かった。

第4章 有機溶媒耐性 PCB 分解菌 *Pseudomonas putida* CE2010 株の PCB 分解経路遺伝子の 遺伝学的解析-2

CE2010 株の *cmt* 及び *tod operon* の全塩基配列を決定した結果、*cmt operon* の promoter 領域に 1 塩基の置換が発見された。この領域は転写因子 CymR の結合領域であり、CymR はリプレッサー蛋白質であることが示唆されている。Gel shift assay の結果、CymR は F1 株由来の *cmt promoter* 領域に対しては高い親和性を示したが、CE2010 株由来の *cmt promoter* 領域には低い親和性しか示さなかった。この結果より、CE2010 株ではこの領域における塩基の置換によって CymR の抑制を受けにくくなり、ビフェニル資化において *cmt operon* が発現することが予想された。

CE2010 株に F1 株由来の *cmt promoter* 領域を置換すると、ビフェニルの資化性が失われた。これらの結果から、CE2010 株における *cmt promoter* 領域の塩基置換がビフェニル資化を可能にしている原因のひとつであることが分かった。

第5章 アルカリ耐性 PCB 分解菌 *Alcaligenes denitrificans* A41 株の PCB 分解経路遺伝子群 の遺伝学的解析

A41 株の PCB 分解経路をコードする遺伝子群をクローニングして塩基配列を決定した。

解析の結果、11つの有意な大きさの open reading frame が見いだされ、予想されるアミノ酸配列について解析した。orf1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 はそれぞれ、*bphE*, *G*, *F*, *orf4*, *bphA1*, *bphA2*, *bphA3*, *bphB*, *bphC*, *bphD*, *orf11*, *bphA4*, *bphR*, *orf14*, *orf15* をコードしていることがわかった。*bphE*, *G*, *F* 遺伝子が *bphA1* 遺伝子の上流に存在し、また *bphA4* が *bphD* の下流に存在することが特徴であった。これらの遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列は、*Pseudomonas sp.* KKS102 株の *bph operon* にコードされるピフェニル分解経路蛋白質に 86%以上の相同性を示した。宿主菌株の種が異なるにも関わらず、両株の *bph operon* の遺伝子構造も同じであった。遺伝子の再編が生じた後に両株に遺伝子が伝達されたのか、または片方の菌株からもう一方の菌株へ遺伝子の移動が起こったことが予想される。

第6章 総括

以上の結果より、微生物は潜在的に新規化合物に適応する能力を有しており、適切な選択圧のもとで新規分解能力を獲得する過程が示唆された。*bph operon* をもたない有機溶媒耐性 PCB 分解菌 *P. putida* CE2010 株は、*cmt operon* 内の遺伝子のわずかな置換により、ピフェニルを分解可能になったことが分かった。これは従来提唱された外部からの遺伝子群の伝播、挿入による新機能の獲得とは異なり、既存の *tod* 及び *cmt* の 2 つの *operon* から成るモザイク分解経路を形成することによって基質特異性を拡大する進化の過程を示すものである。さらに新しいオペロンの形成過程の途中段階であるともいえる。アルカリ耐性 PCB 分解菌 *A. denitrificans* A41 株の全てのピフェニル分解経路、分解遺伝子を明らかにすることができた。*bph* 遺伝子は有意な 11 の ORF がクラスターを形成し、遺伝子構成は特異な構造であることが示された。この遺伝子構成は、種が異なりアルカリ耐性ではない *Pseudomonas sp.* KKS102 株の *bph* 遺伝子群と同じであることから、特殊環境に適応する微生物にも遺伝子が伝播していることがわかった。

本研究により解明されたピフェニル分解能力の獲得方法、*bph* 遺伝子及びその構造は、分解系遺伝子の進化の軌跡、オペロンの遺伝子構成の形成過程を考える上で、大きな手掛かりになるとと思われる。