

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鄭 鎮 成

*Terrabacter* 属細菌 DBF63 株は、ダイオキシンのモデル化合物である dibenzofuran (DF) と polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) のモデル化合物である fluorene (FN) の両方を、唯一の炭素源・エネルギー源として生育可能な細菌である。これまでの研究で、DBF63 株の DF 分解に関与する初発酸化酵素遺伝子(*dbfA1A2*)、メタ開裂酵素遺伝子(*dbfB*)及び加水分解酵素遺伝子(*dbfC*)の取得にも成功している。しかしながら、*dbfA1A2* 遺伝子の周辺約 20 kb に渡って存在する、既知の芳香族分解系酵素遺伝子と相同性を示す ORF についてはその機能が未知であった。本博士論文研究では、*dbfA1A2* 遺伝子群の周辺領域に存在する各 ORF の機能解析、*dbfA1A2* 遺伝子群の局在性と *dbf* 遺伝子群の発現様式の解明を行うとともに、取得された DF 分解系酵素の chlorinated dibenzofurans (CDFs) や dibenzo-*p*-dioxins (CDDs) に対する分解能についても調べてもので、全 5 章からなる。

第 1 章の序論に引き続き、第 2 章では DBF63 株において *dbfA1A2* 遺伝子群の上流に存在した、芳香族化合物分解系酵素遺伝子とそれぞれ相同性を示す 6 個の ORF (ORF13, 12, 10, 9, 8, 7) をクローニングして大腸菌内で発現させ、フタル酸を基質とした変換反応を行った。ORF13, 12, 10, 9, 8 を含むプラスミド pDF203 で形質転換した大腸菌を用いて休止菌体反応を行った結果、フタル酸から 3,4-dihydroxyphthalate の生成が確認された。また ORF7 については確実に大腸菌内で発現させるため、その上流に SD 配列を付加したプラスミド pDFS205 を構築し、大腸菌内で pDF203 と共発現させたところ、フタル酸からプロトカテキン酸の生成が確認された。これらの結果から、ORF13, 12, 9, 8 は phthalate 3,4-dioxygenase の各コンポーネント (PhtA1, PhtA2, PhtA3, PhtA4 と命名) を、ORF10 は 3,4-dihydro-3,4-dihydroxyphthalate dehydrogenase (PhtB) を、ORF7 は 3,4-dihydroxyphthalate decarboxylase (PhtC) をコードしていると結論づけた。また PhtA はフタル酸以外にも、*o*-chlorobenzoic acid も基質として酸化できることを明らかにした。

第 3 章では、*dbfA1A2* 遺伝子の周辺に存在した 5 個の ORF (ORF4, 3, 15, 16, 17) および *dbfA1A2* 遺伝子をクローニングして大腸菌内で発現させ、FN を基質とした変換反応を行った。ORF4-*dbfA1A2*-ORF3-ORF15-ORF16-ORF17 を含む DNA 領域をクローニングし、大腸菌を用いた休止菌体反応を行ったところ、FN の分解産物であるフタル酸の生成が確認された。また、メタ開裂酵素および加水分解酵素遺伝子と相同性を

示す ORF15 および ORF3 を削った ORF4-*dbfA1A2*-ORF16-ORF17 を含む DNA 領域をクローニングし、大腸菌を用いた休止菌体反応を行ったところ、FN の代謝中間体である 2-carboxy-2,3-dihydroxybiphenyl の lactone 化物 8-hydroxy-3,4-benzomucoumarin の生成が確認された。これらの結果から、この領域の ORF が FN からフタル酸への変換に必要な ORF であることを示し (ORF4-*dbfA1A2*-ORF3-ORF15-ORF16-ORF17 を *flnB*-*dbfA1A2*-*flnE*-*flnD1*-ORF16-*flnC* と命名した)。また、FlnB が、9-fluorenone から 9-fluorenone への変換活性も持っていること、FlnD1 と ORF16 遺伝子産物の 2 つのタンパク質がメタ開裂酵素活性を示すのに必要であることも示した。

第 4 章では、DBF63 株から今まで取得された酵素群の DF・FN 分解への関与を示すために、RT-PCR による発現解析を行った。DF および FN で生育させた DBF63 株の菌体から全 RNA を抽出し、*dbfA1A2*、*dbfBC* および *phtA3A4* 遺伝子をそれぞれ増幅するようなプライマーを用いて RT-PCR 解析を行った。その結果、*dbfA1A2* および *dbfBC* 遺伝子は DF 生育時に発現して DF 代謝に関与しており、*dbfA1A2* および *phtA3A4* 遺伝子は FN 生育時に発現して FN 代謝に関与していることが示された。また、DF で生育させた DBF63 株の全 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動に供したところ、染色体以外にメガプラスミドと考えられる 2 本のバンド (pDBF1, pDBF2) が検出され、サザン解析を行ったところ、*dbfA1A2* 遺伝子はプラスミド上にコードされており、*dbfBC* 遺伝子は染色体上に存在することが示された。

第 5 章では、DBF63 株が、実際に環境汚染を引き起こしている塩素化ダイオキシンに対しても分解能を有しているか調べる目的で、DBF63 株による CDFs および CDDs の変換反応を行っている。DF で生育させた DBF63 株を用いて、1 から 3 個の塩素で置換されたダイオキシン類を基質とした休止菌体反応を行った結果、2-chlorodibenzofuran (2-CDF)、2-chlorodibenzo-*p*-dioxin (2-CDD)、2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3-DCDD) からは、分解産物として相当するクロロサリチル酸 (CSA) やクロロカテコール (CC) の生成が認められた。一方、*dbfA1A2* 遺伝子を保持した大腸菌を用いて同様な変換反応を行ったところ、2-CDF と 2,8-dichlorodibenzofuran を相当する trihydroxybiphenyl へと変換し、2-CDD、2,3-DCDD および 1,2,3-TCDD を相当する trihydroxydiphenyl ether へと変換することが示された。

以上、本論文は、*Terrabacter* 属細菌 DBF63 株において FN 分解に関与する上流代謝系酵素遺伝子群を世界に先駆けて明らかにするとともに、本菌株の FN 代謝系酵素が、1 から 3 塩素化ダイオキシンに対して分解活性を保持していることを示すなど、ダイオキシン・PAHs 分解系遺伝子の構造やバイオレメディエーション技術の開発に資する新知見を与えたものとして学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと判断した。