

[別紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 Onruthai Pinyakong

ベンゼン環が2個以上縮合した多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、天然には石炭や石油などの化石燃料中に存在しているが、有機物の不完全燃焼によっても発生するため、化石燃料や廃棄物の燃焼により大気を通じて様々な環境へと拡散し、地球表層を広く汚染している。一般に PAHs は、芳香環の数が増加すると水溶性が低くなり、発癌性や変異原性を示すものも増加するため、環境中における残留性や人体への影響が懸念されている。一方、*Sphingomonas* 属細菌は PAHs の微生物分解において重要な役割を果たしており、naphthalene、phenanthrene、fluoranthene、fluorene など様々な PAHs を基質として利用可能な菌株が単離、解析されている。しかしながら、芳香族化合物分解の各ステップに関与すると推測される遺伝子群のシーケンス解析はなされても、発現様式や機能解析に関する研究はほとんど行われていない。さらに興味深いことに、*Sphingomonas* グループに属する PAHs 分解菌からは、PAHs 分解において重要な役割を果たす初発酸化酵素遺伝子が同定されていなかった。以上のような背景から、本博士論文研究では、phenanthrene 資化菌 *Sphingobium* sp. P2 株における phenanthrene 代謝経路を決定した後、P2 株における phenanthrene 代謝系酵素遺伝子群を単離・解析している。さらに、acenaphthene 資化菌 *Sphingomonas* sp. A4 株における acenaphthene 代謝系酵素遺伝子の単離と解析も行っており、全4章からなる。第1章の序論に引き続き、第2章では、タイ国の油汚染土壌より単離された phenanthrene および naphthalene 資化菌である *Sphingobium* sp. P2 株について、phenanthrene 代謝経路を特定するため、代謝産物の同定を行っている。P2 株の phenanthrene 培養液を酸性抽出し、TLC、シリカゲルカラム、HPLC などに供し、代謝物を精製した。GC-MS および ^1H , ^{13}C NMR 解析を行った結果、2種類の新規な phenanthrene 代謝産物を同定することに成功した。1つは、phenanthrene の 1,2-位が初発酸化、メタ開裂を受けた結果生成した 5,6-benzocoumarin であり、もう1つは 1,5-dihydroxy-2-naphthoic acid であることが明らかとなった。他には既知の phenanthrene 代謝物である 7,8-benzocoumarin、1-hydroxy-2-naphthoic acid、coumarin が検出された。以上、代謝産物の同定結果および P2 株がサリチル酸に生育することから、本菌株の phenanthrene 代謝経路は、1,2-位または 3,4-位が初発酸化され、メタ

開裂反応を受けた後、サリチル酸を経て代謝されることを明らかにしている。

第3章では、トランスポゾン (Tn) 挿入変異による P2 株の phenanthrene 代謝系遺伝子の単離と解析を行っている。Tn 挿入部位周辺の2領域 (15.8-kb および 14-kb) についてそれぞれ塩基配列を決定したところ、28 個の ORF が存在した。相同配列検索の結果、P2 株において見出された5組の芳香族化合物初発酸化酵素の大・小サブユニットをコードする遺伝子 (それぞれ *ahdA1*[a-e] および *ahdA2*[a-e])、それらと相補すると推測される1組の ferredoxin、ferredoxin reductase をコードする遺伝子 (それぞれ *ahdA3* および *ahdA4*) について RT-PCR 解析や機能解析を行った。RT-PCR 解析で phenanthrene 分解に関与すると考えられた、*ahdA1A2*[c-e]、*ahdA3* および *ahdA4* 遺伝子について大腸菌を用いて発現させ、phenanthrene やその代謝中間体に対する変換活性を調べた。その結果、3つの酸化酵素とも phenanthrene の中間代謝物であるサリチル酸をカテコールへと変換する活性が認められ、*AhdA1*[c-e]*A2*[c-e]*A3A4* は全て新規な salicylate 1-hydroxylase であることを明らかにしている。

第4章では、acenaphthene および acenaphthylene 資化菌である *Sphingomonas* sp. A4 株について代謝経路の推定および代謝系酵素遺伝子の単離、解析を行っている。A4 株の acenaphthene 代謝経路については、1-acenaphthenol、1-acenaphthenone、1,8-dicarboxynaphthalene を経て分解されることが既に明らかとなっていたが、本研究で新たに下流代謝中間体として 3-hydroxyphthalic acid を同定した。また既にショットガンクローニングにより取得されていた A4 株のメタ開裂酵素遺伝子 (*arhC*) の周辺領域について塩基配列を決定したところ、*arhC* 遺伝子の約 4.5-kb 下流に既知の PAHs 初発酸化酵素の大・小サブユニットをコードする遺伝子と相同性を示す2つの ORF (それぞれ *arhA1* および *arhA2*) が存在し、この *ArhA1A2* 遺伝子が各種 PAHs に対して初発酸化活性を持っていることを明らかにしている。

以上、本論文は、*Sphingobium* 属細菌 P2 株の phenanthrene 分解において、これまでに報告のない中間代謝物や、新規な multicomponent salicylate 1-hydroxylases を見出すとともに、A4株から *Sphingomonas* に属する PAHs 資化菌において初めて PAHs 初発酸化酵素の terminal oxygenase component を同定するなど、*Sphingomonas* 属細菌由来の PAHs 分解系遺伝子群の構造や機能に関して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。