

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏名 Wiboonluk Pungrasmi

指導教官名 太田 明德

論文題目

Phylogenetic and molecular biological studies on a novel
alkylphenol-degrading *Pseudomonas* sp.

(新規アルキルフェノール分解性 *Pseudomonas* sp.に関する系統学的・分子生物学的研究)

序

産業革命以来、科学技術の発展は地球上の元素循環に対して過去には存在しなかった問題を引き起こしつつある。様々な人工的化合物の急激な生産や、天然の物質でもその本来とは異なる環境下への大規模な移入が、受け入れる環境の自浄能力を超えて起こり、その結果として、環境汚染物質の蓄積が地球上の生命活動を脅かすレベルまでに達している。

アルキルフェノール (AP) は、様々な産業で広く用いられている界面活性剤であるポリエポキシアルキルフェノール (APEO) の主要成分である。AP はまた、それ自身プラスチックの抗酸化剤として使われ、食品容器のプラスチックからの溶出が心配されている。污水处理プラントでは、AP は APEO のポリエポキシレート部分の比較的速やかな分解によって生じ、処理汚泥に残存する物質として報告されている。このようなことから、AP は廃液や飲料水の処理で問題となる脂溶性汚染物質となっており、また、人間や動物の生殖に影響する内分泌攪乱物質としても指定されている。

従って、環境中の AP の有効な解毒と分解のシステムを開発することは緊急の社会的要請である。一般に汚染化合物の解毒と分解のためには、生物分解がその特異性の高さと有害物質の副生が少ないために適している。それゆえ、単一のあるいは微生物集団について、様々な汚染物質の分解能の研究が進められている。しかしながら、AP の解毒については未だごく少数の微生物に

関する研究が公にされているに過ぎない。それらには、*Sphingomonas cloacae*、いくつかの *Pseudomonas* 属細菌、および、酵母 *Candida aquatextoris* などがあるが、これら微生物について、より有効な分解システムを作るために必要と思われる、分類学的な位置、AP 分解の分子機構などについてはほとんど明らかにされていない。

本研究の目的は以下のごとくである。

(1) 汚泥試料中からの AP 分解菌の検索と単離、(2) 分離菌の系統学的位置の決定、(3) AP 分解経路の推定、(4) AP 分解経路に関わる遺伝子の単離。

1. AP 分解菌の分離、性質の検討、及び系統学的解析

活性汚泥試料は東京都小台の下水処理場から入手した。研究室スケールのバイオリアクターを用いて、一定流速で AP 混合物 1000 ppm を含む培地を添加しつつ、試料の馴化培養を行った。ついで、各種 AP を唯一の炭素源として含む培地を入れたフラスコに植え次ぎ、それぞれの AP 分解菌を濃縮した。平板培地上における生育試験を経て、直鎖アルキル基を持つ AP 分解菌を分離した。それらのうち、後ほど *Pseudomonas* 属に属することが判明した WL 株について、さらに性質を検討した。

本菌の分類学的性質を以下にまとめる。本菌はグラム染色陰性で、好気条件で生育する。胞子を形成しない。直線的な短桿菌 (2.0~3.5 x 1.3~1.7 μm) で一方の長軸端から数本の鞭毛を生じ、運動性がある。栄養培地上のコロニーは円形で平板にして、透明性のある乳白色ないし薄い黄色である。ピオシアニンや蛍光色素を生産しない。30°C 及び 37°C で生育可能であるが、4°C あるいは 42°C では生育しない。カタラーゼ、オキシダーゼは陽性であるが、グルコースの酸化及び発酵は陰性。硝酸を亜硝酸に還元できず、脱窒も行わない。G+C 含量は 66% である。主要な脂肪酸は $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{16:1}$ 、 $\text{C}_{18:1}$ 、主要なヒドロキシ脂肪酸は 3-hydroxy $\text{C}_{10:0}$ 、3-hydroxy $\text{C}_{12:0}$ 、2-hydroxy $\text{C}_{12:0}$ であり、主要イソプレノイド・キノンは ubiquinone Q9 であった。以上のこと及び 16S rDNA の配列解析 (AB126621) と近縁種 DNA とのハイブリダイゼーションの結果から、新規 *Pseudomonas* 属菌種であったので、種名として *Pseudomonas japonica* を提案した。タイプ菌株は WL^T (IAM 15071、及び TISTR 1526 (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Microbiological Resource Center)) である。

2. *Pseudomonas* sp. strain WL による AP の分解

本菌種は 1 から 9 までの数の直鎖アルキル鎖を有する AP を利用できた。アルキル鎖が長いものの方が生育は良好であった。標準的な条件下 (30°C) で 1000 ppm の濃度の AP を 10 日以内

にほぼ完全に分解した。この菌はまた、直鎖アルカンを資化し、*n*-ethanol、*n*-butanol、*n*-heptanol、*n*-decanol 等の長鎖アルコールによっても生育可能であった。しかしながら、分岐アルキル鎖を持つ AP、benzene、toluene、phenol、benzoic acid 等については生育を確認できなかった。

0.1% (w/v) *n*-octylphenol (OP) を唯一の炭素源として5日間培養後、*n*-octylphenol 由来と考えられる培養液抽出物主要成分として *p*-hydroxyphenylacetic acid (*p*-HPAA) の蓄積が検出された。この結果および、*p*-HPAA を本菌が資化できることなどから、本菌種は先ずアルキル鎖末端を酸化し、次いでこれを α 酸化あるいは β 酸化により短縮して *p*-HPAA とする可能性がある。さらに、OP あるいは *p*-HPAA を炭素源として培養した後、Rothera 試験によって、紫色の発色を見たので、フェノール環の開裂は後に β ケト酸が生成する *ortho* 開裂によるものと推定した。

3. *Pseudomonas* sp. strain WL による AP の分解に関する分子遺伝学的解析

本菌株に三親伝達法により大腸菌からプラスミド pTnMod-OKm を導入し、Tn5 の転移によって生じたカナマイシン耐性コロニーから、OP を炭素源として生育の悪い変異株を選択した。変異株から DNA を調製し、Tn5 を含む適当な大きさの制限断片を自己閉環後トランスポゾン末端の配列をプライマーとして PCR 増幅し、塩基配列を決定する手法により、トランスポゾンが挿入した遺伝子 *apd1* (alkylphenol degradation 1) を推定した。それらの変異株から WL11 株を選び、野生型株 DNA について広宿主域ベクター pKS13 上に調製したコスミドライブラリーから、その挿入変異を有する遺伝子断片をプローブとして、野生型遺伝子全長を含むクローンをサザンハイブリダイゼーションによって単離した。また、単離したコスミドクローンは変異株の OP 上における生育の欠陥を相補した。

apd1 は 1,869 bp のタンパク質コード領域を有し、想定されるタンパク質生産物は *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10933 の *exaA* 遺伝子産物と 87% のアミノ酸配置が一致した。また、*Pseudomonas putida* ATCC11172 と *P. putida* KT2440 との相同遺伝子とそれぞれ 90%、91% のアミノ酸配置が一致した。*exaA* は *P. aeruginosa* ATCC10933 ではエタノールを、*P. putida* ATCC11172 では炭素鎖長 16 までの *n*-アルコールを酸化する、pyrroloquinoline quinone (PQQ) -dependent alcohol dehydrogenase をコードする遺伝子として報告されている。ゲノム塩基配列が報告されている、*P. aeruginosa* ATCC10933 と *P. putida* KT2440 に対して *apd1* 近傍の領域を比較すると、*apd1* の上流には逆向きにシトクローム 550 をコードする *exaB* に相同な遺伝子、下流にも逆向きにレスポンス・レギュレーターと考えられる *exaE* に

相同な遺伝子が存在していた。これらの他にもオルソログが見出されたが、その配置は必ずしも一致しなかった。*apd1* と *exaE* ホモログ遺伝子の間には 16 nt を挟んで 44 nt をユニットとする回文構造があり、同様な 20 nt を越える長いユニットをもつ回文構造は他の遺伝子間にもあった。これらは転写の終結に関わるものと考えられる。*apd1* 遺伝子の mRNA の合成を RT-PCR によって検討したところ、*apd1* の発現は heptylphenol 及び decanol によって誘導されたが、炭素源となるクエン酸やコハク酸では誘導されなかった。

apd1 を *lacZ* 誘導発現系を用いて大腸菌中で発現させ、計算分子量 68,511 に近い分子量のタンパク質の増幅を得た。無細胞抽出液を調製し、PQQ と Ca^{2+} 及び基質として、*apd1*-変異株 WL11 では利用が大きく低下する *p*-hydroxyphenylethanol を添加したところ、60 分後には非発現菌体抽出液による対照反応に比して、基質残存量は 50%以下に低下した。

以上の結果は、*Pseudomonas* sp. strain WL における直鎖アルキル基を有する AP の分解では PQQ-dependent alcohol dehydrogenase が関与すること、また、恐らくはこれが水酸化された AP の炭化水素鎖末端を酸化し、引き続く酸化系によってアルキル鎖を短縮するものと考えられた。どの段階でフェノール環の開裂があるかは不明であるが、OP 資化の際の *p*-HPAA の蓄積から考えてアルキル鎖の短縮後と考えられる。