

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Wiboonluk Pungrasmi

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。汚水処理プラントでは、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。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ず、そ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。

本研究は、汚泥試料中からの AP 分解菌を単離して、その系統学的位置を決定し、AP 分解経路を推定するとともに、AP 分解経路に関わる遺伝子を単離、解析したものである。

第 1 章は序論である。

第 2 章では、AP 分解菌の分離、性質の検討、及び系統学的解析を行っている。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、WL 株についてさらに性質を検討している。

申請者は、本菌の分類学的性質を、16S rDNA のヌクレオチド配列の決定と比較分析、近縁種 DNA-DNA ハイブリダイゼーションほか、形態学的、生理学的、生化学的試験を行って検討した結果、新規 *Pseudomonas* 属菌種であったので、種名として *Pseudomonas japonica* を提案している。

第 3 章では、*Pseudomonas* sp. strain WL による AP の分解経路を推定している。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。標準的な条件下 (30℃) 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。

*n*-octylphenol (OP) を唯一の炭素源とする場合、*p*-hydroxyphenylacetic acid (*p*-HPAA) の蓄積が検出され、*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  $\alpha$  酸化あるいは  $\beta$  酸化により短縮して *p*-HPAA とする可能性がある

こと、さらに、OP あるいは *p*-HPAA を炭素源として培養した後の Rothera 試験によって、フェノール環の開裂は後に  $\beta$  ケト酸が生成する *ortho* 開裂によることを推定した。

第4章では、*Pseudomonas* sp. strain WL による AP の分解に関する分子遺伝学的解析を行っている。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 *apd1* 遺伝子変異株を選択した。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コスミドクローンを単離した。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* に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。*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である。*apd1* 近傍には上流に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。また、*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。

以上の結果から、*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 がアルキル鎖の酸化過程に関与することを示している。

以上、本論文は、動物の生殖への影響が疑われる環境汚染物質アルキルフェノールの微生物分解について新たな知見と今後の研究への展望を与えるものであり、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認めた。