

## 論文の内容の要旨

農学国際 専攻  
平成 12 年度博士課程 進学  
氏名 山副 敦司  
指導教官 小柳津広志

### 論文題目 *Janibacter* 属細菌による芳香族化合物の分解に関する研究

多環芳香族化合物 (PAHs) は環境中で頻繁に検出される発がん性あるいは突然変異を誘発する潜在性をもつ汚染物質である。PAHs の環境中での動態は社会的関心を集めており、また、バイオレメディエーションによる環境浄化を効率よく行うためにこれら化合物の微生物分解に関する研究が精力的に行われている。

細菌による PAHs の好氣的分解代謝系においては、はじめにその化合物のベンゼン環に水酸基の形で酸素を添加する初発酸化反応が重要であり、その反応は大きく 2 つのタイプに分けられることが知られている。Naphthalene や phenanthrene の場合、二酸素原子添加酵素によりベンゼン環に対しシス型に 2 つの水酸基が導入され、ジヒドロジオール体へと変換される。このタイプの反応を lateral dioxygenation と呼ぶ (図 1-A)。一方で、dibenzo-*p*-dioxin や carbazole などのヘテロ原子を含む化合物の場合、分子内の酸素や窒素といったヘテロ原子が直接結合している芳香環上の炭素原子 (angular position) とそれに隣接する炭素原子に 2 つの水酸基が導入される。このタイプの二酸素原子添加反応を angular dioxygenation と呼ぶ (図 1-B)。これまでに単離された angular dioxygenation を触媒する菌は PAH 分解能力が高い事が知られている。しかし、lateral dioxygenation を触媒する分解菌に比べ angular dioxygenation を触媒する分解菌に関する報告は少ない。

近年、深刻な社会問題となっているダイオキシン類は、dibenzofuran (DF) 分解菌によって分解される事が報告されている。そこで本研究では DF をモデル化合物として angular dioxygenation を触媒する菌の単離を行い、その分解菌の PAHs 分解能力を研究することで環境浄化などの応用のための基礎的知見を得ることを目的とした。

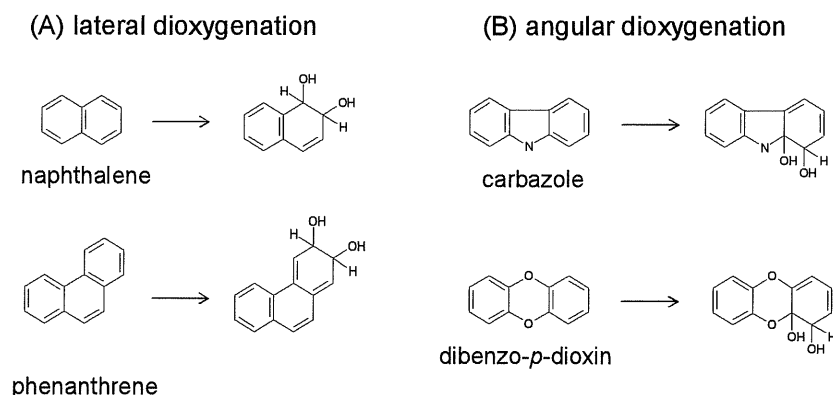


図 1 細菌による PAHs 初発酸化反応

### 1. dibenzofuran (DF) 分解菌の単離と同定

土壌を集積培養することにより、DF を唯一の炭素源として生育する YY-1 株を単離した。YY-1 株の 16S rDNA 配列を決定し BLAST による検索を行ったところ、放線菌の一種である、*Terrabacter* 属 *Janibacter* 属細菌に 96~97% の高い相同性を示した。これらの属に近縁種の基準株を用いて系統樹を作成したところ、YY-1 株は *Janibacter* 属細菌とクラスターを形成し、この属の菌である事が示唆された。確認のため *Janibacter* 属細菌の基準株をカルチャーコレクションより取り寄せ、YY-1 株と合わせて生理学的小および生化学的試験を行った。その結果、YY-1 株と *Janibacter* 属基準株に分類学的性質に多くの共通性が見られたので YY-1 株を *Janibacter* 属と同定した。

### 2. YY-1 株による DF の分解

DF を唯一の炭素源とした培地で YY-1 株を培養したところ、約 13 時間の倍加時間を示し、初期濃度 1g/L の DF を 96 時間で 94% 以上分解した。また、DF 分解中間代謝産物の同定を GC-MS を用いて行ったところ、中間代謝産物として 2,3,2'-trihydroxybiphenyl、dihydroxy-dihydrodibenzofuran などが検出された。これにもとづいて DF 分解の代謝経路を推定した(図 2)。YY-1 株による DF 分解では、(a) angular dioxygenation、(b) lateral dioxygenation の両方による経路が関与している事が明らかになった。また、代謝産物の量から angular dioxygenation による分解が主要な経路だと考えられた。

### 3. YY-1 株による PAHs および関連化合物の分解

YY-1 株の芳香族化合物資化性試験を行った。YY-1 株は DF、Fluorene を唯一の炭素源として、および Dibenzothiophene を唯一の炭素・硫黄源として生育した。次に休止菌体を用いて PAH 分解試験を行った。PAH(各 10mg/L) を加えた培地において 24 時間の休止菌体反応を行ったところ、YY-1 株はベンゼン環を 2,3 個含む化合物で 55~100%、ベンゼン環を 4 個含む化合物で 16~42% 分解した(図 3)。特に DF およびその類似構造化合物は非常によく分解された。YY-1 株によって最も分解されにくい化合物は Chrysene であった。GC-MS による Fluorene、Dibenzo-*p*-dioxin、Dibenzothiophene、Diphenyl ether の分解における中間代謝産物の同定を行った。その結果、いずれの化合物からも angular および lateral dioxygenation 経路だと考えられる代謝産物が検出され、さらに methylenic oxidation や sulfoxidation

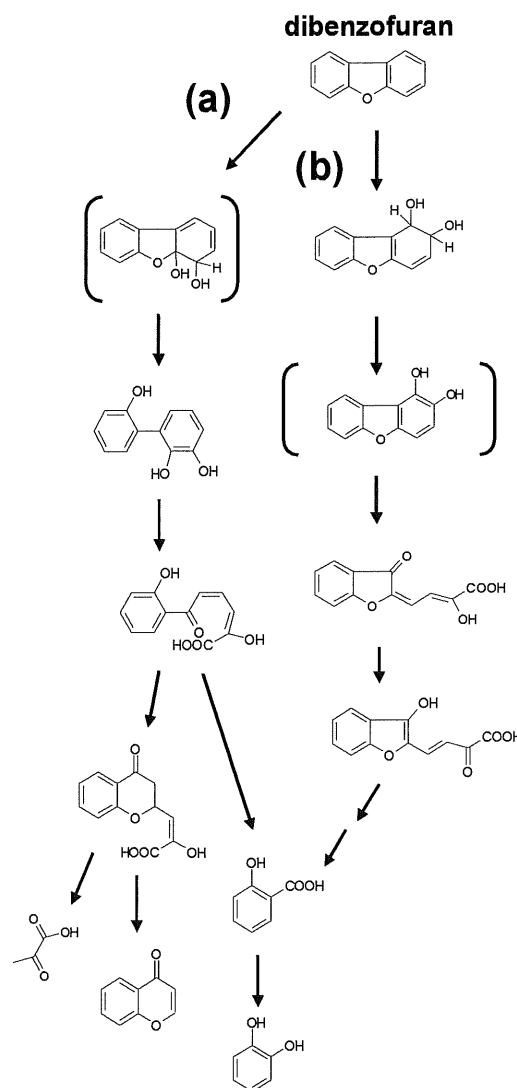


図 2 YY-1 株による DF 分解経路

などの monooxygenation 反応も触媒する事が分かった(図 4)。

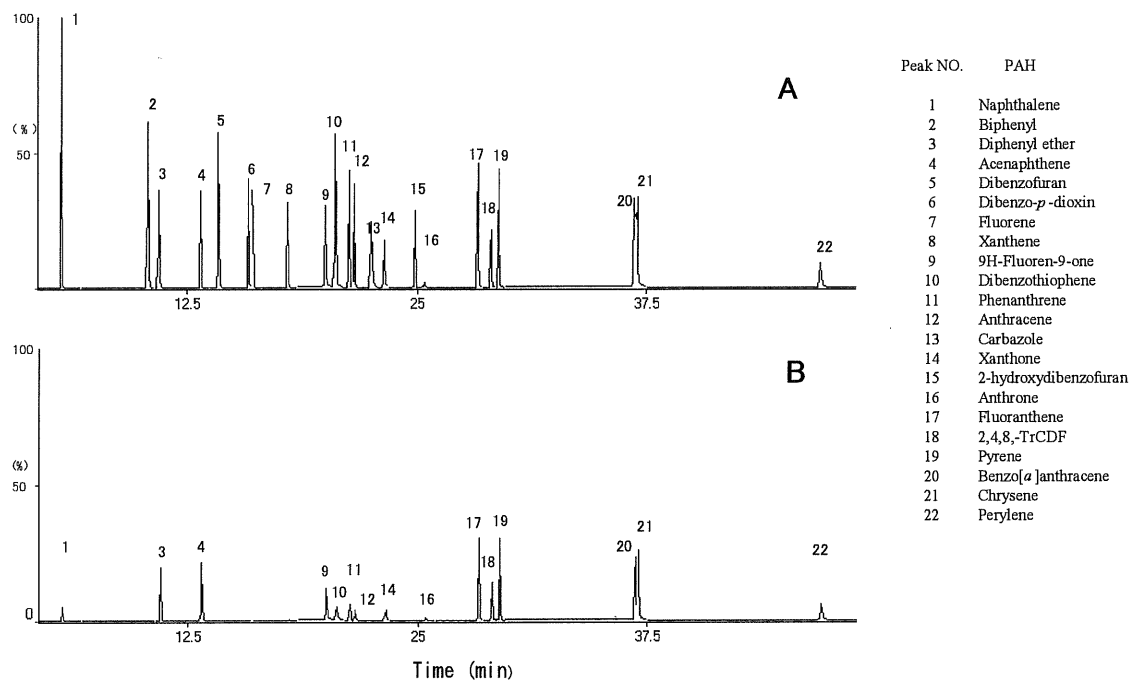


図 3 YY-1 株による PAHs の分解 A:コントロール(YY-1 熱失活 60°C、30 分)、B:YY-1 株

#### Methylenic oxidation



#### Sulfoxidation

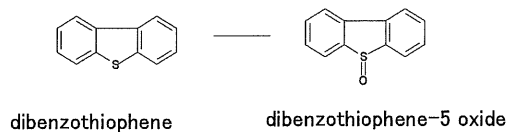


図 4 YY-1 株による monooxidation

#### 4. dibenzofuran 分解遺伝子 (DbfA) の単離

既知の dioxygenase large subunit 遺伝子の保存領域をもとに作成したプライマーを用い、YY-1 株の全 DNA を鋳型とし PCR を行ったところ、約 0.3kb の DNA 断片の増幅が確認された。得られた PCR 断片の塩基配列を決定したところ、*Terrabacter* sp. YK3 株および *Terrabacter* sp. DBF63 の angular dioxygenase にそれぞれ 99% の相同性を示す 2 種類の DF の分解に関与すると思われる配列を含んでいる事が確認された。また、これらの遺伝子は、YY-1 株と別の地点で単離された別の DF 分解菌とも高い相同性を示すことから、DF 分解菌に共通の dioxygenase が環境中で広範囲に分布している可能性が示唆された(図 5)。

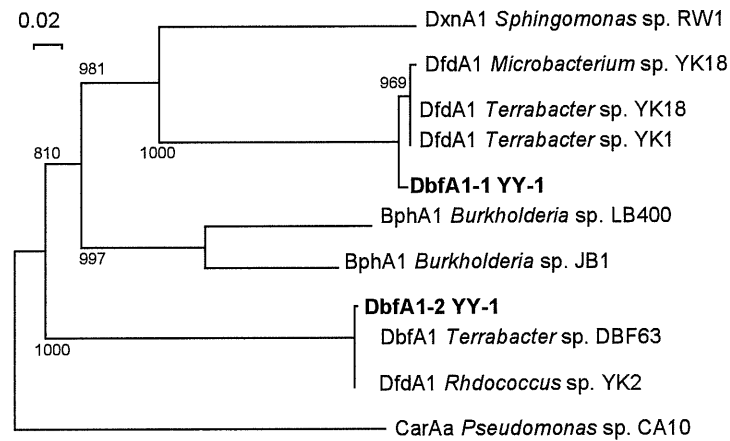


図5 DF分解菌の angular dioxygenase をコードする遺伝子の分子系統樹

#### まとめ

本研究では、DF をモデル化合物として集積培養をすることにより、土壌から *Janibacter* 属細菌 YY-1 株の単離に成功した。YY-1 株は、DF 以外にも Fluorene および Dibenzothiophene を唯一の炭素源として生育した。また、この菌株は芳香族化合物の分解において angular dioxygenation、lateral dioxygenation、methylenic oxidation、sulfoxidation などの多様な代謝経路を持ち合わせ、様々な化合物を分解できる事が明らかになった。YY-1 株のもつ広い基質特異性から環境浄化や有用物質生産などへの応用が期待される。

PCR によって DF 分解遺伝子の単離を行ったところ、これまでに DF 分解菌として報告のある *Terrabacter* 属、*Janibacter* 属細菌の angular dioxygenase と高い相同性を持つ2つの配列が YY-1 株から見つかった。異なる地域で単離された分解菌が共通の配列を保持していることは、共通のDF分解系遺伝子が環境中で水平伝達しているためだと考えられる。この共通の配列を用いることで環境中のDF分解菌のモニタリングが可能だと思われる。また、細菌の汚染土壌への適応・進化メカニズムが解明できれば、分解系遺伝子の水平伝達を利用した効率的な Bioremediation も可能だと考えられる。