

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山副 敦司

---

多環芳香族化合物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。これら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。細菌による多環芳香族化合物の好氣的分解代謝系は、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。このタイプの反応はlateral dioxygenationと呼ばれている。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はangular dioxygenationと呼ばれている。これまでに単離されたangular dioxygenation を触媒する菌は多環芳香族化合物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、汚染物質として深刻な社会問題を引き起こし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。この研究では上記の環境問題に対応するための基礎的知見を得るため、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、その分解菌の多環芳香族化合物分解能力を解明した。

序論に続く第二章では、土壌約500サンプルから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微生物を分離してYY-1株を得た。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、放線菌に近縁な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。

第三章ではYY-1株のDFの分解経路を解明した。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, dihydroxydihydrodibenzofuran 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。YY-1株によるDF分解では、(a) angular dioxygenation、(b) lateral dioxygenation の両方の経路が存在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。

第四章では、YY-1株による各種の多環芳香族化合物の分解特性を解明した。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分解試験を行った。多環芳香族化合物(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65%~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経由だと考えられる代謝産物が検出され、さらにmethylenic oxidationや sulfoxidationなどの monooxygenation反応も触媒する事が分かった。

第五章では、YY-1株のDF分解遺伝子(DbfA)の単離を行った。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が環境中に広範囲に分布している可能性が示唆された。

以上、本論文はダイオキシンのモデル化合物であるジベンゾフランの新規な分解細菌を分離して分解特性を解明したものであり、審査委員一同は学術上、応用上価値あるものと認め、博士(農学)の学位論文として十分な内容を含むものと認めた。