

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 内田 英二

Phytoremediation は、植物を利用して環境中から汚染物質を除く、或いはより害の少ない化合物に変換する環境汚染修復手法として注目されている。農薬や有機溶媒などの難分解性非生物成分(xenobiotics)による汚染の phytoremediation では、分解除去可能な汚染物質の種類が増加と共に、その効率の向上が重要であり、これらの問題を解決するために微生物由来の有用な xenobiotics 分解酵素遺伝子を組込んだ形質転換植物体の作出が試みられている。現在までに、植物細胞における外来タンパク質の細胞質、小胞体、アポプラスト等での発現が研究されており、小胞体発現で抗体が高発現した例やアポプラスト発現で外来タンパク質が植物体外へ分泌した例が知られている。この知見に基づくと、低水溶性の xenobiotics が分泌された分解酵素によって植物体外で分解されると予想され、アポプラスト発現が xenobiotics 汚染の phytoremediation に貢献するものと強く期待された。本論文では、植物細胞における局在的な発現方法を用いて、環境汚染物質分解植物体を作成し、その *in vivo* 及び水耕液中での xenobiotics 分解活性を実験室レベルで評価した。構成は五章からなる。

第一章では、xenobiotics による環境汚染の実態、phytoremediation や形質転換植物に関する研究等の最近までの知見をまとめ、本論文の研究の目的と意義を述べた。

第二章では、環境汚染物質分解植物のモデルケースとして、遺伝子発現も活性評価も容易で、2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHB)を分解可能な *Terrabacter* sp. DBF63 株由来のメタ開裂酵素 DbfB を、シロイヌナズナ細胞のアポプラスト、小胞体、細胞質で局在的に発現させた。2,3-DHB 分解による黄色生成反応を利用して葉の粗酵素抽出液中の DbfB 活性を評価したところ、アポプラスト、細胞質発現区で顕著な活性が検出され、xenobiotics 分解酵素発現の際における細胞内での発現場所の重要性が示された。アポプラスト発現区の粗酵素抽出液中の活性平均値は、細胞質発現区と比較して約半分に止まるものの、アポプラスト発現区の水耕液中の活性平均値は、細胞質発現区の 23.2 倍も高かったことから、xenobiotics 分解酵素がアポプラスト発現によって植物体外へ分泌された事が示された。更に無菌的に水耕栽培していたフラスコへ 2,3-DHB を投与し、水耕液中での 2,3-DHB 分解速度を評価したところ、細胞質発現区の微弱な発色に対して、アポプラスト発現区からはその 11.5 倍に及ぶ速い分解が示されたことから、アポプラスト発現が水溶性の低い xenobiotics による汚染の phytoremediation に有効な手法となる可能性が考えられた。

第三章では、アポプラスト発現による植物体外への xenobiotics 分解酵素の分泌系を phytoremediation へ応用する実証的研究の一つとして、1-クロロブタンに対して特に補因子を必要とせずに脱塩素化可能な *Rhodococcus* sp. m15-3 株由来のハロアルカンデハロゲ

ナーゼ DhaA をタバコ細胞のアポプラスト、細胞質で局在的に発現させた。アポプラスト発現区の葉の粗酵素抽出液中の活性平均値は、細胞質発現区の 13.0 %程度だったものの、アポプラスト発現区で最も活性が強かった line A4 の水耕液中の活性は、細胞質発現区で最も発現が強かった line C16 の 76.4 倍も有意に高かったことから、xenobiotics 分解酵素がアポプラスト発現によって植物体外へ分泌され、水耕液中でも xenobiotics 分解に関与している事が示された。また、水耕栽培しているフラスコへ 1-クロロブタンを加え、DhaA の作用によって生じた 1-ブタノールを GC-MS で経時的に定量した結果、反応初期においては line A4 でのみブタノールが検出されたが、反応 10 時間後では line C16 が line A4 を上回った。このことから、植物体に取り込まれやすい xenobiotics については細胞質発現も phytoremediation の有効な手法になる事が示された。さらに水耕液に 1-クロロブタンを加えて生育阻害実験を行ったところ、line A4 は line C16 や野生株に比べて 1-クロロブタンに対する顕著な耐性が観察されたことから、植物体外で毒性物質を分解できるように生育阻害を受けにくいと考えられるアポプラスト発現は、持続的な phytoremediation に適した手法である事が示された。

第四章では実証的研究として、ダイオキシン骨格構造を含む芳香環の分解に関与する *Pseudomonas resinovorans* CA10 株由来の CARD0 (三つの遺伝子産物 CarAaAcAd からなるマルチコンポーネント系)を、タバコ細胞のアポプラスト、細胞質で局在的に発現させた。三つの遺伝子を導入できたタバコの中で特に CarAa の発現量の高い 3 系統を用いてカルバゾールによる生育阻害実験を行った結果、ベクターコントロールの植物体に対して、CarAa を発現している全ての植物体で有意な生育阻害の緩和が観察され、タバコが CARD0 を発現してカルバゾールを分解した可能性が示唆された。

第五章では、全体の総括と今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、アポプラスト発現が水溶性の低い xenobiotics による汚染の phytoremediation に有効である可能性を示すと共に、細胞質発現が植物体に取り込まれやすい xenobiotics の phytoremediation に有効である事を実験室レベルの研究で明らかにしたもので、学術上ならびに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。