

	えん どう りょう
氏名（本籍地）	遠 藤 諒
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第100号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26 の γ -HCH 分解資化に関わる新規因子の解明
博士論文審査委員	（主査）教授 津 田 雅 孝 教授 草 野 友 延 教授 古 山 種 俊 助教授 永 田 裕 二 教授 伊 藤 義 文 （農学研究科）

論文内容の要旨

はじめに

Sphingobium japonicum UT26 は環境汚染物質の一つである有機塩素系農薬 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH)を好氣的条件下で唯一の炭素源・エネルギー源として分解資化するグラム陰性細菌である。本研究に先立ち、UT26 の γ -HCH 分解関与遺伝子群として5つの分解酵素構造遺伝子 *linA* から *linE* と、*linE* と *linD* の転写を制御する遺伝子 *linR* が単離・解析され、 γ -HCH は LinA から LinE の働きにより maleylacetate にまで変換されることが明らかになっていた(Fig. 1)。

γ -HCH のような難分解性の人為化合物を分解する細菌の分解能力は、一般に遺伝的に不安定であることが多く、菌の培養中に高頻度で分解能が欠失する例が知られている。また複雑な化合物の分解菌の多くは分解能・資化能が微弱であり、分解の効率が悪い。そのため実際にバイオレメディエーションに応用されている例は限られている。解決策としては他菌株への分解遺伝子群の導入を含めた高度分解菌の育種が考えられるが、単純に他菌株へ分解遺伝子を導入するだけでは分解能を安定に発現することはまれであり、直接の分解酵素構造遺伝子以外にも発現制御系や、基質の取り込み、酵素の局在、基質の細胞毒性の解毒など間接的に分解に関わる様々な因子が重要であると考えられる。しかし、このような点に着目した研究は分解酵素遺伝子の研究に比べてはるかに立ち遅れている。

これらのことを踏まえ、本研究では *S. japonicum* UT26 の細胞としての γ -HCH 分解代謝能を総合的に理解することを目的として、効率的トランスポゾン変異導入・解析系の確立と、変異株を用いた γ -HCH 分解に関わる新規因子の取得と解明を行った

第1章 トランスポゾンを用いた UT26 突然変異株の取得

第1章ではミニトランスポゾン *TnMod* を用いた UT26 の効率的変異導入・解析系を確立し、UT26 の γ -HCH 分解資化能に関する突然変異株を取得した。スクリーニングの結果、既知の *lin* 遺伝子以外の変異によって γ -HCH 資化能を欠損したと考えられる変異株が 11 株得られた。その中で *TnMod* 挿入が γ -HCH 資化能欠損と関わっていることが確認できた UT1023 と UT953 については第2章と第4章でそれぞれ詳細な解析を行った。

第2章 γ -HCH 下流代謝経路とその関連遺伝子群の解析

UT1023 の解析により、LinE の次のステップを触媒する maleylacetate reductase をコードする

遺伝子 *linF* を同定するとともに、 γ -HCH 下流代謝経路の成り立ちについても考察した。 γ -HCH は *LinA* から *LinE* によって maleylacetate にまで変換され、次に *LinF* によって β -keto adipate に変換される。さらに第 1 章で得られた他の変異株と 2006 年 11 月に解読された UT26 の全ゲノム塩基配列を解析した結果から、 β -keto adipate は UT26 中で、土壌細菌に広範に保持される β -keto adipate 代謝経路によって完全分解されると結論した (Fig. 1 and 2)。また、*linF* の上流逆向きに存在した *linE* ホモログ *linEb* は 2,6-dichlorohydroquinone (2,6-DCHQ) 分解酵素をコードしていることを明らかにし、*linF* と *linEb* は本来 2,6-DCHQ の分解代謝を担っていることが示唆された (Fig. 1)。

一方、PFGE 解析により *linF* のゲノム上の位置決定を行い、当研究室で並行して行われた他の *lin* 遺伝子群のマッピング情報と合わせ、UT26 の *lin* 遺伝子群は、3 つの主要なレプリコン (一番染色体、二番染色体、プラスミド pCHQ1) 上の 6 カ所の位置に分かれて局在していることが明らかとなった (Fig. 2)。UT26 の γ -HCH 代謝経路は、ゲノム内に散在する関連性の明確でない遺伝子、あるいは遺伝子群を複数組み合わせられて構築されていることが以前から示唆されていたが、そのことが明確に証明された。

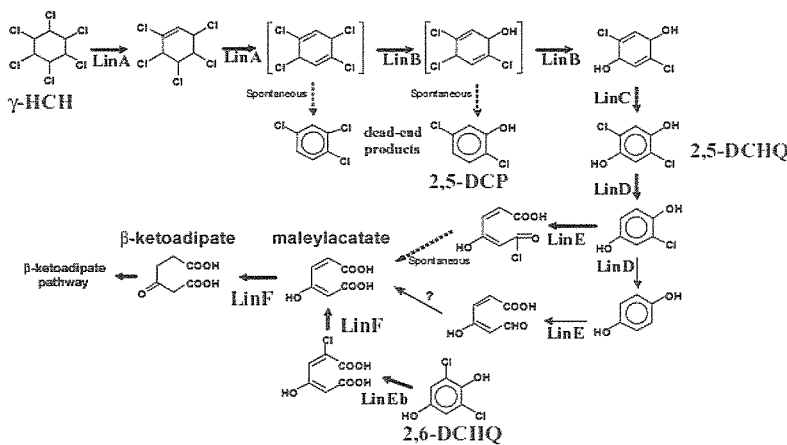


Fig. 1. UT26の γ -HCH代謝経路と2,6-DCHQ代謝経路

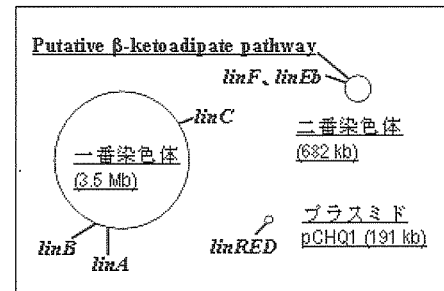


Fig. 2 UT26の γ -HCH分解酵素遺伝子群のゲノム内配置

第 3 章 γ -HCH 代謝産物による生育阻害効果

UT26 の γ -HCH 資化能を規定する要因の一つとして、 γ -HCH 及び代謝産物の生育阻害効果に着目し、栄養培地に γ -HCH を添加した場合の UT26 の増殖への影響を調べた。また、各分解酵素活性欠失のために各反応段階の γ -HCH 代謝産物を蓄積する変異株についても同様の解析を行い、各代謝産物が UT26 の生育に及ぼす影響について検討した。その結果、 γ -HCH そのものは UT26 に対し毒性を示さず、*LinB* による反応以降の代謝産物のうち、少なくとも 2,5-dichlorophenol (2,5-DCP) と 2,5-DCHQ が UT26 に対し毒性を示すことが明らかとなった。特に 2,5-DCP は、2,5-DCHQ より

も低濃度で毒性を示すことに加えて、分解されずに反応系中に残存することから、 γ -HCH 分解時の生育阻害の主たる原因物質は 2,5-DCP であると結論した。

第 4 章 UT26 の γ -HCH 資化に必要な ABC トランスポーター遺伝子 *linKLMN* の同定と解析

TnMod 挿入変異株 UT953 の解析から、UT26 が γ -HCH を単一炭素源として生育するために必要な新規因子として ABC トランスポーター遺伝子 *linKLMN* を同定し、その機能について解析した。*linKLMN* は ABC トランスポーターの膜コンポーネント、ATPase コンポーネント、機能未知のペリプラズムタンパク質とリポタンパク質をそれぞれコードすると推測され、既知の ABC トランスポーターと相同性の低いユニークな遺伝子群であった。遺伝子破壊株の解析から、*linKLMN* は UT26 の γ -HCH 代謝産物 2,5-DCP に対する耐性に必要であり (Fig. 3)、さらに有機溶剤耐性や疎水性蛍光プローブの細胞膜侵入抑制にも関わることを示された。また、*linKLMN* の破壊株は γ -HCH を野生株よりも速やかに分解するが、反面、毒性代謝産物の産生量が多くなることから (Fig. 4)、*linKLMN* は 2,5-DCP 耐性だけでなく、 γ -HCH 代謝バランスにも関与していると考えられた。

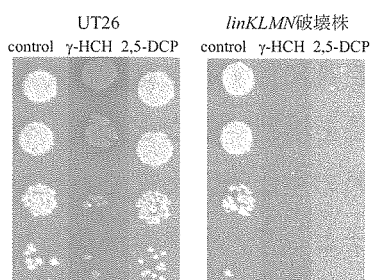


Fig. 3. *linKLMN*破壊株の γ -HCHと2,5-DCP存在下の生育
1/3 LB培地に γ -HCHと2,5-DCPを添加

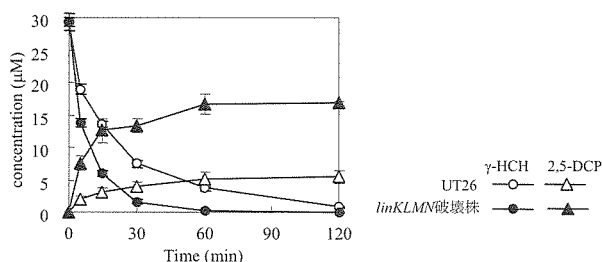


Fig. 4. UT26と*linKLMN*破壊株の γ -HCH分解量と2,5-DCP産生量の比較

まとめ

本研究を通して、UT26 の γ -HCH 代謝経路に特異的に必要な分解酵素遺伝子群については、完全に明らかになったと考えられる。さらに代謝産物 2,5-DCP が UT26 に毒性を示すことを明らかにし、その耐性に関わる ABC トランスポーター遺伝子 *linKLMN* を同定した。*linKLMN* のような間接的に代謝に関わる遺伝子は γ -HCH 代謝のみならず様々な疎水性化合物の代謝能に関わる可能性があり、高効率な環境汚染物質分解菌の育種への応用が期待される。本研究で得られた結果は、UT26 の γ -HCH 分解機構の解明に加え、実際のバイオレメディエーションに適した菌株の開発や、微生物が人為起源物質に適応し資化能を獲得する機構の解明に新たな知見を与えるものである。

論文審査結果の要旨

Sphingobium japonicum UT26 は環境汚染物質の一つである有機塩素系農薬 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) を好氣的条件下で唯一の炭素源・エネルギー源として分解資化するグラム陰性細菌である。本研究に先立ち、UT26 の γ -HCH 分解において γ -HCH は LinA から LinE の働きにより maleylacetate にまで変換されることが明らかになっていた。

γ -HCH のような難分解性の人為化合物を分解する細菌の分解能力には、(i) 分解酵素とその遺伝子、(ii) 基質の取り込み、酵素の局在、基質の細胞毒性の解毒など間接的に分解に関わる因子の双方が重要であると考えられるが、従来の研究は前者に偏っていた。本研究では、前者のみならず、後者にも注目して γ -HCH 分解資化に関わる新規因子の同定と解明を行ない、UT26 の細胞としての γ -HCH 分解代謝能を総合的に理解することを目的とした点に大きな特徴がある。

本研究では、まず UT26 の効率的トランスポゾン変異導入・解析系が確立され、変異株を用いた γ -HCH 分解に関わる新規因子の取得と解明が行われた。その結果、maleylacetate 以降の代謝に関わる遺伝子群が同定され、本研究以前に得られていた結果と合わせて γ -HCH 代謝経路の全貌が解明された。その結果をもとに、細菌が γ -HCH という特殊な化合物の分解能力をどのように獲得してきたかが考察され、細菌の特殊環境への適応機構を理解するための新たな知見が得られた。次に、UT26 が γ -HCH を代謝する際に観察される UT26 自身に対する生育阻害効果について解析が行われた。代謝系遺伝子の変異株を用いて阻害効果を検討するなどして、 γ -HCH 代謝系の dead-end 産物である 2,5-dichlorophenol が生育阻害効果の主な原因物質であることが明確に示された。さらに、UT26 の γ -HCH 分解資化に必須な因子として、新規の ABC トランスポーター相同遺伝子 *linKLMN* が同定された。LinKLMN はセットで機能し、細胞膜の疎水性物質の透過性のコントロールに効いていることが示唆された。本結果は、 γ -HCH のような難分解性の人為化合物の分解資化に直接の分解酵素遺伝子以外の因子が必須であることが明瞭に示された最初の例であり、当該分野で極めてインパクトの高い成果である。

以上、本研究結果は、これまでの分解酵素遺伝子のみにも焦点を絞った環境汚染物質分解細菌の研究とは明らかに一線を画すものであり、環境浄化のみならず、細胞工学への応用や、細菌の特殊環境への適応機構を考える上でも重要な知見である。従って、本研究の成果は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを明瞭に示しており、遠藤諒氏提出の論文を博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。