

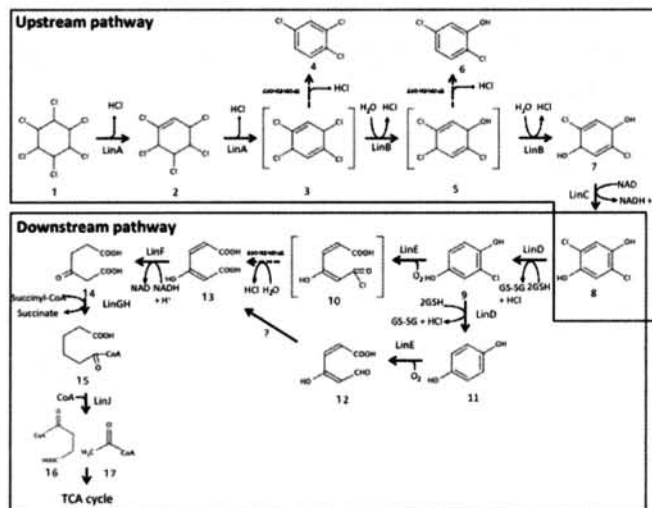
	たばた みちろう
氏名（本籍地）	田端 理朗
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第224号
学位授与年月日	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	有機塩素系殺虫剤分解能を担う細菌由来プラスミドの研究
博士論文審査委員	（主査） 准教授 永田 裕二 教授 津田 雅孝 教授 東谷 篤志 准教授 三井 久幸

背景

人間は利便性を追求する中でこれまでに様々な化学物質を大量に生産し使用してきた。これら化学物質は時には自然環境という開放系で大規模に使用され、様々な環境汚染を引き起こしてきた。その中で xenobiotics と称される非天然化学物質の多くは自然生態系の物質循環に取り込まれにくく、環境中に残留し蓄積されてきた。これら非天然化学物質の中にはヒトを含めた生態系に悪影響を与えるものが多く、地球規模での汚染が問題となっている。環境汚染物質の代表的なものとしてダイオキシン類 (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins) や PCB (polychlorinated biphenyl)、DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis[*p*-chloro-phenyl]ethane)、2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)、 γ -hexachlorocyclohexane (別名 BHC, lindane) 等の有機塩素系化合物が知られている。PCB や DDT、および本研究で対象としている有機塩素系殺虫剤 γ -HCH は現在 POPs 条約で製造や使用が禁止されている化合物であるが、これらの残留汚染は深刻である。現在でも α -HCH は安価であることから発展途上国の一部では未だ使用されている。

γ -HCH は、嫌気的条件下では微生物によって比較的分解されやすいが、好気的条件下では残留性が高いことが知られている。東京大学農学部の旧土壌学研究室では、農学部構内の試験圃場において 1974 年から毎年一回 γ -HCH を散布し、土壌での α -HCH の変動を追跡する実験が行われた。最初の 2 年間は γ -HCH の分解は観察されなかったが、3 年目より急激な分解が観察されるようになり、12 年目の土壌より集積培養と単コロニー分離を経て γ -HCH を唯一の炭素源として好気的環境下で生育する *Sphingobium japonicum* SS86 株が分離された。 α -HCH 分解機構の解析は、SS86 の派生株である UT26 株を用いて行われてきた。現在までに明らかにされている UT26 株の α -HCH 推定分解代謝経路を Fig. 1 に示す。本経路において α -HCH は、LinA(γ -HCH dehydrochlorinase)、LinB(1,4-TCDN halohydrolyase)、LinC(2,5-DDOL dehydrogenase)という 3 種類の酵素によって 2,5-DCHQ (2,5-dichlorohydroquinone) に変換され、LinD(2,5-DCHQ reductive dechlorinase)による脱塩素反応を経た後、LinE(CHQ 1,2-dioxygenase)によって環開裂される。その後、LinF (maleylacetate reductase) によって β -keto adipate へと変換される。

γ -HCH から β -keto adipate までの変換に関与する 6 つの酵素遺伝子(*linA*、*linB*、*linC*、*linD*、*linE*、*linF*)と 1 つの発現制御遺伝子(*linR*)がクローニングされ、さらに UT26 の全ゲノム配列が決定されたことで *lin* 遺伝子群の UT26 株ゲノム上での局在が明らかにされている。代謝経路の上流の反応を触媒する酵素遺伝子群 *linA*、*linB*、*linC* は主染色体上でオペロンを形成することなく構成的に発現しているのに対し、下流の反応を触媒する遺



1. γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH), 2. Pentachlorocyclohexene (γ -PCCH), 3. 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene (1,4-TCDN)
 4. 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB), 5. 2,4,5-trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol (2,4,5-DNOL), 6. 2,5-dichlorophenol (2,5-DCP)
 7. 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol (2,5-DDOL), 8. 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ), 9. Chlorohydroquinone (CHQ)
 11. Hydroquinone (HQ), 10. Acylchloride, 12. γ -hydroxymuconic semialdehyde (γ -HMSA), 13. Maleylacetate, 14. β -ketoadipate
 Fig. 1 UT26における γ -HCHの推定分解代謝経路

伝子群 *linD* と *linE* はオペロンとしてプラスミド pCHQ1 上に存在し、LinR により発現制御を受けている。また、*linF* は二番染色体上に存在する。これまでの研究で γ -HCH 分解細菌が世界各地で取得されており、インドで単離された *S. indicum* B90A 株やフランスで単離された *S. francense* Sp+ 株でいずれも UT26 株と相同性の高い *lin* 遺伝子群を保持していることが明らかにされてきた。これらの細菌のうち *S. francense* Sp+ 株は 32 kb から 543 kb の 6 つのプラスミドを有し、*linA*、*linB*、*linC* が異なる 3 つのプラスミド上に存在していることが報告され、プラスミドを介した水平伝播が γ -HCH 分解能の獲得に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

1.MM-1 株の純粋分離とその性質

インドの研究グループは高濃度 HCH 汚染インド土壌から γ -HCH 分解能を有する細菌として *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5 株を取得し、この株が *linA*、*linB*、*linC*、*linD*、*linE*、*linR* を有すること、 γ -HCH を含まない栄養培地では *lin* 遺伝子群が欠失することを報告していた。しかし、これまでに詳細な解析がなされている γ -HCH 分解能を有する細菌は α -プロテオバクテリアである *Sphingomonas* 属細菌のみであり、 γ -プロテオバクテリアに属する *Pseudomonas* 属細菌では ITRC-5 株以外に報告例がない。そこで本菌株は純粋分離が不十分で *P. aeruginosa* ITRC-5 株以外に α -HCH 分解能を担う別細菌種が共存している可能性を考え、再度 γ -HCH 分解能を有する細菌株の純粋分離を試みた。 α -HCH と yeast extract を含む無機液体培地で一週間培養後、同様の培地に植えつぎ、さらに一週間培養した。この培養液を希釈して 1/3LB 寒天培地に撒くことで、 α -HCH 分解能

を有する株と有さない株を取得した。16SrRNA 遺伝子解析の結果から各々の株は *Sphingomonas* 属細菌と *P.aeruginosa* であることが明らかになった。前者株を *Sphingomonassp.* MM-1 株と命名した。

2.MM-1 株における *lin* 遺伝子群の局在の解析及び配列解析

Sphingomonassp. MM-1 株は4つのプラスミド pISP1 (約 200 kb)、pISP2(約 50 kb)、pISP3 (約 40 kb)、pISP4 (約 30 kb) を有し、サザン解析の結果から pISP1 上に *linA*、*linC*、*linF*、pISP3 上に *linD*、*linE*、*linR*、pISP4 上に *linB*、*linC*、*linF* を有していることを明らかにした (Fig. 2)。この結果からこれらプラスミドを介した水平伝播によって *lin* 遺伝子群が環境中で拡散していることが予想される。また挿入配列 IS(Integration Sequence) や ICE (Integrated and Conjugative Element)、トランスポゾンなどが細菌の新規遺伝子の獲得に関連していることが予想されており、UT26 株や B90A 株においても *lin* 遺伝子群近傍領域において IS6 ファミリーに属する IS6100 が高頻度で見出されている。MM-1 株のプラスミドに対するサザン解析の結果から、4つのプラスミドすべてにおいて IS6100 が見出され (Fig. 2)、IS6100 がゲノムの再編成と *lin* 遺伝子群の獲得に関連性があることが予想された。

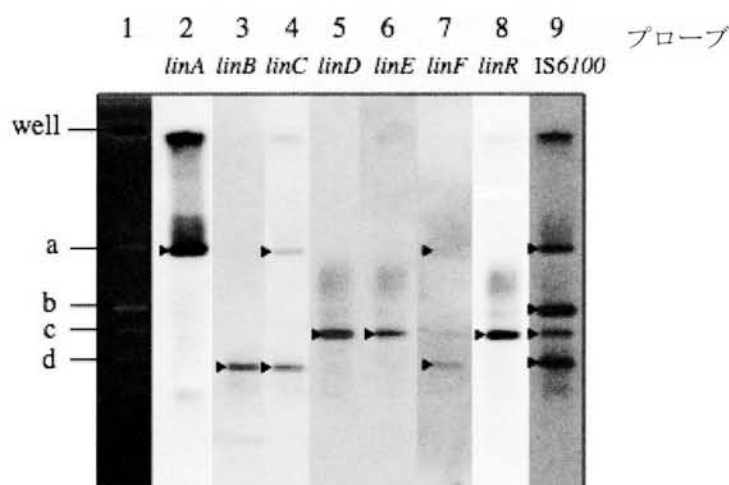


Fig. 2 MM-1 株のプラスミドに対する *lin* 遺伝子群および IS6100

をプローブとしたサザン解析

a, b, c, d はそれぞれ pISP1, pISP2, pISP3, pISP4 のバンドを示す。

3. MM-1 株が保持するプラスミドの塩基配列解析

MM-1 株から Kado 法によって total プラスミドを抽出し、ショットガンシーケンスに供するとともに、コスミドライブラリーを構築した。また、MM-1 株の全ゲノム DNA を 454 シーケンス及びイルミナ解析に供した。プラスミド配列は Codon code aligner を用いて解析し、ゲノム配列は Newbler を用いて解析した。これらにコスミドライブラリーを用いたシーケンス結果を合わせることで、pISP2 (53,841 bp)、pISP3 (44,405 bp)、pISP4 (33,183 bp) の全塩基配列を決定した。これらの配列に対して当研究室で作製された配列解析支援プログラム GenomeMatcher を用いて ORF 抽出および、アノテーションを行った。pISP3 が保持する *linRED* は UT26 が保持する *linRED* オペロンと塩基配列レベルで 99% の相同性を示し、MM-1 株の *linD* と *linE* は UT26 の場合と同様に *linR* による発現調節を受けていると予想された。また *linA*、*linB*、*linC*、*linD*、*linF* のいずれの近傍領域からも挿入配列 IS6100 が見出された。以上のことから MM-1 株が保持する γ -HCH 分解プラスミドの特徴の一端を明らかにするとともに、*lin* 遺伝子群と IS6100 に密接な近隣関係があることを再確認した。

4. ミニレプリコンの作製と安定性

pISP1 と pISP3、pISP4 のアノテーションにおいて複製分配に関与する領域を検討したところ、pISP1 は *repABC* family に特徴的な複製維持装置を有していたが、pISP3 と pISP4 では pISP1 と異なり典型的な分配遺伝子である *repB* ホモログは検出できなかった。各々のミニレプリコンは MM-1 株と近縁種の UT26 株で保持されたが、 β -プロテオバクテリアや γ -プロテオバクテリアでは保持されなかった。また、UT26 株にそれぞれのミニレプリコンを保持させて非選択条件で経代培養を行いプラスミドの安定性を検討したところ、ミニ pISP1 は安定であるがミニ pISP3 とミニ pISP4 は不安定であることが示された。

MM-1 株が保持する γ -HCH 分解関連プラスミドが類縁性の高い UT26 株で保持されたことから、*Sphingomonas* 類縁菌の間でのプラスミドの水平伝播と、それに続くプラスミドやゲノムの再編成が *lin* 遺伝子群の獲得に寄与していると考えられた。また 5 つのレプリコンを有する UT26 株にさらに MM-1 株由来の上記ミニレプリコンを導入した。ミニ pISP3 導入時に限って UT26 株保有の pUT1 が脱落した可能性があるものの、ミニプラスミドは維持された。このことは *Sphingomonas* 類縁菌が多数のレプリコンを同時に保持できることを示している。

以上、本研究では、MM-1 株が有する *lin* 遺伝子群がすべてプラスミド上に存在すること、またこれら *lin* 遺伝子群の近傍に IS6100 が存在していることから IS とプラスミドという 2 つの因子が *Sphingomonas* 属細菌の γ -HCH 分解能獲得機構に大きく寄与していると結論付けた。*Sphingomonas* 類縁菌群は比較的ゲノムサイズが小さい (4.5Mb 程度) にもかかわらず、それぞれがスペシャリストとして極めて多彩な能力を有することから、遺伝子交換を活発に行っていると推定されている。人工化合物である γ -HCH 分解という特殊能力の獲得に多重プラスミドと IS が関与していることを明確に示した本研究は、細菌の環境適応戦略機構に新たな知

見を加えるものである。

論文審査結果の要旨

近年様々な人工化合物を分解可能な *Sphingomonas* 類縁菌が見出され、これらの株の多くで分解関連遺伝子がプラスミド上に存在していることが報告されている。一方で、これまでに *Sphingomonas* 類縁菌が有するプラスミドの詳細な解析は行われておらず、複製・分配・維持に関する機能解析が行われた例はない。博士論文は難分解性有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) を分解資化可能な *Sphingomonas* sp. MM-1 株を対象に、分解関連プラスミドの分子遺伝学的解析を行った。本研究は、MM-1 株がプラスミドを 4 つ保持し、そのうちの 3 つに γ -HCH の完全分解に必要な *linA* から *linF* のすべての *lin* 遺伝子群が存在することを明らかにした。また、ショットガンシーケンスやコスミドシーケンスから 3 つのプラスミドについて全配列を決定し、*lin* 遺伝子群の近傍に挿入配列 IS6100 が存在すること、*lin* 遺伝子群とその近傍配列が既知の γ -HCH 分解細菌の *lin* 遺伝子群とその近傍配列と高い相同性を有していることを明らかにした。さらに、*lin* 遺伝子を有さないプラスミドの複製・分配装置が γ -HCH 分解細菌 *S. japonicum* UT26 株が保持するプラスミド pUT1 の複製・分配装置と同一であること、この機能領域が IS6100 に挟まれる形で存在していることを明らかにした。これらの知見から、本論文は MM-1 株が有するプラスミドが *Sphingomonas* 類縁菌由来のレプリコンの組換えや融合によって構成された可能性があること、この過程に IS6100 が重要な役割を果たしていることを指摘した。本研究成果は人工化合物である γ -HCH 分解という特殊能力の獲得に多重プラスミドと IS が関与していることを明示し、細菌の環境適応戦略機構に新たな知見を加えるものである。以上の内容は、田端理朗君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示している。したがって、田端理朗君の提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認められる。