Osaka University Knowledge Archive

Title	極低酸素濃度環境下における多環式芳香族化合物分解細菌　Xanthobacter polyaromaticivorans 127W株の単離及び特性解析
Author(s)	平野, 伸一
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48484
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【14】

氏　　名	平　野　伸　一（ひら の しん いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　２１１２５　号
学位授与年月日	平成 19 年３月 23 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科物質・生命工学専攻
学　位　論　文　名	**極低酸素濃度環境下における多環式芳香族化合物分解細菌 *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W 株の単離及び特性解析**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金谷　茂則 （副査） 教　授　大竹　久夫　　教　授　菊地　和也　　教　授　福住　俊一 教　授　宮田　幹二　　教　授　高井　義造　　教　授　伊東　一良 教　授　渡部　平司　　教　授　兼松　泰男

論　文　内　容　の　要　旨

近年、多環式及び複素環式芳香族化合物類（PAH、HAC）による環境汚染が深刻な問題となっている。そこでこれらの浄化に向けた効率的なバイオレメディエーションプロセスを構築するため、低酸素濃度条件下においても高いPAH、HAC 分解活性を示す微生物の探索及び解析を行った。

まず、石油備蓄タンク中のスラッジを単離源としてジベンゾチオフェン（DBT）を分解する微生物 127W 株を単離した。127W 株は好気条件下だけでなく非常に酸素濃度の低い ELO（DO＜0.2 ppm）条件下でも広範囲の PAH、HAC を分解することが可能であった。好気条件下と ELO 条件下で 127W 株は異なる分解経路を持ち、ELO 条件下では嫌気的な分解経路を持つ可能性が示唆された。16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統学的な解析及び生理学的試験の結果から 127W 株を新種微生物と同定し、*Xanthobacter polyaromaticivorans* と提案した。

次に、127W 株より ELO 条件下で PAH、HAC 分解活性を担う酵素の精製及びその遺伝子配列の取得を試み、芳香族化合物分解の初発酸化酵素であるジオキシゲナーゼを含む 6.4 kb の遺伝子配列を取得した。このジオキシゲナーゼは PAH、HAC 分解活性を持つが、その配列は単環式芳香族化合物を基質とするジオキシゲナーゼと高い相同性を示したため、水平移動により取得した遺伝子を基質にあわせ進化させた可能性が推定された。また 127W 株のジオキシゲナーゼ遺伝子破壊株を作成することにより、このジオキシゲナーゼが好気条件下だけでなく、ELO 条件下においても 127W 株の PAH、HAC 分解における重要な役割を果たしていることを明らかにした。

さらに、127W 株の持つ酸化酵素の酸素に対する親和性を含む特性解析を行った。127W 由来 gentisate 1,2-dioxygenase（GDO）の酸素に対する親和性は、既報の GDO の値と比べ４－５倍高い値を示していた。嫌気的な分解経路を持つだけでなく、127W 株はこのような酸素親和性の高い分解酵素を持つことで低酸素濃度条件下での PAH 分解活性を達成していると推定される。

また、GDO の活性に必要である Fe^{2+} が構造形成にも必要であることをはじめて明らかにし、バイオレメディエーションに向けた酵素の機能改変に対して有益な知見を与えた。

論文審査の結果の要旨

本研究はバイオレメディエーションに有効な微生物の単離を行い、その代謝機構を解明した点で意義深い。第一章では、多様な PAH、HAC を好気条件下だけでなく極低酸素濃度条件下においても分解可能である微生物（127W 株）の単離を行い、諸特性を明らかにし新種として提案している。さらに 127W 株の PAH、HAC 分解特性及びその代謝経路を明らかにしている。既報の PAH、HAC 分解微生物とは異なり、極低酸素濃度を含む広範囲の酸素濃度条件に対応可能である新種 PAH、HAC 分解微生物を取得したことはバイオレメディエーションにとって非常に意義のある結果であるといえる。第二章では、低酸素濃度条件下での PAH 分解に関与する酵素を精製、取得し、それをコードする遺伝子領域を決定し、terminal dioxygenase であると同定している。さらに 127W 株ゲノム上の本遺伝子を破壊することにより通常好気条件下で機能する terminal dioxygenase の極低酸素濃度条件下での PAH、HAC 分解への寄与を明らかにしている。本結果は酸素を利用する酵素が極低酸素条件下での分解活性に寄与することを示唆しており非常に興味深い。また本酵素のアミノ酸配列は PAH、HAC を基質とする dioxygenase と相同性を持たず、配列と機能間に相違がある。この結果は基質認識機構の理解に対して考察の機会を与えるとともに、127W 株が進化の過程で PAH、HAC 分解能力をどのように取得したかという疑問に対しても意義深い知見を与えている。第三章では、127W 株の PAH、HAC 代謝経路中の gentisate 1,2-dioxygenase（GDO）の特性解析を行い、GDO が他種微生物由来 GDO よりも酸素に対して高い親和性を有していることを明らかにしている。他種微生物由来 GDO と 127W 株由来 GDO とのアミノ酸配列の比較により酸素親和性を決定しているアミノ酸残基の抽出が可能であり、今後この情報を生かした酵素機能改変が期待される。第一章から三章の結果を統合し、127W 株は酸素親和性の高い分解酵素を持つことに加えて、嫌気的な代謝経路を有することで極低酸素濃度条件での高い PAH、HAC 分解活性を維持していると推定される。この特性に基づき 127W 株が、今後効率的なバイオレメディエーションプロセス構築に利用されることが期待される。 本研究ではさらに第四章において GDO の構造形成機構に知見を与えている。 この酵素の高次構造形成に Fe^{2+} の結合が必要であることを GDO においてはじめて明らかにしている。高次構造が形成されることで基質結合能を発現すること及び、その高次構造形成に寄与するタンパク質領域を明らかにしたことは結晶構造解析が終了していない本酵素において今後機能改変を行っていく上で非常に意義のある知見である。

以上のように、本論文はバイオレメディエーションに有効である新規 PAH、HAC 分解微生物を単離し、その諸特性、代謝機構を解析したものである。

よって、本論文は博士論文として価値のあるものと認める。