

論文内容の要旨

氏名 今井俊輔

近年、天然ゴムはタンパク質を高度に除去する技術が開発され、ナフサなどの化石資源に替わる新たなポリマー原料・有機材料としての用途が広がろうとしている。そうした現況から天然ゴム製品リサイクルシステムの構築に向けた天然ゴムポリマーの低分子化、再資源化処理技術の開発が望まれている。また、微生物の分解酵素を修飾酵素として用いることで、水酸基などの官能基を備えた新規ポリマー原料の開発が期待できる。これまでに天然ゴム分解菌は *Streptomyces* 属細菌を中心としたグラム陽性菌が多く、グラム陰性菌では唯一 *Xanthomonas* sp. 35Y 株が単離されている。天然ゴムの基本構造である poly(*cis*-1,4-isoprene) の分解酵素遺伝子については、*Streptomyces* sp. K30 株と 35Y 株からそれぞれ単離された *lcp* (latex clearing protein) 及び *roxA* (rubber oxygenase) が報告されているに過ぎない。本研究では、天然ゴムのリサイクルシステムの構築と新規ポリマー原料の創成を目指し、新たな天然ゴム分解菌の取得とその天然ゴム分解機構の解明を目的とした。

第1章では日本各地の土壌から天然ゴム分解菌のスクリーニングを行った。天然ゴム寒天培地上で菌周辺に天然ゴムの分解に起因するクリアーゾーンの生成を指標に3株を単離し、Gel permeation chromatography によって poly(*cis*-1,4-isoprene) 分解能を確認した。16S rRNA 部分塩基配列の相同性から3株を *Streptomyces* sp. LCIC4、*Actinoplanes* sp. OR16、*Rhizobacter* sp. NS21 株と同定・命名した。NS21 株は 35Y 株に続く天然ゴム分解グラム陰性菌となった。また、NS21 株でのみ天然ゴム寒天培地上でアルデヒドの蓄積が観察され、NS21 株ではアルデヒド以降の中間代謝産物の分解が律速になっていることが示唆された。

第2章では LCIC4 株のゴム分解酵素遺伝子について解析を行った。LCIC4 株において *lcp* 遺伝子の縮重プライマーを用いた PCR とコロニーハイブリダイゼーション解析によって K30 株の *lcp* とアミノ酸レベルで 99.3% の相同性をもつ *lcp* ホモログ遺伝子を単離した。また、LCIC4 株由来 *lcp* プローブを用いて OR16 株と NS21 株の全 DNA の制限酵素消化物に対してサザンハイブリダイゼーション解析を行った結果、OR16 株で *lcp* ホモログ遺伝子が存在することが示唆された。

第3章では NS21 株のゴム分解酵素遺伝子について解析を行った。トランスポゾン Tn5 の挿入変異によって天然ゴム寒天培地上でクリアーゾーン形成能を失い、アルデヒドを蓄積しない変異株を取得し、35Y 株の *roxA* とアミノ酸レベルで 36.4% の相同性を示す遺伝子への Tn5 の挿入を確認した。本遺伝子が NS21 株の天然ゴム分解酵素遺伝子であると予想し、*latA* と命名した。新たに *latA* 欠失破壊株を構築したところ、天然ゴム寒天培地上でのクリアーゾーン形成能とアルデヒド蓄積能が失われていた。天然ゴム非分解性の *Comamonas testosteroni* IAM 1152 及び *Methylibium petroleiphilum* PM1 を宿主に用いた *latA* の異種宿主発現では天然ゴム寒天培地上でアルデヒドの蓄積が観察された。また、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) 解析の結果、NS21 株の *latA* の転写量が天然ゴム存在下で約4倍上昇することが示された。以上の結果から、*latA* は天然ゴム寒天培地上における NS21 株のクリアーゾーン形成とアルデヒドの蓄積に直接関与しており、天然ゴム特異的に転写誘導されること

が明らかとなった。

第4章ではNS21株のより詳細な系統学的解析を行った。gyrase β -subunit をコードする *gyrB* 塩基配列の比較解析と *Rhizobacter* 基準株との DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析の結果、NS21株が *Rhizobacter* 属の新種であることが示唆された。さらに形態学的、生化学的特徴を明らかにし、NS21株を基準株とした *Rhizobacter* 属の種名を *Rhizobacter gummiphilus* と定義して提案した。

以上、本研究において新規の天然ゴム分解グラム陰性菌であるNS21株から新たに天然ゴム分解酵素遺伝子 *latA* を見だし、その機能を明らかにした。*latA* は天然ゴムの分解システムにおいて重要な役割を担っていることは明白であり、さらに *latA* 産物の反応産物やメカニズムを明らかにすることで、天然ゴムリサイクルシステムの構築と新規ポリマー原料の創成に寄与する成果が得られると期待される。