

論文内容の要旨

氏名 Nguyen Thi Phuong Anh

1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT)は1942年から世界各地で広く使用された殺虫剤である。しかし、DDTは難分解性で、食物連鎖を通じた生物濃縮によるヒト、野生動物への悪影響が指摘され、1970年代に多くの国で製造・販売・使用が原則禁止された。一方、自然環境中におけるDDTの主な分解産物である1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE)もまた難分解性であり、生体への悪影響が示唆されている。こうした背景から、DDT及びDDE汚染の浄化に向けた研究が行われており、中でも汚染現場を直接浄化する原位置浄化が可能な微生物を利用した浄化法が期待されている。

当研究室では、DDT完全分解酵素系の開発を目指して研究を行い、これまでに、*Sphingobium japonicum* UT26株の γ -HCH初発脱塩化水素酵素LinAによるDDTのDDEへの変換に成功している。本研究では、DDEの分解システムの構築を目指し、DDE分解菌の単離とそのDDE分解酵素系の解析を目的とした。

第1章では、DDE汚染土壌からDDEと構造が類似するビフェニルの生育能を指標にDDE分解菌*Janibacter* sp. TYM3221株を単離し、DDE分解産物を同定した。TYM3221株ではビフェニル非存在下でも強いDDE分解が観察され、DDE分解酵素は構成的に発現しており、ビフェニル存在下で発現量が上昇することが示唆された。GC-MS解析を用いてDDE分解産物を同定した結果、DDEは2,3-位及び3,4-位が水酸化され、3-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)vinyl]-6-chlorocyclohexa-3,5-diene-1,2-diol (3DCDD)及び4-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)vinyl]-1-chlorocyclohexa-3,5-diene-1,2-diol (4DCDD)を経て3-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)vinyl]-6-chlorobenzene-1,2-diol (3DCBD)及び4-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)vinyl]benzene-1,2-diol (4DBD)へと変換されると推定された。更に3DCBDは芳香環開裂を受け、生じる3,8,8-trichloro-7-(4-chlorophenyl)-2-hydroxy-6-oxoocta-2,4,7-trienoic acid (TCOA)が加水分解されて3,3-dichloro-2-(4-chlorophenyl)prop-2-enoic acidへと変換された後、2-(4-chlorophenyl)acetic acid及び4-chlorobenzoic acidへと分解される経路が推定された。

第2章では、DDE分解に関与すると推定される*orf2bphDbphAaAbAcAdBCST*遺伝子群の構造と機能及び転写制御を明らかにした。相同性検索から、*orf2*がenoyl-CoA hydrataseをコードしており、*bphD*から*bphC*までの遺伝子がそれぞれビフェニル分解系酵素を、そして*bphST*が2成分制御システムのsensor kinase及びresponse regulatorをそれぞれコードするビフェニル分解遺伝子群と推定された。Reverse transcription (RT)-PCR解析から、*orf2bphDbphAaAbAcAdBCST*は一つの転写単位を形成することが示された。またReal-time RT-PCR解析より、ビフェニル誘導性のプロモーター*orf2p*と構成的なプロモーター*bphAap*が存在することが示唆された。*Rhodococcus erythropolis* IAM1399株を宿主とし、リポータープラスミドを用いたプロモーターアッセイの結果、*orf2p*及び*bphAap*からの転写はBphSTにより制御され、構成的発現レベルが高いことが示唆された。一方、TYM3221株のBphSと*Rhodococcus jostii* RHA1株のBphS1T1を組み合わせた解析から、TYM3221株における*bph*遺伝子群の高い構成的発現は、TYM3221株のBphSに由来することが示唆された。

次に、DDE分解における*bph*遺伝子群の関与を明らかにするために、*bphAa*破壊株の作製及び

bphAaAbAcAdBCD の活性の解析を行った。*bphAa* 破壊株はビフェニル生育能及び DDE 分解活性を失ったことから、*bphAa* がビフェニル生育能と DDE の分解に関与することが明らかになった。IAM1399 株で *bphAaAbAcAd*, *bphB*, *bphC* 及び *bphD* を発現させた結果、*bphAa-Ad* 産物は DDE の 2,3-位及び 3,4-位の水酸化反応を担い、*bphB* 産物は 2,3-位及び 3,4-位の水酸化で生じる 3DCDD 及び 4DCDD をそれぞれ 3DCBD 及び 4DBD へと変換することが示唆された。*bphC* 産物は 3DCBD のメタ開裂に関与することが示唆され、*bphAa* 破壊株の結果と併せて TYM3221 株において、*bphAaAbAcAdbphBbphC* が DDE 分解に関与することが明らかになった。

以上、本研究では DDE 分解菌 *Janibacter* sp. TYM3221 株を新たに単離し、その DDE 分解経路と DDE 分解酵素遺伝子の機能及び転写制御を明らかにした。DDE 分解酵素遺伝子の単離、解析は本研究が初めてであり、本研究で得られた成果は、DDT 及び DDE の汚染浄化に有効な分解菌の開発に大いに資するものである。今後、DDE の下流代謝に関与する酵素遺伝子群を明らかにすることで、DDT 及び DDE の完全分解システムを開発できると期待される。