

論文の内容の要旨

氏名 飯野藤樹

微生物を用いた環境浄化法であるバイオレメディエーション技術は低コストで利用でき、汚染現場での原位置浄化が可能な技術として注目され、環境汚染物質を分解する能力を持つ微生物の分解酵素系の研究や浄化菌の開発が進められている。*Rhodococcus jostii* RHA1 株は 1-8 塩素置換された PCB をビフェニルとの共代謝によって分解することができ、PCB 汚染環境のバイオレメディエーションの適用に有用な細菌として期待されている。また RHA1 株は、多様な芳香族化合物を分解できる細菌としても知られている。RHA1 株は PCB 分解酵素系やその遺伝子の解析が進み、多くの知見が蓄積されているが、実験室内で得られた知見がそのまま環境中で通用するとは限らない。PCB の原位置浄化を想定すると、RHA1 株において土壌などの環境に対応して働く遺伝子の機能は、実汚染環境での浄化で最大限の分解能力を発揮させるために重要な要素となる可能性がある。特定の環境における細菌の生存に重要な遺伝子を特定するのに有効な手段として、signature-tagged mutagenesis (STM) や *in vivo* expression technology (IVET)、DNA microarray (DNA アレイ) が知られている。本研究では、土壌中における RHA1 株の生存に重要な遺伝子を明らかにすることを目的とし、DNA アレイを用いて土壌環境で特異的に発現上昇する RHA1 株の遺伝子を特定し、その遺伝子機能の解析を行った。

第 1 章では、DNA アレイを用いて 165 の土壌特異的に発現上昇する遺伝子を特定した。165 の遺伝子には、Clusters of orthologous groups (COG) において“Metabolism” と分類された 74 遺伝子が含まれており、その中には脂肪酸やアミノ酸、窒素の利用に関与すると推測される遺伝子クラスターが含まれていた。この結果は、土壌中での生存に炭素源以外の様々な基質の利用が重要であることを想像させた。特に窒素の代謝利用に関与すると予想される遺伝子の発現上昇比が高く、使用した土壌中で窒素の代謝利用が重要な要素の一つであったと推察された。

第 2 章では、土壌特異的に発現上昇した窒素の代謝利用に関与すると予想された ro06366: nitrite reductase と、この遺伝子を含む遺伝子クラスター ro06365-ro06368 の機能を明らかにした。ro06366 とそのホモログ遺伝子である ro00862 においては、遺伝子破壊株の解析からこの 2 遺伝子のみが硝酸塩と亜硝酸塩の両方の利用に関与する事が明らかになった。また硝酸塩及び亜硝酸塩の輸送に関与すると予想された ro06365: nitrate/nitrite transporter (*narK*) では、*narK* が RHA1 株の硝酸塩利用に必須の遺伝子であり、亜硝酸塩の利用にも部分的に関与することが明らかとなった。近縁の *S. coelicolor* や *C. glutamicum*、*M. tuberculosis* の硝酸還元は *narGHJI* が担っているが、*narGHJI* を持たない RHA1 株の硝酸塩・亜硝酸塩の利用システムはユニークなシステムであることが示唆された。また特定した窒素利用システムに関与する遺伝子は、アンモニウムにより転写が抑えられ、特に低アンモニウム土壌中での生育に重要な役割を担っていることが示唆された。

第 3 章では、固体環境特異的に発現上昇した 37 の遺伝子のうち、ro05445: GDP-L-fucose synthase の機能を検討した。ro05445 を含む ro05444-ro05449 遺伝子クラスター及び上流の ro05442-ro05443 遺伝子クラスターは液体培地よりも固体培地での転写量が高いことが示された。そして ro05445 の遺伝子破壊株 D5445 は、固体培地での大きな生育の遅れが観察された。この結果から、RHA1 株の細胞外多糖の構成成分である L-fucose の合成に ro05445 が関与している可能性が示唆された。

本研究では、DNA アレイを用いて RHA1 株の土壤中で発現上昇する 165 の遺伝子を特定した。そして発現上昇の見られた窒素代謝利用遺伝子群の機能解析により、土壤中で生育する RHA1 株の窒素源利用の重要性を示した。これらの知見は、汚染環境で RHA1 株の能力を十分に発揮させる技術の確立に寄与すると期待される。