

氏 名 川 崎 東 彦  
かわ さき はる ひこ  
 学位の種類 農 学 博 士  
 学位記番号 論 農 博 第 1178 号  
 学位授与の日付 昭 和 60 年 5 月 23 日  
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当  
 学位論文題目 STUDIES ON PLASMIDS DETERMINING  
 BACTERIAL HALOACETATE DEHALOGENASES  
 (細菌のハロ酢酸デハロゲナーゼを支配するプラスミドに関する  
 研究)

論文調査委員 (主 査)  
 教 授 山 田 秀 明 教 授 左 右 田 健 次 教 授 駒 野 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、細菌の生成する脱ハロゲン酵素、ハロ酢酸デハロゲナーゼの酵素学的性質を明らかにするとともに、本酵素を支配するプラスミドおよびその遺伝子について解析した結果をまとめたものである。その主な成果はつぎの通りである。

1. 工場排水から、フルオロ酢酸を分解資化する細菌数株を分離した。脱ハロゲン活性の強かった *Pseudomonas* sp. A 株と *Moraxella* sp. B 株からハロ酢酸デハロゲナーゼを精製し、その物理化学的、酵素化学的性質を明らかにした。A 株の酵素 (H-1) はフルオロ酢酸に最も強い活性を示したが、B 株の酵素 (H-2) はフルオロ酢酸には全く作用せず、クロロ、プロモ、ヨード酢酸に強い活性を示した。両酵素の分子量はよく似ていたが、アミノ酸組成は異なっていた。B 株は、フルオロ酢酸で培養すると、H-2 酵素のほか H-1 酵素も誘導生成することを認めた。

2. *Moraxella* sp. B 株の 2 種のデハロゲナーゼは、本菌のもつプラスミドに支配されていることを明らかにした。このプラスミドは分子量 43 Mdal で、接合伝達能があり、*Pseudomonas* や大腸菌に伝達されてデハロゲナーゼを発現することを認めた。このプラスミドを pUO1 と名付け、その制限酵素切断点地図を作成し、さらにデハロゲナーゼ H-1 および H-2 の遺伝子座位を決定した。

3. H-1 および H-2 遺伝子をベクター pBR322 に連結して大腸菌にクローニングし、プロモーター、転写方向などを解析した。またプロモーターを交換することによりデハロゲナーゼ発現量を約 3 倍高めることができた。

H-1 遺伝子と H-2 遺伝子の間に DNA の相同性は認められず、起源を異にする酵素であることを明らかにした。H-2 遺伝子の両側には約 1 Kb の逆向き繰返し配列の存在することがサザーン法、鎖内アーニング解析の結果明らかとなり、H-2 遺伝子がトランスポソンである可能性を示唆した。

4. プラスミド pUO1 から、H-2、水銀耐性、伝達能などの遺伝子を失った種々の欠失プラスミッドが生じることを明らかにした。また pUO1 は共存するほかのプラスミドとの間で種々の組換えを起こし、

遺伝子のやり取りをしていることを認めた。このようにプラスミドは環境に応じて頻繁に構造改変、遺伝子の再編をしていることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

有機ハロゲン化合物の多くは微生物分解を受け難く、有毒な環境汚染物質となっている。また微生物の物質分解能や薬剤耐性がプラスミドに支配されている例は多く、さらに微生物が新たな能力を獲得して環境に適応してゆく過程にプラスミドが大きな役割を果たしていることを示す例も報告されている。ハロ酢酸を分解する細菌はすでに分離されており、その分解菌には脱ハロゲン酵素、ハロ酢酸デハロゲナーゼが存在していることが報告されている。

本研究において著者は、2種類のハロ酢酸デハロゲナーゼを精製し、それらの酵素学的性質を明らかにするとともに、このデハロゲナーゼを支配するプラスミドおよびデハロゲナーゼ遺伝子を解析し、それらの構造と機能について追究した。主な成果はつぎの通りである。

1. 工場排水から分離したハロ酢酸分解菌 *Pseudomonas* sp. A 株と *Moraxella* sp. B 株から、基質特異性の異なる2種類のハロ酢酸デハロゲナーゼ H-1 および H-2 を精製し、均一酵素標品をえた。両酵素の物理化学的および酵素化学的性質を明確にした。

2. 細菌の脱ハロゲン能を支配するプラスミド pUO1 をはじめて見いだした。このプラスミドには2種類のデハロゲナーゼと水銀耐性がコードされており、*Pseudomonas* や大腸菌に伝達されることを明らかにした。またこのプラスミドの制限酵素切断点地図を作成し、遺伝子座位を明確にした。

3. デハロゲナーゼ遺伝子をクローン化することにはじめて成功した。

H-1 と H-2 の遺伝子の比較によって、これら2種類のデハロゲナーゼは遺伝子起源を異にする酵素であることを明らかにした。また H-2 遺伝子はトランスポソンである可能性を示唆した。

4. プラスミド pUO1 は共存する広宿主域プラスミド RP 4 と高頻度に生体内組換えを起し、種々の組換え体を生ずることを明確にし、これを利用して広宿主域伝達能とデハロゲナーゼ遺伝子を併せ持つプラスミドを造成することに成功した。

以上のように本論文は、細菌のハロ酢酸デハロゲナーゼの諸性質を究明するとともに、本酵素の遺伝子を支配するプラスミドの構造と機能を明確にしたものであって、微生物による有機ハロゲン化合物の代謝研究に多くの新知見を加えたものであり、応用微生物学、応用酵素学および微生物遺伝学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、昭和60年4月30日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、農学博士の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。