

氏 名	おおこうち ゆ み こ 大 河 内 由 美 子
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1990 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 環 境 工 学 専 攻
学位論文題目	有機塩素化合物分解菌の探索と脱ハロゲン化機能の特性およびその高度化に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 寺 島 泰	教 授 松 井 三 郎	教 授 森 澤 眞 輔
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は生物化学的な作用を利用した環境浄化技術の高度化を目的として、芳香族系有機ハロゲン化合物を分解・資化する微生物を土壌から単離し、それらが有する脱ハロゲン化酵素の特性を把握し、遺伝子工学手法により酵素活性を強化した菌株の育種に取り組むとともに、タンパク質工学手法により触媒機能の改変をおこなった研究であり、6章から成っている。

第1章は序論であり、これまでに単離されている有機ハロゲン化合物分解菌やそれらが生産するデハロゲナーゼに関する研究の現状をまとめ、本論文の目的・意義と構成について述べている。

第2章では、2,4-DあるいはMCPAを分解・資化する微生物を土壌より単離・同定し、菌体内のデハロゲナーゼの存在を確認するとともに、デハロゲナーゼ活性が最も高い菌株 *Burkholderia cepacia* strain KY が生産するデハロゲナーゼの精製を行っている。また精製酵素の活性至適条件や熱安定性、基質特異性などの基本的性質について検討を加え、このデハロゲナーゼが炭素数4以下のDL2-ハロ酸デハロゲナーゼ(DL-DEX)に分類されることを示している。

第3章では、*B. cepacia* KYのDL-DEX遺伝子のクローニングによりデハロゲナーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌の育種を行い、活性発現に必要な因子を探索した結果、ハロゲン化酢酸を添加することによりDL-DEXが誘導されることを明らかにしている。また、この育種菌を包括固定化した場合の活性特性について検討し、固定化により活性持続期間が延長されることも示している。さらにDL-DEXの大腸菌大量発現系を構築し、続く第4章において触媒機能改変を検討するために必要となるデハロゲナーゼの大量調製法を確立している。

第4章では、前章において扱ってきた *B. cepacia* KY由来のDL-DEXに加えて、*Pseudomonas putida* No. 109が生産するL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ、H109も取り上げ、H109の大腸菌大量発現系を構築し、酵素の簡便な精製方法を確立している。このように大量調製したDL-DEXおよびH109の熱および有機溶媒に対する安定性、ならびに炭素数4以上の長鎖のハロ酸に対する活性を改良することを目的として、両デハロゲナーゼに対して合成高分子による化学修飾を行い、化学修飾がデハロゲナーゼの特性に及ぼす影響について検討するとともに、修飾デハロゲナーゼの水系および極性有機溶媒共存系における活性、疎水性基質である長鎖のハロ酸に対する活性への効果について検討している。さらに、H109と高い相同性を示しかつ耐熱性のL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ、L-DEX YLの立体構造を基に、ホモロジーモデリングによりH109デハロゲナーゼの分子モデルを作成し、モデルを使用して安定化に関与すると推測されるアミノ酸残基およびそれらの置換について検討を加えている。これらのうちSer51→Arg, Gly88→Cys, Gly135→Argの置換を行った変異酵素、2カ所のアミノ酸を同時に置換したSer51→Arg/Gly88→Cys, Gly88→Cys/Gly135→Argの二重変異酵素、さらに三重変異酵素Ser51→Arg/Arg63→Ala/Glu66→Aspをそれぞれ調製し、熱安定性を検討した結果、S51Rを除く全ての変異酵素で熱安定性が向上していることを明らかにするとともに、速度論的な解析を行っている。特に顕著な熱安定化効果が得られた二重変異酵素S51R+G88Cおよび三重変異酵素S51R+R63A+E66Dを取り上げ、各アミノ酸置換がH109デハロゲナーゼの熱安定化に及ぼす効果について検討するとともに、他の酵素特性に対する影響評価も行っている。

第5章では、2,4-D分解遺伝子と各種デハロゲナーゼ遺伝子群を指標に用いて、環境中および処理システム中に生息する有機ハロゲン化合物分解菌のPCR検出を行うことを目的として、各遺伝子群検出用プライマーを設計し、各遺伝子群に対する検出および制限酵素解析の条件を決定している。さらに、環境試料中に生息する微生物集団の全DNAを直接抽出して調製し、これをPCRに使用することにより環境中からの上記遺伝子群の検出および制限酵素解析を行い、環境中に生息する培養不能な微生物種も含む有機ハロゲン化合物分解菌の検出に対して、本手法が有効であることを示している。

第6章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、環境浄化技術を高度化するための基礎として、有機ハロゲン化合物分解微生物の探索と脱ハロゲン化機能の特性およびその改良につき、遺伝子・タンパク質工学手法に基づいて研究したものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 芳香族有機ハロゲン化合物の分解化菌を土壌から単離し、デハロゲナーゼの蓄積を確認するとともに、2,4-D分解菌である *Burkholderia cepacia* KY が生産するデハロゲナーゼの精製を行い、活性至適条件や基質特異性、耐熱性などの特性を明らかにした。

2. *Burkholderia cepacia* KY の DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子をクローニングし、デハロゲナーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌の育種を行い、活性発現に必要な因子を決定するとともに、育種菌を包括固定化することにより活性持続性効果を得た。

3. *Burkholderia cepacia* KY の DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼおよび *Pseudomonas putida* No. 109 の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの大量発現系を構築し、迅速な酵素精製法を考案した。これらにより、目的酵素を生産性を改善し、簡便な調製が可能となった。

4. 上記2種類のデハロゲナーゼに対して合成高分子による化学修飾を行い、安定性に対する影響を評価するとともに、*Pseudomonas putida* No. 109 の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの分子モデリングを行い、熱安定性を改良するためのアミノ酸置換をモデル上で検討し、その効果を部位特異的変異導入を行うことで実験的に証明した。

5. デハロゲナーゼ遺伝子などの有機ハロゲン化合物分解に関与する遺伝子群を指標としたPCR検出および制限酵素解析手法を提示し、実際に環境試料への適用を行い、その有用性を評価した。

以上要するに本論文は、有機ハロゲン化合物分解前の遺伝子特性を利用した土壌からの分解菌検出方法を提示するとともに、単離した分解菌が生産する脱ハロゲン化酵素の特性に基づき、遺伝子組換えによる酵素活性の強化、その大量調製方法の確立、ならびに触媒機能の改良を実現し、環境浄化技術高度化の基礎を与えたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成12年10月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行なった結果、合格と認めた。