

氏 名	カレン ミネ ハラダ Karen Mine Harada
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1572 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 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	農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Creation of Super-bacteria by Molecular Transplantation of Macromolecule-transport System (Pit-organ) in <i>Sphingomonas</i> sp. A1 (スフィンゴモナス属細菌 A1 株の高分子輸送システム(体腔器官)の分子移植によるスーパー細菌の創成に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 井 上 國 世 教 授 阪 井 康 能

論 文 内 容 の 要 旨

生物学的環境浄化(バイオレメディエーション)に関する研究の多くは、特定の環境有害物質を分解する微生物を分離し、その分解能力や分解酵素と遺伝子を解析するに止まっている。しかし、自然界に棲息する微生物の分解能は、実用的観点から十分とは言い難い。*Sphingomonas* 属細菌は、様々な環境有害物質を分解する能力を有し、環境浄化への適用が期待されている菌群である。その能力を増強すれば、実用的な環境浄化能を持つ菌株を得ることができる。そのためには、応用微生物学が確立して来た従来の手法に優る技術の導入が求められる。

Sphingomonas 属細菌 A1 株は、高分子物質(アルギン酸)の資化に際して、細胞表層に「体腔」(口)を形成し、そこから高分子物質を取り込み、細胞内で低分子化する巧妙なシステム「超チャネル」を持つ。「超チャネル」は、細胞表層の「体腔」、ペリプラズムの「結合タンパク質」、及び細胞内膜の「ABC トランスポーター」から構成されており、「超チャネル」に関連する遺伝子は一つのクラスターを形成している。

本研究では、A1 株の「超チャネル」を他の細菌に分子移植することにより、多様な物質を強力に分解する「スーパー細菌」の創成を試みるとともに、そのバイオレメディエーションへの適用性を検討した。また、大規模細胞機能改変技術としての「分子移植工学」の確立を目指した。

第 1 章では、A1 株の「超チャネル」を他の細菌に分子移植する遺伝子転移技術の基盤を確立するため、A1 株が保持する環状 2 本鎖 DNA プラスミド(pA1)の全塩基配列を決定し、pA1 の特性を明らかにした。pA1 は、46kb (46,557bp) から成り、GC 含量は 65%、49 遺伝子を含む。全体構造(遺伝子構成)に基づいて、pA1 はグラム陰性細菌に見られる自己複製可能な広宿主ベクター IncP プラスミドと類似しており、特に IncP-1 β サブファミリーに分類されることが分かった。しかし、他の IncP-1 β プラスミドと異なり、pA1 はトランスポゾンを含んでいなかった。

以上のことから、本プラスミドは、*Sphingomonas* 属細菌のみならず、グラム陰性細菌を宿主とする広宿主ベクターに応用可能であることが示唆された。そこで、pA1 に「超チャネル」構成遺伝子クラスターを挿入し、*Sphingomonas* 属細菌を始めとする種々のグラム陰性細菌に導入しようと試みたが、形質転換体の取得が困難であった。形質転換効率を向上させるため、pA1 のサイズ縮小化や遺伝子挿入部位の作製などの改良が必要であると考えられた。

第 2 章では、*Sphingomonas* 属細菌 A1 株の「超チャネル」を他の細菌に分子移植することにより、様々な物質(ダイオキシン、ポリプロピレングリコール、アルギン酸、ポリデキストロース、ヘミセルロース)を強力に分解する「スーパー細菌」の創成を試みた。

バイオレメディエーションの対象物質として、発ガン性や催奇形性の高いダイオキシンに焦点を当てた。ダイオキシン分解菌 *Sphingomonas wittichii* RW1 株への「超チャネル」の分子移植には、広宿主コスミドベクター pKS13 を用いた接合導入法を利用した。「超チャネル」構成遺伝子クラスターを pKS13 にクローニングし、プラスミド pBE11 を構築した。

RW1 株及び RW1 株に pBE11 を導入して得られる形質転換体 RW1 (pBE11) を、アルギン酸 (0.5%) とダイオキシンのアナログであるダイベンゾフラン (10mM) を添加した無機培地 (W 培地) で 4 日間培養した。RW1 株は 10 mM ダイベンゾフランを完全分解するのに 4 日間以上を要したのに対し、RW1 (pBE11) 株はその半分の時間で分解した。また、RW1 (pBE11) 株はアルギン酸非存在下でも「超チャネル」関連遺伝子群を構成的に発現して体腔を形成し、ダイベンゾフラン、ダイベンゾ-*p*-ダイオキシン、及び土壌に混入したダイベンゾフランを効率よく分解した。

以上の結果、RW1 株に A1 株の「超チャネル」を分子移植することによって、構成的に「超チャネル」を形成し、野生株よりも高効率でダイオキシンを取り込み、かつ分解する「スーパー細菌」を創成することができた。

ポリプロピレングリコール分解菌である *Sphingomonas subarctica* IFO16058^T 株に pBE11 を導入し、その分解能を検討した。形質転換株 IFO16058^T (pBE11) は、「超チャネル」を構成的に発現し、明瞭な体腔を形成した。また、この形質転換株では、対照の IFO16058^T (pKS13) 株と比較して、アルギン酸とポリプロピレングリコールの分解能が向上しており、ポリプロピレングリコールの分解能はアルギン酸の存在により更に増大した。同様に、A1 株の「超チャネル」構成遺伝子クラスター (プラスミド pBE11) を、ポリデキストロース分解菌 *Sphingomonas sanguis* IFO13937^T 株に導入した。この場合も、得られた形質転換株は「超チャネル」を構成的に発現し、人工多糖 (ポリデキストロース) の顕著な分解能を示した。これらの結果、「超チャネル」の分子移植により、ポリプロピレングリコール、アルギン酸、及びポリデキストロースを強力に分解する「スーパー細菌」を創出することができた。

米糠は、ビタミン類やミネラルなど豊富な栄養素を含む利用価値の高い資源 (バイオマス) である。しかし、難分解性の食物繊維 (ヘミセルロース) の存在がその利用を制限している。そこで、米糠ヘミセルロース分解微生物を自然界から分離し、「超チャネル」を応用してその分解能を増強することを試みた。米糠ヘミセルロースを炭素源として生育する細菌を土壌より分離した。形態学的・生理学的分析、及び 16S rRNA 塩基配列の解析結果に基づいて、本菌を *Paenibacillus* 属細菌 (HC1 株) と同定した。HC1 株は、米糠ヘミセルロースを単一炭素源として生育できる最初の例である。米糠ヘミセルロースの分解に関わる本菌のキシラナーゼとグルコシダーゼの性状を解析した。これらの遺伝子を pBE11 にクローニングしたプラスミドで *Sphingomonas* 属細菌を形質転換することにより、ヘミセルロース分解「スーパー細菌」の創成に途を拓いた。

以上のように、「超チャネル」の分子移植によって創成される「スーパー細菌」は、低分子物質 (ダイオキシン) のみならず高分子物質 (ポリプロピレングリコール、ポリデキストロース、アルギン酸) をも効率よく分解することから、そのバイオレメディエーションへの高い適用性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

現在の微生物を用いる環境浄化の研究は、基本的には特定の環境有害物質を分解する微生物を分離し、その分解酵素や遺伝子を解析することに主眼が置かれている。しかし、自然界に棲息する微生物の分解能は、実用的見地から十分とは言い難く、また多様な分子サイズや水溶性・水不溶性などの形態を取る物質に対して一様に適用できるものではない。また、分解能力の向上には分解酵素遺伝子の大量発現を基本とする代謝工学的手法が用いられているが、特定基質のみを対象としているため、その適用範囲には自ずと制限がある。環境浄化能を増強する普遍的な手法の開発が望まれている。

Sphingomonas 属細菌は、様々な環境有害物質を分解する。その能力を格段に増強すれば、実用的な環境浄化能を持った菌株を得ることができる。*Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、細胞表層の「体腔」、ペリプラズムの「結合タンパク質」、及び細胞内膜の「ABC トランスポーター」から成る高度な物質輸送システム (超チャネル) を有する。本研究では、A1 株の「超チャネル」を他の細菌に移植することにより、様々な物質 (ダイオキシン、ポリプロピレングリコール、アルギン酸、ポリデキストロース) を強力に分解する「スーパー細菌」を創成するとともに、そのバイオレメディエーションへの適用性を実証した。また、大規模細胞機能改変技術としての「分子移植工学」を確立した。評価すべき点は、以下の通りである。

1. *Sphingomonas* 属細菌 A1 株が保持するプラスミド pA1 の全塩基配列を決定した。pA1 は、46kb (46,557bp) から成り、GC 含量は 65%、49 遺伝子を含むことを明らかにした。
2. pA1 は、グラム陰性細菌に見られる自己複製可能な広宿主ベクター IncP プラスミドと類似しており、IncP-1 β サブ

ファミリーに分類されることから、グラム陰性細菌を宿主とする広宿主ベクターに応用可能であることを示した。

3. ダイオキシン分解菌 *Sphingomonas wittichii* RW1 株に A1 株の「超チャネル」を分子移植することによって、構成的に「超チャネル」を形成し、野生株よりも高効率でダイオキシンを取り込み、かつ分解する「スーパー細菌」を創成した。
4. ポリプロピレングリコール分解菌 *Sphingomonas subarctica* とポリデキストロース分解菌 *Sphingomonas sanguis* に A1 株の「超チャネル」を分子移植することにより、高分子物質（ポリプロピレングリコールとポリデキストロース）を強力に分解する「スーパー細菌」を創成した。「スーパー細菌」は、低分子（ダイオキシン）、並びに高分子物質（ポリプロピレングリコールやポリデキストロース）も効率よく分解することから、そのバイオレメディエーションへの高い適用性を示した。
5. 米糠の有効利用を可能にする「スーパー細菌」を創成するため、分離した米糠ヘミセルロース分解細菌、並びに米糠ヘミセルロース分解に関わる該菌の酵素と遺伝子の特性を明らかにした。

以上のように、本論文は、細菌の巨大分子装置（体腔器官）を他の細菌に分子移植し、環境有害物質を始めとする様々な物質を強力に分解する「スーパー細菌」を創成することにより、細胞の構造と機能を大規模に改変する技術（分子移植工学）を確立したものであり、応用微生物学、遺伝子工学、環境工学、生物機能変換学、及び分子移植工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月9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、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。