

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	化学生命工学専攻
学生番号 Student No.	51425406
氏名 Name	愛宕 祐基

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

Analysis of novel extracellular protein for biphenyl metabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1
(放線菌RHA1株のビフェニル質化における新規細胞外タンパク質の解析)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は水に極めて溶けにくく、沸点が高く、非常に安定性の高い油状物質である。さらに熱によって分解されにくい、不燃性で絶縁性が高い物性から 1960 年代を中心として工場やビル、電車などのトランスやコンデンサなどに使用され、世界中で 100 万トン以上生産された。しかしながら、PCB を含む廃棄物は食物連鎖などで生物の体内に濃縮しやすいことや、環境中で難分解性のため、地球規模での汚染 (イヌイットの人々、アザラシ、クジラ等への蓄積) を引き起こすことが報告されている。日本でもカネミ油症事件の原因物質として大きな被害をもたらした。以上のことから有害な PCB は生産・使用・廃棄が世界的に禁止されているが、現在も多量の PCB が処分方法が定まらないまま保管されており、加えて環境中の残留 PCB も問題となっている。この問題解決に向けて、放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 株 (RHA1 株) は高い PCB 分解能力を有しており、土壌での生存にも優れ、遺伝子操作が容易であることから、低コストで PCB を処理する技術や環境汚染を修復するバイオレメディエーション技術への高度な応用が期待されている。しかし、このような研究を進めるためには PCB が実験室でさえ使用が禁止されているため、モデル基質としてビフェニルを用いた研究が進められている。これまでにカナダのブリティッシュコロンビア大 (UBC, バンクーバー) が RHA1 株の全ゲノムを解析しており、ビフェニルの代謝酵素遺伝子群の同定とプラスミド上に存在する転写因子: BphT1 がビフェニル代謝に必須であることなどが判明しており、基礎研究が進んでいる。一方で、ビフェニル代謝酵素遺伝子以外の遺伝子群がビフェニル代謝にどのように関与しているのかは未解明な点が多く残っている。

そこで、私たちの研究では RHA1 株におけるビフェニル代謝のマスター転写因子: BphT1 から PCB 分解の全容を解明することを目的として、抗 BphT1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法とマイクロアレイ解析を組み合わせた ChIP-chip 法により、ビフェニル誘導時における RHA1 株の全ゲノム上での BphT1 結合領域を網羅的に同定を試みた。その結果、RHA1 株がビフェニル応答時に BphT1 依存的に発現することが予想されるビフェニル代謝酵素遺伝子以外の遺伝子を新規に 6 種同定することに成功した。

さらにこの 6 遺伝子の生理学的意義を解明するため、各遺伝子を単一欠損させた遺伝子破壊株を作製し、ビフェニルを唯一の炭素源とした最小塩液体培地での生育を調べた。その結果、2 つの遺伝子破壊株 ($\Delta ro1861$, $\Delta ro8628$) において野生株と比較して生育能が低下し、1 つの遺伝子破壊株 ($\Delta ro10225$) は生育能を欠失することが判明し、PCB 分解経路でもこれらの同定因子が重要な機能を担っていることが示唆された。そこで、これ以降は $ro10225$ 遺伝子を対象にプロテオミクスな手法による機能解析を進めた。

$Ro10225$ 組み換えタンパク質を用いて抗 $Ro10225$ 抗体を作製し、ビフェニルを唯一炭素源とした培養を行った RHA1 株 (野生株) の細胞内や培養培地に対して、Western blot 法を用いて $Ro10225$ タンパク質の存在を確認した。その結果、 $Ro10225$ タンパク質は RHA1 株の細胞内だけでなく培養上清にも存在することが確認された。さらに、 $Ro10225$ タンパク質を培地へ直接添加すると $\Delta ro10225$ の生育能が回復し、相補実験が成功した。以上の結果から、 $ro10225$ は RHA1 株のビフェニル代謝に必須な新規遺伝子であることが確認された。また、 $Ro10225$ タンパク質は全長 (約 55 kDa) だけでなく小さい領域 (約 19 kDa) も Western blotting で強く反応するバンドとして検出されたことから、 $Ro10225$ タンパク質は約 19 kDa のタンパク質に限定分解された後、機能を発現する可能性が示唆された。さらに、ビフェニルを炭素源として培養した RHA1 株 (野生株) の培養培地に含まれるタンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーによる分離・精製を試みたところ、約 19 kDa のタンパク質は推定分子量 2,000 kDa の高分子量の素通り画分として溶出され、複合体を形成していることが示唆された。この複合体に含まれていた 3 種類のタンパク質に対する N 末端配列の分析を行ったところ、約 19 kDa のタンパク質は $Ro10225$ タンパク質の分解物であり、残り 2 つはビフェニル代謝の初期段階に関与する既知酵素 (EtbAa, BphAb) であることが明らかとなった。さらにこの 3 者複合体は、全長の $Ro10225$ タンパク質の添加量の 1/1000 の量で $\Delta ro10225$ 株のビフェニル依存的な生育回復が認められた。

以上の結果から、RHA1 株のビフェニル代謝に必須な新規遺伝子 $ro10225$ は、その限定分解産物が既知ビフェニル代謝酵素と複合体を形成して細胞外に分泌するため、RHA1 株のビフェニル初期代謝に必須の機能を発現するものと考えられた。