

氏名(国籍)	呂 傑 (中国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2457号
学位授与年月日	平成12年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	微生物によるジベンゾチオフェン及びその誘導体の分解
主査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副査	筑波大学教授 農学博士 小 澤 哲 夫
副査	筑波大学教授 農学博士 柿 篤 眞

論文の内容の要旨

本研究は、石油中の難分解性有機硫黄化合物であるジベンゾチオフェン (DBT) とその誘導体, 4,6-ジメチルジベンゾチオフェン (4,6-dmDBT) を分解する細菌を自然界から取得し, その分解特性および分解機構の解明を目的としている。

まず, 4,6-dmDBT 分解菌を探索した。4,6-dmDBT は入手が困難であるので, DBT 分解菌の探索から始めた。その結果, DBT 分解菌として, 土壌中から 12 株, 原油中から 11 株の候補株が得られた。そのうち, 原油から分離された 1 株 (TZS-7 株) のみが, 4,6-dmDBT を分解した。そこで, この株の菌学的検討を行ったところ, *Sphingomonas paucimobilis* と同定された。本菌株は, DBT および 4,6-dmDBT を唯一の硫黄源としては利用できず, また, 4,6-dmDBT の分解能は, DBT, naphthalene, fluorene などの環状化合物によって誘導された。次に, 分解特性について詳細に検討した。本菌株の休止菌体を用いて, 各種の DBT アナログ, 単環, 2 環, 3 環の芳香族化合物の分解を行った結果, 本株は各種環状化合物を強力に分解し, 幅広い基質特異性を持つことが明らかになった。さらに, GC-MS を用い, 本株による DBT と 4,6-dmDBT の分解産物を推定した。DBT 分解反応液からは, 3-hydroxy-2-formylbenzothiophene, DBT-sulfoxide および DBT-sulfone の 3 種の分解産物が同定された。一方, 4,6-dmDBT の分解産物としては, 3 種の化合物が検出され, そのうち 2 種は, それぞれ既に報告されている 7-methyl-3-hydroxy-2-formylbenzothiophene と 7-methylbenzothiophene-2,3-dione の GC-MS スペクトルと一致した。あとの 1 種は, GC-MS スペクトルから 6-methyldibenzothiophene-4-carboxylic acid と推定されたが, 同定できていない。以上の結果から, TZS-7 株による 4,6-dmDBT の分解経路は, 環開裂型 (C-C 結合切断型) DBT 分解経路と類似し, 4,6-dmDBT のメチルベンゼン環の 1 つを開裂するという経路であることが明らかになった。C-C 結合切断型分解菌による 4,6-dmDBT の分解菌は本研究が初めてである。

次に, TZS-7 株の芳香環開裂酵素遺伝子のクローニングを行った。本菌株の遺伝子ライブラリーの構築に成功し, そこから 2 種類の環開裂遺伝子を取得することができた。それらの DNA 塩基配列を検索し, 1 つは, 多環系の開裂酵素に見られる 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase で, 片方は単環系の開裂酵素の catechol 2,3-dioxygenase であることが示された。粗酵素を用いて, dihydroxybiphenyl (2 環) および catechol (単環) に対する基質特異性を調べた結果, それぞれの遺伝子の特徴をよく反映していた。さらに多環系環開裂酵素遺伝子の近傍の遺伝子配列の解析を行い, TZS-7 株における多環芳香族分解酵素遺伝子がクラスターを形成していることを明らかにした。こ

の断片には10個のORFが含まれていた。それぞれコードする酵素は、2,3-dihydroxybiphenyl meta-環開裂酵素, multi component typeの芳香族水酸化酵素のferredoxin, multi component typeの芳香環水酸化酵素の β -subunit, α -subunit, 芳香環開裂産物の isomerase, multi component typeの芳香環水酸化酵素のferredoxin reductase, dihydrodiol 芳香環脱水素酵素 dihydrodiol dehydrogenase および aldolase であった。これらの遺伝子群は、他の多環芳香族分解酵素遺伝子との相同性がある程度高かった。しかし、遺伝子の配列順序や方向などはTZS-7株独特のものであった。同定した多環芳香族分解酵素遺伝子群を保持したpJ1によるDBT, 4,6-dmDBTの分解は確認できていない。この点について、さらなる検討が必要である。

TZS-7株はDBT類硫黄化合物だけでなく各種芳香族化合物も強力に分解することから、石油汚染に対するバイオレメディエーションへの応用が期待される。

審査の結果の要旨

石油に含まれる難分解性硫黄化合物ジベンゾチオフェン (DBT) 類は、酸性雨の原因の一つになっており、高効率でかつ環境に負荷の少ない微生物脱硫プロセスの開発が急がれている。また、DBT類は石油汚染のマーカーとされており、石油汚染に対するバイオレメディエーション技術開発の視点からDBT類分解菌の取得が望まれている。このような社会的ニーズを背景に、本研究は、DBTおよびその誘導体である4,6-ジメチルジベンゾチオフェン(4,6-dmDBT)分解能を有する菌の探索と分解菌の分解特性および分解機構の解明を目的として行われたものである。

まず、原油中からDBTおよび4,6-dmDBT分解菌1株(TZS-7株)を取得することに成功し、菌学的検討の結果、本菌を *Sphingomonas paucimobilis* と同定した。本菌株は各種のDBTアナログやその他の芳香族化合物を強力に分解し、幅広い基質特異性を持つことが示された。さらに、分解産物の同定を行い、本菌株による4,6-dmDBTの分解は、環開裂型(C-C結合切断型)DBT分解経路と類似した経路で行われることを明らかにした。C-C結合切断型分解菌による4,6-dmDBTの分解は本研究が初めてであり、独創性の高い研究成果と言える。

次に、TZS-7株の芳香環開裂酵素遺伝子のクローニングを行い、遺伝子ライブラリーの構築に成功し、そこから2種類の環開裂遺伝子を取得することができた。これらは、多環系の開裂酵素に見られる2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenaseと単環系の開裂酵素のcatechol 2,3-dioxygenaseの遺伝子であった。多環系環開裂酵素遺伝子の近傍の遺伝子配列を調べ、本菌株における多環芳香族分解酵素遺伝子がクラスターを形成していること、他の多環芳香族分解酵素遺伝子との相同性が高いが、遺伝子の配列順序、芳香などは本菌株独特のものであることを明らかにした。

以上の成果は、石油中の難分解性硫黄化合物の微生物分解に新知見を加え、石油の微生物脱硫プロセスの構築あるいは石油汚染に対するバイオレメディエーション技術の開発に有益な情報を与えるものであり、極めて優れた研究と評価できる。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。