

氏名(本籍)	おか の くに ひろ 岡野邦宏(茨城県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第4002号
学位授与年月日	平成18年3月24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	生命環境科学研究科
学位論文題目	藍藻由来毒性物質 microcystin 分解菌の分解機構解明と分子進化的考察

主査	筑波大学教授	農学博士	前川孝昭
副査	筑波大学教授	農学博士	佐竹隆顕
副査	筑波大学教授	農学博士	杉浦則夫
副査	筑波大学教授	博士(農学)	山口智治
副査	筑波大学教授	工学博士	松村正利

論文の内容の要旨

強力な肝臓毒 microcystin (以下 MC) は環状ペプチドであるため物理化学的に安定であることが知られているが、自然水域では秋になると MC が急激に分解される現象が確認されている。そのため、MC の特異的生分解は湖沼において重要な因子になっていると考えられる。しかしながら、MC を特異的に分解する細菌が見つかるものの、その詳細な分解機構については、分解に関与する MC 分解関連オペロン (*mlrA* オペロン) の cDNA として1種だけ報告されている。自然水域における MC の分解機構を解明するうえで、MC 分解に関わる微生物の特性および多様性に関する研究は必要不可欠である。したがって、MC 分解の生化学的特性、特にその分解に関わる酵素の機能・進化を解明することはその分解機構を解明するための第一歩といえる。

そこで、本研究では自然水域における MC の生分解機構の解明を目的として、タンパク質分解酵素による MC 分解の生化学的特性を調べるとともに MC 分解菌における MC 分解酵素の多様性、アルカリ性環境下における MC 分解菌の探索について検討を行った。さらに、MC 分解菌の近縁種について系統発生解析を行うことで MC 分解酵素の進化について考察を行った。

まず、環状 MC-LR の物理化学的安定性を評価するために pH 値を 2 から 12 まで変化させた結果、pH2 から 11 では安定であった。また、環状 MC-LR は代表的なタンパク質分解酵素 12 種に対しても安定であった。一方、MC 分解菌 *Novosphingobium* sp. MD-1 株の細胞抽出液 (CE) を用いて準備された直鎖型 MC-LR は 9 種の酵素に対してゆっくりとした分解 (約 20% /day) を示した。しかしながら、この分解速度は MD-1 株の CE と比較して著しく遅いため、*mlrA* オペロンは極めて特異的な酵素であることが分かった。一方、現在報告されている MC 分解菌において *mlrA* オペロンの保存は確認されていない。そこで、MC 分解酵素遺伝子 *mlrA* の保存性を明らかにするために新規 MC 分解菌 *Sphingomonas* sp. Y2 株および *Novosphingobium* sp. MD-1 株より *mlrA* 遺伝子の検出を試みた結果、それぞれの *mlrA* ホモログを発見することに成功した。

これらの結果から自然水域の分解には *mlrA* オペロンのような特異的な酵素群を持つ細菌が関与している

ことが考えられる。有毒アオコ発生水域においては、藍藻類の生理活性により水域の pH 値が 11 付近になることが報告されている。しかしながら、現在報告されている MC 分解菌は pH 中性条件で単離された細菌のみである。そこで、アルカリ性環境下における MC の生分解機構を解明するためにアルカリ耐性 MC 分解菌の探索を行った結果、*Sphingopyxis* sp. C-1 株の単離に成功した。この分解菌は、pH11 においても良好な増殖を示すアルカリ耐性菌であり、藍藻類が優占化する自然水域における MC 分解に関して重要な役割を示すと考えられた。また、*mlrA* ホモログが保存され *mlrA* (MJ-PV) と 95% 以上の相同性を示すとともに、MC-LR の一次分解産物の構造も既往の報告と同様であったことから、C-1 株も *mlrA* オペロンを保有していることが示唆された。

このことから、*mlrA* オペロンの多様性や進化について検討することは湖沼における MC の生分解機構を解明するうえで極めて重要な知見となる。そこで、MC の生分解において特に重要な役割を持つ MC 分解酵素 *MlrA* の進化について MC 分解菌の近縁種 α -プロテオバクテリア 270 種について 16S rDNA を用いた系統派生解析を行った結果、MC 分解菌 6 種は共通祖先から派生する類縁な種であることが明らかとなった。また、*mlrA* 遺伝子およびそのホモログについても系統派生解析を行い、16S rDNA と比較したところ *mlrA* の進化に水平伝播は関与せず、ハウスキーピング遺伝子と共進化していることが示唆された。この仮説を証明するために微生物保存機関より MC 分解菌の近縁種を取り寄せ、*mlrA* ホモログの検出を行った。しかしながら、新規 *mlrA* ホモログは発見されなかった。また、サザンブロットィング法を用いても *mlrA* ホモログが検出できなかったことから、*mlrA* 遺伝子全体が欠損していることが確認された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

藍藻由来毒性物質 microcystin はヒトや動物の肝臓に毒性を示す。7つのアミノ酸からなる環状ペプチドの一種である。WHO は湖沼における暫定規準を 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ と定めている。湖沼の富栄養化が進むなかで、この毒性物質を自然界において分解させることは非常に重要な研究である。本研究では microcystin 分解菌の探索を行ない、分解菌のもつ分解酵素の *mlrA* オペロンについてその保存性を明らかにした。2 種類の新規な microcystin 分解について *mlrA* 遺伝子の検出を試み、*mlrA* ホモログを発見した。さらに microcystin 分解菌のうちアルカリ性環境下で生育する分解菌を単離した。この株は *Sphingopyxis* sp. C-1 株であり、これも *mlrA* オペロンを保存していることが判った。次に microcystin 分解菌の近縁種 α -プロテオバクテリア 270 種について 16SrDNA を用いた系統派生解析を実施した結果、microcystin 分解菌 6 種は共通祖先から派生する類縁種であることを明らかにした。*mlrA* 遺伝子およびそのホモログについて同様に解析した結果、*mlrA* の進化に水平伝播は関与せず、系統マーカー遺伝子と *mlrA* が microcystin を基質として共進化したことを仮定した。これを証明するために microcystin 分解菌近縁種について *mlrA* ホモログの検出を試みたが、検出できなかったので、*mlrA* 遺伝子全体の欠損と考えた。この結果は、microcystin 分解菌はその分解において、極めて特異的な *mlrA* オペロンおよびそのホモログによる類似の分解機構によって分解していることを推定した。

以上より、富栄養化の進んだ湖沼の藍藻毒性物質の分解機構に対して新規な知見を得て、水環境生態工学の発展に寄与していることが高く評価される。

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。