

氏名(本籍)	しみずかずや 清水和哉(群馬県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第5033号		
学位授与年月日	平成21年3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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Microcystin 分解菌における microcystin 分解酵素遺伝子群の転写制御に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	杉浦則夫
副査	筑波大学教授	工学博士	王碧昭
副査	筑波大学教授	博士(農学)	張振亜
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	中島敏明

論文の内容の要旨

世界各国の富栄養化した水源においてアオコが発生し様々な問題を引き起こしている。とくに、アオコを構成しているシアノバクテリアの中で強力な肝臓毒 microcystin (以下 MC) を産生するものが存在し、安全な水資源の確保においてそれらの動態把握及び対策は喫緊の課題である。この MC は環状ペプチドであるため物理化学生物学的に安定であることが知られているが、自然水域ではアオコ崩壊時になると MC が急激に分解する現象が確認されている。そのため、MC の特異的な生分解は自然水域における MC 分解の重要な現象である。実際に、MC を特異的に分解する細菌が単離されているが、自然水域においてアオコ崩壊時の MC の急激な減少のメカニズムはほとんど解明されていない。自然水域中のアオコ崩壊時の MC の急激な減少がどのような要因により引き起こされるのかを解明することは MC 動態把握に寄与するとともに安全な水資源確保に必要不可欠である。そのためこの現象を解明するうえで、MC 分解活性に MC 分解菌の MC 分解酵素遺伝子の転写制御機構に関する研究が重要となる。従って、MC 分解の MC 分解酵素発現特性、特に MC 分解に関わる遺伝子の発現特性の解析は MC 分解菌の MC 分解活性制御機構の解明につながる。

そこで、本研究では自然水域中のアオコ崩壊時の MC の急減現象の解明を目的として、初発の MC 分解に関わるとされている MC 分解酵素 MlrA の活性特性及び MC 分解酵素遺伝子 *mlrA* のプロモーター構造を調べるとともに MC 分解菌における MC 分解酵素遺伝子の発現に及ぼす MC および MC 分解生成物の影響を検討した。

まず MC 分解酵素 MlrA の活性特性を調べるために、MC 分解菌 *Sphingopyxis* sp. C-1 株の増殖期毎の MC 分解活性を測定するとともに MC 分解酵素遺伝子の発現解析を行った。その結果、MC 分解酵素遺伝子の発現量は対数増殖期初期に最大値を示したが、MC 分解活性は定常期に最大となった。この誘導期に MlrA が活性を持つためには菌体内で何らかの機構があることが考えられたので、*mlrA* のプロモーター構造を調べた。その結果、*mlrA* は負の転写制御機構が働いていることが示唆された。これらの結果からアオコ崩壊時の MC 及び MC 分解生成物が MC 分解菌の MC 分解活性の上昇に影響を及ぼしているものと推定された。そこで、MC 分解活性に及ぼす MC の影響を調べたところ、MC 分解菌は MC に応答して MC 分解活性の上昇を起こすことが証明された。さらに、MC 分解酵素遺伝子 *mlrA* の発現における MC 分解菌の各増殖期

での MC の影響を解析したところ、対数増殖後期においてのみ MC により *mlrA* の発現は誘導され制御されていることが示唆された。さらにアオコ発生時における自然水域中の MC 分解菌及び溶藻細菌と MC 産生 *Microcystis* sp. の細胞密度は正の相関関係にあることや *Microcystis* sp. 細胞が周囲に形成している粘液中に MC 分解菌や溶藻細菌が多く存在していることが報告されており、アオコ崩壊直前時には MC 分解菌は MC により *mlrA* の発現誘導を起こすのに十分な体制が整っていることが推定された。そこで詳細な解析のために、MC といくつかの MC 分解生成物の MC 分解酵素遺伝子群への発現の影響を調べたところ *mlrA* と *mlrB* は MC 及びその分解生成物によって発現誘導が引き起こされた。しかし、*mlrC* は MC にのみ応答し発現誘導が起きた。従って、*mlrA* と *mlrB* は MC の特に Adda が転写制御機構に関与し、*mlrC* では MC の環状構造が転写制御機構に関与していることが考えられた。

以上のことから、アオコ崩壊時において MC 分解菌は、細胞内外の溶藻菌により溶藻されたシアノバクテリアから溶出した MC や MC 分解菌による MC 分解生成物に反応することによって MC 分解菌が持つ MC 分解酵素遺伝子などの機能遺伝子と酵素機能の連鎖反応により MC 分解酵素活性を上昇させ、自然水域中の MC を急速に分解するものと推定できた。

審査の結果の要旨

本論文は、富栄養化湖沼において顕在化し、特に有害視されるアオコを構成するシアノバクテリアが産生する生物毒性物質 microcystin の自然水域中でアオコ崩壊時にみられる急減現象の解明を目的とした。

効果的に microcystin を分解する microcystin 分解細菌を用いて、microcystin 分解酵素遺伝子群がどのような転写制御を受けているのか基礎的研究を実施した。その結果、microcystin 初発分解酵素遺伝子 *mlrA* が負の転写制御を受けていることを解明し、microcystin 分解酵素遺伝子群が microcystin やその分解生成物に反応して mRNA 発現誘導を連鎖反動的に引き起こすと同時に酵素発現誘導を引き起こすことで急激に microcystin を分解することを発見した。

以上の知見は、自然水域中における microcystin 動態把握に極めて資する重要な知見であり、水環境生態系の理解と安全・安心な水利用技術開発に資する優れた研究であ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。