

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 デバナデラ アレン アルシアガ

ベンゼンは土壌や地下水でよく検出される汚染物質であり、発がん性を有するために大きな健康問題を引き起こす場合も多く、効率的汚染浄化が求められている。細菌の有するオキシゲナーゼによる好氣的ベンゼン分解は古くから知られているが、汚染環境が嫌氣的なことも多く、近年、ベンゼンの嫌気分解菌の単離や嫌氣的分解経路の解明が試みられてきた。それらの研究では、推定嫌氣的ベンゼン分解経路の初発反応として、トルエンへのメチル化、安息香酸へのカルボキシル化、フェノールへのヒドロキシル化の3つが提唱されていた。

Azoarcus sp. DN11 株は脱窒能を有する硝酸還元菌で、好気と嫌気の両条件下でベンゼン、トルエン、安息香酸等を分解できる。DN11 株はベンゼン汚染のバイオレメディエーションへの適用が期待されているが、ベンゼン分解経路は未解明で、分解に関わる酵素・遺伝子の情報も不十分であった。このような背景から、本研究はゲノム解析と同位体標識化合物を使った代謝能評価を通して、DN11 株のベンゼン代謝系を明らかにしようとしたもので、序論と今後の展望を含めて全5章で構成されている。

地下水汚染の現状とベンゼンの好氣的、嫌氣的分解系をまとめた序論に引き続き、第2章では、DN11 の完全長ゲノムシーケンス解析とゲノム配列データの分析により、代謝系酵素遺伝子群の存在について調べている。4,956,835 bp の完全長ゲノムを明らかにした後、一般的なアノテーションの結果において検出された分解系遺伝子を、さらに BLAST 等で詳細に調べることで、初発反応の酵素遺伝子は未解明なものの、上記の3つの嫌氣的ベンゼン分解経路の2段階目以降の代謝系が全て存在しうることが示された。また、ベンゼンの好氣的分解に関与しうる推定モノオキシゲナーゼとジオキシゲナーゼも発見されている。

続いて第3章では、 ^{13}C で標識したベンゼンの代謝中間体を GC-MS で分析することで、嫌気環境下で ^{13}C ベンゼンが ^{13}C フェノールに変換されていることを示している。合わせて、 ^{13}C トルエンや ^{13}C 安息香酸は検出されず、DN11 株がフェノールへのヒドロキシル化反応を経由してベンゼンを分解していることを明らかにしている。さらに、 ^{18}O 標識した水を与えた条件で DN11 株が嫌氣的にベンゼンを分解しても、 ^{18}O フェノールは検出されず、水酸基の酸素原子は水由来ではないことを示唆するデータも得ている。

第4章では、RNA-Seq 解析を用いて、ベンゼンと安息香酸（対照）を唯一の基質として嫌氣的に生育させた DN11 株細胞のトランスクリプトーム比較を行っている。その結果、DN11 の嫌氣的フェノール分解経路の遺伝子は、ベンゼンを分解する際に安息香酸で生育する場

合より多く発現することが示された。嫌気条件下でトルエン、あるいは安息香酸を介してベンゼンが分解する経路に関与する遺伝子の発現量は、ベンゼンで成長した細胞では低く、第3章で得られたフェノールを介する経路が働くことを支持する結果と言える。一方、嫌気的なベンゼン分解を行っている細胞で、酸素を使ってベンゼンを代謝する推定ベンゼンモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子が高発現していることも示している。

近年、いくつかの菌株で一酸化窒素ジスムターゼ (Nod) が脱窒経路により生産された 2 分子の一酸化窒素から酸素を遊離させることが報告された。硝酸を制限した培地ではベンゼン分解が検出できないことから、Nod による酸素発生が起こる可能性があるが、現段階では、DN11 株ゲノム中に当該遺伝子は見いだされていない。以上のことから、細胞で硝酸に由来して生成された酸素あるいは、培養系に微量に混入した酸素がベンゼンモノオキシゲナーゼによってフェノール生成に利用された後、嫌気的フェノール代謝系で完全分解される可能性が高いことを考察している。

第5章では、上記の結果をまとめて総合的な考察を加えると共に、今後の研究の展望について述べている。

以上、本博士論文は、ゲノムワイドな解析と緻密な代謝解析を通じて、DN11 がフェノールを介する経路で嫌気的にベンゼンを分解することを示したもので、得られた結果は、DN11 株をベンゼン汚染土壌などのバイオレメディエーションに利用するにあたっての分解能の評価手法の開発や高分解能細胞の培養条件の決定に重要な情報を与えることが期待できる。また、中間代謝物としてのフェノールの発見のみならず、Nod による酸素発生の可能性など新規な代謝反応の関与の可能性を示唆するなど、嫌気条件下でのベンゼン代謝系の全貌解明のために大きな成果を上げたと評価できる。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。