

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)	氏名	Nitisakulkan Tisana
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Studies on a novel degradation pathway of 4-chloroaniline and chemotaxis to 4-chloroaniline in <i>Pseudomonas</i> strains (<i>Pseudomonas</i> 細菌における新規4-クロロアニリン分解経路と4-クロロアニリン走化性に関する研究)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	加藤 純一	印
審査委員	教 授	山田 隆	印
審査委員	教 授	黒田 章夫	印
審査委員	准 教 授	中島田 豊	印
審査委員	チュアロンコン大学准教授	Vangnai, Alisa	印
〔論文審査の要旨〕			
<p>クロロアニリン(CA)は重要な化成品中間体であり、化学産業で大量に使用されている。また農業で多量に使用されている尿素系除草剤は土壤中で生物分解を受け、難分解性のCAを生じる。このように、産業活動及び農業活動を通じてCAの環境汚染は、特に東南アジアや東アジアの諸国で広がってきている。バイオレメディエーションは、CAで汚染された環境を修復する有効な技術であると期待されている。本研究では、CA汚染バイオレメディエーション技術開発に資する、新規なCA分解系の発見・特性化ならびにCAに集積する走化性応答の発見・特性化を目的とした。</p> <p>まず、トルエン資化性 <i>Pseudomonas putida</i> T57株が微弱ではあるが、4-クロロアニリン(4CA)分解能を有することを見出した。<i>P. putida</i> T57の4CA分解能はトルエン誘導性であることから、トルエンジオキシゲナーゼ系が関与すると推察した。トルエンジオキシゲナーゼをコードするT57の <i>todC1C2BA</i> 遺伝子を大腸菌に導入したところ、形質転換株は4CA分解活性を示したことから、トルエンジオキシゲナーゼが4CA分解を行っていることが分かった。分解産物をTLC-MSで分析した結果、4-クロロカテコールと5-クロロピロガロールが検出された。この結果から、トルエンジオキシゲナーゼは4CAの酸化的脱アミノ反応を触媒して4-クロロカテコールを生成するとともに、4-クロロカテコールをさらに酸化して5-クロロピロガロールを生成することが推察された。トルエンジオキシゲナーゼ経路の遺伝子(<i>todC1C2BADE</i>)をコードした発現プラスミドを <i>P. putida</i> T57を導入し、同株の4CA分解能の向上を図った。その結果、形質転換株は親株の250倍の4CA活性を示し、2mMの4CAを2時間で完全に分解するようになった。この形質転換株を用いて基質特異性を調べた結果、2-クロロアニリン(2CA)、3-クロロアニリン(3CA)、3,4-ジクロロアニリン(34DCA)も分解可能で、分解活性の強さは4CA>3CA>2CA>34DCAの順であった。</p>			

4CA への走化性は分解細菌を分解対象の基質(4CA)まで運ぶことから、4CA のバイオレメディエーションを加速化させることができると期待される。そこで、*Pseudomonas* 属の 4CA 走化性を測定したところ、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 が 4CA 走化性を示すことを見出した。同株の走化性センサー遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、かつて無機リン酸センサーとして見出されていた CtpL が 4CA の走化性センサーであることが分かった。4CA に化学構造が類似する芳香族化合物に対する走化性を調べたところ、CtpL はカテコールも感知し、その応答は 4CA に対するものよりも強かった。また 4CA は栄養源とならないのに対しカテコールは炭素源となるので、CtpL の本来の芳香族化合物の誘引物質はカテコールであることが推察された。

以上のように、本論文の著者は、CA の新規分解経路を発見するとともに、その経路の遺伝子を用いることで CA 分解能を育種することが可能であることを示した。さらに CA に対する走化性を見出し、その走化性センサーの特定にも成功した。この成果は、CA 汚染土壌の環境浄化技術の開発に大きく貢献すると考えられる。よって、本論文の著者は、博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。

備考 審査の要旨は、1,500 字程度とする。