

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	レイラ エルバッシ
題 目	難分解性有機硫黄化合物の微生物分解 (Microbial Degradation of Recalcitrant Organosulfur Compounds)
<p>ジベンゾチオフェン、ベンゾチアゾールのような芳香族およびチオジグリコール、スルホランのような脂肪族有機硫黄化合物は、石油や化学品産業の排水に見出されるものがあり、そのうちのいくつかは難分解性であることから、環境中、特に環境微生物による分解の挙動について把握し、分解処理のためのバイオプロセス構築が急務となっている。本論文では、微生物による芳香族/脂肪族有機硫黄化合物分解について評価し、バイオリメディエーションの可能性について検討した。</p> <p>難分解性の芳香族有機硫黄化合物として合成ゴムの加硫促進剤に使用されているベンゾチアゾール (以下 BTH) とその誘導体の微生物分解を検討した。その結果、グラム陰性細菌 <i>Pseudomonas putida</i> HKT554 株が BTH だけでなく、2-メルカプト BTH、2-メチルチオ BTH を分解変換することを明らかにした。また、GC/MS 解析から BTH が 2-(3H)-benzothiazolone/2-hydroxybenzothiazole に変換されることを明らかにした。さらに、トランスポゾン法により構築した HKT554 株の遺伝子破壊株ライブラリー約 4800 クローンを用いて BTH 分解に関わる遺伝子の解析を行ったところ、ナフトレンジオキシゲナーゼ(NDO)が検出された。これらの結果は、<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来の NDO が BTH 変換に関わっていること、BTH の芳香環ではなくチアゾール環を酸化変換することを初めて見出した報告である。本菌株は一般的な石油分解菌に認められるようなグルコースによる発現抑制などが無いという有利点を持ち、BTH 含有排水処理に十分貢献できると考えられる。</p> <p>さらに難分解性脂肪族有機硫黄化合物として「マスタードガス」として知られる化学兵器イペリットの加水分解物であるチオジグリコール (TDG) を取り上げ、微生物分解について検討した。TDG は容易にイペリットへの変換が可能であり、化学兵器禁止条約の特定物質と指定されているため、環境微生物による分解性を明らかにする必要がある。研究室保存のジベンゾチオフェンあるいは/また、ベンゾチオフェン脱硫細菌のコレクションから TDG 分解菌を探索したところ、<i>Rhodococcus</i>, <i>Gordonia</i> 属細菌のいくつかは TDG を唯一の硫黄源として生育することを見出した。最も高い TDG 分解活性を示した T09 株は、16SrRNA 配列により <i>R.jostii</i> と同定された。また、本菌は TDG を唯一の硫黄源として生育させた場合にのみ TDG 分解活性を発現することを明らかにした。本菌の TDG 生育菌体を用いて TDG の繰り返し回分分解を検討したところ、50 時間にわたって継続分解が可能であることが明らかとなった。</p> <p>以上のように、検討された HKT554 株および T09 株が、今後益々重要性が高まるとされる多様な難分解性有機硫黄化合物のバイオリメディエーションに高い可能性を示すことが明らかとなったが、今後は、プロセス条件の最適化等により実用規模での利用が可能となると考えられる。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Leila El Bassi
題 目	Microbial Degradation of Recalcitrant Organosulfur Compounds (難分解性有機硫黄化合物の微生物分解)

Organosulfur compounds (O.S.C.) include aromatic compounds such as dibenzothiophene (DBT), benzothiazole (BTH), and aliphatic compounds like thiodiglycol and sulforan, etc. These compounds appear in the petroleum polluted areas or wastewater from chemical industries. Some of these compounds are regarded as recalcitrant. Therefore, it is necessary to understand the fate of such compounds by environmental microbes and develop the process for their degradation. In this thesis, microbial degradation of aromatic and aliphatic OSCs was characterized to know the possibility of OSC bioremediation.

The biotransformation of benzothiazoles derivatives (BTHs) classified as aromatic organosulfur compounds by an axenic microbial culture was examined in this study. A Gram-negative bacterium, tentatively named as strain HKT554 and identified as *Pseudomonas putida*, was able to transform not only benzothiazole and 2-mercaptobenzothiazole but also 2-methylthiobenzothiazole, which was previously reported as the dead-end product of wastewater treatment. GC/MS analysis of the solid-phase extract of the culture broth showed the formation of 2-(3H)-benzothiazolone/2-hydroxybenzothiazole from benzothiazole. By transposon mutagenesis, a mutant library containing 4800 insertion mutants was constructed from the *P.putida* strain HKT554. Analysis of the disrupted gene from one of the mutants showing BTHs transformation deficiency revealed that the knocked-out gene was naphthalene dioxygenase (NDO). Our results also showed *Pseudomonas*-derived NDO, known to have wide substrate specificity, oxidizes the thiazole-ring, not the aromatic-ring, of BTH to form benzothiazolone/2-hydroxybenzothiazole. Along with the fact that the strain expressed NDO activity in a general medium, such as LB or glucose containing minimal medium, as shown previously, this bacterium could contribute to the BTHs containing wastewater treatment.

We also examined the degradation of an aliphatic organosulfur compound; thiodiglycol (bis (2-hydroxymethyl) sulfide, TDG), which is the hydrolysate of the Yperite, a chemical weapon known as sulfur mustard. TDG is included in the schedule list of the Chemical Weapons Convention (CWC). TDG degrading bacteria were screened from our dibenzothiophene and/or benzothiophene desulfurizing bacterial collection. Several strains belonging to the genera *Rhodococcus* and *Gordonia* were found to utilize TDG as the sole sulfur source. Among them, strain T09, re-identified as *R. jostii* from the 16SrDNA sequence analysis, showed the highest TDG degradation activity and its activity was expressed only when grown with TDG as the sole sulfur source. Repeated batch degradation of TDG could be continued for over 50h, with a slight loss of activity. Thus, in this study, we have shown that *R. jostii* T09 strain could be a potential tool to degrade TDG in both resting and growing cell state.

In conclusion, the results shown in this study has proved that 2 isolated strains have a great potential to degrade various recalcitrant O.S.Cs, and further characterization for the process optimization should contribute for the practical application of the OSC's remediation in an industrial scale.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	EL BASSI, Leila
審査委員	主査 琉球大学教授 屋 宏典
	副査 琉球大学教授 外山博英
	副査 鹿児島大学教授 徳永正雄
	副査 佐賀大学教授 神田康三
	副査 琉球大学教授 高野良
審査協力者	琉球大学准教授 松井 徹
題 目	Microbial Degradation of Recalcitrant Organosulfur Compounds (難分解性有機硫黄化合物の微生物分解)
<p>生体外異物（ゼノバイオティクス）は、生分解性が低く、生体に対する毒性を示すものが少なくないため、環境中に拡散することによる汚染が懸念されている。有機硫黄化合物にもこのような性質を持つものが多く、例えば石油に含まれるジベンゾチオフェン誘導体は燃焼により発生する酸化硫黄が酸性雨の原因となることから、微生物分解研究が盛んに行われてきた。しかしながら、難分解性有機硫黄化合物には、合成ゴム製造に使用されるベンゾチアゾール（BTH）誘導体をはじめとする芳香族有機硫黄化合物やスルフィド結合を有する脂肪族有機硫黄化合物など検討の必要な化合物が多く残されているのが現状である。本研究では、難分解性有機硫黄化合物の微生物分解の可能性を探るため、自然界から新規分解微生物を分離し、芳香族および脂肪族有機硫黄化合物の分解特性について検討を行った。</p> <p>まず、芳香族有機硫黄化合物としてBTH誘導体、特にBTHと合成ゴム生産の加硫促進剤として使用量が多いにもかかわらず微生物分解報告がほとんどない2-メルカプトBTHを含む3種類のBTH誘導体について、多環芳香族分解細菌 <i>Pseudomonas putida</i> HKT554</p>	

による分解特性を検討した。本菌は検討に使用したBTH誘導体 (BTH, 2-メルカプトBTH、2-メチルチオBTH) すべてを同様の分解速度で分解すること、分解活性の発現に特別な誘導物質を必要としないことなどを明らかにした。これらの知見は、単一の細菌による2-メルカプトBTHの分解、BTH誘導体を含む産業排水処理における最終代謝物 (dead end products) と考えられていた2-メチルチオBTHの分解を初めて示唆するものである。また、BTHの分解により量論的に変換生成される生産物の構造を明らかにするために、生産物の精製と精製物の機器分析 (GC-MS, LC-MS) 結果から、変換生成物をベンゾチアゾロンと同定した。さらに、BTH誘導体変換に関連する酵素遺伝子類を同定するためにトランスポゾンベクターを用いてHKT554株のランダムな遺伝子破壊を行い、遺伝子破壊株ライブラリー (約5000クローン) を構築した。当該ライブラリーを用いてBTH誘導体分解活性欠損株のスクリーニングを行い、欠損株の破壊遺伝子をインバースPCRあるいはTAIL PCRにより同定したところ、ナフトレンジオキシゲナーゼ遺伝子破壊株が含まれていた。この結果により、*Pseudomonas* 由来のナフトレンジオキシゲナーゼがBTH誘導体の分解変換に関与することが初めて明らかとなった。

次に、脂肪族有機硫黄化合物としてチオジグリコール (TDG) を取り上げ、微生物分解について検討した。TDGは化学兵器イペリットが水中で容易に加水分解されて生成する有機硫黄化合物であり、化学兵器禁止に関する国際条約 (Chemical Weapons Convention, CWC) において管理されるべき化合物リストに挙げられている。

TDGの微生物分解報告は、炭素骨格の分解変換に限られているため、環境中におけるTDG分解の新たな知見を得るために、TDGを唯一の硫黄源として生育する微生物の探索を行った。その結果、ベンゾチオフェンを硫黄源として生育する放線菌T09株を含む数株がTDGを分解することを見出した。T09株は16SrRNA配列から *Rhodococcus jostii* と同定されること、無機硫黄化合物生育菌体では分解活性を発現せず、TDGを硫黄源とした場合にのみ活性が誘導発現されることを明らかにした。さらに、TDG分解活性を発現する条件を検討し、TDGの逐次添加による繰り返し分解を試みたところ、60時間以上、8回にわたる繰り返し分解に成功した。

以上の結果は、これまで不十分であった有機硫黄化合物の微生物分解に関する秀逸な基礎的知見を提供するものであり、有機硫黄化合物のみならずゼノバイオティクスの微生物分解さらには環境浄化に大きく貢献することが期待できる。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	EL BASSI, Leila
審査委員	主査 琉球大学教授 屋 宏典
	副査 琉球大学教授 外山博英
	副査 鹿児島大学教授 徳永正雄
	副査 佐賀大学教授 神田康三
	副査 琉球大学教授 高野良
審査協力者	琉球大学准教授 松井 徹
実施年月日	平成23年 1月 13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成23年1月13日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	EL BASSI, Leila
<p>[質問1]分解反応においてベンゾチオフエンは容易に細胞内に取り込まれるのか？ [回答1]ベンゾチオフエンは細胞内へ容易に取り込まれて細胞内酵素により分解されていると考えている。</p> <p>[質問2]遺伝子破壊株の破壊された遺伝子の解析のステップを具体的に説明して欲しい。 [回答2]トランスポゾン遺伝子マーカー周辺の遺伝子増幅はインバースPCRで行い、増幅できなかった場合はTAIL PCRにより増幅した。塩基配列の解析は増幅DNAを直接シーケンスし、解析できなかった場合はTAクローニング後、ベクタープライマーによりシーケンスした。</p> <p>[質問3]TAIL PCRでは2回PCRしているが、通常は3回ではないのか？ [回答3]文献を検索すると2回PCRしているプロトコールと3回PCRしているものと両方報告されている。私の菌株の場合は2回PCRで明確なバンドが増幅された。</p> <p>[質問4]NDO反応に関与する補酵素をNADとしているが、NADPでは反応しないのか？ [回答4]PseudomonasのNDOは、広く知られており、文献の記述からNADとした。実際には検討していない。</p> <p>[質問5]BTH以外の基質（メルカプトBTH, メチルチオBTH）からの変換生成物は検出されなかったのか？ [回答5]自分が行ったHPLC条件ではBTHを基質とした場合にのみ生成物が認められ、他の基質では検出されなかった。</p> <p>[質問6]（上記に関連して）分解活性の消失した遺伝子破壊株を使用した場合に分解反応のヒントとなる生成物が検出される可能性があると考えられるが、検討したか？ [回答6]検討していないが、ご指摘の通りだと思います。</p> <p>[質問7]BTH分解反応での基質濃度はなぜ、0.1mMと設定したのか？基質は反応液に溶解しているか？ [回答7]高濃度での反応阻害を引き起こさない濃度という点で0.1mMとした。この条件では基質、生成物とも反応液に溶解している。</p> <p>[質問8]NDOは膜結合型、細胞質内酵素のいずれか？ [回答8]後者である。</p> <p>[質問9]酸化反応の酸素はどこから供給しているのか？ [回答9]オキシゲナーゼ反応なので空気中の分子上酸素が分解反応に関与している振盪培養による空気中からの酸素が、培地中に溶解し供給されている。</p> <p>[質問10]休止菌体反応でグルコースを添加しているのはなぜか？ [回答10]補酵素が関与しているために、細胞内の補酵素（還元型）が消費されると反応は停止してしまう。細胞内で生成した酸化型補酵素を還元型にリサイクルするための酵素（例えばグルコースデヒドロゲナーゼ）反応をするために基質のグルコースを添加している。</p>	