



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Gene cloning and functional analysis of triple alkane monooxygenases from <i>Geobacillus thermoleovorans</i> B23 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Boonmak, Chanita
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11349号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55458
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Chanita_Boonmak_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

生物圏科学専攻：博士（環境科学）

氏 名 Boonmak Chanita

審査委員	主査	教 授	森 川 正 章
	副査	教 授	福 井 学
	副査	助 教	小 島 久 弥
	副査	特任助教	三 輪 京 子

学 位 論 文 題 名

Gene cloning and functional analysis of triple alkane monooxygenases from *Geobacillus thermoleovorans* B23

(*Geobacillus thermoleovorans* B23の三連型アルカン酸素添加酵素に関する
遺伝子クローニングと機能解析)

即効性のある環境保全対策のひとつとして、有害な化学汚染物質の浄化技術開発は不可欠である。ここで生物作用を利用するいわゆる生物環境修復技術は省エネかつ環境への負荷が少ない技術として注目されている。原油は油田採掘から輸送の過程において大規模な漏出事故が起こりやすく、これまでも多くの環境汚染を引き起こしてきた。この漏出原油汚染浄化に有効な生物がアルカン分解微生物群であり、その生理生態を理解することは生物環境修復技術開発の重要な科学基盤となる。

1895年にわが国の植物学者 三好 学によって、ブドウ果実表皮のパラフィンを分解するカビが発見されて以来、さまざまな環境からアルカン分解微生物が見つかった。 *Geobacillus thermoleovorans* B23 は、新潟県の深度地下油田から発見した高度好熱性アルカン分解細菌である。本細菌のユニークな特徴は 70℃という高温において炭素数11から32程度までの広範囲にわたる鎖長のアルカンを分解できることである。本論文では、B23株の新規アルカン分解機構を解明することを目的として実施した研究についてまとめている。

まず第一章において本研究の背景とその意義について述べた後、B23株のほぼ全長ゲノム (3.35Mb) の塩基配列の決定およびその解析について論じている。具体的な成果として、3,349個のタンパク質コード遺伝子を見出した。GC含量は52.3%であった。さらにこれらを同属近縁種でアルカン非分解細菌のゲノム配列と詳細に比較することによって、B23株ゲノムに固有の 11.8Kb 領域内にフラビン依存性 LadA 型のアルカン分解遺伝子（アルカン酸素添加酵素遺伝子）が3つ連続(三連)して存在すること（それぞれ *ladAαB23*, *ladAβB23*, *ladBB23*と命名）を見出した。また、その酵素活性発現に不可欠なフラビンモノヌクレオチド還元酵素遺伝子も同じ領域内に見出すことに成功した。次に、*Geobacillus*属 細菌群におけるアルカン分解遺伝子群の多様性を系統解析した結果、鉄依存性 AlkB 型遺伝子とフラビン依存性 LadA 型遺伝子の分布は種を問わず広く分布していることおよび両者が重複して保有されないを発見した。

第二章ではこれらの遺伝子の機能を確認するために、それぞれの遺伝子を発現ベクターにクローニング後、アルカン分解活性を有さない常温性細菌 *Pseudomonas fluorescens* KOB2Δ1 に移入している。KOB2Δ1は70℃で生育できないため、通常生育温度の30℃と最高生育温度である 35℃において各遺伝子の発現ならびに活性を比較評価した。その結果、*ladAαB23*, *ladAβB23*, *ladBB23* を保有する KOB2Δ1組換え株はいずれも、より高温環境の 35℃において明確なアルカン分解活性を獲得していた。これは各遺伝子が好熱菌由来であることと矛盾しない。さらに、それぞれの遺伝子組換え体が分解できるアルカン鎖長（炭素数12から23）について調べたところ、いずれも全ての鎖長のアルカンを分解したことから、*ladAαB23*, *ladAβB23*, *ladBB23* 遺伝子が基質となるアルカンの鎖長ごとに役割を分担している訳ではないことが示唆された。ただし、これは反応温度が 70℃ではなく 35℃であることに起因するのかもしれない。さらに興味深いことに、これら3種類の遺伝子のなかでは、既知のプラスミド性 *ladA* とは進化系統的に遠縁の *ladBB23* が最も高い活性を有していることを発見しており、これら3つの遺伝子群の系統関係や発生の順位などについて今後の研究成果が期待される。

第三章では B23株と同属である高度好熱性アルカン非分解細菌 *Geobacillus kaustophilus* MK93 における異種遺伝子発現の試みについて記述している。

以上、本論文では、これまでプラスミド性遺伝子としてしか報告のなかったフラビン依存性 *LadA* 型のアルカン酸素添加酵素遺伝子が機能を持った状態で一つの細胞のゲノム内に三連で存在することを初めて明らかにし、当該遺伝子の進化過程の推定に重要な知見をもたらした。また、高度好熱性 *Geobacillus*属細菌群において従来型の鉄依存性 *AlkB* 型遺伝子と同程度に広く分布することも実証した。これらの成果は、深度地下 1,000~2,000mに棲息する極限環境微生物のアルカン分解遺伝子群の分布多様性と進化過程ならびにその機能を明らかにしただけではなく、長鎖アルカンを多く含む難分解性化学物質である漏出原油に対する生物環境修復技術基盤の開発にも貢献するものである。

審査委員一同はこれらの成果を高く評価すると共に、大学院博士課程における研鑽や修得単位状況、さらには本論文以外にも複数の原著論文を書き上げている業績などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。