

学位被授与者氏名	下條 光浩 (Mitsuhiro Shimojo)
学位の名称	博士 (工学)
学位番号	博 (一) 第 2 5 号
学位授与年月日	平成 2 3 年 3 月 2 0 日
論文題目	新規 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸分解菌の分解酵素遺伝子の解析とバイオセンシングへの応用に関する研究
論文題目 (英訳または和訳)	Analysis of genes encoding degrading enzyme of novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-dissimilating bacteria and their application to biosensing
論文審査委員	論文審査委員会 委員主査 : 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 川上 満泰 同審査委員: 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 呉 行正 同審査委員: 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 三田 肇 同審査委員: 福岡工業大学大学院知能情報システム工学専攻教授 赤木 文男
論文審査機関	福岡工業大学大学院工学研究科
論文内容の要旨 (和文)	<p>2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)は化学合成により製造され、除草剤として世界中で広く使用されてきた。また、環境中では微生物による分解を受けることやダイオキシンなどの毒性の強い化合物と構造が似ていることから、環境汚染物質の微生物分解のモデル化合物として研究されてきた。</p> <p>本研究では、土壌中の 2,4-D 分解菌の挙動を調べるため 2,4-D 分解菌の分離と特徴付けを行った。そして、2,4-D 分解菌による 2,4-D 分解に関わる酵素遺伝子のクローニングと解析を行い、さらに迅速な測定技術の開発を目的として 2,4-D 分解菌を用いたセンサシステムの開発を行った。</p> <p>第一章では、本研究の背景とその目的について、これまでに報告された 2,4-D 分解菌の特徴や、バイオセンサの応用について述べた。</p> <p>第二章では、2,4-D 分解菌の分離と特徴付けについて述べた。様々な環境の土壌試料を用意し、2,4-D を唯一の炭素源とする培養液に土壌試料を適量加え集積培養を行った。その結果、11 種の 2,4-D 分解菌を分離した。観察の結果、全てグラム陰性の桿菌であることが分かった。次に、16S rRNA 遺伝子の部分的な塩基配列を遺伝子データベースと比較することで菌種を同定した。その結果、<i>Ralstonia</i> 属 4 種、<i>Variovorax</i> 属 1 種、<i>Sphingomonas</i> 属 5 種、<i>Bradyrhizobium</i> 属 1 種に分類されることが分かった。生化学的特性を調べた結果、同属であっても糖の代謝経路や酵素生産が違っていたことが分かった。</p> <p>第三章では、2,4-D 分解に関わる酵素遺伝子のクローニングと解析について述べた。本章では、他の菌とは特徴の異なる <i>Sphingomonas</i> sp. 58-1 株を使用した。はじめに 58-1 株の分子系統的解析を行ったところ、<i>Sphingomonas agrestis</i> と同定された。次に、本菌株から 2,4-D 分解酵素遺伝子をサザンハイブリダイゼーション法によりクローニングすることを試みた。その結果、<i>cadA</i> 遺伝子の一部を含むと思われる約 5 Kbp の DNA 断片をクローニングすることができた。この DNA 断片は 3 つのタンパク質 (ORF1,2,3) をコードする遺伝子群を含んでいた。この DNA 断片を用いて <i>Escherichia coli</i> DH5 α 株による発現を試みたところ、2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP)変換活性が示された。また、DNA 断片中の種々の制限酵素サイトを消化後、サブクローニングすることで様々なプラスミドを構築した。その結果、2,4-DCP 変換活性には ORF2,3 が必須であることが確認された。塩基配列の相同性や、酵素機能の解析の結果から、58-1 株からクローニングした ORF2,3 を 58-1 株の <i>cadA</i>,B と結論付けた。</p> <p>第四章では、2,4-D 分解菌を用いた 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸センサシステムの開発について述べた。分離した菌の中で最も成長速度が速く、分解活性が高い <i>Ralstonia</i> sp. 57-1 株を固定化した担体粒子を充填した固定床型反応器とチロシナーゼ修飾電極からなる新規なバイオセンサシステムを作成した。このセンサシステムは、57-1 株の 2,4-D 分解による初期分解生成物である 2,4-DCP 及び 3,5-ジクロロカテコール、或いはその両方をチロシナーゼ電極によって検知することにより、2,4-D 量を本センサシステムで評価できることを明らかにした。</p> <p>第五章では本論文の主要な結果を要約する。</p>
論文内容の要旨 (英文)	Having been produced by chemical synthesis since around the 1940's, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has been used as herbicide across the world. It

has also been studied as a model compound for microbial degradation of environmental pollutants, since it undergoes environmental degradation by microbes and its structure is similar to that of highly toxic compounds such as dioxin. In the present thesis, novel 2, 4-D degrading bacteria have been isolated and characterized to examine the behavior of 2, 4-D degrading bacteria in soil. Then, cloning and analyzing enzyme genes responsible for 2, 4-D degradation has been achieved. In addition, a biosensing system based on 2, 4-D degrading bacteria has been developed with the aim of development of rapid measurement technology.

In Chapter 1, characteristics of 2, 4-D degrading bacteria ever reported as well as application of biosensor are described in relation to the background and purpose of the present study.

In Chapter 2, isolation and characterization of 2, 4-D degrading bacteria are described. Soil sample was collected from a variety of environments in Northern Kyushu. Adding a proper amount of soil sample into a medium containing 2, 4-D as the sole carbon source, enrichment culture was carried out. As the result, 11 kinds of 2, 4-D degrading bacteria were isolated, and they could be classified into 4 kinds of *Ralstonia* bacteria, a kind of *Variovorax* bacterium, 5 kinds of *Sphingomonas* bacteria and a kind of *Bradyrhizobium*.

In Chapter 3, cloning and analysis of enzyme gene involved in 2, 4-D degradation by degrading bacteria are described. From among degrading bacteria isolated in Chapter 2, *Sphingomonas* sp. 58-1 strain having characteristics different from other bacteria was employed as a conspicuous degrading bacteria. DNA fragment of approximately 5 Kbp which was supposed to contain a part of *cadA* gene could be cloned by southern hybridization method. The DNA fragment was found to contain set of genes encoding three kinds of proteins (ORF1, 2, and 3). In an attempt of expression by *Escherichia coli* DH5 α strain, converting activity of 2, 4-D to 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP) was observed. Further, by carrying out sub-cloning, it has been confirmed that ORF2 and 3 are essential for converting activity of 2, 4-D. ORF2 and 3 have been concluded to be *cadA* and B of the strain judging from sequence homology and the result of enzymatic function analysis.

In Chapter 4, development of 2, 4-D biosensor system based on 2, 4-D degrading bacteria is described. A novel biosensor system has been constructed with tyrosinase-modified electrode and a fixed bed reactor filled with carrier particles on which *Ralstonia* sp. 57-1 strains with highest growth rate and degradation activity among isolated bacteria were immobilized. The sensor system has proven its ability to evaluate amount of 2, 4-D by detecting the intermediate during 2, 4-D degradation, i.e. 2, 4-DCP or 3, 5-dichlorocatechol or both of them using tyrosinase electrode.

In Chapter 5, main results of the study are summarized.

論文審査結果

この論文は、除草剤や果実の早期落下防止剤としてこれまで世界中で広く使用されてきた 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を、環境汚染物質の微生物分解のモデル化合物として取り上げ、2,4-D 分解菌の分離と特徴付け、分解酵素遺伝子の解析ならびにバイオセンシングへの応用についての研究をまとめたものである。

第1章で、本研究の背景とその目的について述べたのち、第2章では、まず福岡県内の田畑や有機化学工場内の敷地など約 50 箇所から土壌サンプルを採取し、分解菌の分離・同定を試みている。その結果、*Ralstonia* 属 4 種、*Variovorax* 属 1 種、*Sphingomonas* 属 5 種、*Bradyrhizobium* 属 1 種の計 11 種の 2,4-D 分解菌を分離し、分解特性や生化学的特性などの特徴付けを行っている。第3章では、前章で分離した分解菌の一つである *Sphingomonas* sp. 58-1 株を使用し、2,4-D 分解に関わる酵素遺伝子のクローニングと解析について述べている。その結果、サザンハイブリダイゼーション法によりクローニングした分解酵素遺伝子の一部を含むと思われる約 5 kbp の DNA 断片が、3 つのタンパク質をコードする遺伝子群 (ORF1、2、3) を含んでいること、また、2,4-D 分解過程の初発反応である 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) 変換活性には ORF2、3 が必須であることなどを見出し、ORF2、3 を 58-1 株の *cadA*、B 遺伝子と結論付けている。2,4-D 分

	<p>解菌は、一般にクラスⅠ～Ⅲに分類されるが、ここで得られた知見は、これまでほとんど研究されていなかったクラスⅡに属する 2,4-D 分解菌の分解酵素遺伝子に関してその種類や機能をはじめて明らかにしたものといえる。第4章では、分離した菌の中で最も増殖速度が速く、分解活性の高かった <i>Ralstonia</i> sp. 57-1 株を用いた 2,4-D センサシステムの開発について述べている。本センサシステムは、この菌株を固定化した担体粒子を充填した固定床型反応器とチロシナーゼ修飾電極からなっており、2,4-D 分解による初期代謝産物である 2,4-DCP 及び 3,5-ジクロロカテコール、或いはその両方をチロシナーゼ電極によって検知することにより、溶液中の 2,4-D 濃度を評価するものである。このように微生物による代謝産物を検知するタイプのセンサはまだ報告例がなく、微生物のセンシング素子としての新しい利用方法を提示するものといえる。第5章では本論文の主要な結果の要約と今後の研究指針を述べている。</p> <p>以上の研究成果は、学術著書 1 編（第 1 著者 1 編）、査読付き論文 2 編（第 1 著者 1 編）、紀要等 3 編（第 1 著者 1 編）、学会発表(国内)29 件として公表されている。</p> <p>以上より、学位論文審査委員会は、この論文が学位論文として適切な内容であると判断した。</p> <p>学位論文公聴会は 2023 年 2 月 17 日 16 時 30 分より約 25 名の参加者のもとで開催された。公聴会においては、副査を含む教員から論文内容に関連する種々の工学的及び技術的な質問が 10 件ほどあったが、いずれも適切な回答を行うことができた。</p> <p>予備審査ならびに最終試験においては、学位論文に関連する分野の学識を有し、今後研究を進めていくための研究能力を備えていることを確認した。また第 1 著者として査読付き論文や学術著書を執筆していることから、英語論文作成能力も十分に備えていると判断した。</p> <p>以上の結果から、学位審査委員会はこの論文が博士（工学）の学位に適格であると判定した。</p>
<p>主な研究業績</p>	<p>参考論文 6 編 1 冊</p> <p>(著書)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Flow injection biosensor system for 2,4-dichlorophenoxyacetate based on a microbial reactor and tyrosinase-modified electrode. In“Biosensors for Health, Environment and Biosecurity/ Book 3”, ISBN:978-953-307-444-3, Intech(2011), accepted.Authors : Mitsuhiro Shimojo, Kei Amada, Hidekazu Koya, Mitsuyasu Kawakami. <p>(査読付き論文)</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Analysis of genes encoding the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading enzyme from <i>Spingomonas agrestis</i> 58-1, <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i>, Vol.108, No.1, pp.56-59(2009) Authors: Mitsuhiro Shimojo, Mitsuyasu Kawakami, Kei Amada. 3. Amperometric 2,4-dichlorophenoxyacetate biosensor system based on a microbial reactor and a tyrosinase-modified electrode, <i>Analytical Letters</i>, Vol.40, No.5, pp.921-932(2007) Authors : Mitsuyasu Kawakami, Hidekazu Koya, Kei Amada, Mitsuhiro Shimojo. <p>(紀要等)</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. <i>Spingomonas</i> sp.由来 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸分解酵素遺伝子の解析, 福岡工業大学環境科学研究所所報, 1 巻, pp.19-24(2007) 著者: 下條 光浩, 柳 里恵, 川上 満泰, 天田 啓. 5. 土壌細菌を用いたハロゲン化芳香族化合物の分解・除去, 福岡工業大学エレクトロニクス研究所所報, 23 巻, pp.51-53(2006) 著者: 天田 啓, 下條 光浩, 柳 里恵, 川上 満泰. 6. 土壌細菌による環境汚染物質の分解, 福岡工業大学エレクトロニクス研究所所報, 21 巻, pp.23-28 (2004) 著者: 天田 啓, 下條 光浩, 比嘉 高之, 川上 満泰.