

環境分子科学研究

Ecomolecular Science Research

代表研究者 土 肥 義 治

(高分子化学研究室)

1. 環境分子の材料変換に関する研究

研究担当者：土肥義治，田口精一，阿部英喜，岩田忠久（高分子化学研）；伊藤幸成（細胞制御化学研）；仲村高志（分子構造解析室）

PHA ポリエステル生合成経路にリンクするモノマー供給系酵素 2 種類（脂肪酸分解に関与する PhaJ と脂肪酸合成に関与する PhaG）について重点的に機能解析した。PhaJ は、高分解能で X 線結晶構造解析に成功した。その情報をもとに部位指定変異実験から活性重要残基を同定できた。同時に基質特異性に関わる残基の推定も行い、ポリエステルの共重合組成をコントロールするための変異体作製の設計指針を得た。また PhaG 遺伝子を、重合酵素遺伝子と共に *Ralstonia eutropha* の PHA 変異株に導入したところ、再生可能な糖を炭素源として高性能共重合ポリエステルを生産することを見いだした。

さらに、様々な生分解性脂肪族ポリエステルの単結晶を生成するとともに、その結晶構造と表面構造を透過型電子顕微鏡・原子間力顕微鏡を用いて解析した。また、配向結晶性フィルムや単結晶マットを作成し、X 線回折により三次元構造の解析を行うと共に、コンピュータを用いたエネルギー計算により、高分子鎖の安定構造と折れ曲がり構造の解析を行った。単結晶の酵素分解様式の解明に関しては、原子間力顕微鏡を用いた直接観察により、透過型電子顕微鏡を用いた従来の結果に加え、新たな知見を得ることに成功した。コンピュータを用いた解析では、分子動力学シミュレーション法による高分子鎖と水の相互作用を解析する研究にも着手した。

また、生分解性脂肪族ポリエステルの固体構造形態の 1 つであるラメラ結晶の成長機構について検討を行った。ポリエチレンサクシネートおよびその共重合体、ポリ乳酸について、ラメラ結晶の成長速度の測定と速度論解析を行い、ラメラ結晶の成長様式とその結晶形態との相関を解明した。また、温度制御型原子間力顕微鏡を用いた観察により、ポリ乳酸のラメラ結晶の成長様式を直接観察することに成功した。さらに、生分解性脂肪族ポリエステルとポリエステル加水分解酵素との反応を速度論的に解析するための新しい手法として、水晶発振子マイクロバランス法の確立に着手し、ポリエステルフィルム表面への酵素の吸着反応をナノグラムオーダーで解析できるシステムを構築した。

2. 環境分子の生体変換に関する研究

(1) 芳香族系環境汚染化学物質の微生物分解に関する研究

研究担当者：工藤俊章，飯田敏也，堀之内正枝^{*1}，田口勝彦^{*2}，林 敏明^{*2}，小林祥之^{*3}，山本貴子^{*3}，本山正樹^{*3}，中村 薫^{*4}，向坂由貴^{*4}（微生物学研）

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）として悪影響が指

摘されている物質など、生態系に重大な影響を与える物質について、その分解微生物に関する基礎研究を推進する。微生物による難分解性物質の分解メカニズムを解明し、遺伝子組換え等の技術を用いて、より効率的に分解できる微生物の育種を試みる。

重大な環境汚染問題としてその対策が急がれているダイオキシン類について、汚染環境の微生物を利用した浄化修復を目指し、分解微生物の多様性や生態学的機能、およびそれらの分解関与遺伝子群の構造、機能、進化に関する研究を進めている。ダイオキシン類の骨格化合物の分解能を有する多様な細菌を自然界より単離した。ジベンゾフラン分解菌の一株について代謝経路等の解析を行い、分解関与遺伝子群が放線菌の間で水平伝播により広がっていることを示唆する興味深い事実を見いだした。また、PCB 分解性 *Rhodococcus* 属細菌より、従来知られているものとは異なる進化の道筋をたどってきたと思われる、新規なピフェニル分解関与遺伝子群を取得した。動物し尿排水などには、多くのステロイドホルモン類が含まれ、それらによる内分泌攪乱作用も無視できない問題である。主要な男性ホルモンであるテストステロンの微生物分解経路の解明を目指し、*Comamonas* 属細菌による代謝経路および代謝関与遺伝子群を解析した。また、*Rhodococcus* 属細菌においても類似の代謝経路であることを示し、テストステロン誘導性のメタ開裂酵素遺伝子を解析した。

(2) 環境汚染化学物質の代謝・分解における微生物-植物複合系利用に関する研究

研究担当者：本山高幸，山口 勇（微生物制御研）

微生物-植物複合系を利用して、内分泌攪乱作用などの毒性を示す化学物質や残留性農薬等の有害環境分子をコントロールすることを目的とする。

トマトおよび、トマト根圏への定着能を持つ *F. oxysporum* との複合系を用いたバイオレメディエーション系の構築を行った。PCP 分解系の第一段階の酵素の遺伝子 (*pcpB*) を PCP 資化菌 *Sphingomonas chlorophenolica* 株からクローニングした。そして、糸状菌発現ベクターに導入し、*F. oxysporum* に形質転換した。なお、共生能も同時にみるために GFP 発現用ベクターも同時に導入した。取得した形質転換体の PCP 分解能をみたところ、形質転換体は最大で 70% 程度 PCP を分解していた。更に、形質転換体とトマトとの複合系による PCP 代謝実験を行ったところ約 40% の PCP を代謝することが可能であり、形質転換体のみの灌注よりも更に効果的に PCP を代謝できた。また、蛍光顕微鏡による観察では、トマト根面および根の付近の土壌において GFP の蛍光により菌株を観察することができた。また、形質転換体は、形質転換体を接種したトマト根圏において高頻度で再分離された。よって、形質転換体もトマト根圏にお

いて安定した定着能を有すると考えられた。以上のように、トマトとトマト根圏糸状菌 *F. oxysporum* の複合系はバイオレメディエーションに有効であることが明らかとなった。

(3) 内分泌攪乱作用の検定法の開発

研究担当者：高月 昭，室井 誠（動物・細胞システム研）；有本 裕，山口 勇（微生物制御研）

多くの化学物質の内分泌攪乱作用の因果関係を明らかにするためには内分泌攪乱作用の検定法の確立が望まれる。そこで魚類を用いた検定法の開発を行った。内分泌攪乱作用の多くが魚類を含めた水棲生物に観察されることも、魚類を用いる検定系の妥当性を支持すると考えられる。色々検討を加え、孵化の確実性，成熟魚体長，テリトリー意識，雌雄判別，成熟期間などを考慮して，*Poecilia reticulata* var. が適当であると結論した。検討する化学物質としては，主に内分泌攪乱作用との関連で環境庁がリストアップした化学薬品のうち，農薬を対象とした。内分泌攪乱作用が知られている化合物 Diethylstilbestrol を対照とし，Benomyl，Maneb，Zineb，Carpropamid，Probenazole，Imidacloprid，Glyphosate，Quintozene，Fenitrothion，Simazine 等の検討を行った結果，数種の化合物について生殖能の欠如が見られたので，その再現性並びに今後その生殖異常の機構について検討している。

^{*1} 基礎科学特別研究員，^{*2} 協力研究員，^{*3} 研修生（東洋大大学院），^{*4} 研修生

3. 環境分子の化学変換に関する研究

研究担当者：若槻康雄，俣 召民，三瀬孝也，鈴木教之，大沢正久，中島隆之^{*1}（有機金属化学研）；星野幹雄（有機合成化学研）；千原貞次（化学分析室）

(1) 異種金属多核クラスター錯体の合成法開発と SO₂ ガス分子の固定

複数個の金属原子で構成される有機金属クラスターは固体金属超微粒子の分子性モデルと見なすことができる。昨年度に引き続き合金微粒子触媒モデルとして環境汚染ガス分子の反応に供することを目的として，新しい異種金属クラスターの合成法開発を行った。比較的簡単な方法でルテニウム多核クラスターで他の金属クラスターを挟んだサンドイッチ型多核合金クラスター錯体の効率的合成，特に 3 種類の金属種を含む錯体合成に成功し，X-線解析による構造決定を行った。また，ルテニウムクラスターを金属酸化物に担持した後，還元して微粒子化することによりヘテロ触媒を作成し，SO₂ ガスの水素または一酸化炭素による還元反応を検討した。従来のルテニウム塩から作成する金属微粒子に比べ，特に低温領域で極めて高い活性を示すことが明らかとなった。

(2) 可視光感性性多金属中心錯体の合成

可視光を効率よく吸収し，そのエネルギーを分子内チャネルを通して反応活性サイトに供給することのできる多金属錯体のデザインと基本部分の合成を行った。可視光吸収部位としてポリピリジンルテニウム錯体を，エネルギー伝達チャネルとしてエチニレンおよびフェニレンなどの剛直な骨格を持つ錯体を合成し，活性サイトに種々の金属種を入れて，ルテニウムの MLCT 三重項からの消光効率を検討した結果，伝達距離が長くなる程，伝達効率は減少する

ものの，エチニレンの効果による可視光吸収係数の増大と光感応部位の絶対数が重要であり，結果的に分岐型のデンドリマー錯体が極めて有効であることを明らかにした。

^{*1} 基礎科学特別研究員

4. 環境分子の光合成変換に関する研究

(1) らん藻によるバイオポリエステル生産のための代謝工学

研究担当者：土肥義治，山下宏一，田口一徳，平石知裕，Sudesh K.^{*1}，柘植丈治^{*1}，前原 晃^{*1}，中江純子^{*2}，松本謙一郎^{*3}（高分子化学研）

様々なポリエステル生産微生物からポリエステル生合成系遺伝子を取得，解析を行うとともに，光合成微生物にこれら有用遺伝子を導入することにより，二酸化炭素から，良好な物性をもつポリエステルを効率的に生産する光合成微生物（らん藻）の分子育種を試みる。

効率的ポリエステル生産には，ポリエステル重合酵素の基質となる (R)-3-ヒドロキシシアシル-補酵素 (CoA) (3HA-CoA) を供給する酵素が必要となる。2 種のポリエステル生産細菌 (*Pseudomonas* sp. 61-3, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1) より，脂肪酸代謝経路の中間体から 3HA-CoA を供給するための代謝酵素遺伝子 (*phaG*, *phaJ*) を取得し，解析を行った。さらに，*phaG* 遺伝子を他の細菌 (*Ralstonia eutropha*) へ遺伝子導入することにより，遺伝子組換え微生物を育種し，(R)-3-ヒドロキシブタン酸と (R)-3-ヒドロキシアリカン酸との共重合ポリエステルを生産し，その物性を調べた。また，らん藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803) にこの代謝酵素遺伝子とポリエステル重合酵素遺伝子とを導入した株を構築し，ポリエステル生産を検討した。*phaJ* 遺伝子については，部位特異的変異を施し，その PhaJ 酵素の活性に関与するアミノ酸残基の検討を行った。

(2) ポリエステル生産植物の分子育種

研究担当者：土肥義治（高分子化学研）；山口 勇，鈴木義勝，仲下英雄，小林裕美子，清水俊行，新井祐子^{*3}，蔵野 実^{*4}（微生物制御研）

植物ペルオキシソーム中に存在する 3-ヒドロキシアリカン酸エピメラーゼ活性を利用し，共重合ポリエステルの植物生産系を構築した。ポリエステル生産細菌 *Aeromonas caviae* 由来 PHA 合成酵素をペルオキシソームに局在するようにベクターを構築し，アグロバクテリウム法によりタバコ (*Nicotiana tabacum*) およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入した。得られた遺伝子組換え植物は，炭素数 4~6 の (R)-3-ヒドロキシアリカン酸からなる共重合ポリエステルを合成・蓄積した。

次に，新たなポリエステル生産法として，葉緑体ゲノムが原核型の構造をしていることを利用した物質生産システムの構築を試みた。ポリエステル生産細菌 *Ralstonia eutropha* 由来の *phbA*, *phbB*, *phbC* 遺伝子群からなる *phb* オペロンをタバコ葉緑体に導入した。本来のバクテリア由来のオペロンおよび各導入遺伝子のリボソーム結合部位をタバコ葉緑体遺伝子由来に変更したオペロンのどちらにおいても，得られた形質転換体は PHB を合成・蓄積した。遺伝子の導入および発現は分子生物学的手法によっても確認され，原核型オペロンの導入にとって植物の代謝系を改良すること

に成功したことが示された。導入したオペロンは、すべての葉緑体ゲノムには挿入されなかったが、自殖後代においても安定に保持されていた。

また、これらポリエステル生産植物から培養細胞系を構築し、オーキシン類およびショ糖濃度が PHB 生産に与え

る影響について検討した。

^{*1} 基礎科学特別研究員, ^{*2} 訪問研究員, ^{*3} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*4} 研修生

計算科学技術研究

Computational Science and Engineering

代表研究者 牧野内昭武

(素形材工学研究室)

1. 地球シミュレータ用並列ソフトウェア開発

研究担当者: 姫野龍太郎 (情報環境室); Xing H. ^{*1}, 宮村倫司 ^{*2}, 金井 崇 ^{*3}, 阪口 秀 ^{*3}, 荒川貴道 ^{*4} (素形材工学研)

地球シミュレータは、大気・海洋および固体地球分野における複雑な諸現象の解明を目指して、大規模超高速シミュレーションのための並列計算機および並列計算用ソフトウェアの研究開発を行う科学技術庁のプロジェクトである。理研は、このうち、固体地球分野のソフトウェア開発を担当しており、プレート運動に伴う地殻の変動、断層へのひずみの集積、それに起因する断層の動的なすべりと地震の発生、地震波の伝播という一連の現象を、そのまま通して大規模計算を行うためのソフトウェアの研究開発を行っている。これにより、大域的な地震の発生予測と、地震発生後の、局地的な地震波の伝播予測を目指すものである。

本年度は次のような開発を行った。(1) モデリング、メッシュジェネレーション、並列計算のための領域分割、有限要素法解析、可視化を通して行うためのトータルなシステム。(2) 静解析有限要素法と、動解析有限要素法プログラムへの、プレート境界面および断層面における、すべり依存摩擦構成則や、速度および状態依存摩擦構成則を扱うための機能の導入。(3) シミュレーションの出発点となる日本列島近辺の三次元地殻構造モデルを構築するための地殻 CAD。地殻構造データベース作成のための専用インターフェース、三次元ソリッドモデルを作成するための CAD 機能、それをメッシュジェネレータに渡すためのインターフェース。

^{*1} 協力研究員, ^{*2} 研究協力員, ^{*3} 共同研究員, ^{*4} 研修生 (埼玉大学院)

バイオアーキテクト研究

Bioarchitect Research Project

代表研究者 中野明彦

(バイオアーキテクト研究推進グループ)

1. 構築原理研究

(1) アポトーシス執行タンパク質の機能とその制御

研究担当者: 森島信裕 (遺伝生化学研)

生体内でのアポトーシス制御について調べるため、生体内でのカスパーゼ活性化検出系の構築を目指した。カスパーゼ-9 によって切断されたピメンチンのみを特異的に認識する抗体を作製し、これを用いてカスパーゼ-9 活性化の検出に成功した。分子シャペロンの未知機能解明のため、生化学的な解析を行った。ミトコンドリア HSP70 が従来知られているのとは異なる結合様式で特定の酵素に結合し、その特性を変換させていることを明らかにした。

(2) ミトコンドリア遺伝の原理

研究担当者: 凌 楓, 柴田武彦 (遺伝生化学研)

酵母ミトコンドリアの相同組換え、ホモプラスミー形成

に働く Mhr1 タンパク質の機能同定を旨とし、大腸菌で Mhr1 タンパク質大量発現系を構築した。その際、Mhr1 タンパク質を発現する大腸菌細胞で、核様体分離抑制に起因すると見られる異常を見つけた。この仮説を裏付けるとともに、酵母ミトコンドリアでも核様体分離抑制を見いだした。Mhr1 タンパク質の核様体分離抑制は、ホモプラスミー成立と mtDNA 相同組換えでの機能を説明できる。

(3) 個体における核ゲノムの安定性と組換え制御の構築原理

研究担当者: 川崎勝己, 柴田武彦 (遺伝生化学研)

個体における核ゲノムの安定性と組換え制御の構築原理を知ることが目的として、ショウジョウバエ相同的組換え関連 RECQE タンパク自身の機能を明らかにした。また初期胚で RECQE タンパクと共同して働くタンパクを複数見