論 文 の 内 容 の 要 旨

応用生命工学専攻
平成９年度博士課程　入学
氏　名　Widada Jaka
指導教授　大森　俊雄

Identification and monitoring of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and their catabolic genes for use in bioremediation

芳香族炭化水素資化菌およびその代謝系遺伝子の解析とバイオレメディエーションに向けたモニタリング技術の開発

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) 及び polychlorinated dibenzofuran (PCDF) による広範囲な環境汚染は現在深刻な社会問題となっている。既に dibenzo-*p*-dioxin（DD）やその類縁化合物である dibenzofuran（DF）、carbazole (CAR)を分解できる細菌が単離されており、そのうちのいくつかは塩素置換数の少ないダイオキシン類を分解できることが明らかとなっている。

Pseudomonas sp. CA10 株は CAR 分解菌として活性汚泥より単離され、CAR 分解に関わる酵素、およびそれらをコードする遺伝子について解析が行われてきた。CAR の初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) の terminal oxygenase の推定アミノ酸配列は、既知の terminal oxygenase と相同性が低く（12－39%）、CARDO が新規性の高い oxygenase であることが明らかにされている。一方、CARDO は CAR のみならず１および２塩素化 DF、DD も同様に酸化分解できることが確認されており、ダイオキシン類に汚染された土壌の修復に有用な tool となることが期待されている。

CA10 株を用いた bioaugmentation を実用化するにあたり、土壌中に存在する CA10 株や CARDO の terminal oxygenase をコードする *carAa* 遺伝子をモニタリングする技術の開発は、分解活性の高い環境条件を検討する上で必須である。また、CAR 分解菌を用いた bioaugmentation の基礎的知見として、*car* 遺伝子の自然界での分布状況を知ることも重要である。そこで本研究では、(1) CA10 株および *carAa* 遺伝子のモニタリング技術の開発；(2) CAR および塩素化ダイオキシン汚染土壌の CA10 株による浄化の検討；(3)自然界における *carAa* 遺伝子の分布状況の解析、を行った。

一方、PAH による環境汚染も深刻な問題であり、bioaugmentation による浄化が期待されている。PAH 分解菌の分布と基質特異性等の分解特性の解明は、bioaugmentation を考える上で極めて重要であることから、(4)自然界に存在する PAH 分解系遺伝子の分布状況の解析、についても研究課題とした。

1. CA10 株および *carAa* のモニタリング技術の開発

土壌中に存在する *carAa* を正確に定量する目的で、TaqMan プローブを導入した競合 PCR 法を開発した。標的 template DNA と G+C 含量、長さが等しく、かつ同じプライマー結合配列を有する競合 template DNA をデザインした後、それぞれに特異的にアニールする 2 種の TaqMan プローブと共に PCR 反応を行った。各 TaqMan プローブが 5' nuclease 活性により分解を受けることで生じる蛍光を ABI PRISM 7700 sequence detection system で検出することで、標的 template DNA のコピー数の定量を行った。既知濃度の *carAa* を templateDNA に用いて検量線を作成した結果、10^2～10^7 コピー数/tube の範囲で定量が可能であることが示され、本 PCR 法が土壌中の特定遺伝子のモニタリングに適していることが確認された。

さらに土壌中で生育する CA10 株の菌数を計測する目的で、green fluorescent protein（*gfp*）遺伝子を CA10 株ゲノムへ導入し、*gfp* 遺伝子を安定に保持し、生育や CAR 分解に欠損を持たない変異株も構築した。

2. CA10 株による CAR、あるいは塩素化ダイオキシン汚染土壌の浄化の検討

CAR、あるいは PCDD のモデルとしての 2, 3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin（2, 3-DCDD）を含むモデル汚染土に CA10 株を接種し、土壌中の CA10 株の菌数と *carAa* の消長の動向を 1.の方法を用いてモニタリングした。貧栄養の能勢マサ土を用いた CAR 汚染土壌の場合、CA10 株の菌数は 3 日で 10^8 から 10^1 まで低下したが、高栄養の能勢マサ畑土を用いた場合、21 日目まで接種時の菌数が維持されていた。これらの結果より、bioaugmentation の効率化には土壌の栄養度が重要であることが示唆された。さらに能勢マサ畑土を用いた CAR 汚染土（添加濃度 100 ppm）では、非接種土壌では 1 ppm 以下まで減少するのに 21 日間を要したのに対し、接種土壌では 7 日間で CAR の除去が確認された。また菌添加後 5 日間までは *carAa* のコピー数は CA10 株の菌数とよく一致したが、それ以降は菌数の低下と反してコピー数の減少は確認されなかった。この結果より CA10 株の死滅後も *carAa* 遺伝子が土壌に残存していることが推測された。また 2, 3-DCDD 汚染土（1 ppm）を用いた分解実験では、菌数、*carAa* 遺伝子ともに接種時の濃度を 14 日間維持し、44－58％の分解が確認された（FIG. 1)。さらに 2 日毎に CA10 株を追接種することでほぼ 100％まで分解されることが確認され（FIG. 1)、CA10 株による bioaugmentation が PCDD にも有効であることが示された。

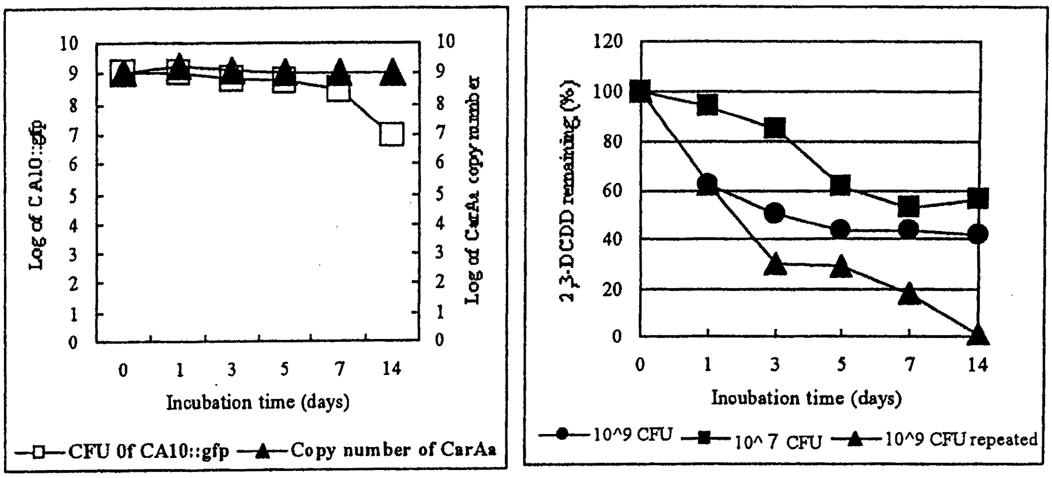

FIG. 1. Survival and metabolic activity of strain CA10 in 2,3-DCDD contaminated soil

3. 自然界における *carA* 遺伝子分布の解析

自然界での *carAa* 遺伝子の分布を検討する目的で、計 30 株の CAR 資化菌を土壌（3 種)、活性汚泥（7 種)、河川水（10 種）および河川底土（10 種）より単離した。各菌株の 16S rDNA 断片の制限酵素解析から、30 株は 19 種の遺伝子型に分類することができた。そのうち 11 株について、16S rDNA 配列を決定した結果、*Frateuria* 属(1 種), *Agrobacterium* 属(1 種), *Pantoea* 属(1 種), *Enterobacter* 属(1 種), *Stenotrophomonas* 属(1 種), *Sphigomonas* 属(1 種), *Acidovorac* 属(1 種), *Pseudomonas* 属(5 種)であることが確認され、多様な属の CAR 分解菌が自然界に広く分布していることが推測された。また約 90%（19/21 株）の菌株が DD を共酸化し、そのうちの 4 株は 2,3-DCDD も共酸化することが明らかとなり、CAR 分解菌の多くはダイオキシン類に対する分解力も有している可能性が示唆された。サザン解析、PCR の結果から約 43%（13/30 株）の菌株で *carAa*-like 遺伝子の保持が確認され、さらにシーケンス解析によりそれらが *carAa* と 93-99%の高い相同性を有することも明らかとなった（FIG. 2)。

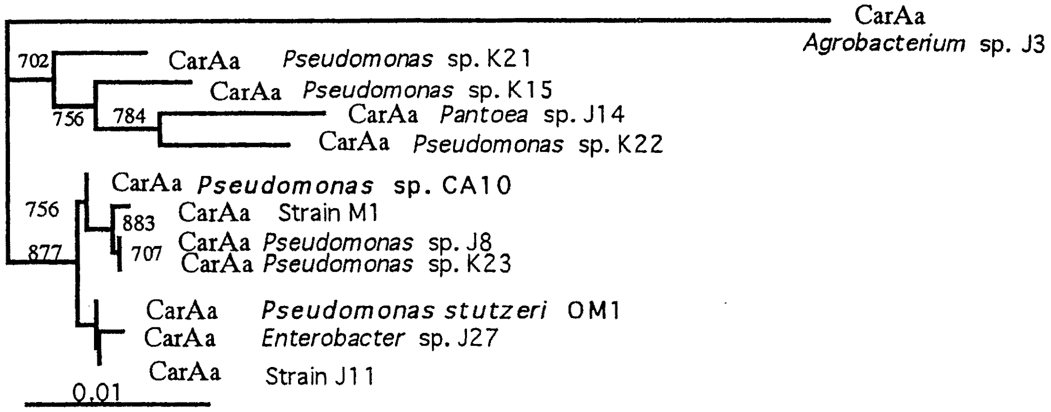

FIG. 2. Dendrogram based on a comparison of 810 bp of nucleotide sequence from genes encoding the terminal carbazole dioxygenase. The unrooed tree is rooting using CarAa from strain J3 as an out group. Bootstrap value greater than 50% are indicated. The tree was constructed using the Clustal W and was visualized using the Tree View program. The bar indicates a Jukes-Cantor distance of 0.01.

さらに詳細なサザン解析により、それら遺伝子は CA10 株の *car* gene cluster とは異なる構造を取っており、さらに約 62%（8/13 株）において自己伝達性メガプラスミド上に局在していることが明らかとなった。これらの結果より *car* 遺伝子は、自己伝達性プラスミドを介して多様な属の細菌種に転移することで比較的広範囲に分布している可能性が考えられた。

4.　　自然界における PAH 分解系遺伝子の分布の解析

3. と同様の手法を用いて PAH 代謝系遺伝子の自然界での分布を検討した。PAH 分解菌（日本、タイ、インドネシア、クエートの土壌より単離したナフタレン資化菌 5 株、フェナントレン資化菌 14 株）のうち 8 株について 16S rDNA 配列を決定した結果、それぞれ *Sphingomonas* 属 (1 種), *Burkholderia* 属 (5 種), *Comamonas* 属 (1 種), *Pseudomonas* 属(1 種)であることが明らかとなった。既知の PAH 分解系遺伝子である *phnAc*（*Burkholderia* sp. RP007 株）および *pahA*（*Pseudomonas putida* OUS82 株）をプローブとしたサザン解析の結果、19 株の PAH 資化菌のうち 6 株で *phnAc* との有意なハイブリダイゼーションが確認されたが、*pahA* ではいずれの株でも確認されなかった。さらに、*phnAc*-like 遺伝子を保持する菌株は全て *Burkholderia* sp. に属しており、同 PAH 分解系遺伝子は *Burkholderia* 属細菌に特異的に分布している可能性が示された。また、半数以上の菌株ゲノムが既知の PAH 分解系遺伝子とハイブリダイゼーションを示さなかったことから、未知の PAH 分解系遺伝子が自然界に多く存在していることが推測された。

総括と展望

本研究では CA10 株を用いた bioaugmentation のための基礎研究として、分解菌と分解系遺伝子のモニタリング技術を開発した。確立した手法を用いて、2 種の能勢マサ土を対象とした CAR もしくは 2,3-DCDD 分解実験を行った結果、分解菌の生育さらには分解活性の維持には土壌の栄養度が大きく栄養することが確認された。また、分解菌死滅後も分解系遺伝子はしばらく土壌に残存することが明らかとなった。難分解性物質による汚染は、土壌、水圏など様々な環境に広がっており、今後はさらに多様な環境条件を想定した実験を行う必要がある。また実際の汚染地域では複数の難分解性物質により汚染されていることが殆どであるため、複数種の分解菌を添加した bioaugmentation についても興味が持たれる。今後は複数の菌株や遺伝子を同時にモニタリングする技術も開発が重要である。

一方、*car* 遺伝子の自然界での分布を調べる目的で、複数の CAR 分解菌について解析を行った結果、*car* 遺伝子がプラスミドを介して異種微生物間を転移している可能性が示された。これら CAR 分解菌の *car*-like 遺伝子を分子レベルで解析することで、従来想像の域を出なかった芳香族化合物分解系オペロンの進化過程について、より具体的かつ詳細に解析することができるものと期待される。