

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Widada Jaka

カルバゾール (CAR) 分解菌 *Pseudomonas* sp. CA10 株の CAR 初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) は CAR のみならず 1 および 2 塩素化ジベンゾフラン (PCDF)、ダイオキシン (PCDD) に対しても酸化活性を有しており、汚染土壌の修復に有効であると期待される。CA10 株を用いた bioaugmentation の実用化にあたり、本論文では (1) CA10 株および *carAa* のモニタリング技術の開発 ; (2) CAR および PCDD 汚染土壌の CA10 株による浄化の検討 ; (3) 自然界における *carAa* の分布状況の解析、を行った。一方、多環芳香族化合物 (PAH) による環境汚染も深刻な問題であるため、bioaugmentation のための基礎研究として、(4) 自然界に存在する PAH 分解系遺伝子の分布状況の解析、も行った。

第 1 章は、研究の背景と目的を述べた緒論から構成されている。

第 2 章では、CA10 株および *carAa* のモニタリング技術の開発について述べられている。土壌中に存在する *carAa* を定量する目的で、TaqMan プローブを導入した競合 PCR 法を開発した。既知濃度の *carAa* を用いて検量した結果、 $10^2 \sim 10^7$ コピー数/tube の範囲で定量が可能であり、本 PCR 法が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 株を計測する目的で、green fluorescent protein (*gfp*) 遺伝子を安定に保持する変異株も構築した。

第 3 章では、CA10 株による CAR、あるいは PCDD 汚染土壌の浄化の検討について述べられている。能勢マサ土と能勢マサ畑土を用いて CAR モデル汚染土を調製し、分解を追跡した結果、より高栄養の能勢マサ畑土において菌数の長期にわたる維持や速やかな CAR 分解が観察され、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。また菌接種 7 日目以降では、菌数の低下と反して *carAa* 遺伝子のコピー数の減少は観察されず、菌死滅後も同遺伝子が土壌に残存することが示唆された。2,3-DCDD 汚染土 (1 ppm) の分解実験では、2 日毎に菌を追接種することで約 100 % まで分解され、CA10 株による bioaugmentation が PCDD にも有効であることが示された。

第 4 章では、自然界における *carA* 遺伝子分布の解析について述べられている。30 株の CAR 資化菌を自然界の多様な site から単離し、16S rDNA 配列決定の結果、*Agrobacterium* 属、*Enterobacter* 属、*Sphingomonas* 属、*Pseudomonas* 属等であることが確認され、多様な属の CAR 分解菌が自然界に存在することが示された。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 DD も共酸化することが示めされた。PCR、サザン解析より約 43 % (13/30 株) の菌株が *carAa*-like 遺伝子を保持しており、それらは *carAa* と 93-99 % の高い相同性を有することも明らかとなった。さらに約 62 % (8/13 株) で *carAa*-like 遺伝子が

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り、*car*遺伝子が多様な細菌種に転移している可能性が考えられた。

第5章では、自然界におけるPAH分解系遺伝子の分布の解析について述べられている。日本、タイ、インドネシア、クウェート土壌より単離した19種のPAH分解菌のうち8株について、既知のPAH分解系遺伝子 *phnAc* (*Burkholderia* sp. RP007株) および *pahA* (*Pseudomonas putida* OUS82株) をプローブとしてサザン解析した結果、約32% (6/19) 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。半数以上の菌株ゲノムが既知遺伝子と有意な相同性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。

以上、本論文はCA10株を用いたbioaugmentationのための基礎研究として、CA10株のモニタリング法を確立するとともに、それをモデル汚染土を用いた分解実験に適用し、分解力と分解菌(遺伝子)の消長の相関を明らかにした。さらに自然界に多様なCAR分解菌が存在することを示すとともに、*car*遺伝子が自己伝達性プラスミドを介して多様な細菌種に転移している可能性も示した。この様に本論文は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。