

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 堀寄 允文

数ある環境汚染物質の中でも、dieldrin (DIL)、perfluorooctanesulfonic acid や hexachlorobenzene などの有機ハロゲン化合物は残留性有機汚染物質 [Persistent Organic Pollutants (POPs)] と呼ばれる化合物群に分類され、環境中での残留性・生物蓄積性・生物毒性が高く、長距離移動性が懸念されている。これらの化合物で汚染されている環境を修復するために、強力な分解微生物を用いた bioaugmentation (分解菌の汚染現場への添加) や、分解能を付与した組換え体植物を用いた phytoremediation に注目が集まっている。本研究は、bioremediation 法を用いて低コストで効率よく POPs で汚染された環境の修復方法を開発することを最終的な目標に、POPs そのもの、あるいは構造類似の有機ハロゲン化合物の分解菌、分解酵素遺伝子を取得すると共に、それらの化合物の分解に重要な役割を果たすと考えられる脱ハロゲン化酵素に関する基礎的知見を収集することを目的としている。本論文は 6 章からなり、1 章の序論に続いて、2 章から 5 章までの本論でドリリン系農薬 (2 章)、モノクロロ酢酸 (3 章)、モノフルオロ酢酸 (4 章)、ペンタクロロフェノール (5 章) の分解菌・分解菌群の単離と解析を行い、6 章において総合討論を行っている。

第 2 章では、通常的环境中における存在割合が非常に低いと考えられるドリリン系農薬分解菌を、終濃度 400 ppm で DIL を汚染させた土壌・堆肥を作製することで優占化させ、DIL 懸濁 3 倍希釈 LB 寒天培地上でのクリアゾーン形成能を指標に汚染化堆肥から単離する事に成功した。DIL-1 株と名付けた本菌は、DIL 懸濁寒天培地上で約 75% の DIL を、同様の endrin (END) 懸濁寒天培地上で約 90% の END を分解することが明らかになり、分子系統解析の結果、*Geobacillus* 属細菌であることも示した。また、他の *Geobacillus* 属細菌の DIL 懸濁寒天培地を用いた分解能評価の結果、*G. jurassicus*、*G. toebii*、*G. thermoglucosidasius* が明確なクリアゾーンを、*G. caldxylyticus* が微弱なクリアゾーンを形成することを示した。さらに、DIL-1 株を含む上記菌株のドラフトゲノム解析を行うと共に、性状評価を進めることで、DIL-1 株を用いたショットガンクローニング、あるいは *G. thermoglucosidasius* を用いた変異株の取得と変異点同定のいずれかの方法でドリリン系農薬分解酵素をコードする遺伝子の取得が可能であることを示した。

第 3 章では、菌体の生育に伴ってモノクロロ酢酸 (MCA) を培養開始 24 時間以内に完全に分解し、全ての塩素を脱離させる *Burkholderia* 属細菌 5 株を単離した。これら 5 株の MCA 資化菌は、生育基質特異性の解析により、モノフルオロ酢酸を除く全てのモノハロゲン化酢酸を生育基質とする一方、ジハロゲン化酢酸、トリハロゲン化酢酸を生育基質とし

ないことを示した。また、既知のMCA脱塩素化酵素と65～75%の相同性を有する推定MCA脱塩素化酵素を有することも示した。さらに、2株のMCA資化菌に関しては、ジクロロ酢酸から一つの塩素を脱離可能であることも明らかにした。

第4章では、モノフルオロ酢酸(MFA)資化菌として *Burkholderia cenocepacia* F-1 株、同 F-2 株の単離に成功した。これらのMFA資化菌に対し、トランスポゾン挿入変異を行ってMFA代謝関連遺伝子の探索を行うと共に、両株のドラフトゲノム配列の決定を行った結果、既知のMFA脱フッ素化酵素と83%程度の相同性を有する酵素の存在を見出すと共に、未知のMFA代謝に重要な因子が存在することを示した。

第5章では、約14日で100 ppmのペンタクロロフェノール(PCP)を検出限界濃度以下まで分解するPCP分解菌群を10種取得した。各分解菌群は、理論上PCPの全ての塩素を脱塩素化していることを示すと共に、7種からPCP懸濁R2A寒天培地上でクリアゾーンを形成するPCP分解菌候補株を12株単離した。

以上、本論文は難分解性・残留性の有機ハロゲン化合物で汚染された環境の修復法開発のための材料として様々な有機ハロゲン化合物分解菌、分解菌群を取得し機能解析を行ったもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、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。