

論文の内容の要旨

論文題目 土壤中の3-クロロ安息香酸分解細菌の分子生態学的研究

氏名 森本 晶

微生物は、物質代謝をはじめとする極めて多様な役割を環境中で担っている。そうした能力の利用法の一つにバイオレメディエーションがある。これは、化学物質で汚染された環境を、その物質の分解能をもつ微生物の働きによって浄化しようとするものである。こうした分解菌を探索する手段としては、集積培養とよばれる培養法が広く用いられてきた。しかし、環境中とは全く異なる人工的な培養条件でスクリーニングされた分解菌は、必ずしも環境中で働く分解菌を反映しないという問題がある。さらに、環境微生物の大部分は難培養であることが知られ、培養技術のみに依存しては環境中の微生物資源のほんの一部にしかアクセスできない。これらの問題を克服する手段として、近年、環境試料から直接抽出した DNA (メタゲノム) を用いて環境中の微生物の構成や動態を解析する分子生態学的手法が急速に発達した。中でも PCR-DGGE 法は、微生物群集の比較やモニタリングに広く用いられており、汚染環境中の優占的な分解菌を検出することにも活用できる。ただし、遺伝子の検出によって有望な分解菌の存在を示せたとしても、それだけではその能力をさらに調べたり利用

したりすることはできない。見いだした微生物を実用につなげるためには、その微生物の実体を得るか、遺伝子資源として利用できる形にする必要がある。こうした背景をふまえ、本研究では、3-クロロ安息香酸（3CB）分解細菌をモデルターゲットとして、PCR-DGGE を機軸とする実用的な分解菌スクリーニング法を提案することを目指した。

クロロ安息香酸類は、環境汚染物質として知られる PCB の中間代謝物のひとつであり、3CB は芳香族塩素化合物の分解菌研究におけるモデル化合物としてよく用いられている。これまでに、多くの 3CB 分解細菌が土壌から見つかっているが、それらは人工培地中での分解能を指標として得られたものであり、土壌中で実際に働いている分解菌を反映したものかどうかは分からない。そこで、3CB を添加した土壌で優占化する細菌を PCR-DGGE 法で検出することによって、土壌中で優占的な役割を果たす 3CB 分解菌を明らかにすることを試みた。自然林から採取した土壌に 3CB を添加したところ、添加 7 日後には初期量の約 40% にまで 3CB 濃度が低下し、細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR-DGGE プロファイルには少なくとも 4 本の新たなバンドが出現した。系統解析の結果、これらのバンドはいずれも *Burkholderia* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に高い相同性を示した。また、3CB の初発酸化酵素である安息香酸ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*benA*) を標的とした PCR-DGGE によっても、3CB の添加に伴って増強するバンドが複数確認できた。このうちの 2 本のバンドについては、既知 *benA* との類縁関係から *Burkholderia* 属由来の *benA* であることが推定された。以上の結果から、供試土壌における 3CB 分解には、複数種の *Burkholderia* 属細菌が関与していることが示された。

続いて、3CB を反復添加した土壌で優占化する 3CB 分解菌を、DGGE バンドの塩基配列を指標として培養分離することを試みた。土壌中の 3CB 分解速度は反復添加によって加速され、当初 500 mg/Kg の 3CB がほぼ消失するまでに約 3 週間を要したが、3 回目の添加時にはその期間が 3 日間に短縮された。3CB 分解速度の上昇にともなって、16S rRNA 遺伝子と *benA* の DGGE プロファイルには複数のバンドの優占化がみられた。この土壌から、直接平板法と液体集積法それぞれを用いて細菌を分離し、16S rRNA 遺伝子と *benA* の DNA 配列を解読して優占 DGGE バンドとの照合を行った。その結果、直接平板法によって収集した分離株

の中から、3CB 反復添加土壌の優占 DGGE バンドと同じ遺伝子配列を有する 5 系統の *Burkholderia* 属細菌 (ASS3, ASS7, ASS8, ASS11, ASS14) が得られた。一方、液体集積法では、このうちの 1 系統 (ASS7) が選択的に集積され、他の系統が排除されてしまうことが分かった。取得した 5 系統の *Burkholderia* 属細菌株はいずれも 3CB の資化能を示し、これらに相当する DGGE バンドは 3CB 反復添加土壌の主要な優占 DGGE バンドを網羅した。よって、この 5 系統の *Burkholderia* 属細菌株が供試土壌中の優占的な 3CB 分解菌群であると考えられた。

ASS3、ASS7、ASS8、ASS11、ASS14 が土壌中で実際に 3CB 分解菌として働くことを実証するために接種実験を行った。これらの株をそれぞれ 3CB 添加土壌に接種したところ、いずれの株を接種した場合にも土壌中の 3CB の分解速度が顕著に促進された。また、PCR-DGGE によるモニタリングの結果、これらの株は接種後速やかに土壌中で優占化することが示された。これら 5 株を混合接種した場合にも 3CB の分解促進が観察されたが、その効果は単独で接種した場合とほぼ同様であった。したがって、これらの *Burkholderia* 属細菌は協調的に 3CB 分解を行うのではなく、競合的に土壌中の 3CB を資化しているものと考えられた。以上の結果に基づき、ASS3、ASS7、ASS8、ASS11、ASS14 の 5 株は供試土壌中で機能する優占的な 3CB 分解菌群であると結論づけられた。

3CB 添加土壌で優占化した DGGE バンドのうち、一部については対応する培養分離株を得ることができなかった。このように、PCR-DGGE で検出される細菌は必ずしも一般的な手法で培養できるものとは限らない。*benA* のような機能遺伝子を標的とした PCR-DGGE により検出されるバンドは、それ自体が遺伝資源として利用し得るものであるが、それらは標的遺伝子の部分断片にすぎないという欠点がある。完全な機能遺伝子を得るためには、メタゲノムからその断片の隣接領域を回収しなければならない。そこで、PCR-DGGE で検出した部分断片の隣接領域を回収する手段として、メタゲノムウォーキングを用いることとした。*benA* の PCR-DGGE によって 3CB 添加土壌に特異的に検出された優占バンドのうち、培養分離株が得られていないバンド (*ben-1*, 358 bp) をメタゲノムウォーキングの標的 *benA* 断片として選んだ。その結果、2161 bp の遺伝子配列を得ることに成功し、この配列には標的 *benA* (1338 bp) および *benB* (486 bp) の全

長領域が含まれていることが分かった。PCR-DGGE とメタゲノムウォーキングを用いたストラテジの汎用性を検証するために、3CB の代謝物であるクロロカテコールの開裂を担うクロロカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*tfdC*) について同じ方法を適用した。*tfdC* を標的とした PCR-DGGE によっても 3CB 添加土壌で優占化するバンドが複数検出され、そのうちの最優占バンド *tfd-1* (263 bp) をメタゲノムウォーキングの標的として選んだ。その結果、3649 bp の遺伝子配列が得られ、この配列は標的 *tfdC* (765 bp) とその下流遺伝子 *tfdD* (1110 bp)、*tfdE* (702 bp) の各全長領域を含んでいた。これらの結果から、PCR-DGGE とメタゲノムウォーキングを用いた手法がメタゲノムからの完全長機能遺伝子の取得に有用であることが実証された。

以上、本研究では土壌中で優占的な役割を果たす 3CB 分解細菌に焦点をあて、環境中の微生物資源開拓のための以下二つのストラテジの有効性を示した。

- (1) PCR-DGGE と培養法の併用による優占分解菌の分離
- (2) PCR-DGGE とメタゲノムウォーキングによる完全長分解酵素遺伝子の取得

本研究で確立したこれらのストラテジは、環境中で優占的に機能する微生物や遺伝子のスクリーニングに広く応用できるものと期待される。