

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 森本 晶

微生物の多様な代謝産物の利用法の一つに、化学物質などによって汚染された環境を、その物質の分解能をもつ微生物によって浄化するバイオレメディエーションがある。従来、環境中からこうした微生物を取得するためには、集積培養法などの培養技術が主要な役割を果たしてきた。しかし、環境中とは全く異なる人工的な培養条件で選抜された微生物は、必ずしも環境中で働く微生物を反映するとは限らない。また、環境微生物の大部分は難培養であることが知られており、培養技術のみに依存した方法では微生物資源のごく一部しか利用することができないという問題がある。

本研究ではこうした問題の克服のために、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、分子生態学的手法の一つである PCR-DGGE 法を用いた実用的な分解菌スクリーニング法を提案することを目的とした。クロロ安息香酸類は、ポリ塩化ジフェニル (PCB) の中間代謝物として知られ、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好適である。本研究では、特に、土壤中で優占的な役割を果たす 3CB 分解細菌あるいはその分解酵素遺伝子を効率的に取得することを主眼に置き、

(1) PCR-DGGE と培養法の併用による土壤中の優占分解細菌の分離

(2) PCR-DGGE とメタゲノムウオーキングによる分解酵素遺伝子の取得

という二つの戦略について検討を行った。以下、第 2 章-第 4 章で (1) について、第 5 章で (2) について述べている。

第 2 章では、PCR-DGGE による 3-クロロ安息香酸 (3CB) 添加土壤の細菌群集構造解析について述べている。3CB を添加した自然林土壤の細菌群集構造を、細菌 16S rDNA の PCR-DGGE によって解析したところ、添加 7 日目には無添加土壤のパターンにはみられない 4 本の新たな DGGE バンドが出現した。これらの塩基配列はいずれも *Burkholderia* 属細菌の 16SrDNA に高い相同性を示した。また、クロロ安息香酸の代謝に関わる安息香酸 1, 2-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 の添加にともなって増強する複数のバンドが確認され、少なくともこのうちの 2 本については、既知鳥飽 A との系統関係から *Burkholderi* 属由来の *benA* であると推定された。以上の結果から、複数の *Burkholderi* 属細菌が 3CB の添加にともなって土壤中で増殖することが示された。

第 3 章では、PCR-DGGE によって検出した優占細菌の培養分離について述べている。ここでは、3CB の反復添加によって土壤中での 3CB 分解菌を優占させ、DGGE バンドの塩基配列に基づいてそれらを培養分離することを試みた。反復添加によって土壤中での 3CB 分解速度は顕著に高まり、16SrDNA と *benA* の各 DGGE パターンには複数の優占的なバンド

が現れた。この土壌から直接平板法によって細菌の分離を行い、それらの遺伝子と DGGE バンドを照合した結果、DGGE パターンに出現した主要な優占バンドを構成する 5 系統の *Burkholderia* 属細菌 (ASS3, ASS7, ASS8, ASS11, ASS14) を取得した。

第 4 章では、取得した 5 系統の血融通血属細菌の土壌への接種効果について述べている。ASS3, ASS7, ASS8, ASS11, ASS14 をそれぞれ 3CB 添加土壌に接種したところ、全ての系統で明瞭な 3CB 分解促進効果が認められた。また、PCR-DGGE によるモニタリングの結果、これらは接種後速やかに土壌中で優占することが示された。以上の結果に基づき、これら 5 系統の且戯曲由属細菌は供試土壌中で優占的な役割を果たす 3CB 分解菌群であると結論され、PCR-DGGE と培養法の併用がこうした環境中で働く分解菌の探索・取得に有用であることが示さ訂した。

第 5 章では、PCR-DGGE とメタゲノムウオーキングによる 3CB 分解酵素遺伝子の取得について述べている。ここでは、DGGE で検出した遺伝子断片を元に、分解酵素遺伝子の全長をメタゲノムから直接取得することを目指した。benA の PCR-DGGE によって検出された優占バンドのうち、培毒分離株が得られなかったものについてメタゲノムウオーキングを行った結果、このバンド配列を含む完全長の benA を土壌 DNA から取得することに成功した。この方法の汎用性を調べるために、3CB の代謝に関わる別の酵素遺伝子 (tfdC) を標的として同じストラテジの適用を試みたところ、3CB 添加によって土壌中で優占する紺の全長を期待通りに取得できることが確かめられた。以上の結果により、PCR-DGGE とメタゲノムウオーキングを用いたストラテジが、メタゲノムから標的分解酵素遺伝子を直接取得する方法として有効であることを実証した。

以上、本研究は、土壌中の 3-クロロ安息香酸分解細菌のスクリーニング過程を通して、PCR-DGGE 法を機軸とした二つのストラテジが環境中の微生物資源の開拓に有用であることを示した。これらのストラテジは、環境中で機能する微生物や遺伝子を対象とする様々な研究に幅広く適用し得るものであり、学術的、応用的に貢献するところは少なくない。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。