

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Nguyen Lan Huong
審査委員	主査 井藤 和人 (印) 副査 中島 廣光 (印) 副査 横山 和平 (印) 副査 木原 淳一 (印) 副査 巢山 弘介 (印)
題目	Genetic and Ecological Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)- and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid (2,4,5-T)-Degrading Bacteria in Vietnamese Soils (ベトナム土壌における2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)および2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T)分解菌の遺伝学的および生態学的研究)
審査結果の要旨(2,000字以内)	
<p>本研究は、フェノキシ酢酸系除草剤である2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)および2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T)を主成分とする枯葉剤による汚染歴のあるベトナムの土壌に生息する2,4-Dおよび2,4,5-T分解菌の遺伝学的および生態学的特徴を明らかにするための研究で、その成果は以下の様に要約される。</p> <p>枯葉剤が使用された経歴の有無に関係なく、ベトナムの広範囲にわたる10種類の土壌から、様々な2,4-Dおよび2,4,5-T分解菌が単離された。353株の分解菌は<i>Burkholderia</i> sp.、<i>Sphingomonas</i> sp. および<i>Ralstonia</i> sp. の3つの主要な属と、<i>Bradyrhizobium</i> sp. と<i>Nocardioides</i> sp. の2つのマイナーな属に分類された。全分解菌の内、65%は2,4-Dだけでなく2,4,5-Tも分解し、それらは、10箇所全ての土壌から単離され、<i>Sphingomonas</i> sp.、<i>Burkholderia</i> sp. および<i>Bradyrhizobium</i> sp. に分類された。<i>Burkholderia</i> sp. の分解菌はベトナムの中央部と南部のみから、また、<i>Ralstonia</i> sp. の分解菌は1つの例外的な菌を除いて、北部のみで単離された。<i>Sphingomonas</i> sp. は広く分布していた。</p> <p>2,4-D オキシゲナーゼをコードした<i>tfdA</i> は<i>Burkholderia</i> sp.、<i>Ralstonia</i> sp.、および<i>Nocardioides</i> sp. で検出され、<i>tfdA</i> と相同遺伝子である<i>tfdAα</i>が<i>Bradyrhizobium</i> sp. で検出された。2,4-DCP ヒドロキシラーゼをコードした<i>tfdB</i> はすべての分解菌で検出され、系統的に<i>Ralstonia</i> sp.、<i>Nocardioides</i> sp. および<i>Burkholderia</i> sp. からなるグループ、<i>Sphingomonas</i> sp. からなるグループおよび<i>Bradyrhizobium</i> sp. からなるグループに分類された。2,4,5-T オキシゲ</p>	

ナーゼをコードした *tftA* と相同性のある *cadA* は、*Bradyrhizobium* sp. と *Sphingomonas* sp. で検出された。*tftA* と 2,4,5-TCP オキシゲナーゼをコードした *tftC* は *Burkholderia* sp. の 2,4,5-T 分解菌にだけ検出された。

Bradyrhizobium sp. の 2,4-D 分解菌は、これまで農薬使用歴の無い環境からしか単離されていなかったが、汚染された土壌からも *Bradyrhizobium* sp. に属し、2,4-D だけでなく 2,4,5-T をも分解する菌が単離された。*Bradyrhizobium* sp. の 2,4,5-T および 2,4-D 分解菌の *tfdB* の間には、塩基配列で 59%、アミノ酸配列では 64% の相同性があり、それらは系統的に区別された事から、起源が異なること、また、それらは水平伝達によって獲得された遺伝子であることが示唆された。2,4-D 分解菌の *TfdB* はこれまでに報告されている *TfdB* と比較して、より狭い範囲の基質にしか活性を示さなかった。

単離した分解菌の中で *Sphingomonas* sp.、*Bradyrhizobium* sp.、*Nocardioides* sp.、および *Burkholderia sacchari* JS150 を除いて、単離した分解菌のほとんどがプラスミドを持ち、大きさが異なる少なくとも 4 種類のプラスミドが存在した。それらは *tfd* 遺伝子を持っていたが、*cad* および *tft* 遺伝子は持っておらず、また、大きさの違いと土壌の採取場所や分解菌の系統学的グループとの関連性は無かった。これらの結果から、*tfd* 遺伝子は *Burkholderia* sp. および *Ralstonia* sp. の間で、複数のプラスミドを媒体とした水平伝達によって、ベトナムに広く分布したものと考えられた。

ベトナム土壌の集積培養によって、多様な 2,4-D および 2,4,5-T 分解菌が単離された。単離された分解菌の集積培養中における挙動と土壌懸濁液中の微生物群集の遷移を、16S rRNA 遺伝子による変性剤濃度勾配ゲル電気泳動分析 (DGGE) によって検証した。それぞれのサンプルで、2,4-D および 2,4,5-T が分解した時の DGGE の主要なバンドの多くは、単離した 2,4-D および 2,4,5-T 分解菌の 16S rRNA 遺伝子と一致し、多様な分解菌微生物群集の遷移が明らかとなった。これらの結果から、単離した 2,4-D および 2,4,5-T 分解菌が土壌懸濁液の中で 2,4-D および 2,4,5-T の分解に主な役割をはたしていることを示した。

本研究は、高濃度の 2,4-D および 2,4,5-T に長期間汚染されたベトナムの土壌から多種多様な 2,4-D および 2,4,5-T を単離し、それらの系統学的特徴や分解遺伝子、プラスミドおよび分解酵素の特徴を調べ、これまでに報告されている分解菌との違いを明らかにした。さらに、2,4-D および 2,4,5-T の土壌中での分解過程における微生物群集の変遷を調べ、単離された分解菌の挙動との関係から、培養法および非培養法のいずれもが重要であることを明らかにした点で、今後、分解菌を含む土壌微生物の生態学的研究を進めていく上で重要な成果であり、博士（農学）の学位を与えるに十分な価値を持つものと判定した。