

氏 名	しの 篠 だ 田 よし 吉 ふみ 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1152 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Isolation and characterization of novel bacteria that degrade aromatic compounds under denitrifying conditions (脱窒条件下で芳香族化合物を分解する新規な細菌の単離とその諸性質)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

化学物質による環境汚染は多岐にわたっており、これを修復する技術の開発が進んでいるが、その中で微生物の分解能を汚染箇所の原位置で活用するバイオレメディエーションは有力な手段と目されている。この場合、汚染箇所の多くが地下にあるため、好気性微生物を利用する従来のバイオレメディエーション法では、微生物の増殖に必要な栄養塩とともに酸素を送り込む必要がある。しかし、原位置バイオレメディエーションでは、汚染箇所に生息する微生物を活用することが望ましく、酸素分圧が低い箇所で好気性微生物を利用することは必ずしも生態系を考慮した適切な方法とは言えない。

本論文では、生態系への影響を最小限に保った新しいバイオレメディエーション法を開発するための基盤的知見を得ることを目的とし、微生物としては酸素の有無に関わらず生存が可能な脱窒細菌を、汚染物質としてはフェノールやトルエンなどの芳香族化合物をそれぞれ対象としている。本研究は、嫌氣的条件下でこれらを分解する新しい細菌群が存在し、これが自然界に広く分布していること、および通性嫌気性細菌が酸素分圧の変化に対応して巧みに分解能を発揮する仕組みを有することを見出したものであり、その結果は以下のように要約できる。

1) フェノールを炭素源とした脱窒条件下で、長期にわたる連続培養によって、水田土壌よりフェノールを嫌氣的に分解できる2種の細菌、CC-11株とCC-26株を分離した。16S rDNAの塩基配列を基に、CC-11株は従来芳香族分解性脱窒細菌として知られている *Azoarcus* 属に属し、CC-26株は *Magnetospirillum* 属の種に近縁な新規な細菌であることを明らかにした。従来、芳香族化合物分解性の脱窒細菌は全て *Proteobacteria* の β -サブクラスに属するものであり、CC-26株は α -サブクラスに属する初めての例である。両菌株について、培養および菌体反応の過程を精査し、フェノールが4-ヒドロキシ安息香酸を経る経路で分解されることを示した。

この分離の過程では、培養液中のフェノールを分解する優占種がCC-11株からCC-26株に変遷することを認め、これが両菌株の鉄イオンの要求性の違いによって起こるものと推定した。

2) この推定に基づき、鉄イオン濃度の低い培地を用いた集積培養によって様々な試料よりフェノール、トルエン、安息香酸などの芳香族化合物を脱窒条件下で分解できる多くのらせん状細菌を分離し、この種の細菌が自然界に広く存在していることを明らかにした。16S rDNAの解析により、これらの細菌はCC-26株と同様に、*Magnetospirillum* 属の種に近縁なひとつのグループを形成することを見出した。また、従来の *Magnetospirillum* 属とは異なり、これらの細菌が走磁性を示さないことから、これらの分離菌はこの属の全く新しい種であることを示したことになる。

3) トルエンを脱窒条件下で分解する細菌、*Thauera* sp. DNT-1株を排水処理プラントの嫌気汚泥より分離し、本菌がトルエンを嫌氣的にも好氣的にも分解できることを見出した。酸素分圧が低い条件で本菌を培養した結果に基づいて、本菌は酸素分圧が低下するに従って、酸素呼吸から硝酸呼吸に切換えること、またトルエンの分解も酸化的な経路から嫌氣的な経路に変換することを明らかにした。さらに、蓄積する代謝中間体やその消費速度から、両経路を特定した。

4) 酸化的および嫌氣的トルエン分解経路のそれぞれの初発反応を触媒するトルエンジオキシゲナーゼおよびサクシニ

ル-CoA シンターゼに相当する遺伝子群をクローニングし、本菌がトルエンを両条件下で分解できる能力を有することを遺伝子のレベルで明らかにした。

論文審査の結果の要旨

有害な化学物質により汚染された環境を修復する方法として、微生物の分解能を活用するバイオレメディエーション法があり、汚染をその原位置で処理できる点に技術上の特徴がある。しかし、従来法の多くは、好気性微生物を利用するため、酸素分圧が低い多くの汚染箇所に対する処理方法として必ずしも適切な方法ではなかった。本論文は、嫌気条件下での微生物機能を活用する新しいバイオレメディエーション法を開発するための基盤的知見を得ることを目的とし、代表的な環境汚染物質である芳香族化合物を嫌氣的に分解する新しい脱窒細菌群の存在と、酸素分圧の変化に対応する微生物の新しい機構を見出したものであり、評価すべき点は以下の4点である。

1) 水田土壌を微生物分離源とし、炭素源をフェノールとする脱窒条件下での長期にわたる連続培養を行った結果、培養槽中のフェノール分解菌の優占種が CC-11 株から CC-26 株に変遷することを認め、16S rDNA の塩基配列に基づく系統分類により、CC-11 株は *Azoarcus* 属に、CC-26 株は *Magnetospirillum* 属にそれぞれ属することを明らかにした。CC-26 株は芳香族化合物分解性の脱窒細菌として、*Proteobacteria* の α -サブクラスに属する初めての例である。また、この連続培養中の優占種の変遷は、両菌株の鉄イオンの要求性の違いによることを実験事実に基づいて推定した。

2) CC-26 株の鉄イオン要求性が低いことに着目した分離法により、これと同種の細菌が自然界に広く分布し、多様な芳香族化合物の分解性を有することを明らかにするとともに、分離菌の 16S rDNA の塩基配列を基にした解析により、これらが *Magnetospirillum* 属内に新しいグループを形成することを明らかにした。

3) トルエンを脱窒条件下で分解できる細菌、*Thauera* sp. DNT-1 株を排水処理プラントの汚泥試料から分離し、これが、嫌気・好気両条件下でトルエンを分解できることを見出した。さらに、本菌は、酸素分圧の変化に対応して酸素呼吸から硝酸呼吸へ切換え、それに伴ってトルエンの分解も酸素添加反応を含む経路から、嫌氣的な反応による経路へ転換することを見出した。

4) 酸化的および嫌氣的トルエン分解経路を、蓄積する代謝中間体の同定やその消費速度などの実験事実に基づいて特定するとともに、各初発反応の酵素系をコードする遺伝子群をクローニングして、その推定一次構造を明らかにすることにより、本菌がトルエン分解に対して酸化的・好氣的両経路を有することを明らかにした。

以上のように本論文は、自然環境に立脚したバイオレメディエーション技術に適用可能な、新しい細菌群と環境変化に応答するための新しい機能を見出したものであり、制御発酵学、応用微生物学、微生物生態学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年7月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。