

氏名（本籍）	酒井 順子		
学位の種類	博 士 （農学）		
学位記番号	博 甲 第	7364	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	水田土壌から分離した2,4-D分解菌由来の分解遺伝子及び大型プラスミドに関する研究		
主査	筑波大学教授	博士（学術）	中島 敏明
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧昭
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	内海 真生
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	山田 小須弥

論 文 の 要 旨

人類は、化学技術の発達と共に自然界に存在しない有機化合物を大量に作出し、環境中に放出してきた。これらの化合物を分解する能力を微生物がいかに獲得するかを明らかにすることは、難分解物質の分解技術の向上につながると考えられる。さらに、人類は自然界に存在しない生物、すなわち遺伝子組換え生物も作り出した。遺伝子組換え生物の利用は、生物多様性保護を目的とするカルタヘナ法に従い、組換え遺伝子が環境中へ移行しないよう行われている。しかし予期せぬ事故による流出の可能性もあり、その拡散リスクが懸念されている。

最も古い化学合成除草剤で、1940年代から世界的に多用された2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）の分解菌は、新規化合物に対する分解遺伝子群獲得のモデル微生物として、60年以上の研究の歴史がある。また、2,4-D分解遺伝子は可動性遺伝因子によって細菌間に伝播していることが知られている。このため、2,4-D分解遺伝子群を調べることで、細菌による遺伝子の獲得と伝播の実態を知ることができると考えられる。本研究では、2,4-Dを過去に大量に施用しながら解析例のない水田土壌を対象として、その分解菌を調査した。

まず、日本各地の水田土壌を収集して2,4-D分解菌を分離し、16S rDNA配列と2,4-D分解遺伝子の部分塩基配列を調べた後に、分解遺伝子を保有する可動性遺伝因子候補のプラスミドと分解遺伝子の関係を調べた。ここまでの解析で、これまでに詳細な報告例のない、大型の伝達性2,4-D分解プラスミドの存在が示唆されたため、この全塩基配列を解析して遺伝子の同定を行った。次いで、このプラスミド上に保有されている2,4-D分解遺伝子群、および他の遺伝子について既知の配列と比較解析を行い、さらに、プラスミドの分類群を明らかにするため、プラスミド固有の配列を、既知のプラスミドと比較解析した。最後に、プラスミドの伝達性を調査するため、接合伝達試験、および類似プラスミドの部分塩基配列の調査を行った。

スクリーニングの結果、水田由来の2,4-D分解菌が世界で初めて分離された。これらの分解菌には、これまで世界各地で見出されてきた代表的な2,4-D分解遺伝子が存在することが示されると共に、少なくとも2,4-D分解の最初の3段階に関わる遺伝子は、全てプラスミド上に存在することが明らかになった。なお、本研究において、 α -プロテオバクテリアでは初めてプラスミド上に存在する2,4-D分解遺伝子が取得された。これまで、2,4-D分解遺伝子群の伝播は、主にIncP-1グループの伝達性プラスミドが担っていると考えられてきたが、水田由来の分離株ではこのグループのプラスミドは見出されなかった。代わりに、200 kb以上の大型のプラスミド上に2,4-D分解遺伝子群が見出され、特に、水田から分離された14株のうちの8株は、およそ600 kbのプラスミド上に、互いに相同な2,4-D分解遺伝子配列を保有した。この大型のプラスミドの一つであるpM7012の全塩基配列を明らかにして、他のプラスミドと比較解析を行ったところ、このプラスミドは、これまでに報告例のな

い新規の伝達性プラスミドグループに属することが示された。また、リラクサーゼ遺伝子を持たないプラスミドに伝達性はないとするこれまでの概念を覆す可能性が示され、今後の可動性遺伝因子の研究に大きな影響を及ぼすものと考えられた。アメリカで分離された2,4-D分解菌も、同じグループの分解プラスミドを保有することが示され、国をまたいでの遺伝子伝播の可能性も示された。

審 査 の 要 旨

本論文は化学合成除草剤の一種である2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 分解菌及びその分解遺伝子の挙動について、これまで解析例のない水田土壌を対象として研究を行ったものである。その結果、水田由来の2,4-D分解菌が世界で初めて分離された。さらにこれらの微生物が大型プラスミドを保有すること見だし、そこにコードされている2,4-D分解遺伝子群、および他の遺伝子についての解析を行った。その結果、これらがこれまでに報告例のない新規の伝達性プラスミドグループに属することが示された。この2,4-D分解プラスミドの産業利用の可能性としては、バイオレメディエーションへの利用と分子生物学的研究におけるベクターとしての利用が挙げられる。一方、2,4-D分解遺伝子群は構築されてから数十年で世界各地に伝播しており、日本もその例外ではなかった。すなわち、野外での生残に有利な組換え遺伝子を保有する微生物が放出された場合、その遺伝子は、短期間に地球上に拡散することが予想され、本研究で見出された大型の伝達性プラスミドも、遺伝子拡散の担い手になり得ると考えられた。以上のように、本研究は基礎・応用の両面において優れた研究であるといえ、博士学位論文にふさわしいと結論づけた。

平成27年1月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。