

氏名(本国籍)	多胡 香奈子 (岡山県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第406号
学位授与年月日	平成18年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	土壌における有機リン系農薬分解細菌の多様性と生態
審査委員会	主査 静岡大学 教授 森田 明雄 副査 静岡大学 教授 瀧川 雄一 副査 岐阜大学 教授 百町 満朗 副査 信州大学 助教授 久我 ゆかり

論文の内容の要旨

日本で大量に使用されている農薬の1つである有機リン系農薬、フェニトロチオンを資化することができるフェニトロチオン分解菌 *Burkholderia* sp. NF100 を用い、フェニトロチオン分解酵素遺伝子の特徴と本分解菌の国内耕地土壌における多様性ならびに優占種決定過程を検討した。

まず、NF100 が持つフェニトロチオン分解酵素遺伝子 *fed* を解析したところ、本菌の *fed* が新規の有機リン加水分解酵素遺伝子であることを明らかにした。また、本酵素が Fed A と Fed B の2つのタンパクより成ることと、Fed B が膜結合に関与し、細胞膜に局在していることを示した。さらに、本酵素の分子量は約 55kDa、等電点は pI5.8 であり、幅広い基質特異性を有していることを明らかにした。一方、フェニトロチオンの中間代謝産物であるメチルヒドロキノンの分解に関与する2つの酵素遺伝子 *mhqA*、*mhqB* についても解析を行い、MhqA が NAD(P)H 依存性のモノオキシゲナーゼ、MhqB がエクストラジオールジオキシゲナーゼと高い相同性を示し、両遺伝子ともアミノ酸配列に保存配列が存在していることを明らかにした。

また、茨城県、栃木県、静岡県、熊本県より採取した4種類の耕地土壌から170のフェニトロチオン分解菌を分離し、これらをプロテオバクテリアの5属 (*Burkholderia* 属、*Bartonella* 属、*Cupriavidus* 属、*Rhizobium* 属、*Pseudomonas* 属) に分類した。このうち *Bartonella* 属、*Cupriavidus* 属および *Rhizobium* 属の細菌は、本研究で初めて有機リン系農薬分解菌として分離された。また、*Bartonella* 属はフェニトロチオンを共代謝により分解したが、他の属の細菌はフェニトロチオンを資化したことから、日本の土壌に棲息するフェニトロチオン分解細菌が共代謝と資化という2つの分解様式を有することが明らかとなった。これ

らの結果は、フェニトロチオン分解菌の多様性が非常に高いことを示した。

次に、最も優占的なフェニトロチオン分解菌である *Burkholderia* 属を用いて、フェニトロチオン施用下での分解菌群集の構造変化の過程を調査した。フェニトロチオンを継続的に散布すると、供試した3種類全ての土壌で分解菌数が急激に増加し、*Burkholderia* 属の1種類の細菌が分解菌群集の優占種となったことを示した。またPCR-DGGE解析の結果から、増加した分解菌が属内の優占種となったことも明らかにした。さらにフェニトロチオンの添加による分解菌増加過程での *Burkholderia* 属細菌の菌数と多様性の変化を *Burkholderia* 属の選択培地を用いて調査した。フェニトロチオンの継続散布により、分解菌は急激に増加したが、非分解菌数は変化しないことが示された。また、分解菌数が急激に増加した期間に分離した約500の菌株をARDRAにより解析したところ、分解菌の優占種が分解菌の増加にともない8種類から1種類に収束するとともに、非分解菌の優占種は特定の種に偏ることを明らかにした。

以上のことから、土壌中においてフェニトロチオン分解能を持つ細菌が多様性を有していることやフェニトロチオンの選択圧下での分解菌の優占種の形成過程を明らかにした。これらの研究成果は、土壌微生物による農薬分解のメカニズムや農薬分解の加速や細菌の適応機構の解明など農薬動態と微生物生態を理解する上で重要な基礎データである。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、農薬分解能を持つ細菌の多様性と菌群構造の変化を明らかにすることを目的に、有機リン系農薬フェニトロチオンを対象農薬として用い行った。

まず、既に申請者らが分離したフェニトロチオン資化性菌 *Burkholderia* sp. NF100 が持つフェニトロチオン加水分解酵素遺伝子 (*fed*) とその中間代謝物メチルヒドロキノンの分解酵素遺伝子 (*mhqA*, *mhqB*) を解析した。その結果、*fed* が新規の有機リン加水分解酵素遺伝子であることが明らかとなった。また、本酵素については、2つのタンパクにより構成され、そのうち1つは膜結合に関与している可能性が高いこと、存在部位としては細胞膜に局在していること、さらに幅広い基質特異性を有していることを明らかにした。一方、メチルヒドロキノン分解酵素遺伝子については、*mhqA* がNAD(P)H依存型のモノオキシゲナーゼであり、*mhqB* はエクストラジオールジオキシゲナーゼであることを示した。

次に、土壌生態系におけるフェニトロチオン分解細菌の多様性を明らかにするため、国内4地点の耕地土壌より合計170のフェニトロチオン分解菌を分離し、系統的な多様性とそれらが持つ分解能の特徴を調べた。また、上記の結果をもとに、既知の有機リン系農薬加水分解酵素遺伝子と有機リン系農薬中間代謝物分解酵素遺伝子の分布についても検討を行った。その結果、分離した分解菌はプロテオバクテリアの5属に分類され、フェニトロチオン分解菌が高い多様性を有していることを明らかにした。またこのうち3属の細菌は、本研究で初めて有機リン系農薬分解菌として分離されたものであった。5属の分解菌の、フェニトロチオン分解過程を検討したところ、日本の耕地土壌中の細菌によるフェニトロチオン分解様式には資化と共代謝の2つがあることを明らかにした。さらに、有機リン系農薬加水分解酵素遺伝子と中間代謝物分解酵素遺伝子の分布が異なっていたことから、土壌には多様な分解酵素遺伝子の組み合わせが存在する可能性があることを示した。

また、フェニトロチオンを選択圧として土壌に与えたときの分解菌群集内での優占種決定過程と、その過程における分解能を持たない近縁種の群集構造の変化を調べた。土壌へフェニトロチオンを継続散布することで土壌中の分解菌数が急激に増加し、*Burkholderia* 属の単一種が分解菌群集の優占種となり、さらに、増加した分解菌群集の優占種が属内における優占種ともなることを示した。また、分解菌の増加過程において、属内の分解菌の優占種の多様性は分解菌数の増加に伴い複数種から1種類に収束することを明らかにした。このとき同属の非分解菌数は変化しなかったが、非分解菌の優占種の多様性は特定の種に偏ったことも明らかにした。

以上のように、本論文は、フェニトロチオン資化性菌 *Burkholderia* sp. NF100 が持つフェニトロチオン分解関連遺伝子の特性を明らかにするとともに、日本の土壌に生息するフェニトロチオン分解能を持つ細菌が系統的な多様性を有し、多様な分解酵素遺伝子の組み合わせを持つ可能性を示した。また、フェニトロチオン選択圧下では、土壌中の分解菌数が急激に増加し、*Burkholderia* 属の単一種が分解菌群集の優占種となる一方、同属の非分解菌数は変化しないが、非分解菌の優占種の多様性は特定の種に偏るといふ群集構造の変化過程も明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

【基礎となる学術論文一覧】

1. 論文題目 : Characterization of methylhydroquinone-metabolizing oxygenase genes encoded on plasmid in *Burkholderia* sp. NF100
発表雑誌名 (学会等) : Journal of Bioscience and Bioengineering (日本生物工学会)
年号 : Vol.100 No.5 Page 517~523
著者名 : Tago, K., Sato, J., Takesa, H., Kawagishi, H. and Hayatsu, M.
2. 論文題目 : Purification and characterization of fenitrothion hydrolase from *Burkholderia* sp. NF100
発表雑誌名 (学会等) : Journal of Bioscience and Bioengineering (日本生物工学会)
年号 : in press
著者名 : Tago, K., Yonezawa, S., Ohkouchi, T., Hashimoto, M. and Hayatsu, M.
3. 論文題目 : Novel organophosphorus pesticide hydrolase gene encoded on a plasmid in *Burkholderia* sp. strain NF100
発表雑誌名 (学会等) : Microbes and Environments (日本微生物生態学会)
年号 : in press
著者名 : Tago, K., Yonezawa, S., Ohkouchi, T., Ninomiya, T., Hashimoto, M. and Hayatsu, M.