

## 二国間交流事業 共同研究報告書

平成25年9月27日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 静岡大学・工学部職・氏名 (ふりがな) 教授・二又裕之 ふたまたひろゆき

1. 事業名 相手国 (ベトナム) との共同研究 振興会対応機関 (VAST)
2. 研究課題名 分解プラスミドの水平伝播を利用したベトナムにおけるダイオキシン汚染土壌の浄化
3. 全採用期間  
平成 22 年 9 月 1 日 ~ 平成 25 年 8 月 31 日 ( 3 年 0 ヶ月)
4. 経費総額
- (1) 本事業により執行した研究経費総額 7,051,278 円  
初年度経費 1,680,638 円、2年度経費 2,500 千円、3年度経費 2,500 千円  
4年度経費 370,640 円
- (2) 本事業経費以外の国内における研究経費総額 1,000,000 円
5. 研究組織
- (1) 日本側参加者 (代表者は除く)

氏名	所属・職名
金原和秀	静岡大学大学院工学研究科・教授
野尻秀昭	東京大学生物生産工学研究センター・教授
新谷政己	静岡大学大学院工学研究科・准教授
谷 明生	岡山大学資源植物科学研究所・助教
尹 忠鉄	東京大学大学院農学生命科学研究科・博士研究員
高橋裕里香	東京大学大学院農学生命科学研究科・博士研究員
松井一泰	東京大学大学院農学生命科学研究科・博士課程3年
鈴木 溪	静岡大学創造科学技術大学院・博士課程1年
山本脩二	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
稲松 遼	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
倉橋正典	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
小林達弥	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
鈴木 翔	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
森岡啓幸	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
大田隼矢	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年
工藤勇人	静岡大学大学院工学研究科・修士課程2年

山田幸太	静岡大学大学院工学研究科・修士課程 2年
福田洸平	静岡大学大学院工学研究科・修士課程 2年
青木真央	静岡大学大学院工学研究科・修士課程 1年
飯田健明	静岡大学大学院工学研究科・修士課程 1年
木村光平	静岡大学大学院工学研究科・修士課程 1年
鈴木研志	静岡大学大学院工学研究科・修士課程 1年

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 ベトナム科学アカデミー・フエ資源研究所・上席研究員・Ho Dinh Duan

(3) 相手国参加者（代表者は除く）

氏 名	所 属・職 名
Pham Xuan Truong	Hue Institute of Resources, VAST・研究所長
Hoang Thi Binh Minh	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Truong Thi Cat Tuong	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Le Canh Viet Cuong	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Tran Phuong Ha	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Trinh Thi Giao Chau	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Cao Thi Thuy Van	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Ninh Khac Bay	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Ton That Huu Dat	Hue Institute of Resources, VAST・研究員
Nguyen Hoang Loc	Hue University・准教授
Tran Huu Tuyen	Hue University・講師
Nguyen Huu Ty	Hue University・講師
Hoang Thai Long	Hue University・講師
Nguyen Thi Quy Hoa	Hue University・研究員

6. 研究実績概要（全期間を通じた研究の目的・研究計画の実施状況・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

### 研究の目的

ダイオキシンで汚染した広範囲にわたる土壌を、分解微生物を投入して浄化する場合、散布する微生物量は膨大となり、事実上不可能である。しかし、環境中から単離した安全な微生物が、ダイオキシン分解能を保有し、かつその分解に関与する遺伝子群が自然界で安全に伝達可能な染色体外遺伝因子であるプラスミド上にある場合、その微生物を宿主として土壌中に投入することにより、宿主が保有するプラスミドが水平伝播し、土壌中の土着微生物群がダイオキシン分解能を獲得することが期待できる。この方法はプラスミドオーグメンテーションとして近年提唱されている。ここで問題となるのは、プラスミドと微生物の投入による環境への影響である。本研究では、①ダイオキシン分解能を保有する微生物のベトナムのダイオキシン汚染土壌からのスクリーニング、②プラスミドの水平伝播による分解能の発現と持続性に関してモデルプラスミドを用いての検討、を目的として共同研究を遂行した。

### 研究計画の実施状況

上記目的の①に関しては、23・24年度の交流でベトナムのダイオキシン汚染地域の土壌を採取し、サンプリングした土壌を用いてダイオキシン分解菌をスクリーニングするとともに、生息する微生物の種類と量の調査を行った。微生物量の測定は、蛍光染色して顕微鏡による直接計数を行った。また、微生物の種類は土壌中からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のシーケンス解析を行った。微生物群集調査と同時に、ダイオキシン類分解菌のスクリーニングに関しては全期間を通じて行った。日本側とベトナム側で同じ土壌サンプルを用いて同様の研究を行い、24年度までに日本側の研究者がベトナムに短期滞在して、ベトナムの若手研究者と共同して研究を行った研究経験を生かして、ベトナムの若手研究者が土壌中からの微生物の採取と解析を行った。優れた分解性を持つ遺伝資源の獲得は、微生物による汚染物質分解の最も重要なポイントである。

### 成果

平成22年10月の初回の訪問時に、日本側の二又、金原、野尻が微生物採取を目的として、ダイオキシン汚染状況の調査をベトナムの研究者と行った。フエの西南西約50キロメートルにあるホーチミンルートへ行き、元米軍の飛行場跡地周辺を調査した。これらの基地では、散布用のヘリコプターや軍用機にダイオキシンの補給が行われたことが現地の住民により確認されており、現在でも高い汚染が検出された汚染サイトには立ち入り禁止となっている。これらの調査の結果、最も汚染度が高いとされているサイトから、土壌サンプルならびに微生物採取を行うことを協議した。また、フエ資源研究所ならびにフエ大学を訪問し、本プロジェクトに参加する研究員と討論を行った。特に、フエ大学は微生物を用いた実験を行う環境が整備されており、本プロジェクトの遂行に支障がないことを確認した。

平成24年2月3日～2月9日に行った現地調査の結果、ベトナムの土壌微生物群集は、日本の微生物群集と異なるものの、枯葉剤が散布されていたと思われる地域の特徴は見出されなかった。しかし、脱塩素能がある *Dehalococcoides* 属細菌が見出された。また、ダイオキシン類の分析の結果、濃度は日本の基準値よりは低いものの、枯葉剤の成分の一つで、最も毒性が強いとされている2,3,7,8-TCDDというダイオキシンが特徴的に検出され、ベトナム戦争での散布の影響が認められるものであった。その結果を受け、再度の土壌サンプリングを行うこととし、ベトナム側と日程の確認および調査ポイントの選別等について協議した。その結果、11月26日から現地へ赴き、合計3カ所から延べ6個のコアサンプルを得た。1カ所目は健康被害が生じている地域、2カ所目および3カ所目ラグーン地域で実施した。調査地点の土壌状態によってサンプル

量は異なるが、大凡 20 cm～70 cm 程度のコアサンプルを採取できた。フエ大学においてコアサンプルを深度別に分別し、ベトナムと日本の両方で解析を進めるために2つに分けた。ベトナム側のサンプルは直ちに-80℃で保存され、日本側のサンプルは直接持ち帰った（植物防疫所からの認可済み）。

上記の共同研究の結果、ダイオキシン汚染土壌からジベンゾフラン分解菌を取得することができたことから、この菌を用いたバイオレメディエーションの可能性が得られた。また、ベトナムのダイオキシン汚染地域の土壌から脱塩素能がある *Dehalococcoides* 属細菌を見出すことができた。また、その菌密度とダイオキシン濃度には、若干の相関が認められ、現場環境が持つダイオキシン分解ポテンシャルを評価する新たな手法の手掛かりを見出すことができた。

さらに、野尻らが単離したカルバゾール分解遺伝子群をクローン化したプラスミドの構築と接合伝達試験の方法を検討した。本研究で構築したプラスミド pHKA1 (51.3 kb) を用いて、代表的な土壌細菌 3 菌株 (*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4、*P. putida* PpY101 および *P. fluorescens* Pf0-1) を受容菌に用いて接合伝達試験を行った。その結果、Pf0-1 株を受容菌とすると、当初の接合伝達頻度は低いものの、15 日間の実験期間中に徐々に頻度が増加するという、これまでにない現象が認められた。この結果から、適した受容菌を選べば、時間経過とともに遺伝子の伝播効率が上昇することが示唆され、本研究で目的とした、プラスミドオーグメンテーション法の有効性を示す結果が得られた。

これらの研究開発から得られたノウハウを、日本とベトナムの若手研究者が共有することにより、ベトナムにおけるダイオキシン汚染問題を、両国の若手研究者が解決する道筋につながるものと考えられた。また、ベトナム国土の様々な汚染問題の解決に応用することが出来れば、今後の両国の友好的な関係をさらに発展させるものであると期待できる。