

ダイオキシンの生分解機能の探索と特性評価
(研究課題番号：H10－生活－052)

平成10年度厚生科学研究費補助金
(生活安全総合研究事業) 研究報告書

平成11年3月

主任研究者 平 石 明
(豊橋技術科学大学エコロジー工学系助教授)

研究課題名：ダイオキシンの生分解機能の探索と特性評価
(課題番号：H10-生活-052)

平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
研究報告書

研究事業期間：平成10年4月1日～平成11年3月31日

交付金額：4,600千円

研究組織

主任研究者：平石 明（豊橋技術科学大学エコロジー工学系 助教授）
分担研究者：鈴木 慈郎（豊橋技術科学大学エコロジー工学系 教授）
分担研究者：藪内 英子（愛知医科大学 客員教授）
分担研究者：鈴木晋一郎（大阪大学大学院理学研究科化学専攻 教授）

はしがき

ダイオキシンは自然界では他の有機化合物に比べて分解されにくく、一旦環境を汚染すると長期間残存することが考えられる。化学構造や性質が類似するPCBが、先進国では既に数十年前に排出が禁止されているにもかかわらず、今なお世界規模で高濃度で自然界に存在することを考えれば十分に予想がつく。したがって、ダイオキシン問題の対策としては行政判断、法制化による排出規制やダイオキシン発生の抑制技術の確立と同時に、物理化学的、生物学的ダイオキシン分解技術と環境修復技術の開発を行なう等の多面的なアプローチが必要である。運搬制御が可能な局所的ダイオキシン汚染環境の汚染除去については物理化学的技術で対応できる可能性があるが、広範囲の環境の汚染除去と修復にはコストと技術面から生物学的方法に頼らざるを得ない。

本研究プロジェクトはこのような背景から微生物によるダイオキシン生分解と環境修復を目指して計画された。ダイオキシンの生分解に関する研究の歴史は世界的にみても未だ10年にも満たず、ダイオキシン分解微生物を用いた生物学的環境修復技術も確立されていない。また国内においても高濃度のダイオキシンに汚染された環境がありながら、現在までの調査はダイオキシンの測定に集中しており、ダイオキシン汚染環境の微生物群集や生態系の変化については研究が遅れている。本研究では、既存の微生物の中からダイオキシン分解能を有するものを探索する傍ら、汚染環境の微生物調査を行ない、環境修復技術確立のための基礎データを取得することを試みた。

本研究事業では表記の3人の分担研究者の協力を得て研究・調査を実施した他、研究協力者として藤江幸一教授（豊橋技術科学大学エコロジー工学系）および松澤有希子助手（豊橋技術科学大学エコロジー工学系）に参画していただいた。実際の研究の遂行に当たっては林炳蘭、片岡慎司（いずれも豊橋技術科学大学）および片岡邦重（大阪大学）の研究員、大学院生各氏の協力を得た。また武内真理子博士（〔財〕発酵研究所）および倉石衍博士（日本食品分析センター）にはダイオキシン生分解機能の探索に必要な多くの菌株を分譲していただいた。さらに現場調査と土壌試料採取においては吉田誠宏氏（大阪府環境農林水産部）、小西貴文氏（大阪府立能勢高等学校校長）、尾崎幸仁氏（大阪府立能勢高等学校教諭）、渋木幸子氏（所沢にきれいな空気をもどす会代表）、および横山進氏（グリーンクラブ21、所沢）に多大なる協力をいただいた。各氏に対してこの場を借りて深くお礼申し上げる。

主任研究者 平 石 明

ダイオキシンの生分解機能の探索と特性評価

（主任）研究者 平石 明 豊橋技術科学大学エコロジー工学系 助教授

研究要旨： ダイオキシン汚染環境の生物学的修復の技術的基盤を確立することを最終目標として、ジオキシゲナーゼ系によるダイオキシン分解能を有する細菌を探索した。まず既知のダイオキシン分解菌*Sphingomonas* sp. RW1株を比較対照としてスフィンゴモナス属の既知菌種およびその他のプロテオバクテリア α -4グループに属する菌種について、ジベンゾフラン(DBF)を炭素源とする生育とダイオキシン分解に関わる*dxnA1*遺伝子の有無について調べた。その結果*Sphingomonas*属およびその他の菌属のいくつかの既知種に弱いながらもDBFを利用した生育が認められた。またこれらの菌種からはダイオキシン分解酵素系の*dxnA1*遺伝子が検出された。ダイオキシン汚染環境の土壌の微生物学的調査を行なったところダイオキシンの汚染レベルと微生物量との間に逆相関の関係が認められた。呼吸鎖キノンをバイオマーカーとしてこれらの汚染土壌の微生物相を解析した結果、Q-10含有微生物およびMK-6含有細菌が特徴的に優占することが判明した。ダイオキシン汚染土壌をDBF培地で集積した結果、ダイオキシン汚染レベルに比例して生育量が高くなる傾向が認められたが、その生育量はRW1株と比較して20%以下であった。したがって汚染現場の微生物群集の分解特性は、分解力の強いRW1株とは異なることが推察された。*Sphingomonas* sp. RW1株の分類学的性状を試験したところ、本株は既知のいずれの菌種とも遺伝学的に離れており、スフィンゴモナス属の新種と考えられた。

A. 研究目的

ダイオキシンによる環境汚染は世界的な規模で拡大しており、我が国においても環境中における高レベル汚染の実態が明らかにされてきた。ダイオキシン対策としては行政判断、法制化による排出規制やダイオキシン発生の抑制技術の確立と同時に、物理化学的、生物学的ダイオキシン分解技術の開発を行なう等の多面的なアプローチが

必要である。たとえば、運搬制御が可能な局所的ダイオキシン汚染環境の汚染除去については超臨界水等の物理化学的技術で対応できる可能性があるが、広範囲の汚染環境の汚染除去と修復にはコストと技術面から生物学的方法に頼らざるを得ない。

ダイオキシンの生分解に関する研究の歴史は浅く、世界的にみても未だ10年も経過していない。またダイオキシン分解微生物

を用いた生物学的環境修復（バイオレメディエーション）技術も確立されていない。しかしながら文献上は既にいくつかのダイオキシン分解菌が知られており、生分解の生化学的、分子生物学的機構も特定の菌種について明らかにされつつある。この中の一つとしてスフィンゴモナス属細菌 *Sphingomonas* sp. RW1株が挙げられる (Wittich et al., 1992; Armengaud et al., 1998)。スフィンゴモナス属は当初、臨床および病院環境由来株を中心とした菌種を構成員として提案された属であるが、現在では多くの自然界由来の菌種が加えられている。上記のダイオキシン分解菌 *Sphingomonas* sp. RW1株はドイツの河川底土から分離された天然由来の株であるが、スフィンゴモナス属に帰属されているだけで種は決定されていない。スフィンゴモナス属細菌の中には有機塩素化合物や芳香族化合物を分解する多くの種が知られているが、これらのすべてにダイオキシン分解能力があるのか、また系統的に類縁の他の属の菌種にもダイオキシン分解株がみられるのかよく解っていない。

本研究では *Sphingomonas* sp. RW1株を比較対照として既知細菌種におけるダイオキシン分解能を探索し、加えて汚染環境中に潜在するであろうダイオキシン分解微生物の動態を調査し、その生分解機構を生態学的、生化学的、および分子レベルの観点から明らかにすることを目的とした。この成果をもとに、ダイオキシン汚染除去に必要な

な生物学的環境修復（バイオレメディエーション）技術を早急に確立することが最終目標である。

B. 研究方法

当初設定した具体的な研究アプローチは以下のとおりである。

1. スフィンゴモナス属細菌を中心とする既知細菌におけるダイオキシン分解能の探索：ジベンゾフラン(DBF)やジベンゾ-*p*-ジオキシン(DBPD)の炭素源としての利用性を探ることによりダイオキシン分解の潜在能力を評価する。また既知菌種におけるダイオキシン分解酵素遺伝子の分布を調べる。
2. ダイオキシン分解酵素のスクリーニングと特性評価：有望なダイオキシン分解菌の中から分解酵素を単離し、分解酵素の物理化学的性質について明らかにする。
3. ダイオキシン分解菌の環境分布と生態学的挙動の解明：汚染土壌における微生物群集構造の変化及びダイオキシン分解菌の挙動をバイオマーカー法（キノプロフェイル法）および微生物学的方法を用いて定量的に把握する。また汚染土壌、水試料を採取し、スフィンゴモナス属細菌を中心とする分解菌の分離を行なう。
4. 既知ダイオキシン分解菌（スフィンゴモナス属細菌）の分類学的帰属の解明：分解菌として知られているRW1株と既知菌種、類縁菌種との分類学的関係を表現型、DNA-DNA交雑試験、分子系統データに基づいて明らかにする。

今回は研究期間内に有望な新規ダイオキシン分解菌を得ることができなかつたため、上記項目1、3、4の内容に限定して研究を実施した。項目1に掲げた既知菌のDBF、DBPDによる生育、および項目3に関連するダイオキシン汚染土壌の微生物学的調査は、主任研究者である平石（豊橋技術科学大学助教授）と分担研究者である鈴木（慈）（豊橋技術科学大学教授）が担当した。項目1に関わるダイオキシン分解酵素遺伝子の検出は主に分担研究者鈴木（晋）（大阪大学教授）が担当した。項目4の分類学的研究は分担研究者藪内（愛知医科大学客員教授）が担当した。また項目1、3の研究の実施においては、研究協力者としてそれぞれ松澤有希子助手、藤江幸一教授（いずれも豊橋技術科学大学）の協力を得た。

C. 研究結果

既知細菌の中では*Sphingomonas* sp. RW1株が有機塩素化合物のジオキシゲナーゼ系を用いてダイオキシンを分解することが知られている。また多くのスフィンゴモナス属細菌種が塩素化芳香族化合物を分解することが知られている。そこで本研究ではまず本属細菌と系統的に類縁なプロテオバクテリア α -4グループの既知細菌を中心にダイオキシンの分解性を検討した。ダイオキシンの類似化合物にDBFがあり、ジオキシゲナーゼ系によるダイオキシンの分解と同じ機構で分解される。本研究では毒性の小

さいDBFを用いてその利用性（生育）を調べ、ダイオキシン分解の指標とした。その結果、スフィンゴモナス属の既知菌種および系統的に類縁のプロテオバクテリア α -4グループ内の好気性光合成細菌の菌種に幅広く、DBFを利用した生育が認められた。DBFで生育する菌株は同時にDBPDでも生育を示した。しかしそれらの生育量は*Sphingomonas* sp. RW1株に比較して小さく、最も良好な生育を示した菌でもRW1株の30%以下であった。

次にスフィンゴモナス属細菌種およびプロテオバクテリア α -4グループ内の好気性光合成細菌の菌種を対象として、ダイオキシン分解酵素ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子領域をPCRで増幅し、潜在的なダイオキシン分解能の分布を調べた。その結果DBFで生育が認められた菌種のほとんどからダイオキシン分解酵素遺伝子と思われるDNAフラグメントが検出された。

既知菌種におけるダイオキシン分解能の探索と平行して、ダイオキシン汚染土壌の微生物学的調査を行ない、現場の微生物群集の特徴について検討した。調査地域は主に大阪府豊能郡能勢町美化センター周辺と埼玉県所沢市くぬぎ山周辺である。その結果、美化センター周辺土壌ではダイオキシンの汚染レベルと有機物量あるいは微生物量との間に逆相関の関係が認められた。呼吸鎖キノンをバイオマーカーとしてこれらの汚染土壌の微生物相を解析した結果、Q-10含有微生物およびMK-6含有細菌が特徴的

に優占することが判明した。また能勢町美化センター、所沢市くぬぎ山周辺土壌からはスフィンゴモナス属の菌種に類似した黄色コロニーを形成する細菌が優占的に検出された。

ダイオキシン汚染土壌をDBF培地で集積した結果、ダイオキシン汚染レベルに比例して生育量が高くなる傾向が認められたが、その生育量はRW1株と比較して20%以下であった。豊橋市周辺の非汚染畑地土壌においてはDBFによる生育は認められなかった。

ダイオキシン分解菌として最もよく研究されている *Sphingomonas* sp. RW1株が、未だ種帰属が決定されていない状態であるため、スフィンゴモナス属の既知菌種を比較対照として分類学的、分子系統学的研究を行なった。その結果 *Sphingomonas* sp. RW1株はスフィンゴモナス属のいずれの既知菌種にも該当しない新種とすべき細菌であることが判明した。

D. 考察

本研究ではダイオキシン汚染環境の生物学的環境修復への利用を最終目的として、ダイオキシン分解菌の探索を行なった。今回はジオキシゲナーゼによる有機塩素系化合物の好気分解機構に着目し、既に本機構によりダイオキシン分解を行うと報告されている *Sphingomonas* sp. RW1株を比較対照として関連細菌（プロテオバクテリア α -4グループ）におけるDBFの分解能とジオキ

シゲナーゼ系遺伝子の分布について調べた。

今回の結果は生理学的小および分子生物学の両面から、RW1株のみならず、スフィンゴモナス属の多くの菌種および系統的に類縁のプロテオバクテリア α -4グループ内の好気性光合成細菌に幅広くDBFおよびDBPD分解能が存在していることを示している。しかしDBF, DBPDによる生育はRW1株に比較すると微弱であり、このような菌が果たして効率的に多塩素化ダイオキシンを分解できるかどうか不明である。ダイオキシン分解酵素遺伝子の存在の確証と、それが生理学的に機能するかどうかの検証が今後必要である。

ダイオキシン汚染環境の微生物学的調査は国内では例がなく、われわれが知る限り今回が初めての調査であると思われる。このような微生物学的調査の意義は以下のように考えられる。まず人の生活や世代を超えた人類の生存と健康を考えた場合、自然界におけるダイオキシンの半減期を推定しておくことが極めて重要である。そのためには自然界におけるダイオキシンの長期的減衰に生物学的分解がどの程度関わっているのかを把握しておく必要があり、微生物学的データがその基礎となる。2番目としてダイオキシン汚染が生態系へ与える影響がある。影響があるとすれば、それはまず食物連鎖上最下部に位置する微生物群集に現れるはずであり、そのために微生物群集構造を特定化しておく必要がある。最後

に、微生物学的調査の大きな意義として、現場に存在しているであろうダイオキシン分解菌の質的・量的把握と、ダイオキシン分解菌の分離である。これは生物学的環境修復を実施する場合の必須データとなる。

今回の現場調査からはダイオキシンが微生物群集の増殖・生存に負の影響を与えることが示唆された。またその影響によって汚染環境では非汚染環境とは異なる特有の群集構造が形成されていることが推察される。すなわち汚染土壌ではQ-10含有微生物とMK-6含有細菌が優占することが認められ、また培養法によって黄色コロニー形成菌が多く分離された。これらの結果は、スフィンゴモナス属細菌がQ-10をもち、黄色の色素を形成することを考慮すると、汚染現場にスフィンゴモナス属細菌が多く存在することをイメージさせる。しかしこのような性状を有する微生物は他にも存在するため、確証を得るには更なる調査が必要である。

汚染土壌微生物群集のDBFによる生育試験で予想外だったのは、当初考えていたよりも生育量が小さいということである。その生育量は*Sphingomonas* sp. RW1のそれと比較すると20%以下であった。この事実はRW1株と現場土壌群集とではダイオキシンの分解特性が異なることを示唆している。すなわち、現場のダイオキシン汚染濃度は憂慮すべき高濃度とはいえpg, ng-TEQ/gのオーダーであり、実験室内で培養に使っている濃度とは桁違いに低い。したがって現

場では、低濃度のダイオキシンに適応した親和性の高い微生物群集が形成されている可能性もあり、もしそうだとすると実験室内で使っているDBF濃度では当然増殖阻害が起こっても不思議はない。*Sphingomonas* sp. RW1以外の試験菌が、高濃度DBFに対して微弱な生育しか示さないことも増殖阻害の結果かもしれない。したがって実際の環境修復を想定すると、RW1株のような高濃度DBF対応型の菌よりも、むしろ増殖阻害を起こすような他のプロテオバクテリア α -4細菌の方が適している可能性もある。いずれにせよ、低濃度ダイオキシンに対応した高親和性の（低*K_m*値のジオキシゲナーゼ系を有する）細菌の探索も一方で必要になってきたといえよう。

生物学的環境修復への適用を考えると、その候補微生物は分類学的評価が完了していなければならない。今回候補の一つである*Sphingomonas* sp. RW1株の分類学的位置について表現型、分子系統的観点から研究を行ない、本菌がスフィンゴモナス属のいずれにも該当しない新種と考えるべき菌であることが判明した。この結果を踏まえて新種としての命名提唱を行なう予定である。

E. 結論

既知細菌についてダイオキシン生分解の機能を探索した結果、プロテオバクテリア α -4グループの細菌に幅広くこの機能が分布していることが示唆された。ダイオキシン汚染現場の微生物調査から、汚染の影

響と考えられる特有の群集構造が形成されている可能性が示された。ダイオキシン分解菌 *Sphingomonas* Sp. RW1株と汚染土壌細菌群集のDBF分解特性が異なるため、今後低濃度のダイオキシンに親和性の高い菌を同時に探索する必要があると考えられる。

F. 引用文献

- Armengaud J., Happe B., and Timmis K.N. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3954-3966.
- Wittich, R. M. et al. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1005-1010.

ダイオキシン分解菌の探索と生態 に関する研究

（主任）研究者 平石 明 豊橋技術科学大学エコロジー工学系 助教授

ダイオキシン分解の生理・生化学 に関する研究

（分担）研究者 鈴木慈郎 豊橋技術科学大学エコロジー工学系 教授

研究要旨： ダイオキシン汚染環境の生物学的修復の技術的基盤を確立することを最終目標として、ダイオキシンの生分解機構の一つであるジオキシゲナーゼ系による有機塩素化合物の好氣的分解能を有する微生物を探索した。本機構を有する細菌として知られている *Sphingomonas* sp. RW1株を比較対照として *Sphingomonas* 属の既知菌種およびその他のプロテオバクテリア α -4 グループに属する細菌種について、ジベンゾフラン(DBF)およびジベンゾ-*p*-ジオキシン(DBPD)を炭素源とする生育とダイオキシン分解に関わる *dxnA1* 遺伝子の有無について調べた。その結果 *Sphingomonas* 属およびその他の菌属のいくつかの既知種にDBFを利用した生育が認められた。またこれらの菌種からは *dxnA1* 遺伝子が検出された。しかしDBF培地における生育量においては *Sphingomonas* sp. RW1株を越える菌は存在せず、最も生育の良い菌種でも前者の30%以下であった。既知菌種の探索に加えて、ダイオキシン汚染環境として知られている大阪府豊能郡美化センター周辺その他の地域の土壌の生物学的調査を行った。その結果ダイオキシンの汚染レベルと微生物量との間に逆相関の関係が認められた。呼吸鎖キノンをバイオマーカーとしてこれらの汚染土壌の微生物相を解析した結果、Q-10含有微生物およびMK-6含有細菌が特徴的に優占することが判明した。ダイオキシン汚染土壌をDBF培地で集積した結果、ダイオキシン汚染レベルに比例して生育量が高くなる傾向が認められた。しかしこれらの生育量は *Sphingomonas* sp. RW1に比べると低かった。この事実はダイオキシン汚染環境におけるダイオキシン分解菌の分解特性は *Sphingomonas* sp. RW1などの分解活性の強いものとは異なる可能性があることを示唆している。

A. 研究目的

ダイオキシン汚染環境の修復は、汚染対象が運搬可能な局所的場所に限定される場合を除けば、技術的にもコスト面からも生物学的方法に頼らざるを得ない。本研究で

はこの課題に対処するための技術的基盤として、既知微生物菌種あるいは汚染環境微生物群集の中に潜在するであろうダイオキシンの生分解機能を探索し、その生分解機構を生態学的、生化学的、および分子レベ

ルの観点から明らかにすることを目的とした。この成果をもとに、ダイオキシン汚染除去に必要な生物学的環境修復（バイオレメディエーション）技術を早急に確立することが、本研究の最終目標である。

ダイオキシン分解能を有する微生物が存在することは、文献上既にいくつかの報告例がある(Wittich et al., 1992; Barkovskii & Adriaens, 1996; Takada et al., 1996)。これらの既知情報をまとめると、微生物によるダイオキシンの生分解機構は3種類に分けることができる(図1)。一つは有機塩素化合物を酸化するジオキシゲナーゼ系を用いてダイオキシンを好氣的に分解する機構で、*Sphingomonas* sp. RW1株やその他の一部細菌に知られている。2番目としてメタン生成古細菌を中心とした複合微生物群集によるダイオキシンの嫌氣的脱塩素化がある。最後に担子菌*Phanerocheate sordia*のリグニンペルオキシダーゼ系を利用したダイオキシンの好氣的分解がある。

このようにダイオキシン分解菌の研究対象としてはさまざまな種類の微生物が考えられるが、土壌、水界底土などの広範囲の自然環境の環境修復を想定した場合、好気性細菌が技術的に最も取り扱いやすい。生物学的環境修復技術には微生物補填法(bio-augumentation)と微生物効果促進法(bio-stimulation)とがあるが、この両手法のいずれにおいても好気性細菌は容易に適用可能と予測されるからである。

1. 有機塩素塩素化合物を酸化するオキシゲナーゼによる好氣的分解
プロテオバクテリア *Sphingomonas* sp. RW1 (Wittich et al. 1992)
2. 嫌気性菌による還元的脱塩素
複合微生物群集 (メタン菌) (Barkovskii & Adriaens 1996)
3. リグニンペルオキシダーゼによる分解
担子菌 *Phanerocheate sordia* (Takada et al. 1996)

図1. 微生物による主要なダイオキシン生分解機構

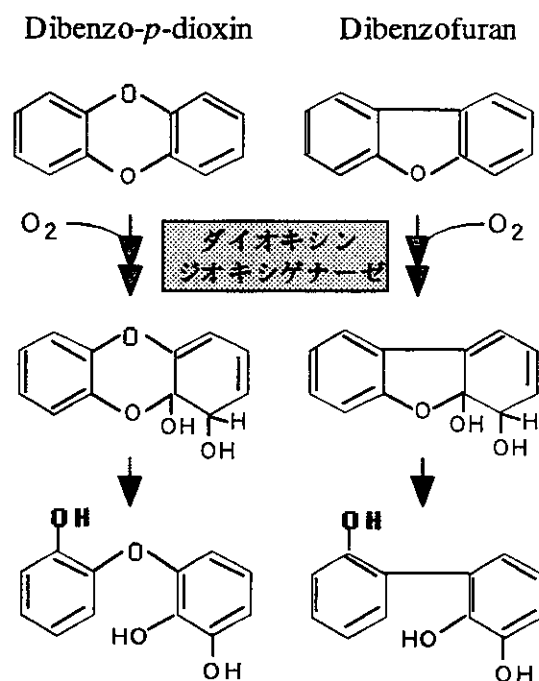


図2. *Sphingomonas* sp. RW1によるダイオキシンおよびDBFの分解過程 (Armenglaud et al., 1998)

そこで本研究ではまずジオキシゲナーゼ系によるダイオキシン分解性を有する *Sphingomonas* sp. RW1株を比較対照として、類縁細菌のダイオキシン分解能を探索した。図2に示すようにジオキシゲナーゼ系においてダイオキシンとジベンゾフラン(DBF)は同様な過程で生分解される(Armenglaud et al., 1998)。そこで今回は分解活性の指標として、毒性の低いDBFを添加した培地における生育を利用した。またダイオキシン分解能の潜在性を探るためにジオキシゲナーゼのA1サブユニットをコードする遺伝子(*dxnA1*)の検出も試みた。さらにダイオキシン分解菌を環境修復に利用する場合、光合成機能を有していれば生残性の点で有利であることから、光合成反応中心タンパクをコードする*puf*遺伝子の存在も試験した。スフィンゴモナス属細菌が属するプロテオバクテリア α -4グループの中には好気性光合成細菌が存在することが既に知られている。

本研究では既知細菌種におけるダイオキシン分解能の探索を実施する傍ら、高濃度ダイオキシン汚染環境の微生物学的調査を実施することにした。ダイオキシン汚染環境の微生物群集がDBFに対しどのような生育特性を示すのか、ダイオキシン分解菌は存在するのか、もしダイオキシン分解菌が存在するとすればその群集はどのような分類学的構造を有しているのかを明らかにすることが目的である。微生物群集構造の推定には呼吸鎖キノンをバイオマーカーと

するキノンプロファイル法を適用した。環境から直接抽出して得られるキノン分子種の組成を解析すれば、培養することなしに比較的容易に群集構造の推定が可能なが報告されている。これらの生態学的知見は生物学的環境修復を実施する場合の基礎情報として必須である。

本報告書の研究は、主任研究者である平石と分担研究者である鈴木(慈)が分担して行なったものであるが、共同で実施した部分もかなりあるため、一括してここに報告する。

B. 研究方法

B-1. 試験菌株

既知細菌の中では*Sphingomonas* sp. RW1株がダイオキシン分解菌として知られており、また*Sphingomonas*属細菌の中には塩素化芳香族化合物を分解するものが知られている。そこで本研究ではまず本属細菌と系統的に類縁なプロテオバクテリア α -4グループの既知細菌を中心にDBFおよびDBPDの分解性を試験した。試験株は既存の菌種である場合にはすべて基準株(type strain)を用いた(図5参照)。菌種が特定化されていない菌株はすべて国内の環境から新しく分離されたものである。一部の菌株については系統学的位置を確定するため16S rRNA遺伝子のPCR増幅と塩基配列の決定を行ない、既存の方法で系統解析した。

B-2. 既知菌のDBF培地における生育

試験株をPBY液体培地(0.5% Bacto-peptone

[Difco]、0.3% Beef Extract [Difco]、0.1% Yeast Extract [Difco])に接種し、30℃で2～3日間往復振とう培養した。この前培養液10 μlを8 mlのDBF培地（無機塩培地に0.1%DBFを加えたもの）に接種し、同様に30℃で往復振とう培養した。生育量は660 nmにおける濁度を測定して求めた。

B-3. *dxnA1*および*puf*遺伝子の分布

ダイオキシン分解酵素遺伝子としてジオキシゲナーゼのA1サブユニットをコードする領域をPCRで増幅した。*puf*遺伝子は色素タンパク複合体βサブユニットと光合成反応中心Mサブユニットにまたがる領域を標的としてPCRで増幅した。PCR産物は平滑末端法でプラスミドベクターに挿入しサブクローニングした後、蛍光サイクル法で塩基配列を決定した。

B-4. 汚染土壌の調査

表1に示す地域の土壌を採取し理化学的微生物学的調査を行なった。試験項目の詳細

表1. 土壌試料の採取地

所在地	試料の種類
1. 大阪府豊能郡能勢町	能勢高校農場土壌
2. 埼玉県所沢市	くぬぎ山産廃処理場 周辺土壌
3. 茨城県つくば市	通産省工技院内土壌
4. 千葉県松戸市	六高台クリーンセンター内公園土壌

土壌採取日：1, 1999年1月12日；2, 1999年2月23日；3, 1999年3月16日；4, 1999年3月17日。

細は表2に示した。この中で元素分析はCHNコーダーを用いて分析した。キノン分析はHPLC法により行なった。

B-6. 汚染土壌のDBF分解活性

土壌100 mgを前記のDBF培地8 mlに接種し、2～3週間往復振とう培養した。この培養液0.3 mlをとり、さらにDBF培地に接種して3週間培養した。生育量測定は前記と同様に行なった。

C. 研究結果

C-1. スフィンゴモナス属および関連細菌の系統関係とDBFによる生育

スフィンゴモナス属には多数の菌種が含まれ、また系統的に類縁の他属の菌種とともにα-4グループを形成している。*Sphingomonas* sp. RW1株と他の類縁菌種のダイオキシン分解能あるいはDBFを利用した生育をみる前提として、これらの菌の系統関係を明確にしておく必要がある。すなわちダイオキシン生分解が特定の菌株にみられる性質なのか、系統的に意味ある性質なのかを把握する必要がある。このためまず試験菌の16S rDNAの塩基配列に基づく系統解析を行なった。

図3に示すようにスフィンゴモナス属の既知菌種は4つの大きなクラスター（クラスターI～IV）に分別された。この中で*Sphingomonas* sp. RW1株はスフィンゴモナス属の基準種である*S. paucimobilis*と同じくクラスターIに属した。スフィンゴモナス属が形成する4つのクラスターの合間を縫っ

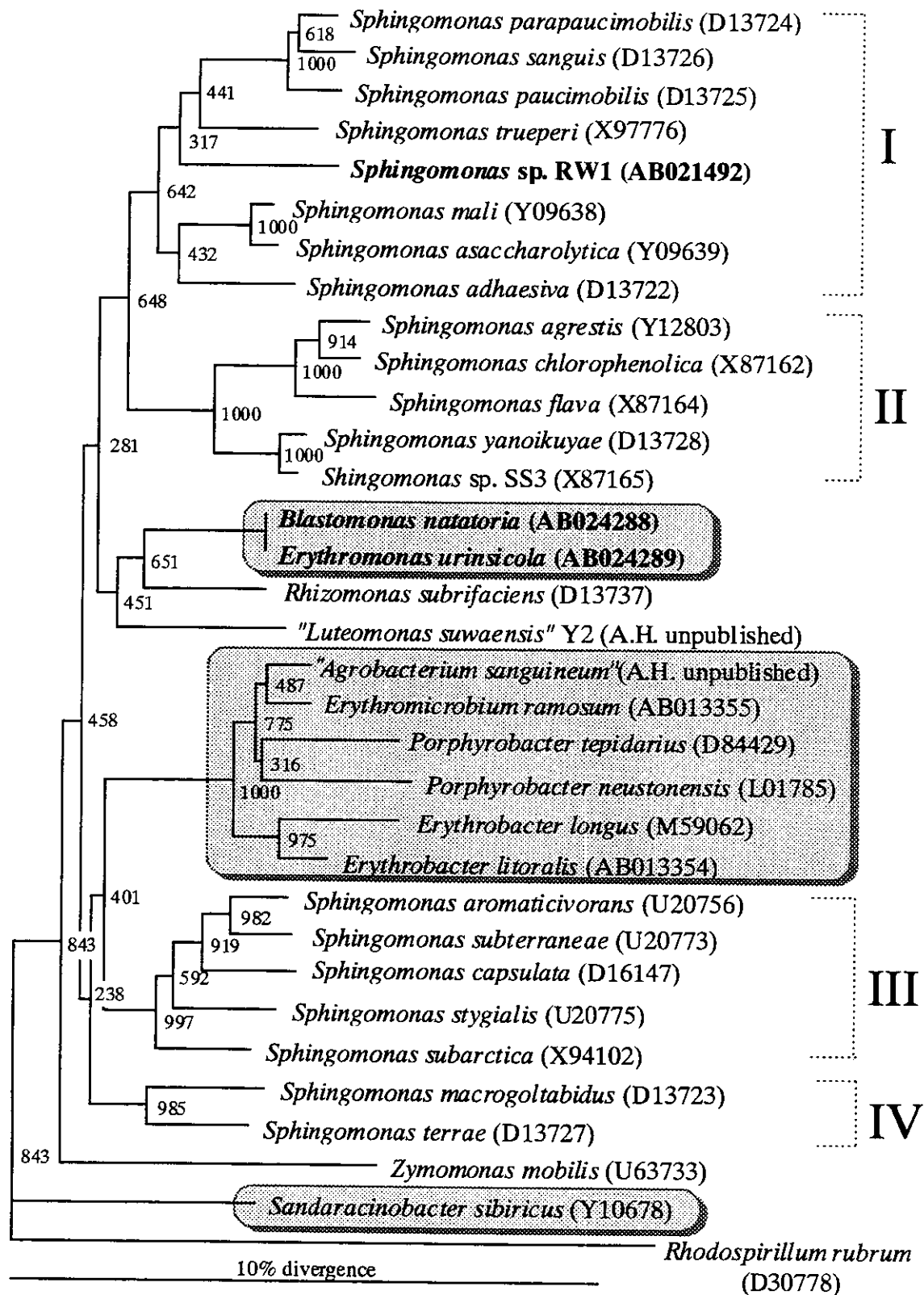


図 3. *Sphingomonas sp. RW1*株および関連細菌（プロテオバクテリア α -4 グループ）の16S rDNAに基づく系統関係。影部分で囲んだ菌種は好気性光合成細菌あるいは今回光合成遺伝子が検出された菌種を示す。今回16S rDNAの塩基配列を決定した菌種はボールド体で示した。

て、他の細菌属のクラスターが存在した。これらのクラスターには好気性光合成細菌の菌属である *Erythromonas*, *Erythrobacter*, *Erythromicrobium*, *Porphyrobacter*などが含まれた。興味深いことに、光合成細菌のクラスターの中に従来非光合成とされてきた

Blastomonas natatoria や "*Agrobacterium sanguineum*" が含まれことがわかった。そこで *B. natatoria* と *A. sanguineum* の光合成の性質について精査したところ、両菌種ともバクテリオテロクロフィル *a* を生産すること、またPCR実験から光合成反応中心のタンパ

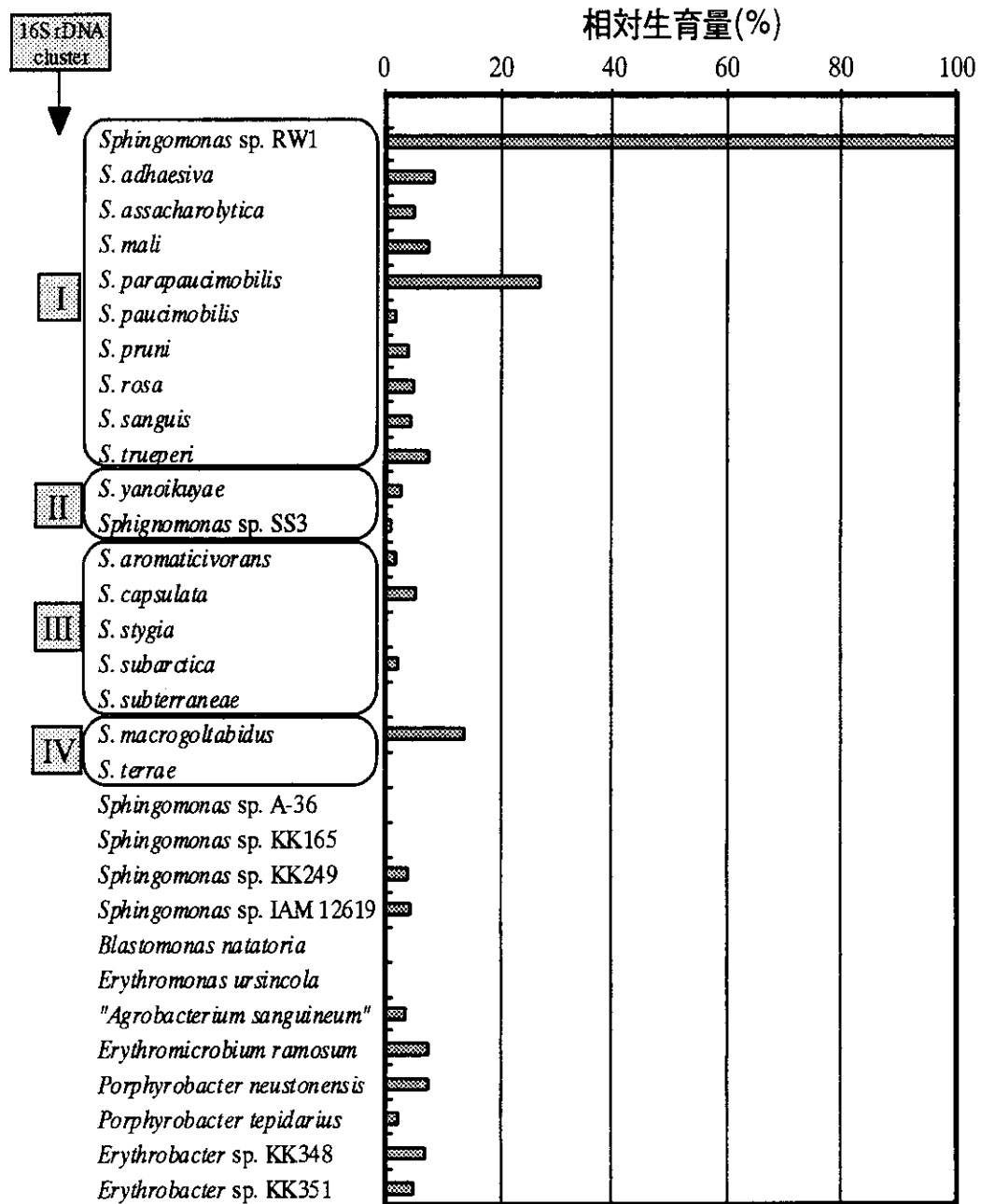


図4. DBF培地におけるスフィンゴモナス属細菌および関連細菌の生育. *Sphingomonas sp. RW1* 株の生育量を100としたときの相対生育量.

クをコードしている *puf* 遺伝子を含んでいることが判明した。

一方、スフィンゴモナス属の既知菌種についてもバクテリオテロクロフィルの生産と光合成遺伝子の存在について調べたが、これらの細菌には光合成の性質は認められなかった。

スフィンゴモナス属および系統的に類縁の既知菌種や分離株についてDBF培地における生育を試験した(図4)。その結果16S rDNAのクラスターとは関係なく、スフィンゴモナス属の多くの菌種がDBFを唯一の炭素源として生育することが認められた。またこれらの細菌はDBPD(0.1%)による生育も示した。しかし、それらの生育量はもっと

も良好な生育を示した *S. parapaucimobilis* においてもRW1株のそれとと比較すると30%以下であり、RW1株を凌いで生育するものは見あたらなかった。好気性光合成細菌である *Porphyrobacter* 属関連の菌種においても弱いながらもDBFを利用した生育が認められた。

C-2. ダイオキシン分解遺伝子の検出

光合成能をもつ菌種にダイオキシン分解活性があればバイオレメディエーションに利用した場合、生残性の点で有利になる可能性がある。そこでDBF培地での試験で弱い生育が認められた好気性光合成細菌の菌種を対象に、ダイオキシン分解酵素遺伝子(*dxnA1*)の検出を試みた。その結果図5に示すように、これらの好気性光合成細菌から対照として用いた *Sphingomonas* sp. RW1株と同様な0.9 kbのPCR産物が検出された。

これらのPCR産物が果たして目的の遺伝子であるのかどうか確かめるため、現在サブクローニングを行なって塩基配列を解析中である。

C-3. ダイオキシン汚染土壌の理化学的、微生物学的調査

バイオレメディエーションに向けた基盤情報を得るために、高濃度ダイオキシン汚染環境の理化学的、微生物学的調査を行なった。調査対象地域として大阪府豊能郡能勢町の美化センター周辺土壌および埼玉県所沢市くぬぎ山周辺の土壌を選択した。

図6に能勢町美化センター周辺の土壌サンプリング地点を示す。1996年にダイオキ

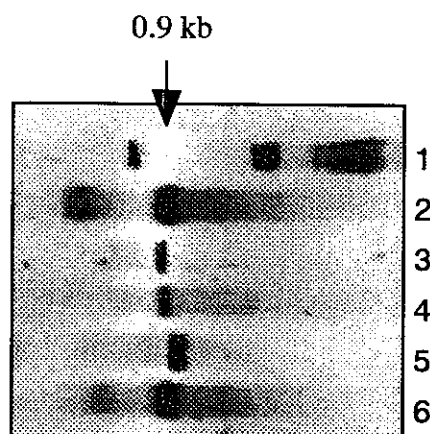


図5. PCRによるダイオキシン分解酵素遺伝子の検出(アガロースゲル電気泳動によるPCR産物の分離)。 *dxnA1* 遺伝子0.9 kbの領域を標的としたPCRを行なった。レーン1、サイズマーカー(λ -*Hind*III digest); レーン2、 *Sphingomonas* sp. RW1; レーン3、 *Erythromicrobium ramosum*; レーン4、 *Porphyrobacter neustonensis*; レーン5、 *Porphyrobacter tepidarius*; レーン6、 "*Agrobacterium sanguineum*".

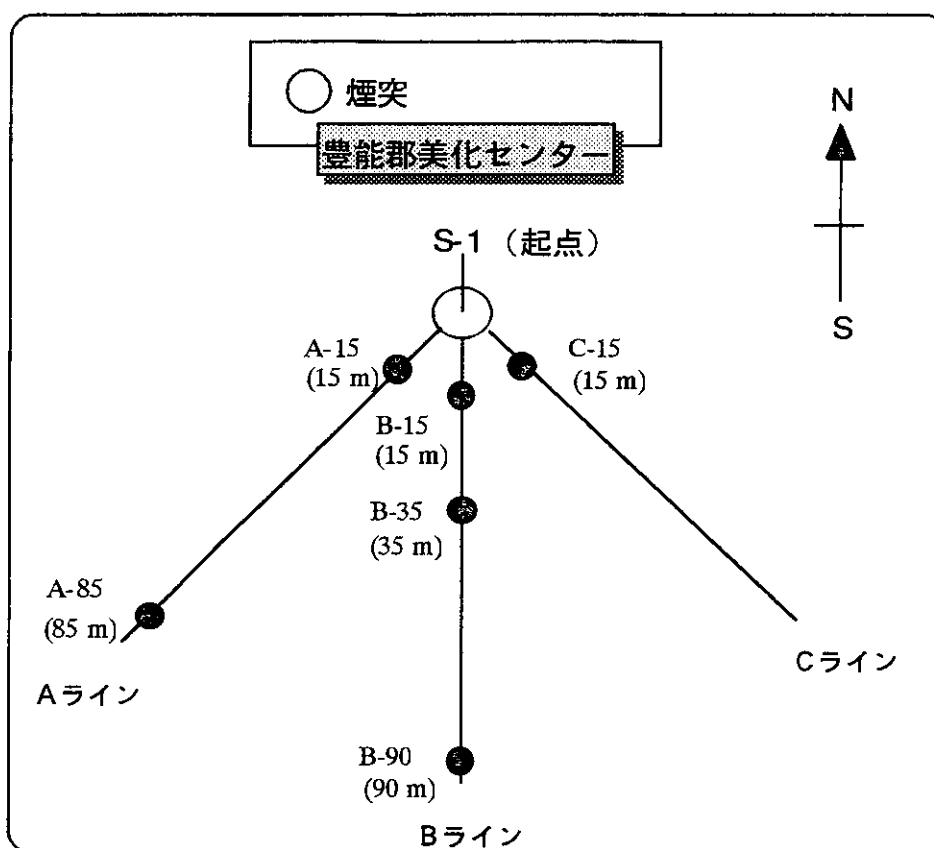


図6. 豊能郡能勢町美化センター周辺土壌のサンプリング地点

表2. 豊能郡能勢町美化センター周辺土壌の理化学的、微生物学的調査結果

採取地点	DXN*1 (pg-TEQ/g)	温度 (°C)	pH	有機物量*2 (%)	元素分析			総菌数 (x 10 ⁹ /g)	生菌数 (x 10 ⁷ /g)	キノン量 (nmol/g)
					C (%)	H (%)	N (%)			
S-1	2900	4.3	5.9	9.35	3.52	0.75	0.24	1.3	3.4	1.80
A-15	2500	4.3	5.7	14.22	5.37	0.95	0.34	2.1	2.8	1.65
A-85	540	4.3	5.4	15.50	10.04	1.15	0.65	8.2	1.7	5.24
B-15	1300	4.6	5.4	8.26	2.86	0.57	0.19	2.5	2.8	1.81
B-35	720	4.6	5.0	18.68	8.38	1.13	0.55	5.9	3.0	4.02
B-90	1100	4.3	6.5	8.37	3.17	0.63	0.18	1.6	9.6	0.86
C-15	3900	4.3	5.0	12.58	4.79	0.84	0.24	2.1	3.0	2.24

*1 ダイオキシン量 (1996年データ)

*2 揮発性化合物量

シンが高濃度に検出された地点から7箇所を選択し、表層土壌を採取した。またこれ以外に高濃度のダイオキシンが検出されたとされる付近の池から水を採取した。

豊能郡能勢町の美化センター周辺土壌の理化学的、微生物学的調査の結果を表2に示す。サンプリング時期は1999年の1月であり、土壌温度は5℃以下であった。またpHは5.0から6.5の範囲にあり、酸性化の兆候が認められた。土壌中の有機物量およびC, H, N量は、ともに3年前に測定されたダイオキシン濃度と反比例して検出される傾向にあった。すなわち、ダイオキシン濃度が高い地点ほど、有機物が少ないという結果が得られた。また土壌中の総菌数とキノン量は、有機物量と正の相関関係で存在した。これらの結果は、ダイオキシン汚染が環境中の一般的な微生物の増殖を抑制することを示唆している。非選択的寒天平板培地で得られた生菌数は総菌数の0.2-6%であり、培養法ではごく一部の菌しか得られないことが判明した。また生菌数は有機物量、キノン量、総菌数と正の相関関係を示さなかった。

美化センター周辺の土壌および池の水から寒天平板培地上に生育してきたコロニーをみると黄色、オレンジ色に着色したものが多く、生菌数の30-80%を占めた。

所沢市くぬぎ山周辺の土壌および他の地点の土壌については目下分析中である。現在のところ、所沢市の土壌からも高比率で色素生産コロニーが分離されており、美化

センター土壌と同様な傾向を示している。

C-4. ダイオキシン汚染土壌のキノンプロファイル

前記したように、美化センターの土壌から非選択的寒天平板培地で得られた生菌数は総菌数のわずか0.2-6%であるため、分離株の同定結果から現場の微生物相を再構成しても信頼性に乏しいことが考えられる。そこで非培養系の化学的バイオマーカー法であるキノンプロファイル法を用いて現場土壌の微生物群集構造を推定することを試みた。キノンは呼吸鎖の電子伝達鎖の必須脂溶性成分であり、分類群に応じて化学構造が異なる分子種が存在する。また原則として1菌種に1つの優占分子種が存在するので、環境から直接抽出されたキノンの分子種組成を解析すれば元の系の微生物組成を大まかに知ることができる(Hiriashi et al., 1998)。

図7に美化センター周辺土壌の典型的なキノンプロファイルを示す。比較対照としてダイオキシン非汚染土壌である愛知県豊橋市内の畑地土壌のキノン分析結果を示した。図にみられるように両者のキノンプロファイルは大きく異なった。美化センター土壌では、ユビキノン分子種Q-10とメナキノン分子種MK-6が主要キノンとして検出され、両者で全体の約40%を占めた。また有機汚濁水系や自然環境の主要キノンであるQ-8は検出されなかった。一方豊橋の土壌ではメナキノン/ユビキノン比が高く、MK-7とMK-8が主要キノンであり、両者で40%を

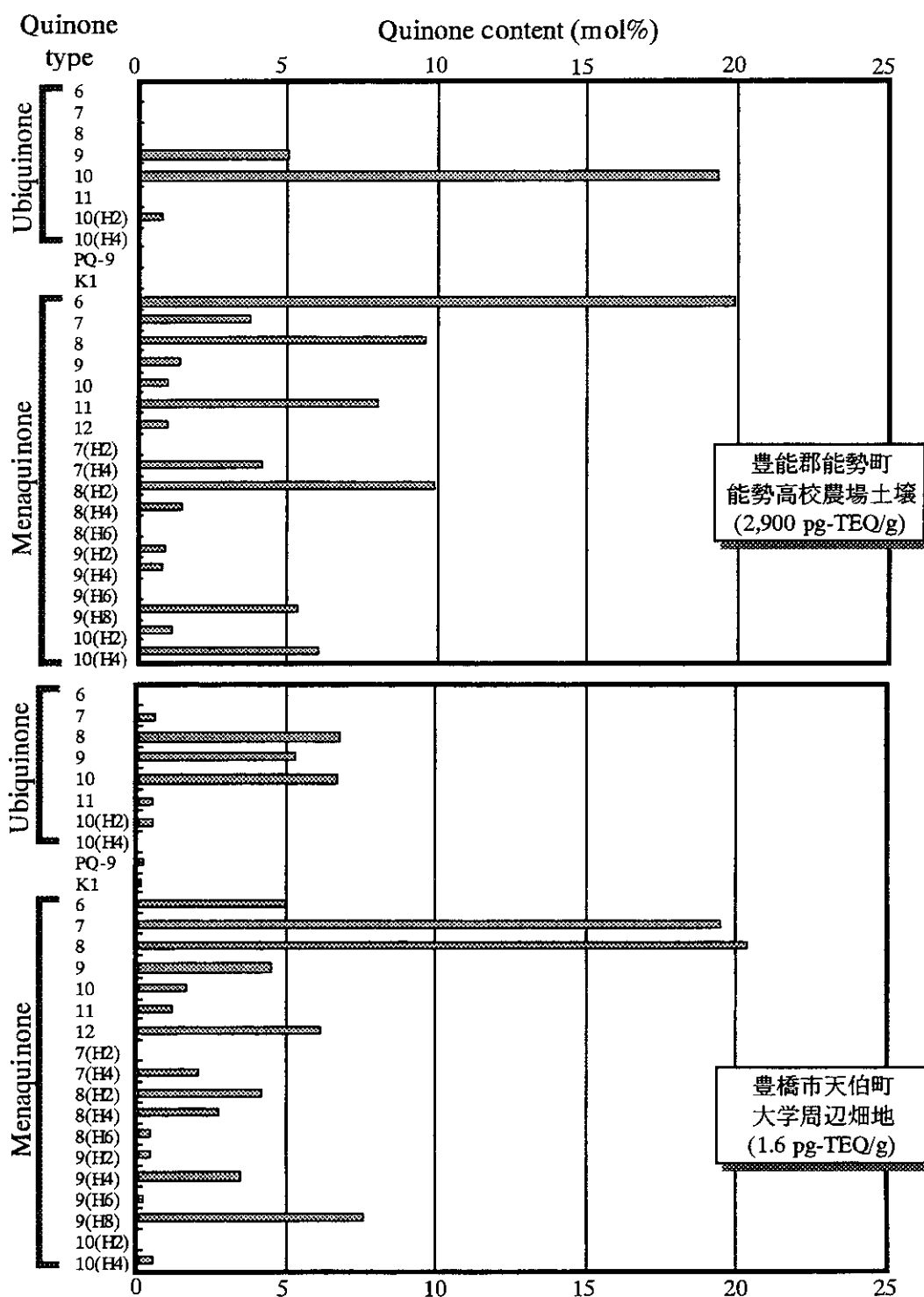


図7. ダイオキシン汚染土壌（能勢町美化センター周辺）（上）と非汚染土壌（豊橋市畑地）のキノプロファイルの比較. Quinone typeの項の数字は、イソプレニ側鎖の単位がn個のユビキノンおよびメナキノンを示す。側鎖がx個の水素で飽和されている場合には、n(Hx)というように表す。PQはプラストキノン、K1はフィロキノン（ビタミンK1）を示す。

越えた。またユビキノンはQ-8, Q-9, Q-10が同じ程度に検出された。部分飽和型メナキノンは種類が異なるが、美化センター、豊橋のいずれの土壌からもかなりの量で検出された。

C-5. ダイオキシン汚染土壌のDBF分解活性

ダイオキシン汚染土壌には既にダイオキシンに適応した微生物群集が存在していることが考えられる。そこで汚染土壌がダイオキシン分解のポテンシャルをもつかどうかを、DBF培地における生育で調べた。

図8は、先に示した能勢町美化センター周辺のダイオキシン汚染土壌によるDBFの分解の様子を、ダイオキシンの汚染のレベルと微生物生育量の関係として表したものである。図にみられるように、ダイオキシン汚染のレベルが高い土壌ほどDBF添加による微生物集積効果が高く、土壌のダイオキシン濃度と微生物の増殖量（集積量）は正の相関関係にあった。すなわち、ダイオキシン濃度が高い土壌ほどDBF分解能を有する微生物が多いことを示唆している。

ダイオキシン汚染土壌にはその汚染レベルに応じてDBF分解菌が含まれることが示唆されたが、図の中で最も高い生育量を示した土壌でも、*Sphingomonas* sp. RW1株と比較するとその相対生育量は20%程度であった。

なお豊橋市のダイオキシン非汚染土壌においては、DBFによる微生物の集積効果は全くなかった。

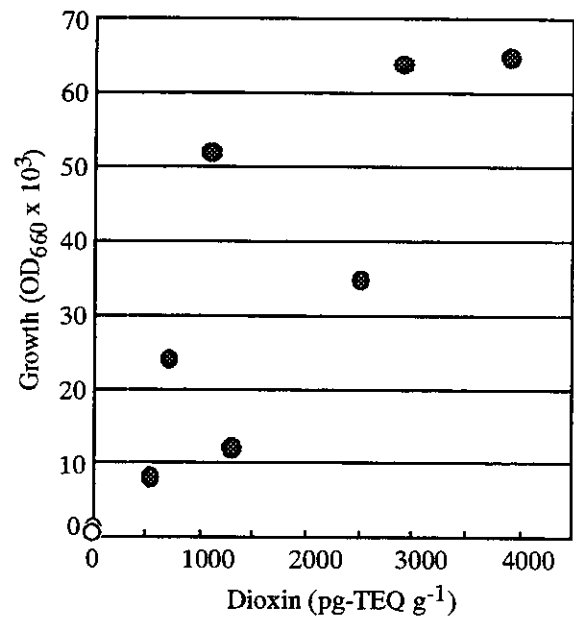


図8. ダイオキシン汚染土壌によるDBFの分解特性（DBFによる土壌微生物の集積量） ●は能勢町土壌（ダイオキシン汚染土壌）、○は豊橋市畑地土壌（ダイオキシン非汚染土壌）のデータ。

D. 考察

本研究ではダイオキシン汚染環境の生物学的環境修復への利用を最終目的として、ダイオキシン分解菌の探索と高濃度ダイオキシン汚染地域の微生物調査を行った。まずオキシゲナーゼによるダイオキシンおよびその他の有機塩素系化合物の好気分解機構に着目し、本機構で同様に生分解されるDBF同族体の分解性を指標として既知好気性細菌における生分解能を探索した。すなわち、当該機構によりダイオキシン分解を行なうと報告されている*Sphingomonas* sp. RW1株を比較対照として、プロテオバクテリアα-4グループに属する関連菌種のDBF, DBPDによる生育特性と*dxnA1*遺伝子