

含有の有無を試験した。

その結果、DBF, DBPDによる生育は程度の差はあるものの*Sphingomonas*属菌種および関連の α -4プロテオバクテリアの細菌に幅広く認められた。興味深いことは、この系統に含まれる好気性光合成細菌の菌属（たとえば*Porphyrobacter*）にも微弱ながらDBFによる生育が認められたことであり、またこれらの細菌からダイオキシン分解酵素遺伝子と思われるPCR産物が得られたことである。光合成細菌にDBF分解（すなわちダイオキシン分解）活性が認められれば、環境修復に適用する場合の有力な候補となり得る。汚染環境はいずれも有機物量に乏しい貧栄養状態にあり、蓄積しているダイオキシン量も高濃度とは言え、通常の微生物の培養に使う炭素基質の量に比べると100万倍の1以下である。このような条件では、修復に用いる一般的な化学合成有機栄養微生物の生存に必要なエネルギーを確保することは難しい。一方光合成細菌は炭素エネルギー源が存在しなくても、光エネルギーを利用して生存に必要なATPを合成できる。*Porphyrobacter*属細菌をはじめとする好気性光合成細菌に果たしてダイオキシン分解能があるのか、更なる精査が必要である。

今回ダイオキシン汚染環境の微生物学的調査を行なったが、我々が知る限り国内では初めての調査であると思われる。このような調査は、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するためにも、ダイオキシン汚染が生態系へ与える影響を考える上でも極めて重要である。また生物学的環境修復を実施する場合には、微生物学的な事前調査を行なっておくことが求められている。

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。すなわちキノプロファイル法によって、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た。このようなキノン組成は一般的な非汚染土壌にはみられない。ユビキノンはプロテオバクテリア α 、 β 、 γ サブクラスの菌種や真核微生物に見られるキノンであり、とくにQ-10は細菌の中では α サブクラスに特有に存在する。一方メナキノンは原核生物のみに存在するキノンであり、その中でMK=6はシトファガ、フラボバクテリアなどに見られる分子種である。今回培養法では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、MK-6含有色素生産菌としてシトファガ、フラボバクテリアがあることなどを考慮すると、汚染現場にこれらの細菌が多く存在することが想像される。しかしこのような黄色系色素生産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。また有

望なダイオキシン菌として担子菌も報告されているので(Takada et al., 1996)、この微生物のキノン系を調べ、汚染現場における存在率を評価することも今後の課題である。

キノンプロファイル法は培養することなく短時間で現場の微生物相を把握することができるので、今後このような生態学的影響をみる場合に強力な技法となろう。

現場の汚染土壌微生物群集によるDBF培地での生育を試験した結果、ダイオキシン分解能をもつことが推察された。しかしながら当初の予想とは異なり、現場微生物群集のDBFによる生育量は小さかった。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人体への影響を考慮しなければならないほどの高い濃度とはいえ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。したがって汚染環境では、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る。このような低濃度に適応した微生物群集であれば、実験室内で使っているDBF濃度(0.1%, w/v)では当然増殖阻害が起こっても不思議はない。汚染現場に果たして低濃度のダイオキシンに高い親和性をもつ微生物存在するのか、今後分離を試みる必要がある。これらの菌の性質とダイオキシン分解酵素の特性が明らかになれば、生物

学的環境修復に向けての大きな一歩になるだろう。

前述したように*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。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 値のジオキシングナーゼ系を有する)既知細菌の探索も一方で必要になってきたといえよう。

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.

Barkovskii, A. L. and Adriaens, P. (1996) Appl. Environ. Microbiol. **62**, 4556-4562.

Hiraishi, A., Ueda, Y., and Ishihara, J. (1998) Appl. Environ. Microbiol. **64**: 992-998.

Takada, S., Nakamura, M., Matsueda, T., Kondo, R., and Sakai, K. (1996) Appl. Environ. Microbiol., **62**, 4323-4328.

Wittich, R. M., Wilkes, H., Sinnwell, V.,

Francke, W., and Fortnagel, P. (1992) Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1005-1010.

G. 既出論文
なし。

ダイオキシン分解酵素の評価 に関する研究

（分担）研究者 鈴木晋一郎 大阪大学大学院基礎工学研究科 教授

研究要旨： ダイオキシン分解酵素であるダイオキシンジオキシゲナーゼ遺伝子をプローブとして用い、3種のスフィンゴモナス属細菌（*Sphingomonas* sp. RW1, *Sphingomonas* sp. SS3, *Sphingomonas yanoikuyae*）を対象にダイオキシン分解酵素系遺伝子の検索を試みた。3株から抽出した染色体DNAを鋳型に、4種類のプライマーを用いてPCRを行なったところ、ダイオキシン分解酵素系遺伝子が確認されているRW1株以外にも特異的遺伝子断片の増幅が確認され、スフィンゴモナス属細菌に当該遺伝子が普遍的に存在する可能性が示唆された。また、PCR反応液の電気泳動パターンから、RW1とSS3の両株は遺伝子的に類似しており、*S. yanoikuyae*は類似性が低いと考えられた。

A. 研究目的

ダイオキシン等環境汚染物質の微生物分解の研究は現在のところ、分解菌の検索、分解機能の解明、分解酵素とその遺伝子の解析まで進んでいて、今後分解菌の分子育種へと進展していき、バイオレメディエーションの実用研究に発展すると考えられる。汚染した土壌や水を原位置で処理するin situバイオレメディエーションに用いる系としては、分子育種した微生物の現地導入より、土着菌に分解機能遺伝子を微生物種を超えて水平伝播させる方が、分解能定着の確実性が高いと考えられる。分解機能の水平移動にはプラスミドやトランスポゾンの伝播能や転移能の利用が考えられるが、その前段階として機能遺伝子単位の決定と

その機能発現系の構築が必要である。

そこで本研究では、スフィンゴモナス（*Sphingomonas*）属細菌のダイオキシン分解酵素系遺伝子を抽出、セルフクローニングすることによる分解能の向上（分子育種）と同時に水平伝播系の開発を目的に、まずPCR法を用いて分解酵素遺伝子の検索を行った。類縁細菌のダイオキシン分解能を探索した。

B. 研究方法

ダイオキシン生分解の第一段階にはダイオキシンジオキシゲナーゼが作用することが報告されており、*Sphingomonas* sp. RW1株の遺伝子解析により、本酵素がヒドロラーゼ相同タンパク質と近接して存在すること

が明らかにされている(Armengaud et al., 1998)。そこで、他のスフィンゴモナス属細菌でも同様の遺伝子構造を有するか否かを明らかにするために、PCR法を用いる遺伝子解析を行った。

まず *Sphingomonas* sp. RW1, *Sphingomonas* sp. SS3, *Sphingomonas yanoikuyae* の 3 種のスフィンゴモナス属細菌を栄養培地を用いて 37°C で 24 時間好気培養した。それぞれ湿重量約 8 mg の菌体から QIAGEN 社製 DNeasy Tissue Kit を用いて、Kit の最適条件で染色体 DNA を調整した。ダイオキシシン分解酵素系をコードする遺伝子、*dxnA1*, *h1* の配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、3 種の染色体 DNA を鋳型に PCR 法によりダイオキシシンジオキシゲナーゼ遺伝子を検索した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーは RW1 株で *dxnA1*, *dxnA2* のクローニングに用いられたものと同じで(Armengaud et al., 1998)、ジオキシゲナーゼ α サブユニットの保存配列を基に合成した primer AJ025: 5'-TAYATGGGBG ARGAYCCVGT; AJ026: 5'-GCRAAYTT CCARTTRCABGCG; および AJ026rev: 5'-CCVTGYAA YTGGAARTTYGC と、ヒドロラーゼ H1 の保存領域を基にした AJ127: 5'-TGYTC DATYTGIAYCCARTG である。AJ025-AJ026, AJ025-AJ127, AJ026rev-AJ127 の 3 通りの組み合わせで染色体 DNA を鋳型に、Takara Ex Taq DNA polymerase を用いて PCR を行い、増幅遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により解析した。

C. 研究結果

Sphingomonas sp. RW1, *Sphingomonas* sp. SS3, *Sphingomonas yanoikuyae* の 3 種のスフィンゴモナス属細菌を栄養培地を用いて試験管培養し、得られた菌体から染色体 DNA を調整した。染色体 DNA の抽出には QIAGEN 社製 DNeasy Tissue Kit を用いたが、他のグラム陰性細菌と同様の手順により、0.2-1.0 ml の培養液(菌体約 8 mg 相当)から約 100 μ g の高分子量 DNA を得ることに成功した。

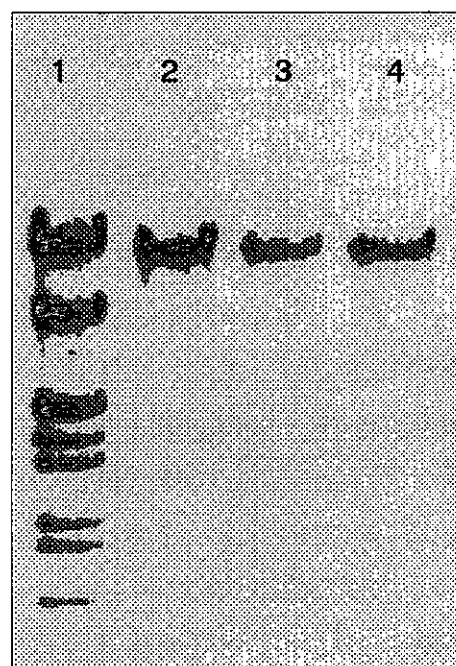


図 1. 菌体からの染色体 DNA の抽出 (アガロースゲル電気泳動による検出)。レーン 1、分子量マーカー；レーン 2、RW1；レーン 3、SS3；レーン 4、*S. yanoikuyae*。

スフィンゴモナス属細菌 3 株の染色体 DNA を鋳型に、3 通りのプライマーの組み合わせで PCR を行なった。反応液に DMSO

を5%添加することにより、AJ025-AJ127、AJ026rev-AJ127の組み合わせですべての試験菌株から特異性の高い増幅遺伝子断片を得ることができたが(図2)、AJ025-AJ026では特異的増幅は見られなかった。また、反応液にDMSOを添加しない場合には全く増幅が観察されなかった。しかしながら、増幅遺伝子断片の大きさは1.6 kbpと予想される1.8 kbpより小さく、異なる遺伝子系が増幅された可能性もある。また、電気泳動パターンから、RW1・SS3の両株は遺伝的に類似しており、*S. yanoikuyae*は遺伝子系の類似性が低いと考えられた。

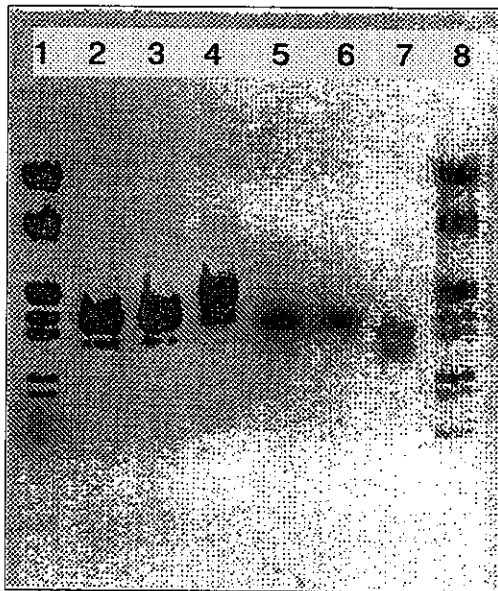


図2. ダイオキシン分解酵素系遺伝子のPCR増幅. 左からマーカー(1)、AJ025-AJ127(*Sphingomonas* sp. RW1(2)、*Sphingomonas* sp. SS3(3)、*S. yanoikuyae*(3))、マーカー) AJ026rev-AJ127(*Sphingomonas* sp. RW1(4)、*Sphingomonas* sp. SS3(5)、*S. yanoikuyae*(6))、マーカー(8).

D. 考察

3種のスフィンゴモナス属細菌から染色体DNAを抽出し、PCRによりダイオキシン分解酵素系遺伝子の検索を試みた。その結果遺伝子が確認されているRW1株以外にも特異的遺伝子断片の増幅が確認され、スフィンゴモナス属細菌にダイオキシン分解酵素系遺伝子が普遍的に存在する可能性が示唆された。予想されるより短い断片が増幅されていたのは用いたプライマーに原因があると考えられ、プライマーを慎重に設計することによって、より効果的に目的遺伝子の検索が可能になるであろう。現在、増幅遺伝子断片のクローン化を試みており、まだ配列の解析まで至っていないが、本断片がダイオキシンジオキシゲナーゼ遺伝子の一部であると考えられる。

今回試験的に3種のスフィンゴモナス属細菌について遺伝子検索を行ったのであるが、今後検索範囲を広げることによって、より高活性な酵素遺伝子の取得も可能になると思われる。また、大腸菌とスフィンゴモナス属菌のシャトルベクターを開発することにより、本遺伝子のセルフクローニングにも道が開けることが期待される。

E. 結論

3種のスフィンゴモナス属細菌から市販のキットを用いて、他のグラム陰性細菌と同様の高い効率で高分子量染色体DNAを抽出できた。この染色体DNAを鋳型にPCR法を用いた遺伝子検索により、ダイオキシン

分解酵素系遺伝子がスフィンゴモナス属細菌に普遍的に存在する可能性が示唆された。

F. 引用文献

Armengaud J., Happe B., and Timmis K.N.
(1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3954-3966.

G. 既出論文

なし。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

（分担）研究報告書

ダイオキシン分解菌の分類 に関する研究

（分担）研究者 藪内 英子 愛知医科大学客員教授

研究要旨：スフィンゴモナス属の定義を修正し、ダイオキシンおよびその関連物質の分解菌として知られる *Sphingomonas* sp. RW1 および SS3 の2菌株の分類学上の位置を決定するため、スフィンゴモナス属の全既知菌種の基準株との間で DNA 交雑試験を行い、両菌株ともに新種の可能性を認識し、現在新種名提案を準備中である。

A. 研究目的

スフィンゴモナス属菌種には、ダイオキシンおよびその関連物を分解するものが多数報告されている。これらの中には分類学上の種が決定されていないものがある。既知の分解菌の菌種の決定は新たな分解菌の検索のために必須であるため、これらの分類学的研究を行った。

B. 研究方法

科 *Sphingomonadaceae* を構成すると考えられる7属26菌種、2亜種の基準株およびダイオキシン分解菌として知られる RW1 と SS3 株を用い、形態、生理、生化学性状、菌体脂質・脂肪酸組成、DNA 交雑試験、16S rRNA 延期配列の系統発生的解析を行った。スフィンゴモナス属22菌種および分解菌2株は36種類の化学療法剤に対する感受性を Kirby-Bauer 法で調べた。

C. 研究結果

使用菌株はすべてグラム陰性桿菌であり、文献には分枝が記載されていたものも工学顕微鏡では確認できなかった。その多くはレモン色から橙黄色の非水溶性色素を産生したが、

なかには殆ど無色のものもあり、通性光合成菌種（葉緑素産生）では茶褐色の発育を示した。16S rRNA 塩基配列解析により *Sphingomonadaceae* に所属すると認められた7属の全菌種に特徴的なスフィンゴ糖脂質の存在を証明した。

“*Rhizomonas*” *suberifaciens*, *Blastomonas natatoria* および *Erythromonas ursincola* をスフィンゴモナス属に移籍し、属の定義を修正した。RW1 と SS3 の両菌株は菌体脂質分析結果などからスフィンゴモナス属菌と認められるが、前者の発育はレモン色で他菌種に比して発育は悪くこの属の13菌種の基準株との DNA 交雑試験で相同値が0-11%と低く、表現形質上からも他菌種と鑑別可能であった。

D. 考察

スフィンゴモナス属菌体脂質に存在するスフィンゴ糖脂質は、その分類学的意義では好気性・嫌気性、葉緑素の存在などよりも上位に位置付けられると考えられる。またこのスフィンゴ糖脂質は他の一般のグラム陰性桿菌の菌体外膜のリポポリサッカライド (LPS) に替るものと考えられており、ダイオキシン

類の分解に何らかの役割を演じていることが推測される。

RW1株は発育が悪く、生理・生化学活性が劣るなど、種々の点で他のスフィンゴモナス属菌種とはかなり異質と見受けられる。RW1はマクロライド系とキノロン系薬剤に、SS3はペニシリン系薬剤に耐性であり、その性状はこれらの菌株が自然界で生残し続けることと関係があるのかも知れない。

ダイオキシン類分解のような特殊な性能を高い効率で発現する菌株の検索は容易なことではない。従来からの調査方法に加えて、新しい分子生物学手法を用いて、目的にかなう菌株の探査または作出を試みなければならない。何れの場合にも、それらの菌株の分類学上の位置を確認し、その地位を確保しておくことは、今後のこの分野の研究の発展に必須のことである。

D. 結論

ダイオキシン類化合物を分解する菌種・菌株について報告の多いスフィンゴモナス属の定義を修正した。

RW1とSS3株の表現形質および分枝遺伝学的性状から、新菌種の可能性を含め、近くその分類・命名を解明するべく作業をすすめている。

E. 文献

Yabuuchi E, Kosako Y, Naka T, Suzuki S and uano I. 1999. *Microbiol. Immunol.* **43** (4), 1999. in press.

Wittich R-M, Silkes H, Sinnwell V, Francke W and Foartnagel P. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 1005-1010, 1992.

Schmidt S, Wittich R-M, Erdmann D, Wilkes H, Francke W and Fortnagel P. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 2744-2750, 1992.

19980568

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

Proposal of *Sphingomonas suberifaciens* (van Bruggen, Jochimsen and Brown 1990) comb. nov., *sphingomonas natatoria* (Sly 1985) comb. nov., *Sphingomonas ursincola* (Yurkov et al. 1997) comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*.

Yabuuchi E, Kosako Y, Naka T, Suzuki S, Yano I.

Microbiol Immunol. 1999;43(4):339-49.