

表1-7 ダイオキシン類の調査結果

分類	調査施設数	濃度範囲(括弧内は平均値) (pg-TEQ/L) (注1)
地下水 (湧水を含む)	204	ND~15 (0.81)
排水	51	ND~22 (1.44)
表流水	65	ND~25 (1.39)
放流水	5	0.002~1.9 (0.40)
その他(注2)	13	0.01~300

(注1)同一施設で複数の調査地点がある場合には、最も濃度の高いデータを当該施設の代表値として採用している。

(注2)埋立地内溜まり水、埋立地保有水、河川水

また、環境庁が取りまとめた結果⁹⁾について、一般廃棄物最終処分場及び産業廃棄物管理型最終処分場の結果を図1-1、1-2に、遮水工または浸出水処理設備を有しない処分場(不適正最終処分場)の結果を図1-3、1-4に示す。また比較検討のため、環境庁が文献調査により行った水環境中、土壌環境中のダイオキシン類濃度を図1-5、1-6に示す。

これより、一般廃棄物最終処分場及び産業廃棄物管理型最終処分場については、浸出水でも特異的な例を除けばほぼ1pg-TEQ/Lであり、処理後の放流水による公共用水域に対する影響は見られなかった。よって、今回の調査結果から、ダイオキシン類を含む焼却灰等が最終処分場に埋立処分され、最終処分場内に適正に管理・封じ込めされていれば、周辺環境に影響を与えるものではないことが明らかになった。

一方、遮水工または浸出水処理設備を有しない処分場に関しては、処分場外部に設けたボーリング孔中の採取水からダイオキシン類が検出されたものもあるが、その影響範囲は限られており、周辺公共用水域への影響は認められなかった。しかし、サンプリング方法や、廃棄物埋立層の境界が不明などの問題はあるにせよ、地下水中から高濃度のダイオキシン類が検出されている例もあり、実態把握のための継続調査と地下水中における挙動に関する検討を今後行っていく必要があると考えられる。

一方、処分場周辺土壌や放流水域の堆積物に関しては、一般的な土壌のダイオキシン類レベルと同程度であった。

(2) 能勢町修復対策事例

焼却施設周辺で高濃度のダイオキシン類が検出された能勢町では、今年度周辺土壌の撤去、及び覆土が実施され、池などの表流水も処理された。撤去された高濃度汚染土壌に関

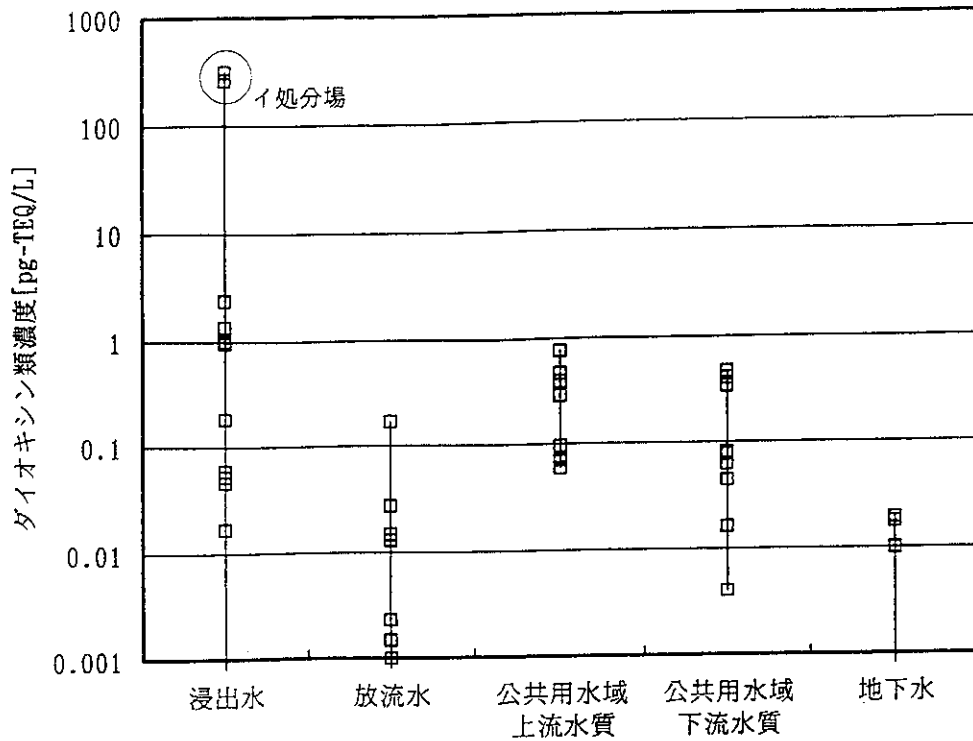


図 1-1 水質のダイオキシン類濃度調査結果
(一般廃棄物最終処分場および産業廃棄物管理型最終処分場)

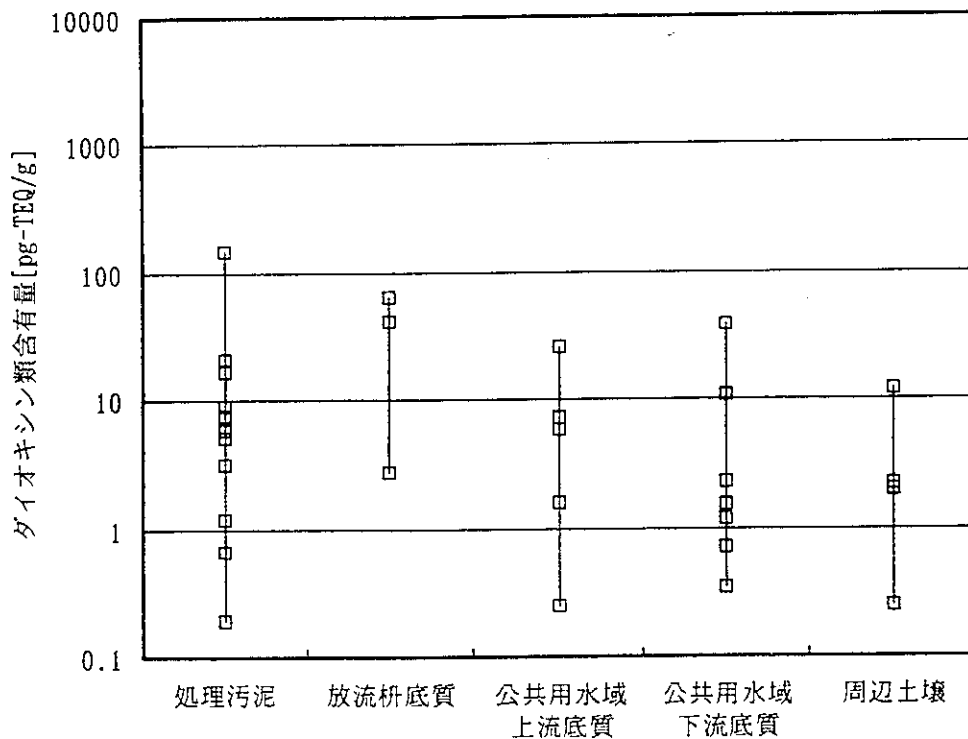


図 1-2 廃棄物・底質・土壌のダイオキシン類含有量調査結果
(一般廃棄物最終処分場および産業廃棄物管理型最終処分場)

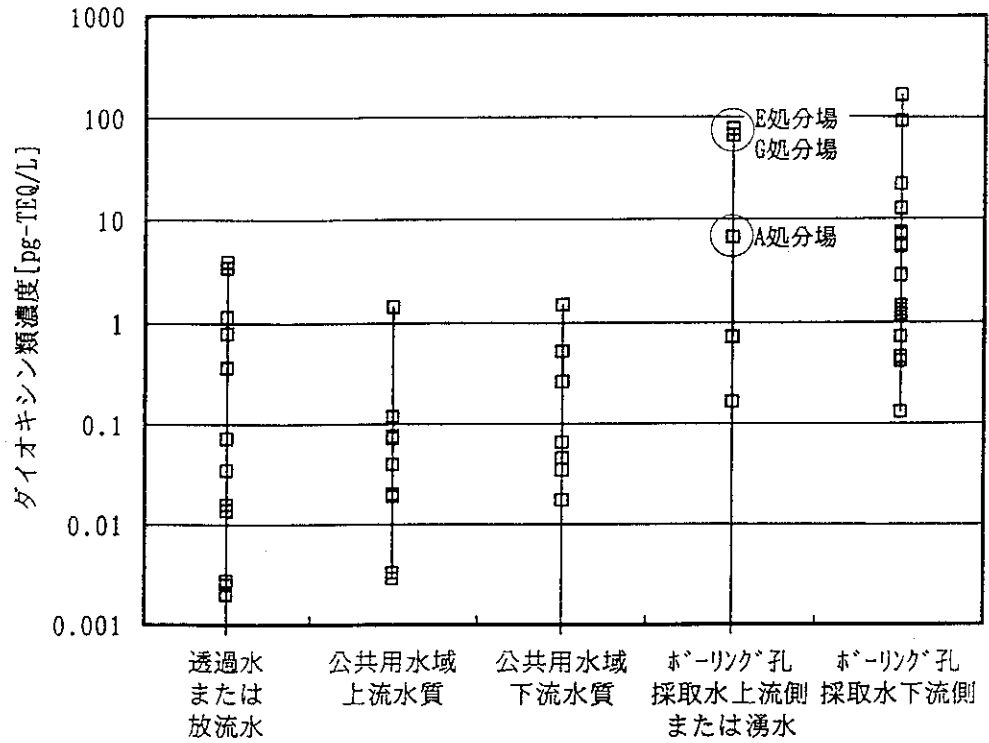


図 1-3 水質のダイオキシン類濃度調査結果
(遮水工または浸出液処理設備を有しない処分場)

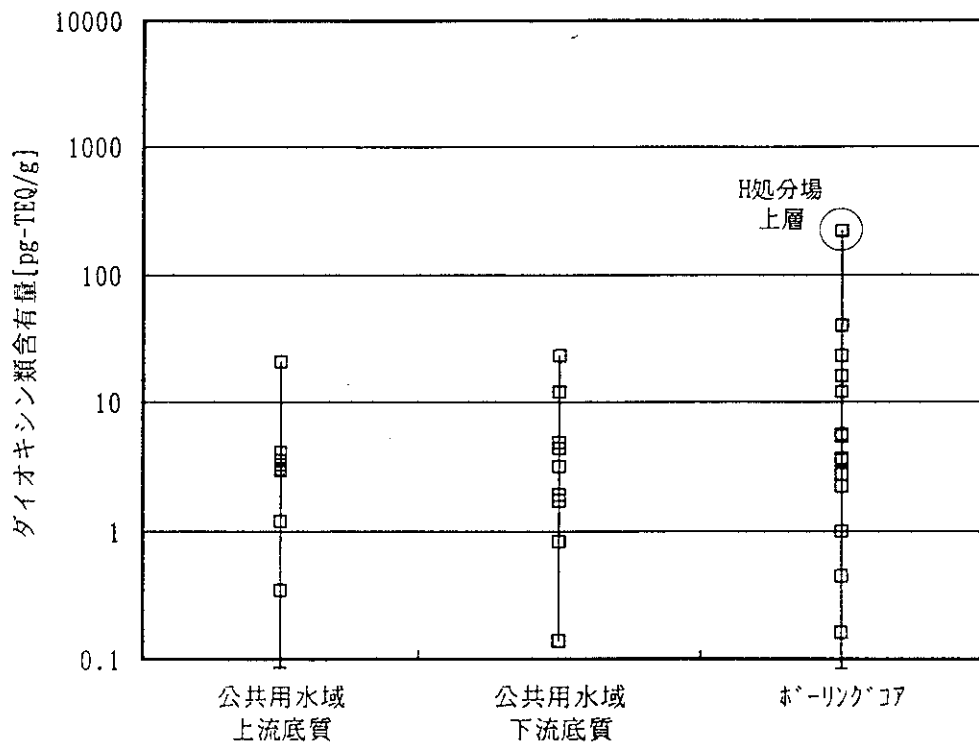
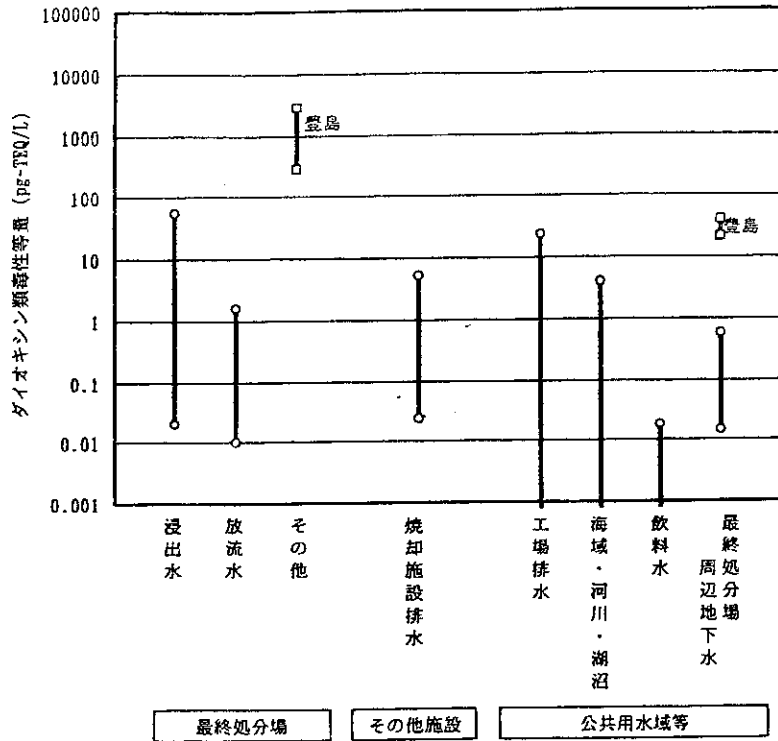
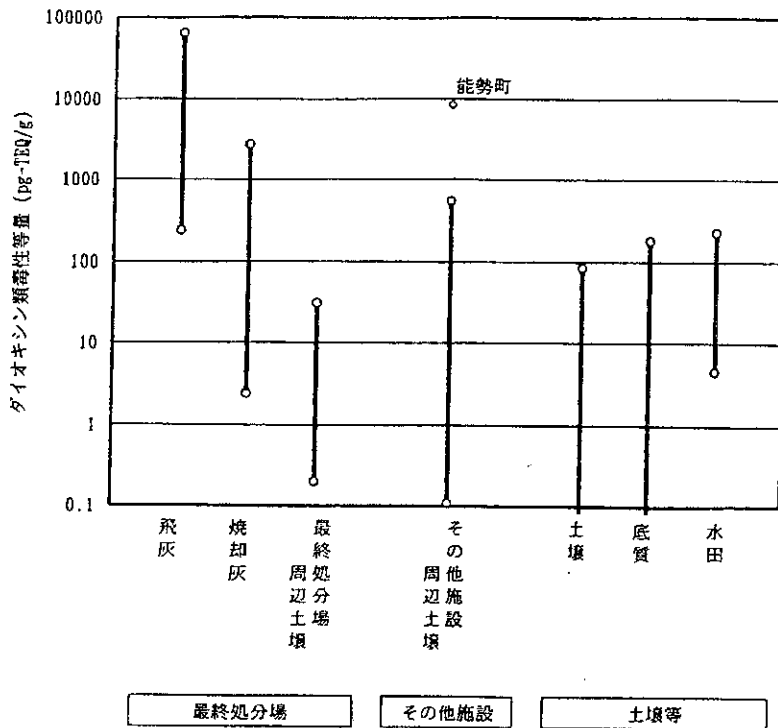


図 1-4 廃棄物・底質・土壌のダイオキシン類含有量調査結果
(遮水工または浸出液処理設備を有しない処分場)



過去の文献等で発表されたダイオキシン類の毒性等量濃度を、測定対象毎に濃度の範囲で示した。
 文献によっては定量下限値以下の値の定義が明確でないものがあるため、実際には図に示した濃度範囲以下の値
 が検出されていることもある。また、特異的に高い濃度を示したデータについては、分離して示した。

図 1-5 水環境中のダイオキシン類濃度（文献調査結果）



過去の文献等で発表されたダイオキシン類の毒性等量濃度を、測定対象毎に濃度の範囲で示した。
 文献によっては定量下限値以下の値の定義が明確でないものがあるため、実際には図に示した濃度範囲以下の値
 が検出されていることもある。また、特異的に高い濃度を示したデータについては、分離して示した。

図 1-6 土壌環境中および廃棄物のダイオキシン類濃度（文献調査結果）

しては、保管施設に一時保管されている。今後、これらの保管土壌中のダイオキシン類処理対策を検討する必要がある。

(3) その他の事例

その他の事例としては、藤沢市の荏原製作所の配管ミスによるダイオキシン類汚染事例¹⁰⁾や和歌山県橋本市の措置命令の事例¹¹⁾がある。和歌山の事例を取り上げる。

産業廃棄物処理場の南側の土壌から、100,000pg-TEQ/g のダイオキシンが検出されていた。これに対して、和歌山県は緊急措置として、土の飛散を防止するためにシートをかぶせるとともに、焼却炉周辺 50m 以内を立ち入り禁止にした。また汚染された範囲を特定するため追加調査を行ったが、結果が出るために時間がかかるために、県は焼却炉を撤去するように業者に命じた。現在のところ業者が応じる可能性は低く、5月末を目途に代執行を行う予定である。また住民は、周辺土壌 40 万 m³の完全撤去を要求しているが、現在のところ、汚染範囲が特定されていない状況である。

(4) 現状の問題点

能勢町の事例や和歌山県の事例から、ダイオキシン類汚染土壌に関しては、高濃度部分は汚染土壌を撤去し、おそらくは低濃度部分は覆土を施すことにより対策をすすめていることが分かった。現在、汚染土壌の処理技術としては、熔融処理等に代表される、熱処理が中心であるが、両事例ともに汚染土壌は撤去するが、撤去された土壌の処理方法は定まっていないと考えられる。また、低濃度汚染土壌に関しては覆土のみの対策にとどまっている。撤去された土壌に対して高コスト、高エネルギー消費型の処理技術を適用するには、コスト的な面、周辺住民との関係から困難であることが予想される。特に廃棄物に関連する汚染事例では、汚染責任者にコスト負担能力が無い場合が多く、行政が肩代わりする場合も考えられる。一方、低濃度汚染土壌に効率的な修復方法が無いため、現状では覆土のみの対策をせざるを得ないと考えることもできる。

このようなことから、高濃度汚染土壌、及び低濃度汚染土壌の効率的な修復を念頭においた低コストで大量処理が可能な処理技術が必要であると言える。

2. 研究目的

2. 1 本プロジェクトの研究フレームと昨年度の研究レビュー

図 2-1、図 2-2 に本研究の研究フレームと研究計画を示す。昨年度にあたる平成 10 年度は、微生物によるダイオキシン分解可能性の確認と実験室スケールのバイオリクター実験による処理プロセス化の可能性の検討を行った¹²⁾。研究成果としては、好熱菌を用いたバッチ実験 (65°C、22 時間培養) により、1ppm の 2,3-ジクロロジベンゾダイオキシン (2,3-DCDD) を 95.4%、2,8-DCDD を 87.5% 分解し、さらに 0.01ppm の 2,3,7-TCDD を 60.5%、2,3,7,8-TCDD を 12.4% 分解することを確かめた。好熱菌は、高温で活性を呈するため他の

競合菌の影響が少なく、また増殖速度が速いため、実用的なプロセス化に適している。さらに好熱菌にプラスミド（45,000塩基長）を確認した。次にダイオキシン類の一つであるコプラナ PCB 分解菌により、30°C、15日間の培養で含有量 4ppm のコプラナ PCB が 86.8% 分解すること、及び無塩素置換のジベンゾフランは約 60% 分解することを確認した。

次に、埋立浸出液処理施設における脱窒プロセスを模擬したバイオリアクター（容量 15L）を用いた室内実験を行った。リアクターは好熱菌槽（A 槽）、コプラナ PCB 分解菌槽（B 槽）、そして脱窒槽から得られた菌体による K 汚泥槽（C 槽）の計 3 槽である。そこで、A 槽、B 槽に関して、外気に接した状態での単離菌の増殖可能性、ダイオキシン類処理可能性（安全性を考慮して無塩化のジベンゾフランを用いた）を確認するために実験を行ったところ、A 槽ではバッチ状態、4日間の培養が達成でき、ほぼ 100% の注入ジベンゾフランが分解されることを確かめた。また B 槽に関しては、4日間の連続運転を達成でき、95% のジベンゾフランが分解されることを確かめた。これらの結果より、我々の単離した菌による実処理の可能性を示すことができた。また C 槽に関しては、4 価～8 価までのジベンゾダイオキシンとジベンゾフランの混合物を対象に実験を行った。そして計 28 日間の連続運転（流量 6L/day）、総量 15ng のダイオキシン類が分解されることを確かめた。今後さらに実験回数を積み重ねる必要があるが、これは実際の浸出液中のダイオキシン類レベルに近いレベルの汚染水の処理可能性を示すものである。

また UV を照射することにより 8 価、7 価のダイオキシンが減少することを文献調査により確認した。つまり、高塩素置換のダイオキシンを前処理により低塩素化あるいは部分的分解することができれば、後段の微生物分解の効率が上昇し、実用的な処理システムを構築できる可能性のあることを示すことができた。

昨年度の研究において、以下のことが課題として抽出された。

- ①我々の単離した微生物によるダイオキシン類分解を確かめることができたが、分解メカニズムや分解特性に関しての知見はまだ不十分であり、酵素反応、遺伝子解析等を行っていく必要がある。
- ②高塩素置換ダイオキシン類を効果的に分解する菌の探索も継続して行う必要がある。
- ③土壌（固相）から液相抽出する技術、そして高塩素置換ダイオキシン類を低塩素化する技術として UV 照射技術等の前処理を検討する必要がある。
- ④K 汚泥を用いたバイオリアクター実験では、さらに詳細に操作条件を明確にするために、分解可能な濃度レベルや分解速度といった基本的な処理特性を確認するとともに、連続運転の可能性を示す必要がある。

2. 2 今年度の研究目的

今年度は、昨年度の研究成果・課題を踏まえ、以下のことを目的として研究を行った（図 2-1、2-2 参照）

- (1) 土壌中のダイオキシン類微生物処理の前処理として、土壌からのダイオキシン類抽出技

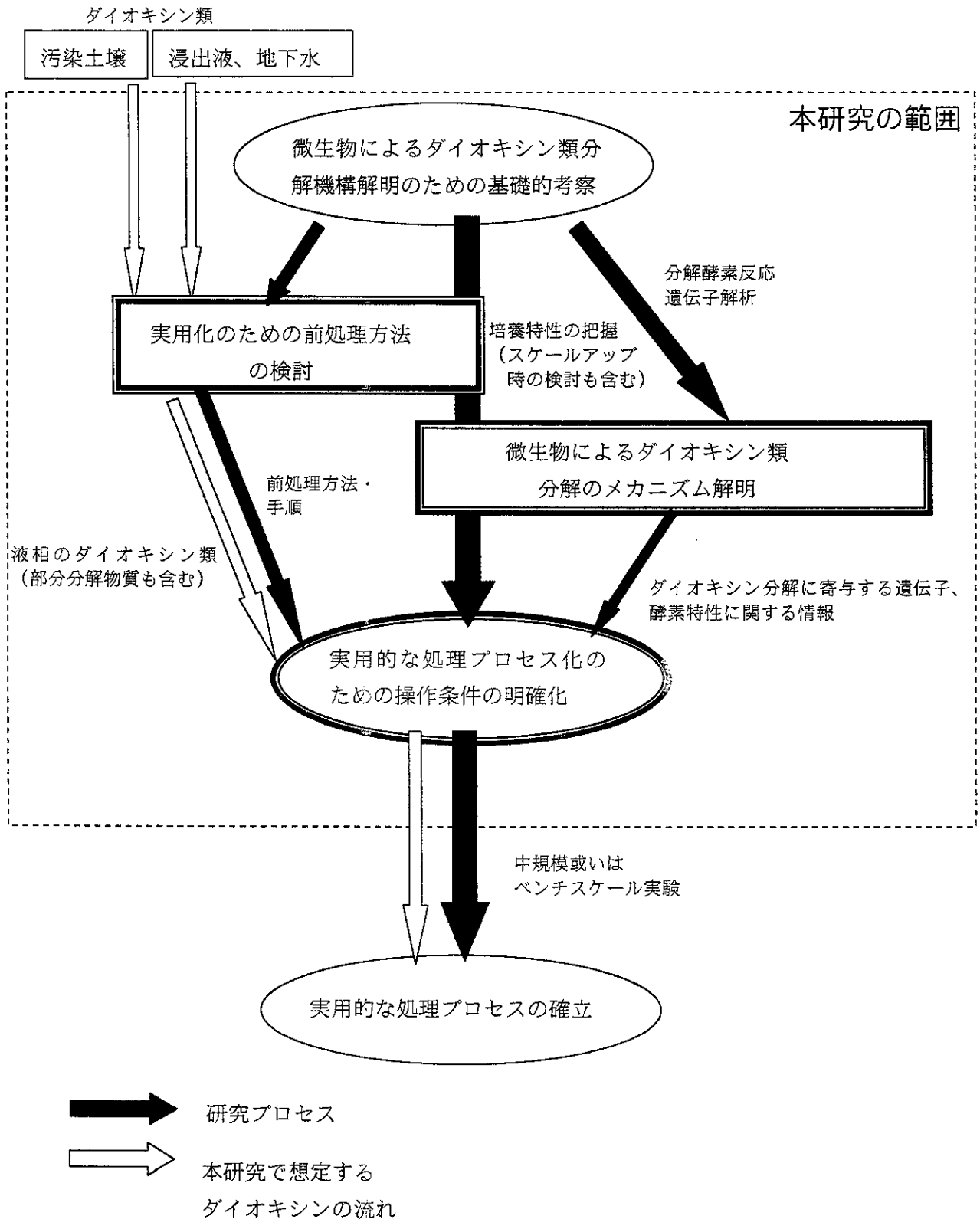


図 2-1 研究プロセス

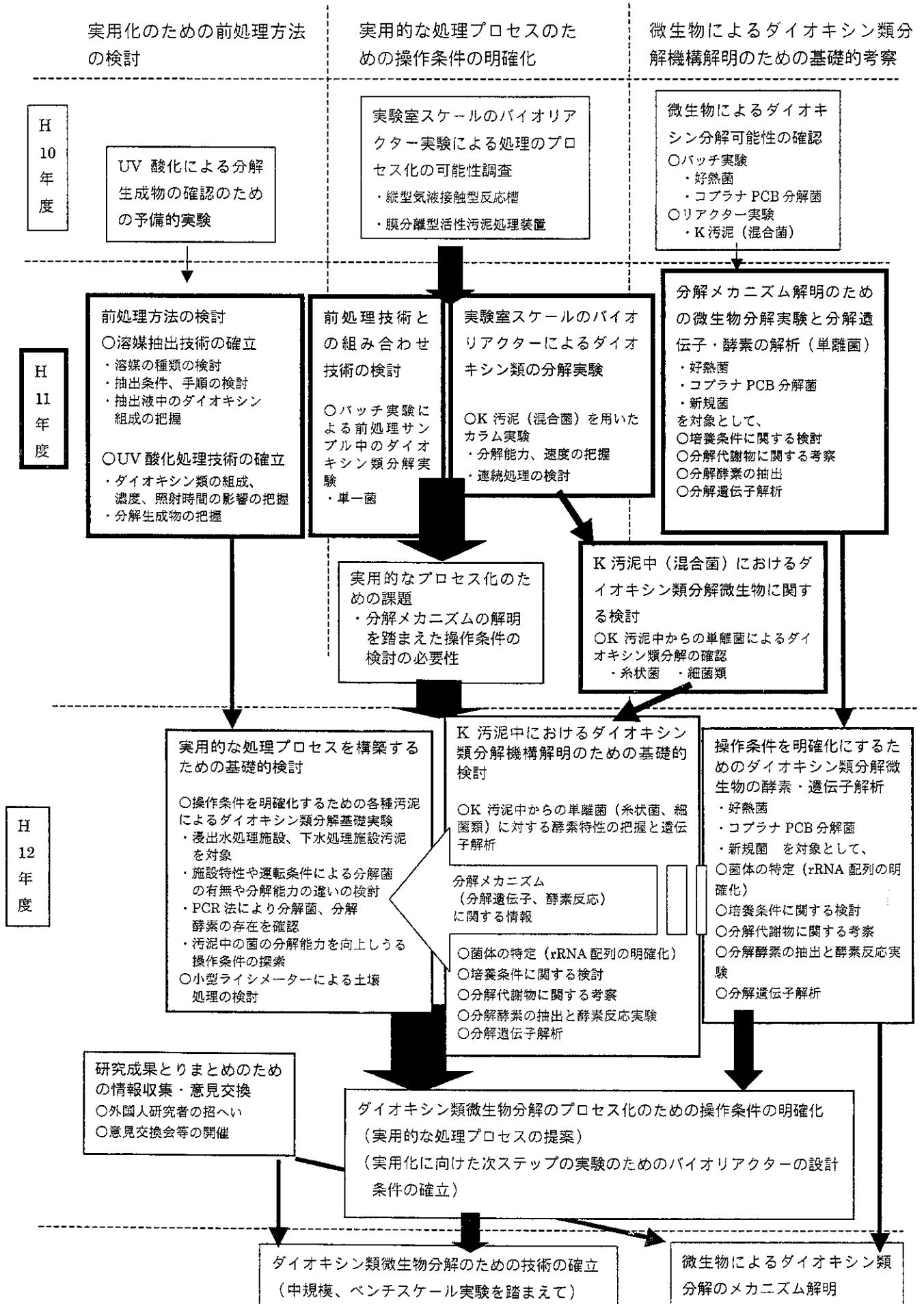


図 2-2 実験計画構想図

- 術と、高塩素置換ダイオキシン類の紫外線（UV）酸化処理技術の検討、
- (2)微生物によるダイオキシン分解メカニズム解明のため、新規に単離された菌体とこれまでに確認された菌体によるダイオキシン類分解試験と酵素・遺伝子解析、
- (3)処理プロセスの実用化のための、K 汚泥（実働の最終処分場浸出水処理施設から採取）を用いた実験室スケールでのバイオリクター実験とダイオキシン類分解特性を明確化、及び分解を促進するための操作条件の検討

参考文献

- 1)ダイオキシン対策推進基本指針(1999年3月)
: <http://www.eic.co.jp/eanet/dioxin/kihonsisin.html>
- 2)ダイオキシン類情報（報道発表資料他）
: http://www.eic.co.jp/eanet/dioxin/course/exec/ge_1_1.html
- 3)ダイオキシン類対策特別措置法（平成11年法律第105号）（1999年7月12日制定）
: <http://www.eic.co.jp/eanet/dioxin/taisaku.pdf>
- 4)環境庁中央環境審議会環境保険部会、厚生省生活環境審議会、食品衛生調査会：ダイオキシンの耐容一日摂取量(TDI)について（概要）（1999年6月）
: <http://www.eic.co.jp/eanet/dioxin/TDI-gaiyo.html>
- 5)環境庁報道発表資料：ダイオキシン排出抑制対策検討会第二次報告について（1999年6月25日）: <http://www.eic.or.jp/kisha/199906/59539.html>
- 6)環境庁報道発表資料：ダイオキシン類緊急全国一斉調査結果について（平成10年度実施）（1999年9月24日）: <http://www.eic.or.jp/kisha/199909/66063.html>
- 7)環境庁告示第68号（1999年12月27日）: <http://www.eic.co.jp/eanet/dioxin/kokuji.pdf>
- 8)厚生省水道環境部環境整備課：一般廃棄物最終処分場の適正化調査結果について（1999年7月7日）
- 9)最終処分場環境保全対策検討会：最終処分場環境保全大差調査報告書（1999年7月7日）
- 10)朝日新聞 朝刊（2000年3月25日）
- 11)ダイオキシン汚染に初の「措置命令」～和歌山・橋本市～
: http://mbs.co.jp/mbs-news/now/2000mar/0308_1.html
- 12)古市 徹（主任研究者）：厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）ダイオキシン微生物処理技術の研究平成10年度報告書（1999年3月）

II 微生物によるダイオキシン分解実験

1. 好熱菌によるダイオキシン分解メカニズムの解明

1.1. 分解副生成物の検討

(分担研究者 郷田浩志 東和科学株式会社 技術研究所主任研究員)
 (研究協力者 宮地和夫 同上 技術センター)

1.1.1 目的と研究の背景

昨年度の研究成果により、保科菌(*Bacillus midousuji* SH2B ATCC202050)の増殖条件下、無/低塩化ダイオキシンが減少する知見を得た¹⁾。これは保科菌が増殖するプロセスとダイオキシンの減少には何らかの関係があると考えられる。今回、この知見を基に、これに生物学的機構が関与するか否かを評価するため更なる検討を行った。

保科菌は 62°C以下の温度条件では増殖しない極めてユニークな好熱菌である。我々はこの性質を利用して、保科菌の増殖しない条件でダイオキシンを反応させることにより、菌体そのものの吸着を含めた保科菌の増殖過程以外のメカニズムとダイオキシンの減少との関係について検討を行った。

無/低塩化のダイオキシンにおける生物学的な分解については *Pseudomonas* や *Sphingomonas* 他、種々の微生物による検討がなされている²⁻¹³⁾(図 1-1-1)。

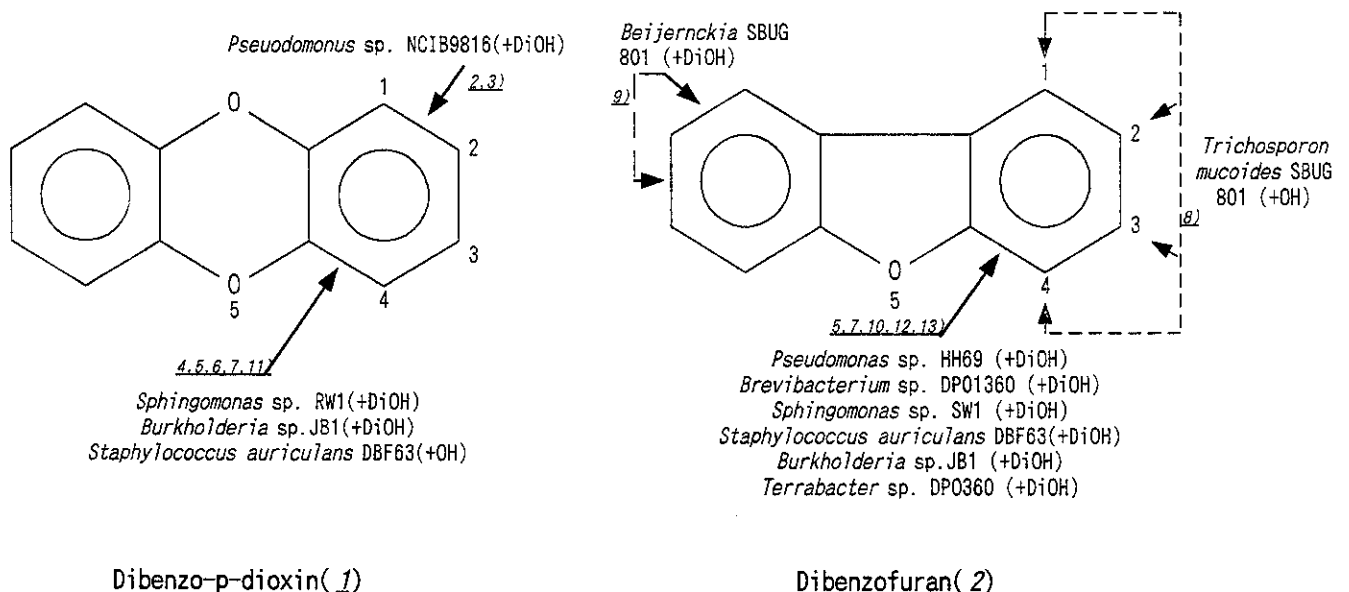


図 1-1-1 ダイオキシン基本骨格

微生物を用いたダイオキシン基本骨格の分解は好氣的条件下で行われると考えられる。

Dibenzo-p-dioxin(DD)(1)では、1,2位、と1位(4位)とエーテル結合の基部にあたる炭素間の結合が報告されている。*Pseudomonas*では、2位の水酸化体(2-OH-体)または、両方が酸化された1,2位の二水酸化体(1,2-diOH-体)が報告されている。予測されている経路は1,2位のdihydrodiol体を中間体とし、非生物学的には2-OH体へ変化、生物学的な経路を経ると1,2-diOH-体を生じる²⁾³⁾。DD(1)の1位(4位)とエーテル橋の基部にあたる炭素間は*Sphingomonas*⁴⁾⁵⁾、*Burkholderia*⁶⁾、*Staphylococcus*⁷⁾によって二水酸化されることが報告されている。

この過程で生成するhemiacetal(3)は、構造的に非常に不安定で非生物学的にring cleavage(3→4)が生じ、2,2',3-Trihydroxybiphenyl ether(2,2',3-THB ether)(4)が生成すると考えられる。しかしながら、*Staphylococcus*ではring cleavage(3→4)は生じることなく1位(4位)のOH-体が生成する経路が確認されている⁷⁾。

Dibenzofuran(DF)(2)では、1,2,3,4各位炭素の水酸化及び1,2位、2,3位の二水酸化が報告されている。その経路は多彩で、同一の経路ではないと考えられる。*Trichosporon*では1,2,3,4位の各水酸化体(OH-体)が生成することが確認されている。この代謝物は、さらなる水酸化によりdiOH-体が生成すると考えられている。このような段階的な水酸化反応の後、ベンゼン環の開裂が生じ、いわゆるring cleavage productまで分解される⁸⁾。

*Beijerinckia*では、1,2-、2,3-の二重結合を水酸化、cis-dihydrodiol体を経て、diOH体を生成するプロセスが報告されている⁹⁾。

最も多くの報告があるのは、DD(1)と同様に4位とエーテル橋基部の炭素(4 a位)間の二水酸化である。4位、4 a位間の二水酸化反応は*Pseudomonas*¹⁰⁾、*Sphingomonas*¹¹⁾、*Burkholderia*⁶⁾、*Brevibacterium*¹²⁾、*Staphylococcus*⁷⁾、*Terrabacter*¹³⁾で報告されており、DF(2)でもDD(1)と同様のプロセスでhemiacetalを経て、ring cleavageが生じ、2,2',3-THBが生成すると考えられる。その後、サリチル酸まで分解される。

DD(1)がdihydrodiol体を経て、2,2',3-THB ether(4)、そして最終的にcatechol(6)まで分解される経路は、ダイオキシンを無機化する経路として重要でバイオレメディエーションに応用できる重要な経路であるとともに(図 1-1-2)、標品として入手可能な化合物、catechol(6)を産生するこの経路は、他の代謝経路に比べ情報も豊富で同定が容易であることから、保科菌についてもこの分解経路の存在について検討を行った。加えて、catechol(6)のような標品がないため同定はできないものの、その他前述したダイオキシンの基本骨格を保持したままの代謝物生成の可能性もあることから、catechol(6)を検出するため、pH2付近まで液性を下げて抽出した(酸性画分)と水酸化体等、比較的中性領域で抽出できる化合物を対象とした(中性画分)に抽出工程を分けて検討を行った。

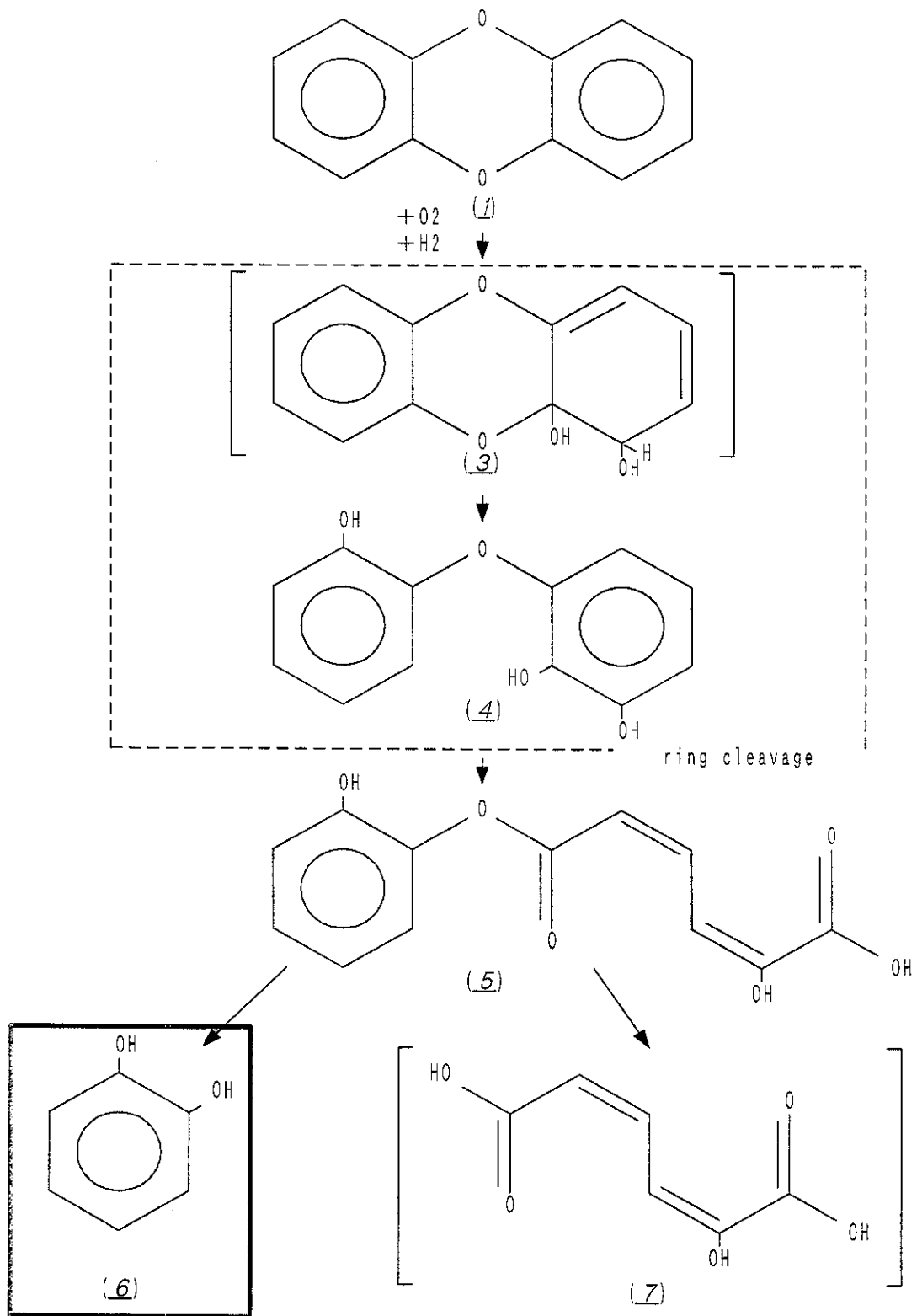


図 1-1-2 Dibenzo-p-dioxin (1) の開環メカニズムと分解の経路

1.1.2 方法

(1) 基質溶液、菌液、培地の調製

基質となる化合物を約 10mg 精密に量りとり、メタノールにて 1mg/ml になるよう溶解、この溶液より 0.2ml を分取、メスフラスコにてメタノールにより 10ml にメスアップし、基質溶液-1 とした。

基質となる化合物を約 1mg 精密に量り取り、1mg/ml になるようにメタノールを加え、基質溶液-2 とした。

菌液は、保科菌(*Bacillus midousuji* SH2B J2, *Bacillus midousuji* SH2B J3) 10^8 cell/ml を用時調製した。

培地はトリプチケースソイブイオンを用いた。

トリプチケースソイブイオン	
Pancreatic Digest of Casein	17.0g
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0g
Sodium Chloride	5.0g
Dipotassium Phosphate	2.5g
Dextrose	2.5g
Final vol.	1 L

(2) 吸着の影響

菌体への吸着については保科菌は 6 2°C 以上で反応を開始することから、反応が進行しない室温条件下、菌体を含む系と含まない系(blank)で比較検討を行った。

培地はトリプチケースソイブイオンを用いた。1ml の培地を試験管に入れ、菌液 10 μ l (10^6 cell 相当)を加えた系と加えない系の 2 条件を用意した。両条件に DF(2)基質溶液-1 を 50 μ l (1 μ g 相当)を培地に添加した。各試験管を、室温条件下、2 日間、振とうし、定法にしたがって DF(2)量を測定した。

(3) 25 倍量での生成物の検討

25ml の培地に菌液 250 μ l (10^7 cell 相当)を加え、25 μ l の DD(2)基質溶液-2 を添加、65°C で 3 時間反応を行った。

(4) 前処理方法

反応後、サンプルはスクリーキャップつき試験管により輸送した。

塩酸処理した後、蒸留水を加え、全量で 4ml 程度になるように調製したのち、この溶液にクリーンアップスパイクとして $^{37}\text{Cl}_4$ -2,3,7,8-TCDD、10ng 相当 を添加した。

トルエンを 500ul 加え、密栓した後に 10 分間振とう、トルエン層をパスツールピペットで分取し、3ml 容量のミニバイアルに移し入れた。同操作を 3 回行い、それぞれのトルエン層は同じバイアルに入れ混合した。

バイアル内のトルエンに窒素気流を緩やかに吹き付け、余剰のトルエンを留去し、溶媒を約 100ul に定容し、注入サンプルとした。

最終容量は、分析対象物質の濃度に応じて適宜濃縮（低濃度の場合）、あるいは希釈（高濃度の場合）した。注入サンプルは、2ul を四重極質量分析計に供した。 $^{37}\text{Cl}_4$ -2,3,7,8-TCDD を内標準物質とした内標準法によりそれぞれの対象物質を定量した。

代謝物の定性：

反応系を pH7 付近の中性条件下、酢酸エチルエステルにて抽出を行い、中性画分とした。次に塩酸により液性を pH2 付近の酸性にした後、同様に酢酸エチルエステルにて抽出を行い、酸性画分とした。各画分をエバポレートした後、窒素気流下、濃縮。GC-MS に供した。

catechol(**g**)のピークの出現が予想される保持時間付近から、基質のピークが出現する保持時間を中心に Total ion chromatograph(TIC)を得た。blank の TIC と比較、blank に無いピークを見出した。

ガスクロマトグラフィーを分離系に用いた四重極質量分析計で定性/定量を行った。分析機器の仕様、測定条件等、詳細については「ダイオキシン微生物処理技術の研究 平成 10 年度報告書」¹⁾、別添資料に記載した通りである。

1.1.3 結果及び結論

室温条件下、菌液を加えた系と加えない系を比較したところ、無菌系と有菌系でも基質残存量に変化は認められなかった。

20ml(通常の 20 倍量)の反応系を用いて DD(**j**)の代謝物/分解物について検討を行ったところ、分解物として、catechol(**g**)の生成は認められなかった。しかしながら、増殖条件下(65°C)で実験を行った系で、増殖の生じない blank の系で見られないピークの出現が認められた(表 1-1-1、添付図 2-1~6 参照)。

表 1-1-1 出現したピークとその保持時間

標準品		SH2B J2 中性画分		SH2B J2 酸性画分		SH2B J2 中性画分		SH2B J3 酸性画分	
標準品名	Rt(min)	Peak #	Rt(min)	Peak #	Rt(min)	Peak #	Rt(min)	Peak #	Rt(min)
		J2N-1	6.24			J3N-1	6.24		
								J3A-1	6.34
catechol (6)	7.30	J2N-2	8.03			J3N-2	8.03		
				J2A-1	10.37			J3A-2	10.41
		J2N-3	10.54						
		J2N-4	10.89						
		J2N-5	11.08						
		J2N-6	11.37						
		J2N-7	11.47						
								J3A-3	11.59
DD (1)	14.29								
		添付図2-2		添付図2-5		添付図2-3		添付図2-6	

以上の結果より、増殖条件下、すなわち、65°Cでのインキュベーションを行った場合と異なり、常温下では保科菌を入れた系でも入れない系でもダイオキシン量に変化はなかったことから、昨年度得られた 65°C増殖条件下でのダイオキシンの減少は、菌体への吸着を含めた増殖プロセス以外では生じず、保科菌の増殖メカニズムと何らかの関与があるものと考えられる。ダイオキシン減少は保科菌が増殖する過程で行う何らかの生物学的な反応に伴うものであることが示唆された。

保科菌と DD(1)を反応させたところ blank とは異なるピークが出現した。SH2B J2 では、酸性画分よりもむしろ、中性画分に多く検出された(添付図 2-2, 添付図 2-5)。これに対して、SH2B J3 は、中性画分よりも酸性画分でピークが検出され(添付図 2-3, 添付図 2-6)、J2,J3 両者間で出現する保持時間の異なるピークが出現するなど(表 1-1-1)、J2 と J3 間で、その代謝系に違いがあるという興味深い結果が得られた。

代謝物の標品がないため、これらのピークに相当する成分の同定はできないものの、DD(1)の代謝物である可能性も考えられる。もし、代謝物であるとするならば、保科菌を増殖条件下で反応させて、TIC により catechol(6)が認められなかったことから、分解経路ではなく新規代謝経路または水酸化体を生ずる他の代謝経路の可能性が考えられる。

これらの知見より、無塩化 DD(1)に引き続き、無塩化 DF(2)、低塩化の DD, DF を基質とした保科菌の分解能について系統的検討を行う必要がであろう。

本年度の研究結果からは、DD(1)の最終代謝物、catechol(6)の生成は認められなかったことから、保科菌は 2,2',3'-THB ether を中間代謝物とする、いわゆる分解経路は有していない可能性が高い。そして、TIC のデータは、この分解経路と異なる代謝経路の存在を示し

ているのかもしれない。しかしながら、2,2',3-THB ether を経る分解経路は有しているものの、生成した catechol(6)が更なる代謝を受けている可能性も考えられる。

未だ DF(2) については DD(1)ほど知見は得られていない。catechol(6)の場合と同じ理由で DF(2)の最終代謝物、サリチル酸についても同様の検討を行う必要もあるであろう。

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Sadayori Hoshina, David H. Figurski, I. Bernard Weinstein, Hiroshi Gohda and Tohru Furuichi Bacterium capable of biodegradation of dioxin-like substances. 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, September 12-17, 1999 Venice, Italy

保科定頼、河野緑、郷田浩志、古市徹 好熱菌によるダイオキシン分解実験および遺伝子解析 第10回廃棄物学会総会 大宮

知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他(本報告書末に添付)

添付資料 2

添付図 2-1 : BLANK (pH 7 画分)

添付図 2-2 : SH2B J2(pH7 画分)

添付図 2-3 : SH2B J3(pH7 画分)

添付図 2-4 : BLANK (pH2 画分)

添付図 2-5 : SH2B J2 (pH2 画分)

添付図 2-6 : SH2B J3(pH2 画分)

参考文献

- 1) 古市 徹 他、厚生省科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)ダイオキシン微生物処理技術の研究、平成 10 年度報告書、p73(1999 年)
- 2) G. M. Klecka and D. T. Gibson: Metabolism of Dibenzop-dioxin and Chlorinated Dibenzop-dioxin by a *Beijerinckia* Species, *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 288-96(1980).
- 3) G.M. Klecka and D.T. Gibson: Metabolism of Dibenzol[1,4]dioxan by a *Pseudomonas* Species, *Biochem. J.*, 180, 639-45 (1979).
- 4) R. M. Wittich et al.,: Metabolism of Dibenzop-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1005-10(1992).
- 5) B.Happe et al.,: Characterization of 2,2',3'-Trihydroxybiphenyl Dioxygenase, an Extradiol Dioxygenase form the Dibenzofuran- and Dibenzop-dioxin-Degrading Bacterium *Sphingomonas* sp. Strain RW1, *Journal of Bacteriology*, 175, 7313-20 (1993).
- 6) J. R. Persons et al.,: Biodegradation pathway of 2-Chlorobenzo-p-dioxin and 2-Chlorobenzofuran in the Biphenyl-utilizing Strain JB-1, *Chemosphere*, 37, 1955-22(1998).
- 7) L. Monna et al.,: Microbial Degradation of Dibenzofuran, Fluorene and Dibenzop-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 285-89(1993).
- 8) E. Haminer et al.,: Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2215-19(1998).
- 9) C.E.Cerniglia et al.,: Bacteria and Fungal Oxidation of Dibenzofuran, *Biochemistry Journal*, 180, 175-85(1979).
- 10) P. Fortnagel et al.,: Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1148-56(1990).
- 11) H-A. Arfmann et al.,: Mineralization of 4-Chloriodibenzofuran by Consortium Consisting of *Sphingomonas* sp. RW1, *Burkholderia* sp. JWS, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3458-62(1997).
- 12) V. Strubel et al., 3-(2-Hydroxyphenyl)catechol as Substrate for Proximal Meta Ring Cleavage in Dibenzofuran Degaradation by *Brevibacterium* sp. Strain DPO1361, *Journal of Bacteriology*, 173, 1932-7(1991).
- 13) A. Schmid et al.,: Characterization of Three Distinct Extradiol Dioxygenase Involved in Mineralization of Dibenzofuan by *Terrabacter* sp. strain DPO360, *Journal of Bacteriology*, 179, 53-62(1997).

1. 2 好熱菌ダイオキシシン分解と遺伝子解析

(分担研究者 保科定頼 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 講師)

1. 2. 1 研究目的

好熱菌である *Bacillus midousuji* SH2A ATCC 55926, SH2B ATCC 202050 は 62°C以上の発育温度域をもち、2 分裂時間が約 8 分であることから、難分解性物質に対する微生物分解の速い速度を得るのに有効な微生物と考えられる。土壌中には多くの微生物が存在することが明らかになっており、常識的にそれらの中には難分解性の化学合成物に対する基質適合酵素を有するものが存在すると考えられる。経済的に、工業的に応用可能な微生物を最大限に利用できるシステムが構築でき、実用化できるかが最大のポイントである。担当したダイオキシシン分解メカニズムを解明する為に酵素・遺伝子解析において、*Bacillus midousuji* の 16S リボソーム RNA 塩基配列の部分配列決定、相同性解析を行うことにより株の特徴である好熱細菌、高速増殖をキーポイントとして調べ、さらにプラスミドを調べることにより、ダイオキシシン類分解に関連する可能性のある遺伝子配列の検討を行った。

前年の平成 10 年度は好熱菌によるダイオキシシン分解メカニズムを解明する為に酵素・遺伝子解析において、*Bacillus midousuji* の 16S リボソーム RNA 塩基配列の部分配列決定、相同性解析を行うことにより変異株のライブラリー化を行った。さらにプラスミド DNA の精製、クローニング、塩基配列の決定を行うことにより、ダイオキシシン類分解に関連する可能性のある遺伝子配列の検討を行った。

平成 11 年度はさらに実用化をふまえ *Bacillus midousuji* のダイオキシシン分解諸性状の解明と遺伝子解析を行った。1. ダイオキシシン類の微生物分解条件の最適化、2. 分解代謝物の検索、3. プラスミド塩基配列の決定、4. ベンゼン環 2 環構造の分解に関する、dioxygenase の水酸化反応と extradiol meta-cleavage 反応とに分けて遺伝子検索を行った。また 5. 16S リボソーム RNA 塩基配列の全塩基配列決定、相同性解析から進化系統樹解析を行い、さらに 6. *Bacillus midousuji* の 2 分裂増殖時間の高速化を担うと思われる DNA 複製開始点 OriV(vegetative replication origin)遺伝子領域の解析を行った。

1. 2. 2 研究方法

1. ダイオキシシン類の微生物分解条件の最適化

1) *Bacillus midousuji* SH2B (HB1030)増殖速度の決定

Bacillus midousuji SH2B HB1030 と *Bacillus subtilis* BN (対照) を用いて均一に分散している培地基質 (トリプチケースソイブイヨン) に対してブドウ糖が微生物に消費されるバッチプロセスにおける菌体個数を解析し、微生物増殖方程式を構成するパラメータ

のオーダーを決定した。*Bacillus midousuji* SH2B HB1030 は増殖温度を 65°C とし *Bacillus subtilis* BN は増殖温度を 37°C とした。毎分 1 リットルの空気を吹き込んで溶存酸素量を確保した。

それらをもとに微生物増殖方程式を差分近似し厳密解と比較した。それらに関して実測値を当てはめ現実の微生物増殖速度を算出した。

これによってバッチ式実用化プロセスのモニターシステムを構築する。

2. 無塩化 Dibenzop-Dioxin の *Bacillus midousuji* SH2BHB1030 による分解代謝物の検索 II-1.1 との共同実験。

3. *Bacillus midousuji* プラスミド DNA の塩基配列決定と遺伝子解析の方法
平成 10 年度報告書に依った。

4. ベンゼン環 2 環構造の分解に関する、dioxygenase の水酸化反応と extradiol meta-cleavage 反応の遺伝子検索

遺伝子、蛋白検索ソフト(Basic Local Arignment Search Tool)を用いて、DNA data base, protein data base および文献検索により extradiol meta-cleavage 遺伝子の保存領域を選び出した。それに対する相補的な塩基配列のオリゴマー DNA を合成した。これらのミックスプライマーより遺伝子増幅法にて SH2BHB1030 DNA を鋳型にして増幅産物が得られる条件を設定した。

5. *Bacillus midousuji* 16S リボソーム RNA 全塩基配列決定と相同性検索

使用した菌株と PCR プライマー：

J1= *Bacillus midousuji* SH2A HA1001

J2= *Bacillus midousuji* SH2B HB1002

J3= *Bacillus midousuji* SH2B HB1030

U1= Universal primer for PCR amplification

5' cag cag ccg cgg taa tac 3'

U8= Universal Primer for PCR amplification

5' acg aca cga gct gac gac 3'

その他、図に示すとおり 1 2 組の PCR 増幅を行って、DNA 全配列を増幅した (表の数字は *E. coli* の 16S ribosomal RNA 塩基位置を示す)。

PCR 増幅は AmpliTaq DNA Polymerase, LD (Perkin-Elmer)を用い、その方法に準拠した。塩基配列決定は PCR 産物を直接片側プライマーを用いて dideoxy termination 法で行った (ABI PRISM)。

相同性検索はデータ通信により Blast(Basic Local Arignment Search Tool)を用いて行った。

6. OriV(vegetative replication origin)遺伝子領域の解析

増殖速度の速い微生物では染色体が2組存在するとか染色体か巨大プラスミドかが区別つかないものが報告されている。例えば Proteobacteriaceae の group として *Brucella melitensis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti*, 他に *Vibrio cholerae* に認められている。これらプラスミドの DNA 複製機構と類似した DNA 複製システムを *B. midousuji* が利用している可能性が考えられる。

グラム陰性桿菌には薬剤耐性遺伝子を搭載したプラスミドが存在し、同一プラスミドが広く分布することが知られている。この宿主広領域プラスミドはかなり研究が進み、分子遺伝学的な分類やプラスミドの複製領域の DNA 配列を利用したレプリコン型別 (replicon typing) などが疫学調査に使われている。

これらのプラスミドでは、類似した DNA 配列の複製領域を含むものは一つの宿主細菌に共存できないことから incompatible (Inc: 不適合) と呼ぶ関係にある。すでにグラム陰性桿菌にはこの Inc group として宿主広領域グループで、IncN, IncP, IncQ, IncW が報告されている。

IncP α プラスミドは 1969 年にイギリスの Birmingham 救急病院の熱傷センターで臨床分離株から得られた R18, R68, RK2, RP1, RP4 という由来の異なるプラスミドで、多少 DNA 塩基配列が異なるが、同一種のプラスミドと考えられている。このうち RK2 プラスミドは米国コロンビア大学医学部微生物学教室にて Prof. David H. Figurski らによってその複製機構が解明されたことから、注目し実験を行った (平成 10 年度生活安全総合研究推進事業による)。

RK2 プラスミドは全塩基配列が決定されており 60,099bp の大きさである。グラム陰性桿菌の promiscuous (雑多な) プラスミドとして、広く分布 (broad host range) している。

OriV(vegetative replication origin)領域はプラスミドが休止期の状態から DNA 複製を始める開始点である。プラスミド上の oriV には蛋白質 TrfA (transferfactor A) が結合する塩基配列: アイテロン (iteron) が最大 10 カ所みられる。アイテロンの塩基配列は ttt cat tga cac ttg agg ggc である。TrfA は oriV の iteron に結合すると oriV は活性化され一方向の DNA 複製を開始する。またその間に蛋白質 DnaA が結合するサイト dnaA Box が 3 カ所にみられる。遺伝子 trfA は oriV を含む上流域に存在し、その蛋白質 TrfA は 2 種類 TrfA1, TrfA2 である。iteron1 と iteron10 の距離は 1090bp である。

iteron1 と iteron10 は逆向きに塩基配列が並び、iteron1 から iteron9 までは同方向に塩基配列が並んでいる。このことから iteron1 と iteron10 は蛋白質 TrfA を介してループ構造のステム (柄) を形成していると考えられている。また iteron4 と iteron5 の間の距離