

が他と比べて大きいことから（間に dnaA が2つ入っている）、ループには役割を分担する2つの iteron ブロックがあると考えられている。iteron2-4 はプラスミドコピー数を調節し、iteron5-9 は DNA 複製を調節している。DNA 複製には DnaA の他に DnaB, DnaC, DNA gyrase が働く。

蛋白質 TrfA をコードする塩基配列 trfA が iteron1-2 を含む領域にあってその距離が大きい。さらに iteron1 の外側には ssb(single strand DNA binding) サイトの塩基配列があり、trfA 領域を含めて6塩基の制限酵素認識サイトが5カ所繰り返してみられる。

QIAfilter Midi(QIAGEN)を使用したプラスミド抽出；始めに 35ml LB プロセス培養を用意し 3000rpm で 15 分、4°C 遠心を行い上清を捨て RNaseA(1/1000)が加えられている P1-Buffer 4ml を加え混和した。ここに P2-Buffer 4ml を加え静かに 4.6 回転倒混和し、室温で 5 分置いた。更に P3-Buffer を 4ml 加えすぐに転倒混和し、これらを QIAfilter カートリッジに QBT を加え室温で 10 分置いた。次に QIAGEN-tip100 に 4ml QBT を入れ平衡化し、そこへ先のカートリッジの内容物をフィルターしながら加えた。QC Buffer 10ml にて2回洗浄し、QF Buffer 5ml にて DNA を抽出した。

ここにイソプロパノール 14ml を加え混和し室温に置き 10000rpm で 30 分遠心し 8ml 上清を捨てた。70%エタノール 8ml を加え室温に置いた後 10000rpm で 15 分遠心を行い上清を捨て 10 分間乾燥させた後、凍結した。

RK2 の iteron による増幅：増幅温度については次のように行った。94°C 5 分、94°C 30 秒、50°C 60 秒、72°C 90 秒、72°C 7 分下線部は 40 サイクル行った。アニーリング温度を 45°C、50°C、55°C、60°C に展開して stringency を高め、RK2 プラスミドの iteron 配列が *Bacillus midousuji* のプラスミドに存在することを検索していった。

1. 2. 3 研究結果

1. ダイオキシン類の微生物分解条件の最適化

Bacillus midousuji SH2B (HB1030) 増殖速度の決定 (添付資料 3-1)

Bacillus midousuji SH2B HB1030 と *Bacillus subtilis* BN (対照) を用いて均一に分散している基質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。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。

それによると、対照の中温菌 *Bacillus subtilis* BN の2分裂時間は40分、目的の好熱菌 *Bacillus midousuji* SH2B HB1030 の2分裂時間は8分と計算された。

2. 無塩化 Dibenzo-p-Dioxin の *Bacillus midousuji* SH2BHB1030 による分解代謝物の検索 (添付資料 3-2)

II-1.1 による共同実験により 65℃ 3 時間の分解条件で無塩化 Dibenzo-p-Dioxin の *Bacillus midousuji* SH2BHB1030 による分解代謝物を検出することが可能であった。1 の実験から分解プロセスが 3 時間で終了することが明らかとなり、無塩化 Dibenzo-p-Dioxin に水酸化反応が加わったカテコール類を検出することができなかつたと思われる。水酸基を標的にした meta-cleavage 反応が観測されベンゼン環の分解物のピークが得られた。

3. プラスミド塩基配列の決定 (添付資料 3-3)

HA1001 には 1 万 8 千塩基の長さをもつ大きさのプラスミドを確認した。、HB1002 (3 万 8 千塩基)、HB1030 (3 万 5 千塩基) のプラスミドは、それらを制限酵素 *EcoRI*、*HindIII* で切断しそのバンドパターンを見ると、両者が異なることが明かとなった。さらに J2HB1002 株と J3HB1030 株のプラスミドの大きさが違っていることが確認された。

その HA1001 のプラスミド pSA101 の DNA を pUC19 ベクタープラスミドに組み込み、ライブラリーを作成し、各クローンの DNA 塩基配列を決定する作業を行った。その結果、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* の耐熱性プラスミド pTB19 と 80% の相同性を見出している。また *B. stearothermophilus* に存在する 1,4- α -glucan branching enzyme をコードする遺伝子 DNA と 100% 相同性が見られた。プラスミド上に必須遺伝子がコードされていることが明らかとなった。

1,4- α -glucan branching enzyme は細胞壁合成酵素の一つで、*B. midousuji* の必須遺伝子と考えられることから推察すると、このような重要な遺伝子がプラスミド上に存在することはプラスミドに染色体遺伝子と同等の遺伝情報が搭載されていることが考えられる。またプラスミドと染色体の区別が付けにくい形態である可能性も考えられる。

4. *BphA* (dioxygenase の水酸化反応)、*BphC* (dioxygenase の extradiol meta-cleavage 反応) の遺伝子検索 (添付資料 3-4)

Bacillus midousuji のリグニン分解能に着目し、その分解酵素遺伝子 *LigZ* にホモロジー検索を行った。

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は担子菌類に属するリグニンを分解する代表的な微生物である。リグニンは非重複性フェニルプロパン単位で構成される非常に複雑な 3 次元ポリマーであり、通常その立体的不規則製が酵素の攻撃に強く抵抗するとともに、高分子のリグニンが細胞に吸収され細胞内酵素で分解されることは困難である。*P. chrysosporium* は、細胞外へ分泌する一群のリグニン分解酵素が関与する極めて非特異的な

ラジカル反応機構によりリグニンを分解すると考えられている。同様の機構によって極めて広範囲の難分解性物質を分解できることが報告されている。

P. chrysosporium が分泌するリグニン分解酵素については、現在、リグニンヘルオキシダーゼ (LiP と略す)、Mn-ペルオキシダーゼ (MnP と略す) とラッカーゼ (Lac と略す) の3種があるが、*P. chrysosporium* はラッカーゼを分泌しない。*P. chrysosporium* はリグニンを分解するのにセルロースやグルコースのような補助物質が必要である。リグニン分解酵素活性が発現する時期は炭素源、窒素源あるいは硫黄元素が欠乏する頃であり、二次代謝として発現すると言われている。

細菌のリグニン分解酵素の研究は少ないが、*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 (*Sphingomonas paucimobilis* SYK-6)、*Agrobacterium tumefaciens* などでは遺伝子解析が行われている。しかしホモロジー検索では *LigZ* は *BphA* (dioxygenase の水酸化反応)、*BphC* (dioxygenase の extradiol meta-cleavage 反応) の遺伝子との相同性は低い。そこで、文献 (Cloning of a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 gene encoding a novel oxygenase that cleaves lignin-related biphenyl and characterization of the enzyme. *App. Env. Microbiol* 64:2520-2527) より *BphC* 塩基配列を得、アミノ酸配列に変えて BLASTP データベースを用いて保存領域の検索を行った。その結果より、*Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus globerulus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* に保存された領域が認められた。アミノ酸配列は CNGRHHT と RHTNDHM を選んだ。その DNA 塩基配列として 5' tgc aay grh sgm cac cac ac 3' と 5' cgc cac acc aat gac cac atg 3' を PCR 増幅反応のプライマーとした。

増幅温度については次のように行った。94°C 5分、94°C 30秒、55°C 60秒、72°C 90秒、72°C 7分下線部は 40 サイクル行った。増幅反応液の Mg 濃度を 2.75mM とした。その結果約 450 塩基の遺伝子増幅産物が得られた。

5. *Bacillus midousuji* 16S リボソーム RNA 塩基配列決定と相同性検索 (添付資料 3-5) J1(HA1001)株、J2(HA1002)は 1995 年に凍結保存された株である。J3(HB1030)株は J1 を月 1 回トリプトソイ寒天培地に継代培養しつづけたものから見いだされ 1998 年に凍結保存した株である。

このように、発見当時 (1995 年) の SH2AJ1, SH2BJ2 両株は 16S ribosomal RNA の塩基配列が同一で、平成 10 年度の報告のようにプラスミドの分子量が異なる 2 つの変異株と考えられる。J3(HB1030)株は初代分離時に近似の株として存在していたものと考えられ、その後継代培養しつづけたものから見いだされ 1998 年に異なる株として保存された。16S リボソーム RNA 塩基配列によると J1(HA1001)株、J2(HA1002)と類似しており、他に生化学性状、

生理学性状が極めて近い。

16S リボソーム RNA 塩基配列決定によって *Bacillus midousuji* SH2A(HA1001), SH2B(HB1002) は *Bacillus thermodenitrificans* に極めて類似していた。

16S リボソーム RNA 塩基配列決定によって *Bacillus midousuji* SH2B(HB1030)は報告がみられない新しい種の好熱細菌と思われる。

6. OriV(vegetative replication origin)遺伝子領域の解析 (添付資料3-6)

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。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る。また iteron4 と iteron5 の間の距離が他と比べて大きいことから (間に dnaA が2つ入っている)、ループには役割を分担する2つの iteron ブロックがあると考えられる。iteron2-4 はプラスミドコピー数を調節し、iteron5-9 は DNA 複製を調節している。DNA 複製には DnaA の他に DnaB, DnaC, DNA gyrase が働く。これらはプラスミドのコピー数を複製する速度を規定しており、バンドのパターン変化を示すものと考えられる。

今後は塩基配列を解析し 62°C によって DNA 複製が開始しその速度を規定するメカニズムを検討する。

1. 2. 4 考察

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。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。本年度は1. ダイオキ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、dioxxygenase 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. ダイオキシン類の微生物分解条件の最適化として *Bacillus midousuji* (HB1030)増殖速度の決定

対照の中温菌 *Bacillus subtilis* BN の2分裂時間は40分に比べ目的の好熱菌 *Bacillus midousuji* HB1030 の2分裂時間は8分と計算された。この速度は後に ppm ダイオキシン類の分解時間が3時間であることから実用化に適合すると考えられる。

2. 無塩化 Dibenzo-p-Dioxin の *Bacillus midousuji* SH2BHB1030 による分解代謝物の検索

分解速度が速く無塩化 ppm の Dibenzo-p-Dioxin に水酸化反応が加わったカテコール類を検出することができなかつたと思われる。水酸基を標的にした meta-cleavage 反応が観測されベンゼン環の分解物のピークが得られた。その後、meta-cleavage 反応の酵素遺伝子 *BphC* を最初に検索する裏付けとなった。

3. プラスミド塩基配列の決定

HA1001 には1万8千塩基の長さをもつ大きさのプラスミドを確認した。、HB1002 (3万8千塩基)、HB1030 (3万5千塩基) のプラスミドは、それらを制限酵素 *EcoRI*, *HindIII* で切断しそのバンドパターンを見ると、両者が異なることが明かとなった。さらに HB1002 株と HB1030 株のプラスミドの大きさが違っていることが確認された。

その HA1001 のプラスミド pSA101 の DNA 塩基配列を決定する作業を行った。その結果、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* の耐熱性プラスミド pTB19 と80%の相同性を見出している。また *B. stearothermophilus* に存在する 1,4-alpha-glucan branching enzyme をコードする遺伝子 DNA と100%相同性が見られた。プラスミド上に必須遺伝子がコードされていることが明らかとなった。1,4-alpha-glucan branching enzyme は細胞壁合成酵素の一つで、*B. midousuji* の必須遺伝子と考えられることから推察すると、このような重要な遺伝子がプラスミド上に存在することはプラスミドに染色体遺伝子と同等の遺伝情報が搭載されていることが考えられる。またプラスミドと染色体の区別が付けにくい形態である可能性も考えられる。

4. *BphA* (dioxxygenase の水酸化反応)、*BphC* (dioxxygenase の extradiol meta-cleavage

反応) の遺伝子検索

Bacillus midousuji のリグニン分解能に着目し、その分解酵素遺伝子 *LigZ* にホモロジー検索を行った。白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は担子菌類に属するリグニンを分解する代表的な微生物である。リグニンは非重複性フェニルプロパン単位で構成される非常に複雑な 3 次元ポリマーであり、通常その立体的不規則製が酵素の攻撃に強く抵抗するとともに、高分子のリグニンが細胞に吸収され細胞内酵素で分解されることは困難である。一方、細菌のリグニン分解酵素の研究は少ないが、*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 (*Sphingomonas paucimobilis* SYK-6), *Agrobacterium tumefaciens* などでは遺伝子解析が行われている。しかしホモロジー検索では *LigZ* は *BphA* (dioxygenase の水酸化反応), *BphC* (dioxygenase の extradiol meta-cleavage 反応) の遺伝子との相同性は低い。そこで、文献(Cloning of a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 gene encoding a novel oxygenase that cleaves lignin-related biphenyl and characterization of the enzyme. App. Env. Microbiol 64:2520-2527)より *BphC* 塩基配列を得、アミノ酸配列に変えて BLASTP データベースを用いて保存領域の検索を行った。その結果より、*Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus globerulus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* に保存された領域が認められた。これをもとに約 4 5 0 塩基の遺伝子増幅産物が得られた。今後、全塩基配列を確定する。

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

16S ribosomal RNA 塩基配列によると HA1001、HB1002 は同一であり、他に生化学性状、生理学性状が極めて近いことから、いくつかのプラスミド遺伝子などの変異はあるものの同一種と考えられる。

16S ribosomal RNA 塩基配列決定によって HB1030 は HA1001、HB1002 と配列がわずかに異なり報告がみられない新しい種の好熱細菌と思われる。

HA1001、HB1002、HB1030 はその他の生化学性状、生理学的性状が極めてにていることからひとまとめにして *Bacillus midousuji* とする。

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

OriV(vegetative replication origin)領域のプラスミドは休止期の状態から DNA 複製を始める開始点である。TrfA は oriV の iteron に結合すると oriV は活性化され一方方向の 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。また iteron4 と iteron5 の間の距離が他と比べて大きいことから (間

に dnaA が2つ入っている)、ループには役割を分担する2つの iteron ブロックがあると考えられる。バンドのパターン変化を示すものと考えられる。iteron1 と iteron10 を用いて遺伝子増幅プライマーとし、PCR 増幅を行いマグネシウム濃度を 1.5mM と一定にし、アニーリング温度を 45°C、50°C、55°C、60°C に上昇させていった。徐々にバンド数が減少していった。

B. midousuji は発育温度が 62°C 以上であることから、このような温度シーケンスを行った。

Stringency が高い状況でバンドが出現していることから、*B. midousuji* に iteron 遺伝子塩基配列が存在するものと考えられる。

1. 2. 5 結論

新規に発見された好熱菌 *Bacillus midousuji* SH2B 株はダイオキシン類を分解し、プラスミド上にその遺伝子塩基配列 *BpfC* (dioxxygenase の extradiol meta-cleavage 反応) がコードされている可能性が示唆された。当該菌は 62°C 以上の発育温度域をもち、実用化時の他の環境微生物に対して優性を維持できること、ヒトへの病原性が考えられないこと、また、2 分裂時間が平均 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である。また増殖メカニズムとして DNA 複製開始点の遺伝子解析の結果から溶存酸素を十分に与えれば実証プラント試験に耐えうると考えられた。

研究発表

論文発表

Hoshina, S., David H. F., I. B. Weinstein., Gouda, H., and Furuichi, T.: Bacterium capable of biodegradation of dioxin-like substances. *ORGANOHALOGEN COMPOUNDS* vol40: 503-505, 1999.

Nakamiya, K., Hoshina, S., Souta, I., Ishii, K., and Furuichi, T.: First step toward Biodegradation of dioxins by means of a reactor. *ORGANOHALOGEN COMPOUNDS* vol40:535-538, 1999.

町田勝彦, 保科定頼: 感染症の遺伝子診断 (総論), *Mebio* 第 16 巻, 6 号: 12-17, 1999.

鈴木憲治, 藤瀬清隆, 小林正之, 河野緑, 保科定頼, 町田勝彦: B 型急性肝炎劇症化例における HBV core promoter/ Pre-C, Core 領域の差異に関する検討, *東京慈恵会医科大学雑誌* 第 114 巻, 6 号: 497-506, 1999.

保科定頼: 新課題医療廃棄物 (増幅 DNA 廃棄物) の病院内実態調査, *医療廃棄物研究* 第

12 卷,1 号 : 13-22,2000.4.12

Miyachi, H., Yano, K., Ikebukuro, K., Kono, M., Hoshina, S., and Karube, I.: Application of chimeric RNA-DNA oligonucleotides to the detection of pathogenic microorganisms using surface plasmon resonance. *Analytica Chimica Acta* 407:1-10,2000.

Chiba, M., Kono, M., Hoshina, S., Komatsu, M., Kitagawa, Y., Iizuka, M. and Watanabe, S.: Presence of bacterial 16S ribosomal RNA gene segments in human intestinal lymph follicles. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* in press.

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.

Kunichika Nakamiya, Sadayori Hoshina, Ikuo Souta, Kazuei Ishii, and Tohru Furuichi First step toward biodegradation of dioxins by means of a reactor. 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

G 知的所有権の取得状況

1 特許取得

なし

2 その他(添付資料3-7)

平成10年度の生活安全総合研究推進事業(外国への日本人研究者派遣事業)による米国コロンビア大学地球環境研究所(Lamont Earth Observatory)でのニューヨーク、ジャマイカ湿地帯環境改善計画シンポジウム(The Jamaica Bay Meeting)での口頭発表(1999年2月1日)(座長 Dr. Arnold L. Gordon(agordon@ldeo.columbia.edu) Lamont Earth Observatory, Columbia University) に対して Raymond N. Sambrotto, Senior Research Scientist, Lamont-Doherty, Earth Observatory (sambrott@ldeo.columbia.edu 61 Rt. 9W/ P.O. Box 1000 Palisades, NY 10964 U.S.A. phone: 914-365-8402 fax: 914-365-8150) から Environmental Genetics Laboratory at Lamont, Columbia University 開設の通知が

あった。

2. 新規ダイオキシン類分離菌株及びコプラナPCB分解菌によるダイオキシン類の分解

(分担研究者 惣田昱夫 神奈川県環境科学センター 専門研究員)

2. 1 研究目的

ダイオキシン類の分解処理方法として安全で、安価な処理方法として期待されているのが微生物を用いて各種汚染土壌等を浄化するバイオレメディエーション技術である。このバイオレメディエーション技術を用いて、ダイオキシン類汚染土壌等の浄化を行いうる、しかも現場で利用できるための技術を開発するためには、ダイオキシン類を分解する微生物を分離し、その特徴を明らかにするとともに、それらの分解菌を用いて広域的な汚染土壌を処理する技術とともに条件を解明することが重要である(1)。本研究では、ダイオキシン類を高濃度に含有する飛灰や汚染土壌等をオンサイトで処理できる技術の開発を目指している。本年は PCB 分解菌として分離した 11 種の菌種(2)の内から昨年実験を行い分解力の強いことが確認された 1 株(3)、また、ダイオキシン類により汚染された大阪能勢町の土壌等から新規に分離した 3 菌株の合計 4 菌株を用いて、1 クロルジベンゾジオキシン及び Co-PCB を含む KC-400、飛灰からの抽出した各種化学物質を用いて各種の分解試験を行い、それらの菌株の持つ分解の特徴等について考察を行った。

2. 2 実験材料及び実験方法

2. 2. 1 使用した菌株

ダイオキシン類分解等の各種試験には、PCB 分解菌より SN-49910 1 株、また新規の菌株として PCB 分解菌の分離法により大阪府能勢町から分離した SF-2002 株、横浜市緑区の田地から分離した SGF-2000 株、食品から分離した SF-2001 株、合計 4 菌株を用いた。

2. 2. 2 分解菌の同定

4 株の分解菌の生理生化学的同定は、簡易菌属同定法 (4) に基づいて行った。まず、分離菌株を 24 時間平板寒天培地で培養し、生育したコロニーを用いてグラム反応を見た。グラム反応でグラム陽性と判定した菌株はカタラーゼ反応を見た。グラム陰性の菌株はチトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖分解、グルコースの嫌氣的分解について調べた。また、新規分離菌及び PCB 分解菌の 16S リボソーム RNA 塩基配列決定と相同性検索による菌属の同定も行った(3)。

使用した菌株と PCR プライマー：

SN-49910

SF-2000

SF-2001

SF-2002

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'

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)。

2. 2. 3 各種ダイオキシン類の生分解試験

(1) 各種菌類の培養条件

各種分解試験には 4 菌株を用いた。試験に用いた休止菌体は以下の方法で作成した。各菌株を、LB 培地にて、24 時間 180rpm、25°C で前培養後、集菌し、菌体 0.5g を 20ml の PAS 培地の入った 50ml の培養フラスコに入れ、それぞれにダイオキシン類化学物質を添加し、振とう培養器で、180rpm、25°C の条件で 5 日間培養した。

(2) 分解対象としたダイオキシン類化学物質及び PCB 類

- 1) PCB (KC-400)
- 2) ダイベンゾフラン (DF)
- 3) ダイベンゾダイオキシン(DD)
- 4) モノクロロダイベンゾフラン(1Cl-DF)
- 5) モノクロロダイベンゾダイオキシン(1Cl-DD)
- 6) 飛灰から抽出した化学物質

(3) 各種分解残渣化学物質の抽出

上記方法で培養後、10000rpm、10 分間遠心分離し、上清液と沈殿物に分離した。上清液は等量のヘキサン：ジエチルエーテルの混合液(6:4)を分液ロートに入れ、5 分間振とうさせ静置した後、溶媒層を分離した (3 回繰り返した)。沈殿物は純水 10ml 入れ超音波で破碎後、上清液同様の混合溶媒 10ml を加え、5 分間振とう抽出した(3 回繰り返した)。両抽出液を合量した後、エバポレーターで濃縮し 1ml に定容した。前記と同条件で回収率試験も行った。

(4) 分析条件(5,6)

定量はキャピラリカラム SP-2331 (スバル社製、60m×0.25mm、膜厚 0.25um) 及び DB-5(J&W 社製、30m×0.25mm、肉厚 0.25um)を用いて、四重極型 GC/MS 分析計 (島津製 QP-5050A 型)で行った。

分析条件は以下のとおりである。

1) PCB 分析条件及び分解物の分析 (島津製 QP-5050A 型四重極型 GC/MS 分析計、キャピラリカラム DB-5 使用)

70°C × 1 min
100~180°C 5°C/min
180~250°C 3°C/min
250°C 17min hold
注入口 250°C スプレットレス
キャリアガス He 1ml/min
イオン化条件 EI 法、
イオン源温度 170°C
イオン化電圧 70eV
測定モード SIM

2) ダイオキシン類分析条件 (島津製 QP-5050A 型四重極型 GC/MS 分析計、キャピラリカラム SP-2331 使用)

100°C × 1 min
100~310°C 5°C/min
180~250°C 3°C/min
250°C 17min hold
注入口 250°C スプレットレス
キャリアガス He 1ml/min
注入口 250°C スプレットレス
キャリアガス He 0.8ml/min
イオン化条件 EI 法、
イオン源温度 170°C
イオン化電圧 70eV
測定モード SIM

3) 4 塩化物以上のダイオキシン類分析 (高分解能磁場型使用、日本電子 JMS-700、キャピラリカラム SP-2331 使用)

100°C × 1 min
100~250°C 8°C/min
250~290°C 4°C/min
290°C hold
注入口 270°C スプレットレス
キャリアガス He 0.8ml/min
イオン化条件 EI 法、
イオン源温度 270°C

イオン化電流 600uA
分解能 10000 以上
加速電圧 10KV
電子加速電圧 70eV
測定モード SIM

(6) KC-400 の生分解による分解量の測定

各濃度の分解量は、SIM (以下に示したイオン) による各ピークを測定し、その平均値から分解率を求めた。

測定イオン 222, 255.95, 289.9, 323.9, 359.85, 393.8, 427.75, 461.7

確認イオン 223.99, 257.96, 291.91, 325.88, 361.84, 395.8, 429.76, 463.72

(7) DD、DF 及び 1Cl-DD の分解分解培養条件

アセトニトリルに溶かした DD、DF 及び 1Cl-DD を最終濃度が 10ppm となるよう加え、25°C で 5 日間培養した。培養後、菌体からの抽出は上記抽出法で抽出し、エバポレーターで適量に濃縮後、GC/MS 分析計で定量を行った。

(8) 飛灰より抽出した PCB 及びダイオキシン類の生分解試験

a) 飛灰中のダイオキシン類及び PCB の抽出法

飛灰中のダイオキシン類及び PCB の抽出は、飛灰 100g を分液ロートに入れ、トルエン 500ml で 1 時間攪拌抽出(100 回/分) した。抽出した物は、エバポレーターを用いて 1ml に濃縮した後、多層シリカゲルクロマトグラフィーを用いてクリーンアップした。この抽出液を 10ml に濃縮し、アルミナカラムクロマトグラフィーで PCB 部分(Ext.1)とダイオキシン類(Ext.2)とを分離した。Ext.1 は 5ml、Ext.2 は 1ml にエバポレーターを用いて濃縮し、微生物分解用試料とした。

b) 飛灰抽出液中の PCB の生分解率

4 株の分解菌を 20 時間、LB 培地で前培養後、遠心分離(10000rpm, 10min)し、休止菌体をえた。休止菌体を PAS 培地 20ml によく懸濁し、飛灰より抽出した Ext. 1 (PCB 部分) を 100 μ l 加え、25°C で 5 日間培養した。培養後、上記方法で、各種化学物質を抽出し、エバポレーターで 1ml に濃縮し、GC/MS 分析計で定量を行った。

(9) SN-49910 菌における DF の代謝経路(7)

SN-49910 菌は、20 時間、LB 培地で前培養後、遠心した(12000rpm, 10min)。遠心後、上清は捨て、沈殿物は PAS 培地 20ml によく懸濁した。懸濁後、菌溶液を 1ml 取り出し別の遠沈官に移した。そこに、10ppm 分の DF を添加し、24 時間培養した。この溶液に 1.2ml の水酸化ナトリウムを加え、5 分間放置した。放置後、溶液をすべて取り出し、Extrelute3

〔メルク社製〕にうつし、5 分間放置した。そこに、20ml のヘキサンを加え、Extrelute3 を通して出てきたヘキサン溶液を回収した。次に、Extrelute3 に 1N 塩酸を 1, 8ml 加え、5 分間放置した。そこに、20ml のジクロロメタンを加え、Extrelute3 を通して出てきたジクロロメタン抽出液を回収した。両系統の抽出液をそれぞれ適量濃縮し、四重極型 GC/MS 分析計によって、代謝物の解析を行った。

(10) DF 100ppm 添加条件下での SDS-PAGE

SN-49910 菌は、20 時間、LB 培地で前培養後、遠心した(10000rpm, 10min)。遠心後、上清は捨て、沈殿物は PAS 培地 20ml によく懸濁した。懸濁したものに、100ppm 分の DF を加え 3 日間培養した。培養したものを、10000rpm、10 分間遠心後、上清は除き、沈殿物は、10ml の PAS 培地で懸濁した。そのものを超音波で破碎し、1ml 取りだし、同量の SDS-sample buffer を加え、約 5 分間煮沸した。化学物質を添加していないコントロールも同様に行った。SDS-PAGE は DD を添加した培養試料各種とコントロールを用いて作成した。

2. 3 結果及び考察

2. 3. 1 PCB 分解菌の同定

16SrRNA 法による試験結果は、別添資料 4 に示した。この同定結果を見ると、いずれもスコアが 900~1100 という高い相同性で同定された。SN-49910 株は、*Proteus* sp、SF-2000 株はグラム陽性菌の *Bacillus subtilis*, SF-2001 株は *Bacillus subtilis*, SF-2002 株は *Bacillus* sp. と同定された。

2. 3. 2 分離菌によるダイオキシン類及び PCB 等の分解試験

(1) KC-400 10 及び 100ppm の生分解率

SN-49910 及び新規分離した菌株による KC-400 の 10 及び 100ppm の分解率は、表 2-1 に示したとおりであった。各菌株による PCB 分解率は異なっていた。前報で報告したとおり PCB 構造の違いにおいても分解率は異なっていた。また、各菌株は、ダイオキシン類であるコプラナ PCB の 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl に対して、SN-49910 菌では 52.58%、SF-2001 菌株では 87.5%といずれも 50%以上の分解能を示した。

表 2-1 KC-400 の 10 及び 100ppm における生分解率(%)

	SN-49910	SF-2000	SF-2001	SF-2002
KC-400 10ppm	72.94	90.32	91.40	83.71
KC-400 100ppm	64.30	75.12	97.26	87.32

(2) DD 及び DF 10ppm の生分解率

4 菌株の分解菌による DD 及び DF の分解率は表 2-2 に示した。DD では SF-2001 菌株は

87.44%、SN-49910 菌で 79.53%、DD では SN-49910 が 98.33%、SF-2001 菌株は 98.21%といずれも高い分解性を示した。

表 2-2 DD 及び DF 10ppm の生分解率(%)

	SN-49910	SF-2000	SF-2001	SF-2002
DD	98.33	98.42	98.21	98.18
DF	79.53	81.43	87.44	98.43

(3) 1Cl-DD 10ppm の生分解率

4 分解菌株による 1Cl-DD の分解率は、表 2-3 に示した。グラム陰性菌である SN-49910 菌 64.31%、陽性菌の SF-2001 菌 85.32%であった。比較的グラム陽性菌の分解率が高かった。

表 2-3 1Cl-DD 10ppm の生分解率(%)

	SN-49910	SF-2000	SF-2001	SF-2002
1Cl-DD	64.31	70.21	85.32	78.50

無塩化のダイベンゾフラン、ダイオキシン骨格及び 1Cl-DD の分解では、4 菌株とも 60% 以上という高い分解性を示した。これらの結果から、いずれの菌株もダイオキシン類や PCB 等の塩素化合物の微生物処理において利用できる可能性があるものと推測される。

(4) 飛灰中の PCB 及びダイオキシン類

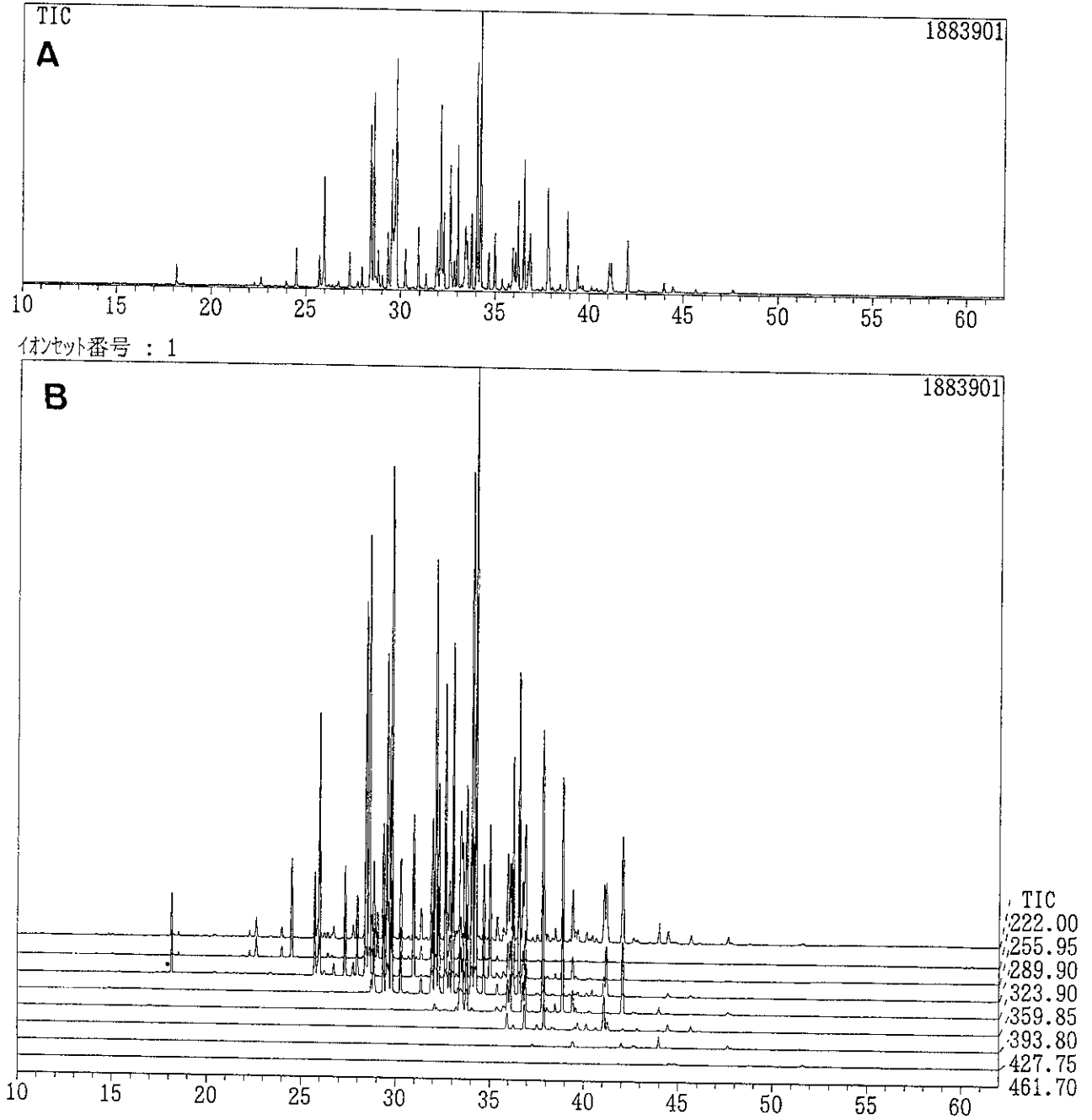
飛灰から抽出した Ext.1 の PCB の TIC 及び測定イオン比を図 2-1 に示した。Ext.1 中の PCBs は 35ppm であった。また、Ext.2 中のダイオキシン類の含有量（4 塩化物以上）及び組成は表 2-4 に示した。TCDDs は 690ng/g、TCDFs は 1900ng/g であった。

この Ext.1 の PCB は、主に 2,3 クロロビフェニルを多く含んでいた。

表 2-4 飛灰中のダイオキシン類濃度と毒性当量

定量対象成分	実測濃度 (ng/g)	毒性当量 (TEQ)
1,3,6,9-T4CDD	1.8	
1,3,7,9-T4CDD	1.5	
2,3,7,8-T4CDD	0.59	0.59
T4CDDs	16	
1,2,3,7,8-P5CDD	5.3	5.3
P5CDDs	80	
1,2,3,4,7,8-P6CDD	7.8	0.78
1,2,3,6,7,8-P6CDD	11	1.1
1,2,3,7,8,9-P6CDD	9.8	0.98
H6CDDs	160	
1,2,3,4,6,7,8-P7CDD	120	1.2
H7CDDs	220	

図 2-1 飛灰から抽出した Ext.1 の PCB の TIC(A)及びイオンクロマトグラフィ(B)



H8CDDs	200	0.02
Total PCDDs	690	9.97
1,2,7,8-T4CDF	4.1	
2,3,7,8,-T4CDF	12	1.2
T4CDFs	99	
1,2,3,7,8-P5CDF	16	0.8
2,3,4,7,8-P5CDD	32	16
P5CDFs	220	
1,2,3,4,7,8-P6CDF	76	7.6
1,2,3,6,7,8-P6CDF	47	4.7
1,2,3,7,8,9-P6CDF	6.6	0.66
2,3,4,6,7,8-P6CDF	130	13
H6CDDs	520	
1,2,3,4,6,7,8-P7CDF	260	2.6
1,2,3,4,7,8,9-P7CDF	50	0.5
H7CDFs	430	
H8CDFs	670	0.067
Total PCDFs	1900	47.127
Total(PCDDs+PCDFs)	2600	57.097

(5) 飛灰抽出物 (PCB 部分) の生分解

4 株の分解菌による飛灰中の PCB 分解率は、表 2-5 に示した。飛灰中の PCB における平均分解率は、SF-2001 菌が 87.86%と最も高く、SN-49910 菌は 39.46%と低かった。また、各異性体の分解率を見たところ菌株により異なっていた。

飛灰より抽出した PCB は、4 クロロビフェニルを多く含んでいた。一部の菌株を除き分解率は添加含有量が少ないこともあり KC-400 10ppm 添加分解と比べ良好な結果であった。

表 2-5 飛灰中の PCB 及びダイオキシン類の生分解率(%)

	SN-49910	SF-2000	SF-2001	SF-2002
Ext.1(PCB)	97.01	35.00	94.86	97.60

(6) 飛灰から抽出したダイオキシン類の生分解率(%)

4 株の分解菌による飛灰中のダイオキシン類の分解率を表 2-6 に示した。SF-2000 菌株を除いて分解率はよかった。SF-2001 菌株は TCDD, TCDF とも分解率が、90%を越えていた。

表 2-6 飛灰から抽出したダイオキシン類の生分解率(%)

	SN-49910	SF-2000	SF-2001	SF-2002
TCDD	79.56	25.63	97.20	88.61
TCDF	80.21	12.30	92.01	62.35

(7) SN-49910 菌による DF の分解代謝物質の確認

SN-49910 菌を用いて DF 分解代謝物質を調べた。中間代謝物質として、安息香酸、ベンズアルデヒド及びベンジルアルコールも確認（マススペクトルは掲載なし）された。これらの中間代謝物質が生成されていることから、ダイオキシン類の完全分解経路が予想された(8)。

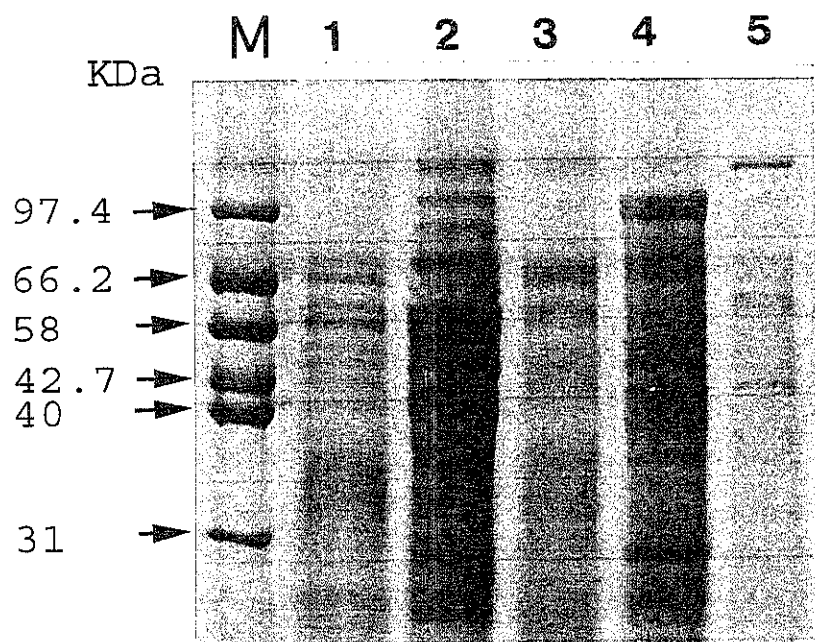
(8) DD 及び KC-400 100ppm 添加時の SDS-PAGE

SF-2001 における DD, KC-400 各々100ppm 添加時の SDS-PAGE を図 2-2 に示した。図のように DD では 55, 43, 40Kda, KC-400 では 97, 40, 30Kda 付近にストレス性タンパクの生成が見られた。これらのストレス性タンパク質はダイオキシン類分解に関与する酵素ではないかと推測している。

2. 4 考察及び今後の課題

以上の結果から、今回分離した菌株は、いずれの菌株もダイオキシン類や PCBs の分解能力が高いことがわかった。ダイオキシン類を多く含む飛灰等は、ダイオキシン類だけでなく PCB やヘキサクロロベンゼン等ベンゼン環が塩素化された化学物質を多く含んでいる。焼却場等から排出された物質により汚染された土壤等を分解除去する場合、ダイオキシン類だけでなくこれらの物質も併せて分解除去する菌種や条件が必要となると予想される。この点を考えると今回分離した菌種は、高いダイオキシン類分解でなく PCB 等塩化物の分解能力を持っていることから、この条件を満たしていると予想される。また、SDS-PAGE を見ると DD, DF 等の添加時にストレス性のタンパク質(10)が生成しており、これらのタンパク質がダイオキシン類の分解に関与しているのではないかと予想される。これらの菌株の分解特性やそのタンパク質の特徴について遺伝工学的に解析を進める必要がある。その理由として、これらの分解能の高い菌株はいずれも抗生物質耐性をもっていることもあり、菌体内にプラスミドを持っている可能性が高い。分解能に関する遺伝子コードもプラスミドに含まれることも予想される。この解析を進めていくことは、これらの菌株を使ったバイオレメディエーション技術を確立する上で重要なものと思われる。

また、現場で、飛灰中に含まれる有害化学物質を微生物に処理させることを考えると、これらの菌株の野外での生育及び分解に最適な培養条件を検討していく必要がある。幸いなことに今回大阪府下の能勢町のダイオキシン類汚染土壤から SF-2002 菌株を分離した。この菌株はグラム陽性菌 *Bacillus* sp. で、高いダイオキシン類の分解力を持っている。この菌は、これまでの方向ではあまり見られないダイオキシン類分解菌株である。現地に生存することから、生育及び分解条件が確立されるならば、現在汚染されている土壤の分解除去に、すぐにでも使用できるものと思われる。今回得た結果を基に、各種の菌を汚染土壤の修復に使えるための各種条件の検討を進めていきたいと考えている。



☒ 2-2 Chemical stress proteins of *Bacillus* sp. SF-2001 on SDS-PAGE

Lane M, molecular weight marker; lane 1, control; lane 2, incubation of 1 day (added DD 100ppm); lane 3, 2 day (added DD100ppm); lane 4, incubation of 1 day (added KC-400 100ppm); lane 5, 2day (added KC-400)

参考文献

- 1) 矢木修身, 有害有機物による土壌汚染とバイオレメディエーション 2、日本土壌肥料学会誌、Vol.70, No4, pp581-587(1999)
- 2) Ikuo Souta, Toshiro Sakurai and Michio Hayashi: Isolation of a Pseudomonas Strain Resistant to Organic Solvents and Capable of Degrading Coplanar Polychlorinated Biphenyls , Biocontrol Science, 3, 57-62(1998)
- 3) 古市徹他: ダイオキシン微生物処理技術の研究、厚生省生活安全総合研究事業平成10年度報告書
- 4) 金子精一: 好気性細菌の同定、微生物同定法、pp1-91 衛生技術会(1983)
- 5) 環境庁水質保全局水質管理課: 外因性内分泌攪乱物質化学物質調査暫定マニュアル〔水質、底質、水生生物〕、平成10年度版
- 6) 厚生省生活衛生局水道環境部環境整備課: 廃棄物処理におけるダイオキシン類測定マニュアル、平成8年度版(1996)
- 7) I. Souta and S. Kaneko: Degradation of 2-n-alkyl thiophene by Pseudomonas sp. And its degradation pathway, Boukin Boubai, 23, 1, p15-18(1995)
- 8) R.M. Wittich: Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., 49;489-499(1998)
- 9) 鈴木智雄編: 微生物工業技術ハンドブック、pp350-367、朝倉書店(1990)
- 10) 畝本力: 特殊環境に生きる細菌の巧みなライフスタイル、p8-10、共立出版(1993)