

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

生物学的ダイオキシン分解技術の開発研究

平成11年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 平 石 明

平成12年（2000年）3月

目 次

I. 総括研究報告	
生物学的ダイオキシン分解技術の開発研究 -----	1
平石 明	
II. 分担研究報告	
1. 環境におけるダイオキシンの生分解と微生物群集の動態に関する研究 -----	8
平石 明	
2. ダイオキシン分解菌の培養生理学に関する研究 -----	8
鈴木慈郎	
3. ダイオキシン分解菌の分類と特性評価に関する研究 -----	8
藪内英子	
4. ダイオキシン分解代謝系モデル化合物ジベンゾフランの生分解の検討 に関する研究 -----	18
鈴木晋一郎	
5. <i>Sphingomonas</i> RW1株の表層構造に関する研究 -----	22
川原一芳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	25

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（総括）研究報告書

生物学的ダイオキシン分解技術の開発研究

（主任）研究者 平石 明 豊橋技術科学大学エコロジー工学系教授

研究要旨：平成10年度の同研究事業「ダイオキシンの生分解機能の探索と特性評価」の研究結果を踏まえ、既知菌および新たに分離されたダイオキシン分解菌の分解評価を行うとともに、環境におけるダイオキシンの微生物分解の特性について調べた。ダイオキシンのモデル化合物としてのジベンゾ-*p*-ジオキシン(DD)、ジベンゾフラン(DF)を用いてスフィンゴモナス属細菌の分解活性を精査した結果、*S. yanoikuyae*に比較的強い分解活性を認めた。本菌は分解時に水溶性の黄色色素を生産した。同属のダイオキシン分解菌RW1株に対しては*Sphingomonas wittichii*の新種名を国際誌IJSEMに提唱した。ダイオキシンの取り込みと菌体膜構造の関係を知る前提として、RW1株の膜成分のなかで最も特徴的なスフィンゴ糖脂質(GSL)の化学的性質を調べた結果、*S. yanoiluyae*と類似するGSL構造を有することが明らかとなった。ダイオキシン汚染土壌の微生物群集の動態を知るためにキノンプロファイル法による詳細な解析を行った。その結果、TEQ換算のダイオキシンの汚染レベルに応じて異なる微生物相が形成されていることが確認された。汚染土壌に有機栄養としてオートクレーブしたコンポストを添加したところ、汚染レベル1,000 pgTEQ以上の土壌ではダイオキシンの脱塩素化が起り、4塩化以上のダイオキシンの総量も3カ月で22%減少することが見いだされた。一方家庭生ゴミのコンポスト化処理過程においても、ダイオキシンの脱塩素化が起り、ダイオキシンの総量も減少することがわかった。これらの結果から、環境中におけるダイオキシンの生分解・減少の主要機構としての還元的脱塩素化の重要性が示唆された。既知のダイオキシン分解菌に加えて、自然界から新たにダイオキシン分解菌を分離し、これらを用いて現場汚染土壌の好氣的ダイオキシン分解実験を行った結果、現場の複合微生物群集以上に分解効果を認めた菌株は存在しなかった。

A. 研究目的

ダイオキシン汚染環境の除染や修復には、安全性やコスト面から考えて生物学的方法が有利と考えられる。たとえば汚染土壌の修復後の再利用を考えた場合、これを

可能にするのは基本的に生物学的アプローチのみであろう。本研究の最終目標は、自然界に存在するであろう微生物のダイオキシン分解能力とその機構を利用して、経済的かつ安全性の高い生物学的ダイオキシン

分解技術を開発することである。この技術を実際の汚染土壌の修復に応用する。

ダイオキシン分解微生物に関する研究は数多くみられるが(たとえばArmengaud et al., 1998; Wittich., 1998)、生分解機構に関する研究は未だ萌芽的研究の段階であり、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未だ確立されていない。

低塩素化ダイオキシン分解菌の一つとしてスフィンゴモナス属細菌 *Sphingomonas* sp. RW1株が知られている(Wittich et al., 1992; Armengaud et al., 1998)。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おり、果たして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属の菌種にもダイオキシン分解株がみられるのか興味があるところである。4塩化以上の多塩素化ダイオキシン(PCDD)や多塩素化ジベンゾフラン(PCDF)の分解微生物としては一部の担子菌が知られている(Takada et al., 1996)。しかしながら、これらの好氣的、酸化的ダイオキシン分解が自然界で実際に機能しているかどうかの証明はない。自然環境中のダイオキシンの減少については、嫌気性微生物による還元的脱塩素化反応の寄与が報告されている(Beurskens et al., 1995; Barkovskii & Adriaens, 1996; Ballerstedt et al., 1997)のみである。

本研究は、平成10年度の当該研究事業「ダイオキシンの生分解機能の探索と特性評価」の研究結果を踏まえ、あらたに設定

した3年計画の研究事業の1年目にあたる実験調査である。本研究の最終目標は上記のとおりであるが、本年度は、単一菌によるダイオキシン分解の特性評価と、環境中のダイオキシンの消長と微生物動態に関する知見を得ることを主な目的として研究を行った。すなわち、ダイオキシンのモデル化合物としてジベンゾ-*p*-ジオキシン(DD)、ジベンゾフラン(DF)、ビフェニル(BP)を取り上げ、スフィンゴモナス(*Sphingomonas*)属細菌の中で比較的強い分解性を示す特定菌種について、また類縁の好気性光合成細菌菌種について、それらの分解特性やそれに関わる特性を調べた。環境調査においては、ダイオキシン汚染土壌やコンポスト中に潜在するであろうダイオキシン分解微生物群集の動態を追跡し、それらとダイオキシン生分解機構の関係に基づいて、実際に生物学的修復技術として機能するアプローチを考察した。

B. 研究方法

以下に示す5項目について研究を行った。

B-1. ダイオキシン分解の特性評価(スフィンゴモナス細菌)

平成10年度の研究事業に引き続き、ダイオキシンモデル化合物DD、DF、BPの分解試験には、スフィンゴモナス属の既知菌種および汚染環境からの分離株を用いた。無機塩培地にヘプタメチルノナンに溶解したダイオキシンモデル化合物またはダイオキ

シン混合物を加え、菌を好氣的に培養した。生育は濁度で測定し、培地中のモデル化合物やダイオキシンの減少はHPLC、GC/MS分析で追跡した。また前年度同様にモデル化合物分解に関わるジオキシゲナーゼ系遺伝子をPCRで増幅分離し、サブクローン化後塩基配列を決定した。

B-2. ダイオキシン分解の特性評価（光合成細菌）：エネルギー代謝の点で貧栄養環境における生残性が高いと考えられる好気性光合成細菌についてダイオキシン分解機能と遺伝子についてスフィンゴモナス細菌同様に調べた。

B-3. 細胞表層構造とダイオキシン分解の関係：スフィンゴモナス属細菌の中で比較的強いDD, DF分解を示す*Sphingomonas* sp. RW1の表層構造、とくにスフィンゴ糖脂質(GSL)の構造について調べた。*Sphingomonas* sp. RW1株の乾燥菌体から脂質成分をクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)および(1:3, v/v)により抽出し、混入するリン脂質を弱アルカリによって分解、除去し、GSLのパターンを薄層クロマトグラフィー(TLC)により分析した。

B-4. 汚染環境調査：環境微生物群集とダイオキシンの消長との関係は、平成10年度に調査した大阪府豊能郡能勢美化センター付近の土壌と生ゴミ処理過程で生じるコンポストを材料として調べた。汚染土壌およびコンポスト中のダイオキシン（4塩化以上のDD, DF [PCDD/F]）はGC/MS法で測定した。環境試料中の微生物群集の量的、

質的動態はキノプロファイル法(Hiraishi, 1999)を用いて行った。キノンの同定はLC/MSを用いて行い、キノプロファイルの数量解析にはBioCLUSTプログラム(Iwasaki & Hiraishi, 1998)を用いた。

C. 研究結果

C-1. モデル化合物を用いた分解の特性評価（スフィンゴモナス属細菌）

本属細菌の中で比較的強いDD, DF分解活性を示す*Sphingomonas* sp. RW1株をさらに精査した結果、他のどの菌種とも分類学的に異なることを再確認した。本株に対しては、分類学的も環境バイオテクノロジーへの応用を考える上においても種名を与えておく必要があると考え、*Sphingomonas wittichii*の新種名を国際誌IJSEMに提唱した。

他のスフィンゴモナス属細菌では*Sphingomonas yanoikuyae*が*S. wittichii*に匹敵するDD, DF, BP分解活性を有することが明らかとなった。本菌は*S. wittichii*とは異なり、DF分解時に黄色の水溶性色素を産生した。この黄色物質は従来知られている*S. wittichii*の分解代謝産物のいずれとも異なった。したがって、*S. yanoikuyae*は*S. wittichii*とは異なる分解経路を持つことが示唆された。

*S. yanoikuyae*からこれらの分解に関する遺伝子の分離を試みた結果、まずBP分解酵素の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列を決定した。この塩基配列は、既に

報告されている同属の*S. aromaticivorans*のBP遺伝子と78%の相同性を示した。

C-2. モデル化合物を用いた分解の特性評価（好気性光合成細菌）

スフィンゴモナス関連好気性光合成細菌についてダイオキシン分解機能を調べた結果、*Blastomonas*, *Erythromonas*, *Erythrobacter*属細菌には分解活性、分解遺伝子ともに認められなかった。

平成10年度の知見を基に、*Porphyrobacter*属に類縁する"*Agrobacterium sanguineum*"から分解遺伝子の取得を試み、BP分解遺伝子のクローニングと一次構造解析に成功した。この細菌は*S. yanoikuyae*同様、DF、BP分解時に黄色色素を生産した。しかしこれらの化合物を炭素源とする生育試験では、ごく弱い生育しか認められなかった。

C-3. 細胞表層構造とダイオキシン分解の関係

スフィンゴモナス属細菌のダイオキシン透過性、分解性と細胞表層構造との関係を明らかにするために、*S. wittichii*や*S. yanoikuyae*を対象として細胞表層に存在すると考えられるスフィンゴ糖脂質の構造を調べた。RW1株のスフィンゴ糖脂質をTLC分析したところ、*Sphingomonas*属菌株に共通のGSL-1（グルクロン酸セラミド）と同じ移動度を示すGSLと、それに比べて移動度が少し小さいGSLの2種類のGSLをもつことがわかった。このパターンと移動度は*S. yanoikuyae*と同一であった。

両GSLの化学組成をさらに調べたとこ

ろ、ともに脂肪酸としてはミリスチン酸と2-ヒドロキシミリスチン酸、スフィンゴシンとしては2-アミノ-1,3-オクタデカンジオールと2-アミノ-13,14-メチレン-1,3-エイコサンジオールを含有することがわかった。

ミリスチン酸をもつGSLはこれまで*Sphingomonas*菌株では報告されていないので、本GSLの特徴であると思われる。糖成分としてはウロン酸が検出され、¹H-NMR分析により両GSLとも単糖型のGSLであることが示された。

C-4. 汚染環境調査

平成10年度完了の当該研究事業の結果を踏まえ、大阪府能勢町の汚染土壌のダイオキシン濃度と微生物群集との関係について再解析した。調査土壌のPCDD/Fの再分析結果から、土壌試料を高汚染土壌(>1,430 pgTEQ/g)、中度汚染土壌(562-806 pgTEQ/g)、および低汚染土壌(<56 pgTEQ/g)に分けることができた。キノプロファイルからみた微生物群集構造は明らかに高汚染土壌と低汚染土壌では異なり、キノン組成の違いを表すパラメータ非類似度は両者間で20%を越えた。すなわちダイオキシン汚染の影響による微生物相の変化(微生物生態系への影響)が考えられた。

採取した能勢町の高汚染土壌に、オートクレーブしたコンポストを有機栄養源として与えたものと与えないものを実験室内で3カ月間インキュベートしたところ、コンポストを与えた系のみダイオキシンの減少が認められた（PCDD/Fの総量として22%

減少)。この場合OCDD/Fは一定の速さで減少したが、HpCDD/Fは見かけ上あまり変化がなかった。TCDD/F、PeCDD/FはOCDD/Fと同様に減少したが、2ヶ月経過したところで減少は見かけ上止まった。これらの結果から、PCDD/Fの減少は、汚染土壌に存在する微生物群集による還元的脱塩素化反応によるものと推定された。

一方高汚染土壌をDFで集積培養した場合には、DFを好気分解する細菌が分離された。キノン分析や16S rDNA解析から分離菌の多くは*Sphingomonas*属と推定された。これらの分離株のほとんどは2塩化までのダイオキシンを分解したが、汚染土壌から抽出した4塩化以上のダイオキシン混合物に対しては、白色腐朽菌1株を除いて有意な分解性（分析誤差を越える9%以上の分解）を示さなかった。

C-5. 生ゴミ処理過程におけるダイオキシンの消長

植木鉢を用いた簡易生ゴミ処理過程におけるダイオキシンの消長について調べた。10ヶ月間の生ゴミ処理過程で、処理資材および生ゴミから持ち込まれた総PCDD/Fは28,300 ng (8.09 ngTEQ)であった。この処理期間で総PCDD/Fの70%以上が分解された。各PCDD/F congenerでは、OCDD/Fの減少率ももっとも高く、TCDD/Fは逆に若干増加した。上記の汚染土壌の場合と同様に、ダイオキシンの初期減少は主に複合微生物群集による還元的脱塩素化によって進行するものと推察された。

D. 考察

本研究で明らかになったように、また既報にもあるようにDD、DF、BPの分解活性を有する微生物は多数存在する。しかし、PCDD/Fを分解できるものは今のところ、ごく一部の担子菌(Takada et al., 1996)しか知られていない。これは単一菌を使う限りにおいては、汚染土壌中のダイオキシンの効果的分解と再使用に耐える修復がかなり困難であることを示唆している。

一方本研究における汚染現場の解析によって、高汚染土壌には低汚染土壌とは異なる特有の微生物相が形成されており、その中の複合微生物群集はダイオキシン分解のポテンシャルを有することが示唆された。すなわち外部から有機栄養物を添加した場合、これらの微生物群集は還元的脱塩素化反応によって、PCDD/Fを低分子化することができる。これらの事実は単一菌を用いるよりも、複合微生物群集によってダイオキシン分解を行った方がより効果的である可能性を示唆している。すなわち、図1に示すように前半の脱塩素化を行う微生物群集と後半の酸化的分解を行う特定種の組み合わせによって、ダイオキシンを効果的に分解する技術が考えられる。既に、微生物の還元的脱塩素反応を環境修復に利用する考え方は広く浸透してきている(Mohn & Tiedje, 1992; Dolfing & Beurskens, 1995; Holliger et al., 1998)。ダイオキシン汚染土壌の場合、この技術にはコストおよび実用的見地からコンポストの微生物群集を活用す

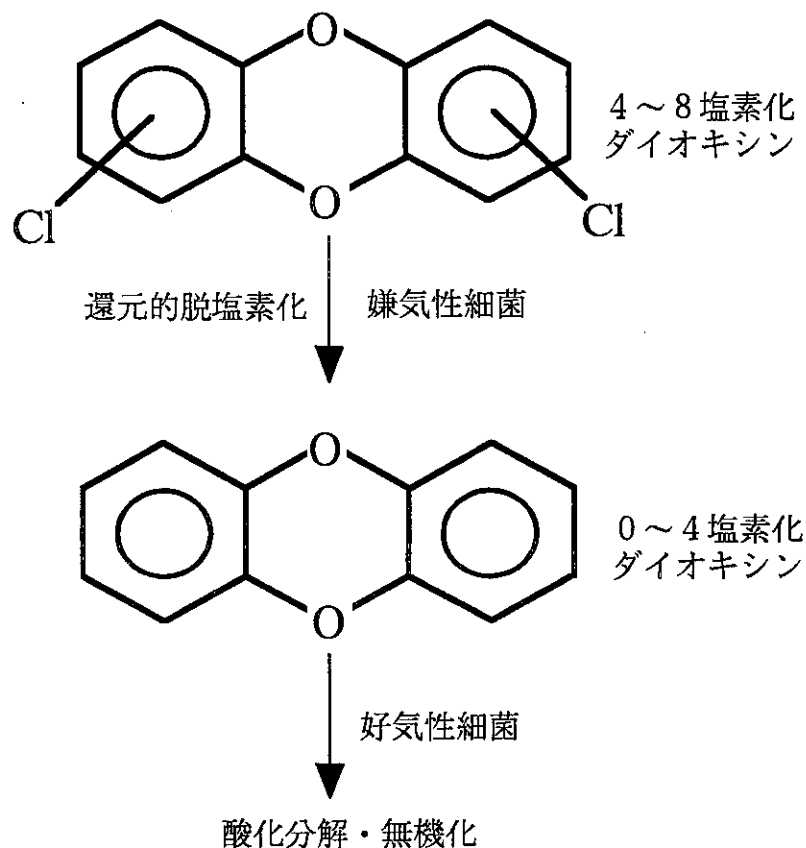


図1. 還元的脱塩素反応と酸化的分解反応を組み合わせた複合微生物群集によるダイオキシンの分解

ることも期待される。

今後は低塩素化ダイオキシンの好氣的酸化分解を行う好気性細菌の特性評価と同時に、環境中でPCDD/Fの還元的脱塩素化を担っている微生物群集の正体とその分子機構を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

低塩素化ダイオキシンを酸化分解する微生物はスフィンゴモナス属細菌を含め、数多く分離されている。一方、自然環境中でのダイオキシンの分解には、嫌気性微生物

によるPCDD/Fの還元的脱塩素化が基盤になっている可能性が示唆された。コンポスト中の微生物群集もこのような還元的脱塩素化活性を有することが明らかとなった。したがって、この脱塩素化を行う微生物群集と酸化的分解を行う特定種を組み合わせることによって、ダイオキシンを効果的に分解する技術が開発できる可能性がある。ダイオキシン汚染土壌の修復には、コスト面、安全性、および再利用の点から実用的である技術が求められる。この観点から、コンポストの微生物群集を修復に活用

することも期待され、今後この方面の研究も詳細に行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

分担研究報告書（別添5）に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

環境におけるダイオキシンの生分解と微生物群集の動態 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教授

ダイオキシン分解菌の培養生理学 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

ダイオキシン分解菌の分類と特性評価 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：本研究では、既知菌および新たに分離されたダイオキシン分解菌の分解評価を行うとともに、環境におけるダイオキシンの微生物分解の特性について調べた。まずダイオキシン汚染土壌の微生物群集についてキノプロファイル法を用いて詳細な解析を行った結果、TEQ換算のダイオキシンの汚染レベルに応じて異なる微生物相が形成されていることが確認された。すなわち1,000 pgTEQ/g以上の高汚染土壌ではMK-6, Q-10含有細菌を中心とする特徴的な微生物群集構造が認められた。このような高汚染土壌に有機栄養としてオートクレーブしたコンポストを添加した場合、多塩素化ダイオキシンの脱塩素化が起り、4塩化以上のダイオキシンの総量も3カ月で22%減少することが見いだされた。一方、家庭生ゴミのコンポスト化処理過程においても、ダイオキシンの脱塩素化が起り、ダイオキシンの総量も減少することがわかった。これらの結果から、環境中におけるダイオキシンの生分解・減少の主要機構としての還元的脱塩素化の重要性が示唆された。既知のスフィンゴモナス属細菌を中心とするダイオキシン分解菌に加えて、これらの汚染土壌から新たに好気性ダイオキシン分解菌を分離し、合計35株による現場汚染土壌の好氣的ダイオキシン分解実験を行った結果、現場の複合微生物群集以上に分解効果を認めた菌株は存在しなかった。したがって自然環境に類似した条件で効率的にダイオキシン分解を行おうとすれば、還元的脱塩素化反応と好氣的酸化的分解反応を行うそれぞれの微生物を組み合わせる必要があると考えられた。ジオキシゲナーゼ系ダイオキシン分解菌 *Sphingomonas* sp. RW1株の分類学的性状をさらに詳しく調べた結果、スフィンゴモナス属の新種とすべき細菌であることが判明し、*Sphingomonas wittichii*の新種名を提唱した。

A. 研究目的

本報告書は、(1)環境中のダイオキシンの生分解と微生物群集の動態の関係、(2)ダイオキシン分解菌の培養生理学、および(3)ダイオキシン分解菌の分類学的性状について、それぞれ平石、鈴木、藪内の分担研究者が担当して調査研究を行った結果を示すものである。各研究項目はお互い内容が異なるが、部分的に3人の共同研究として行われたところもあるため、ここに一括して報告する。

テーマ(1)については、ダイオキシン汚染土壌のPCDD/Fの消長と微生物群集動態との関係を調べ、環境中でダイオキシン分解を担っている微生物群集の正体と分解機構を明らかにすることが目的である。この知見を基に汚染土壌の修復を行うためのもっともよい生物学的アプローチを考察する。

テーマ(2)では、これらの汚染環境から分離されたダイオキシン分解菌、および既知の分解菌の培養生理学的性状を調べ、これらの菌の効果的応用法を考える。さらにこれらのダイオキシン分解菌を汚染土壌に添加した場合、実際に分解効果があるかどうかを検証した。

テーマ(3)では、低塩素化ダイオキシン分解菌として既に知られている *Sphingomonas* sp. RW1株の命名のための分類学的試験を行った。すなわち、本菌を環境に応用する前提として種名が特定化されていない状態では不都合であり、このために詳細な分類学的試験を行い、新種名を提唱した。

B. 研究方法

B-1. 汚染土壌調査—ダイオキシンおよび呼吸鎖キノンの分析

平成10年度に引き続き大阪府豊能郡能勢町美化センター焼却処理場付近の土壌の分析を行った。調査地点は図1に示すように焼却場南側の能勢高校農場跡である。土壌試料のPCDD/F濃度は既報に従い、GC/MS法で決定した。分析は新東工業株式会社に委託した。土壌のキノン分析はHPLC法(Hiraishi, 1999)で行った。キノンプロファイルの数量解析にはBioCLUSTプログラム(Iwasaki & Hiraishi, 1998)を用いた。

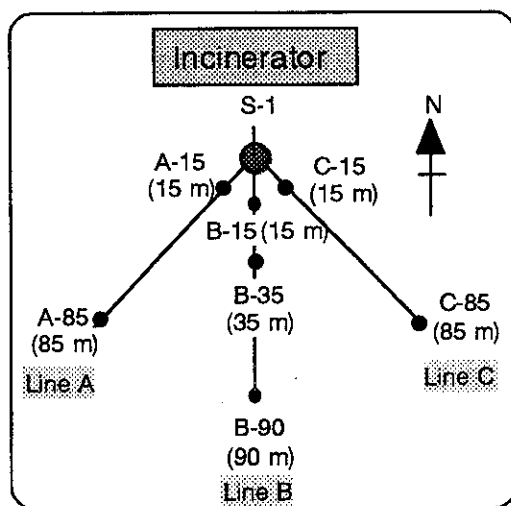


図1. 土壌調査のためのサンプリング地点

B-2. 生ゴミ処理物のダイオキシン分析

既報(平石, 1999)にある植木鉢と園芸土を用いた生ゴミ処理法を用い、家庭から排出される生ゴミの処理を行った。処理器の概要を図2に示す。1999年1月から10月までの10カ月間、計220 kg(乾燥重量54.5 kg)

の家庭生ゴミを毎日投入し処理した。毎月生成する余剰コンポストを別の植木鉢に移し、そのまま静置して熟成処理を行った。11月末に熟成処理コンポストおよび植木鉢中に残存する園芸土・コンポスト混合物のダイオキシン分析を行った。

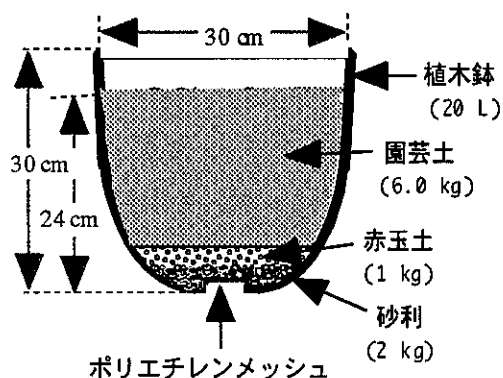


図2. 生ゴミ処理に用いた植木鉢の断面図

B-3. 微生物培養株の分解試験

平成10年度の当該事業研究報告で記したスフィンゴモナス属細菌およびその類縁光合成細菌に加えて、美化センター周辺土壌およびその他の環境試料からジベンゾフラン(DF)集積培養法によって分離された微生物株35株のダイオキシン分解能について調べた。これらの分離株はSSU rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて系統学的位置を決定した。比較対照として美化センター周辺土壌からのDF集積混合培養物をそのまま用いた。

ダイオキシン類は水に不溶であり、固形粉末のまま培養に用いると培養菌体に吸着して定量が困難であった。そこでダイオ

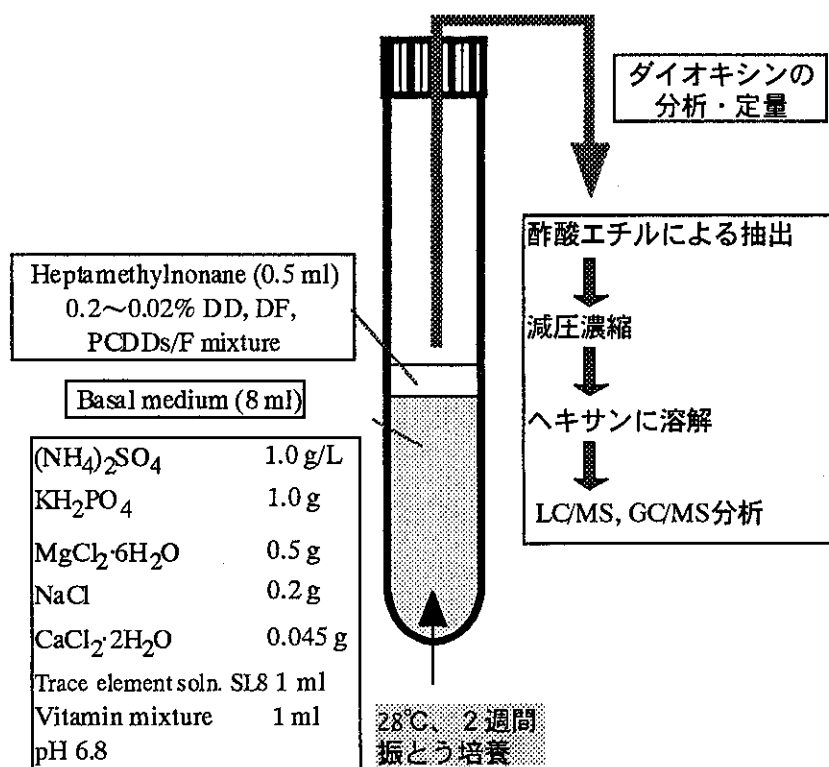


図3. 二層培養法によるダイオキシンの分解試験の概要

キシンを溶解した不活性有機溶媒-培地成分の二層培養法で分解試験を行った(図3)。培養液中に残存するDD, DF, 低塩素化DD, DFはHPLC, PCDD/FはGC/MSで分析した。

B-4. *Sphingomonas* sp. RW1株の分類試験

RW1株の分類学的所属については表現型、化学分類学的性質、16S rDNAの塩基配列およびDNA-DNA交雑形成に基づいて決定した。

C. 研究結果

C-1. 汚染土壌の微生物群集とダイオキシン汚染レベルとの関係

平成10年度完了の当該研究事業の結果を踏まえ、大阪府能勢町の汚染土壌のダイオキシン濃度と微生物群集との関係について

再解析した。土壌のPCDD/F濃度についての分析した結果、美化センター南側の調査範囲(図1)からは562-4,920 pgTEQ·g⁻¹(乾土)のダイオキシンが検出された(表1)。またこの調査地点から南側に1.4 km離れた農地土壌からは31-56 pgTEQ·g⁻¹のダイオキシンが検出された。これらの検出濃度から、土壌試料を高汚染土壌(>1,430 pgTEQ/g)、中度汚染土壌(562-806 pgTEQ/g)、および低汚染土壌(<56 pgTEQ/g)に分けることができた。

これらの土壌試料について微生物の呼吸鎖キノンの分布を調べた結果、高汚染土壌からはMK-6, Q-10が主要キノンとして検出された。一方低汚染土壌や、他の地域(茨城県つくば市、千葉県松戸市、愛知県豊橋市)から採取した非汚染土壌では、Q-10や

表1. 調査土壌のダイオキシン濃度。高汚染および中汚染土壌は能勢町美化センター南側の能勢高校農場から採取したもの。低汚染土壌はこの農場から1.4 km南側の農地から採取した。

土壌試料	PCDD/F濃度 (ng·g ⁻¹ dry wt)														Dioxins (pgTEQ g ⁻¹)
	PCDDs						PCDFs						Total		
	TCDDs	PeCDDs	HxCDDs	HpCDDs	OCDD	Total	TCDFs	PeCDFs	HxCDFs	HpCDFs	OCDF	Total	PCDD/Fs		
高汚染土壌															
S-1	0.316	2.11	12.1	23.8	24.0	62.3	4.97	19.7	60.1	91.0	58.8	235	297	4,080	
A-15	0.431	2.81	17.6	48.2	33.2	102	6.68	19.3	70.5	120	83.8	300	402	4,700	
B-15	0.244	1.47	8.46	17.8	21.1	49.1	3.82	12.9	48.9	49.1	44.5	159	208	3,100	
B-35	0.198	1.38	8.03	16.5	23.8	49.9	3.15	13.2	37.2	59.1	36.3	149	199	2,530	
C-15	0.350	2.98	13.5	22.1	28.3	67.2	5.72	21.6	72.7	107	91.7	299	366	4,920	
C-85	0.119	0.874	3.98	8.10	7.09	20.2	1.75	6.39	21.0	30.4	20.0	79.5	99.7	1,430	
中汚染土壌															
A-85	0.120	0.512	2.40	6.33	5.04	14.4	1.38	3.95	11.4	15.0	12.4	44.1	58.5	806	
B-90	0.0464	0.311	1.52	4.30	4.49	10.7	0.661	2.21	8.58	13.1	8.96	33.5	44.2	562	
低汚染土壌															
NC-1	0.0454	0.0807	0.245	0.664	1.80	2.84	0.104	0.330	1.07	1.92	2.02	5.44	8.28	56	
NC-2	0.0432	0.0558	0.148	0.501	1.60	2.35	0.0982	0.173	0.542	0.975	1.05	2.84	5.19	31	

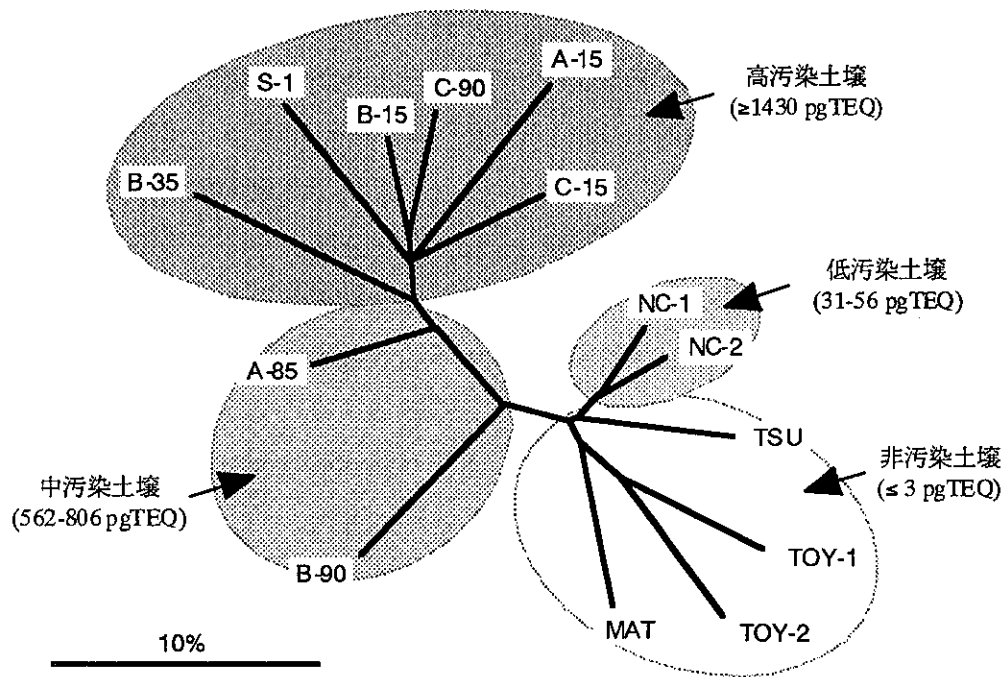


図4. ダイオキシン汚染レベルの異なる土壌における微生物群集構造の違い—キノンプロファイルの数量解析による類別化. 高汚染、中汚染、および低汚染土壌の採取地点は表1に示したとおり、非汚染土壌は茨城県つくば市(TSU)、千葉県松戸市(MAT)、および愛知県豊橋市(TOY-1, TOY-2)の農地から採取した。

MK-8が主要キノンとして検出された。また汚染レベルにかかわらず、MK-8(H2)やMK-9(H8)がかなりの割合で検出された。

得られたキノンプロファイルデータを数量解析した結果、キノン組成の違いを表すパラメータ非類似度(D)は高汚染土壌と低汚染土壌間で20%を越えることが示された。 D マトリックスデータに基づいて近隣結合法を用いたクラスター解析を行った結果、図4に示すように高汚染土壌と低汚染土壌はそれぞれ別のクラスターを形成し、中汚染土壌は両者の中間に位置することがわかった。これらの結果は、高濃度ダイオキシン汚染の影響による微生物相の変化(微生物生態系への影響)を示すものである。

採取した能勢町の高汚染土壌にオートクレーブしたコンポストを有機栄養源として与え、実験室内で3カ月間インキュベートしてダイオキシンの消長を追跡した。対照としては、コンポストを与えないものを用いた。その結果、コンポストを与えた系のみダイオキシンが時間経過とともに減少することが認められ、3カ月後ではPCDD/F総量で22%減少していた(図5)。この場合OCDD/Fは一定の速さで減少したが、HpCDD/Fは見かけ上あまり変化がなかった。TCDD/F、PeCDD/FはOCDD/Fと同様に減少したが、50日経過したところで減少は見かけ上止まった。これらの結果から、PCDD/Fの減少は直接生分解されるため起こ

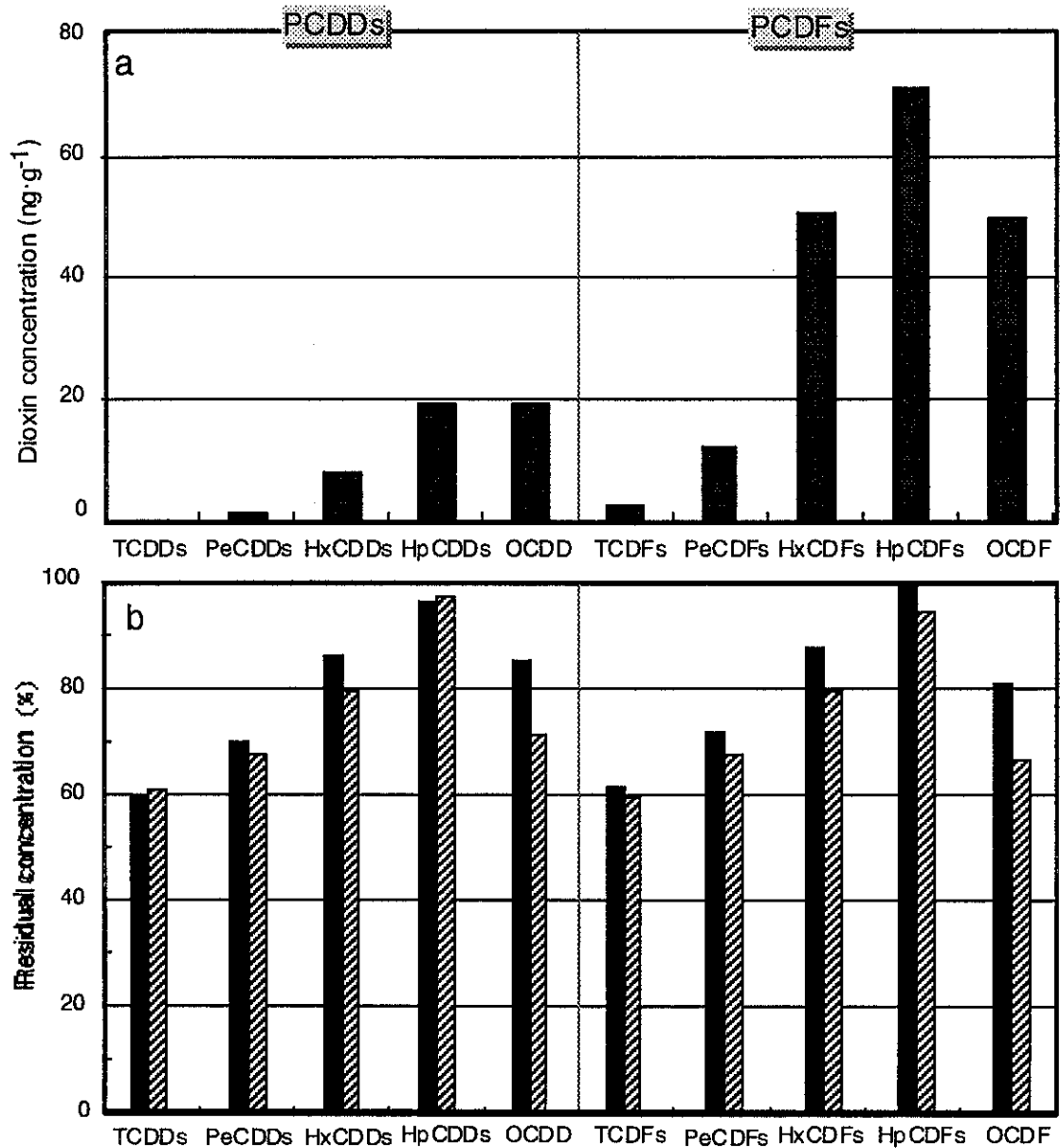


図5. ダイオキシン汚染土壤に滅菌コンポストを加えてインキュベートしたときのPCDD/Fの消長。(a)インキュベート前のPCDD/F congenerの濃度；(b)50日後（黒色のヒストグラム）、および90日後（斜線のヒストグラム）のPCDD/F congenersの残存率（%）。

るのではなく、汚染土壤に存在するある種の微生物の還元的脱塩素化反応によるものではないかと推定された。すなわち、OCDDおよびOCDFの減少速度が脱塩素化の速度そのものとみなされ、その他のcongenerの消長は、その分子の減少と上位の多塩素

化物の脱塩素化由来する増加分が合わさったものと推定された。

C-2. 生ゴミ処理過程におけるダイオキシン分解

植木鉢式処理器に10カ月間、家庭生ゴミを毎日投入して処理し、毎月生成する余剰

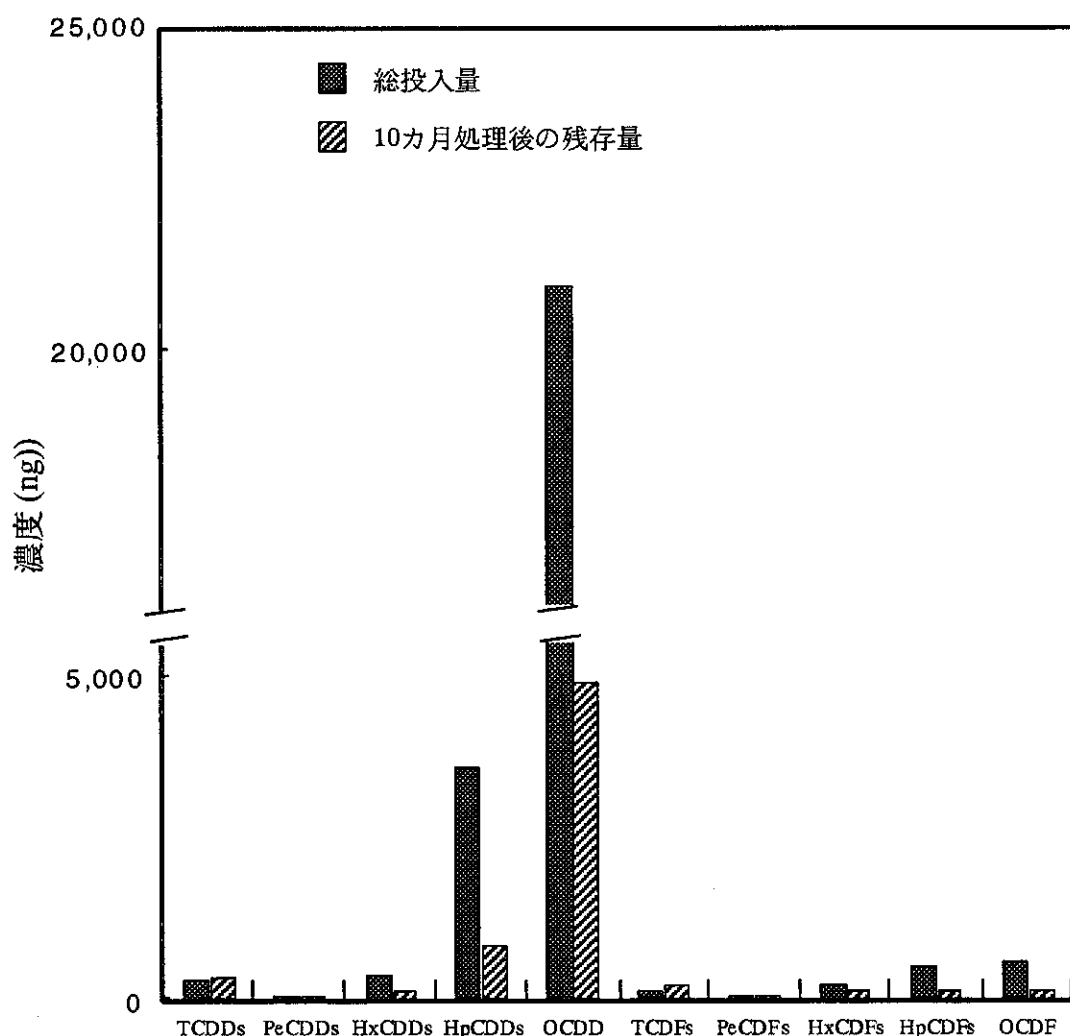


図6. 生ゴミ処理過程におけるダイオキシンの消長

コンポストを別の植木鉢に移し、そのまま静置して熟成処理を行った。10カ月後に熟成処理コンポストおよび植木鉢中に残存する園芸土・コンポスト混合物のダイオキシン分析を行った。

用いた園芸土に元々含まれていたPCDD/Fは9,260 ng（湿重量15 kgあたり）であり、生ゴミ中のPCDD/F量は5回のスポット測定に基づいて19,000 ng（湿重量220 gあたり）と計算された。それらを合計すると28,300 ng（8.03 ngTEQ）となり、10カ月の生ゴミ処理期

間でこれだけの量のPCDD/Fが投入されたと計算された。それに対し、10カ月の処理後の残存PCDD/Fは絶対量として処理器本体に3,570 ng、引き抜いた二次処理生成コンポスト中に3,360 ng存在した。すなわち、投入されたPCDD/Fが10カ月の処理期間で約25%にまで減少していたことになる。

絶対量としてPCDD/F congenersの消長をみるとOCDD/Fの減少率が高くなり、TCDD/Fは逆に若干増加した（図6）。すなわち、上記の能勢町汚染土壌の場合と同様

に、生ゴミ処理過程におけるダイオキシンの初期減少は主に複合微生物群群集による還元的脱塩素化によって進行するものと推察された。

C-3. スフィンゴモナス属細菌および類縁細菌のDF分解試験

スフィンゴモナス属細菌についてDD, DF, BPの分解特性を調べた。これらの試験株の中では*Sphingomonas yanoikuyae*が*S. wittichii*に匹敵するDD, DF分解活性を有することが明らかとなった。またBP分解活性においては本菌種は試験株の中でもっとも優れていた。

*S. yanoikuyae*は*S. wittichii*とは異なり、DF, BP分解時に黄色の水溶性色素を産生した。この黄色物質は従来知られている*S. wittichii*の分解代謝産物のいずれとも異なった。したがって、*S. yanoikuyae*は*S. wittichii*とは異なる分解経路を持つことが示唆された。

*S. yanoikuyae*からこれらの分解に関する遺伝子の分離を試みた結果、まずBP分解酵素の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列を決定した。この塩基配列は、既に報告されている同属の*S. aromaticivorans*のBP遺伝子と78%の相同性を示した。

スフィンゴモナス関連好気性光合成細菌についてもDD, DF, BP分解機能を調べた。その結果、*Blastomonas*, *Erythromonas*, *Erythrobacter*属細菌には分解活性、分解遺伝子ともに認められなかった。

平成10年度の知見を基に、*Porphyrobacter*属に類縁する"*Agrobacterium sanguineum*"か

ら分解遺伝子の取得を試み、BP分解遺伝子のクローニングと一次構造解析に成功した。この菌のBP分解遺伝子から類推されるアミノ酸配列は、*S. yanoikuyae*のそれに対して70%以上の相同性を示した。

*A. sanguineum*は*S. yanoikuyae*同様、DF, BP分解時に黄色色素を生産した。しかしこれらの化合物を炭素源とする生育試験では、ごく弱い生育しか認められなかった。*A. sanguineum*においては、DF, BP分解は極端なcatabolismに傾いていることが示唆される。

C-4. 新規分離株のダイオキシン分解試験

ダイオキシン汚染土壌やその他の環境からDF分解菌としてバクテリア32株、担子菌（白色腐朽菌）3株を分離した。SSU rRNA遺伝子の塩基配列に基づいてこれらの細菌分離株の系統学的位置を決定した結果、半数以上が*Sphingomonas*属に属する細菌であった。

分離株のほとんどは2塩化までのダイオキシンを分解したが、汚染土壌から抽出した4塩化以上のダイオキシン混合物に対しては、白色腐朽菌1株を除いて有意な分解性（分析誤差を越える9%以上の分解）を示さなかった。白色腐朽菌は有機栄養物を加えたときのみ、6塩化以下のダイオキシンを30%以上分解したが、7塩化以上のものはほとんど分解しなかった。能勢町の汚染土壌から集積した複合微生物群集は、ほとんどのダイオキシン同族体について分解活性を

示したが、6塩化物以上に対しては分解性は弱かった。

C-5. *Sphingomonas* sp. RW1株の分類

Sphingomonas sp. RW1株と他の本属細菌種について、生理学的、生化学的性質を比較した。さらに16S rDNAの塩基配列決定やDNA-DNA交雑形成試験などを行った。その結果、RW1株は他のどの菌種とも分類学的に異なることを再確認した。本株に対しては、分類学的も環境バイオテクノロジーへの応用を考える上においても種名を与えておく必要があると考え、*Sphingomonas wittichii*の新種名を国際誌IJSEMに提唱した。

D. 考察

本研究で明らかになったように、また既報にもあるようにDD、DF、BPの分解活性を有する微生物は多数存在する(Armengaud & Timmis, 1998; Wittch, 1998)。しかし、PCDD/Fを分解できるものは今のところ、ごく一部の担子菌(Takada et al., 1996)しか知られていない。担子菌も含めてこれらの微生物の酸化分解活性が環境中のダイオキシン分解にどれほど寄与しているかは不明である。しかし、これらの菌の培養生理学的特性から考えると、環境中のダイオキシンがある程度低塩素化物に変換されていないと、十分に分解活性を発揮することは難しいことが予想される。これはこのような酸化分解型の単一菌を使う限りにおいては、汚染土壤中のダイオキシンの効果的分解と再使用に耐える修復がかなり困難であるこ

とを示唆している。

一方本研究における汚染現場の解析によって、高汚染土壤には低汚染土壤とは異なる特有の微生物相が形成されており、その中の複合微生物群集はダイオキシン分解のポテンシャルを有することが示唆された。すなわち外部から有機栄養物を添加した場合、これらの微生物群集は還元的脱塩素化反応によって、PCDD/Fを低分子化することができる。これらの事実は単一菌を用いるよりも、複合微生物群集によってダイオキシン分解を行った方がより効果的である可能性を示唆している。すなわち、脱塩素化を行う微生物群集と酸化的分解を行う特定種の組み合わせによって、ダイオキシンを効果的に分解する技術が考えられる。既に、微生物の還元的脱塩素反応を環境修復に利用する考え方は広く浸透してきている(Mohn & Tiedje, 1992; Dolfing & Beurskens, 1995; Holliger et al., 1999)。

今回の研究でコンポスト中にもこのような脱塩素化を行う微生物群集が存在することが明らかとなった。もしコンポストの微生物群集を活用することができれば、コスト面および安全性の観点から有力な実用的技術となる可能性がある。今後コンポストやその他の環境の微生物群集のダイオキシン脱塩素化反応について、より詳細に解析して必要があろう。

E. 結論

低塩素化ダイオキシンを酸化分解する微

生物はスフィンゴモナス属細菌を含め、数多く分離されている。しかしこれらの細菌の特性から判断すると、環境中のダイオキシンの分解に直接寄与するとは考えにくい。一方、自然環境中でのダイオキシンの分解には、嫌気性微生物によるPCDD/Fの還元的脱塩素化が基盤になっている可能性が示唆された。コンポスト中の微生物群集もこのような還元的脱塩素化活性を有することが明らかとなった。したがって、この脱塩素化を行う微生物群集と酸化的分解を行う特定種を組み合わせることによって、ダイオキシンを効果的に分解する技術が開発できる可能性がある。ダイオキシン汚染土壌の修復には、コスト面、安全性、および再利用の点から実用的である技術が求められる。この観点から、コンポストの微生物群集を修復に活用することも期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiraishi, A., Kuraishi, H., and K. Kawahara, K. (2000) Emendation of the description of *Blastomonas natatoria* (Sly 1985) and Cahill 1997 as an aerobic photosynthetic bacterium and reclassification of *Erythromonas ursincola* Yurkov et al. 1997 as *Blastomonas ursincola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1113-1118.

2. 学会発表

片岡慎司、山中陽介、平石明、鈴木慈郎

ダイオキシンおよびジベンゾフラン分解菌の探索とその特性評価。日本農芸化学会1999年度大会、福岡。

高梨哲弥、近藤忠志、鈴木慈郎、平石明

スフィンゴモナス属細菌によるジベンゾフランおよびジベンゾ-*p*-ジオキシンの分解。第15回日本微生物生態学会大会、高知、1999。

松下真由美、平石明

スフィンゴモナス属関連細菌におけるダイオキシン分解酵素遺伝子の分布。第15回日本微生物生態学会大会、高知、1999。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

ダイオキシン分解代謝系モデル化合物ジベンゾフランの
生分解生成物の検討に関する研究

（分担）研究者 鈴木晋一郎 大阪大学大学院理学研究科教授

研究要旨： ダイオキシン分解代謝系の反応機構を解明するために、微生物 *Sphingomonas yanoikuyae* および *Agrobacterium sanguineum* によるモデル化合物ジベンゾフランの生分解生成物の同定を試みた。生育過程で生じる水溶性黄色色素は、複数の有色色素から成っていることが判明した。NMR、IR、紫外可視吸収スペクトル法、蛍光X線分光法などの測定により、2種類の主成分色素は、それぞれ水酸基あるいはケトンをもつ長鎖ジエン化合物であることがわかった。この結果より、これまで提唱されているダイオキシン分解機構の見直しが必要であると考えられた。

A. 研究目的

ダイオキシン汚染環境の生物学的修復の技術的基盤確立のため、微生物によるダイオキシン分解代謝系の検討は、重要な課題である。これまで、イクストラジオールジオキシゲナーゼなどの酵素を有する微生物がいくつか報告されており、ダイオキシンの分解機能を果たすことが期待されている。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は類似のメカニズムで分解されると考えられている。ジベンゾフランは、ダイオキシンに比べて、毒性が低く、ダイオキシン分解反応のモデル化合物として適していると考えられる。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、ジベンゾフランを炭素源とする生育の検討が平石らによって行われた。その結果、いくつかの菌種で、ジベンゾフランを利用した生育が認められることが判明した。この生育過程において、水溶性黄色色素が生じる。本研究では、この生じた水溶性黄色色素の同定を試み、微生物によるダイオキシン分解メカニズムについての考察を行った。

B. 研究方法・結果

Sphingomonas yanoikuyae および *Agrobacterium sanguineum* をLB培地で前培養した後、RM2無機塩合成培地に2%ジベンゾフランの2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチ