

ルノナン溶液を加えた培地に数滴接種し、30℃で36時間振とう培養した。菌の生育はわずかであったが、水層に水溶性黄色色素が生じた。

まず、分液ろうとによって、有機層(2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン溶液)と水層を分離した。得られた水層にエタノールを加え、共沸エバポレーションにより乾固し、酢酸エチルにより抽出した。抽出液を酸性水溶液で洗った後、乾燥し、引き続き、酢酸エチル/メタノールの混合溶媒を展開液としたワコーゲルC300カラムにより分離し、数種類のフラクションを得た。それらのうち主成分色素として、2種類の色素、すなわち黄色色素(a)および茶褐色色素(b)を分取した。紫外可視吸収スペクトルでは、黄色色素(a)は325nmに肩を持つスペクトルを示すのに対し、茶褐色色素(b)では、300nmの肩以外に、262nmに吸収極大を持つピークを持つことがわかった(図1)。また、蛍光X線分光測定により、これらの色素は、いずれも金属イオンを含まないことがわかった。NMR測定に

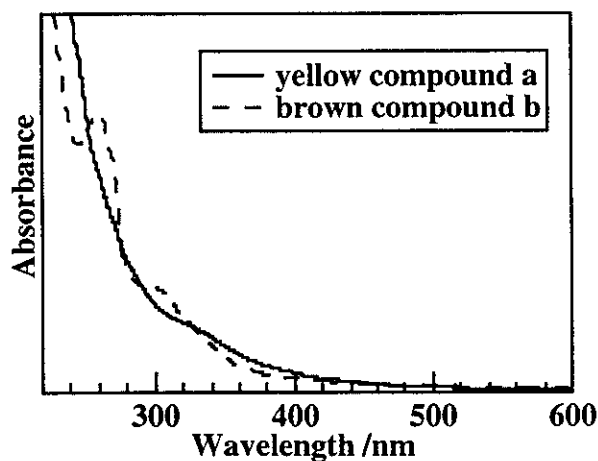


図1 黄色色素(a)と茶褐色色素(b)の紫外可視吸収スペクトル(メタノール溶液)

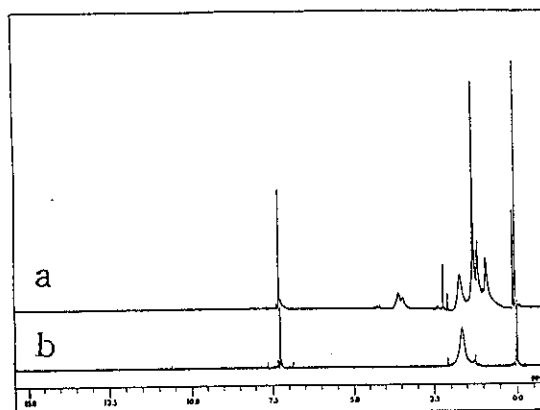


図2 黄色色素(a)と茶褐色色素(b)のNMRスペクトル(重水素クロロホルム溶液)

より、黄色色素(a)では、3.55, 3.39, 1.67, 1.27, 1.12, 0.88, 0.07 ppmにブロードなシグナルが得られ、茶褐色色素(b)では、1.65 ppmにブロードなシグナル1本だけ観測された(図2)。図中の7.25 ppmのシグナルは、 $\text{CHCl}_3$ のプロトンである。また、3.55, 3.39 ppmのシグナルは-OHによるものと考えられる。さらに、赤外スペクトルなどの測定から、黄色色素(a)は、水酸基を有するジエン類であると推定される。一方茶褐色色素(b)は、水酸基ではなくケトンに酸化された化合物であると推測された。いずれの色素の場合も、NMRのシグナルがブロードであることから、ポリマー構造をとっていることが予測された。

### C. 考察

本研究で用いた *Sphingomonas yanoikuyae* および *Agrobacterium sanguineum* は、平石らによって、ダイオキシンを分解する可能性を指摘されている。本研究では、ダイオキシンと比べて毒性の低いジベンゾフランを唯一の炭素源として培養した

場合、生じる水溶性黄色色素の同定を試みた。ジベンゾフランは、ダイオキシシンと同様に、微生物が有するジオキシゲナーゼのよって酸化され、図3に示す機構

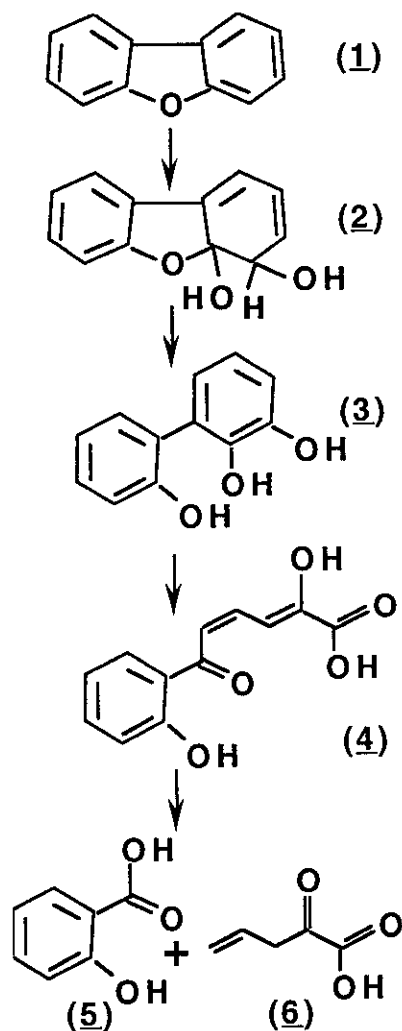


図3 これまで、提唱されてきたジベンゾフランの生分解反応機構

によって生分解され、クエン酸回路に取り込まれることにより、微生物の生育に用いられると考えられている。まずジベンゾフラン(1)がジオキシゲナーゼの働きにより、水酸化反応を受け、4,4a-ジヒドロキシジベンゾフラン(2)を經由し、2,2',3-トリヒドロキシビフェニル(3)が生成する。引き続き、メタ開裂反応により、2-ヒド

ロキシ-6-(2-ヒドロキシフェニル)-6-オキシ-2,4-ヘキサジエノン酸(4)が生じ、さらに、サリチル酸(5)と 2-オキソ-4-ペンテノン酸(6)に分解すると考えられている (図3)。しかしながら、本研究では、複数の有色色素の混合物である水溶性黄色色素が生じた。水溶性黄色色素を分離精製すると、主成分として2種類の色素(a), (b)が得られた。得られた黄色色素(a)および茶褐色色素(b)は、NMRにより、いずれも芳香族ではないことが明らかになった。従って、提唱されているジベンゾフラン分解機構の中間体(2), (3), (4), (5)のいずれとも異なっていることがわかる。また、黄色色素(a)、茶褐色色素(b)のいずれもカルボキシル基を持たないことから、化合物(6)とも異なっている。黄色色素(a)では、水酸基を有していることが示唆された。これらのことから、これまで、提唱されていたジベンゾフラン分解機構とは異なったメカニズムによって、本研究対象の微生物 *Sphingomonas yanoikuyae* および *Agrobacterium sanguineum* はジベンゾフランを分解しているものと思われる。生じた色素類は、菌体外に放出されているものであり、菌体外酵素による分解反応が起こっている可能性も考慮しなければならないかもしれない。もしくは、菌体内に取り込まれたジベンゾフランの分解生成物のうち、生育に不要な物質として、これらの色素が菌体外へ放出された可能性もある。いずれの場合も、ジベンゾフランを分解して生じた色素は、微生物の生育に不要なものである可能性が高い。NMRの結果から、これらの色素は、ジベンゾフランの分解過程において、重合化

して高分子状態になったことが示唆される。実際、得られた黄色色素(a)、茶褐色色素(b)以外にも、分離困難な類似化合物が多数観測されていることから、ジベンゾフランの分解過程における反応の多様性が予測できる。ダイオキシン分解においても、ジベンゾフランと同様な分解機構が考えられているが、本研究結果により、これまで提唱されていた分解機構の見直しが必要であると思われる。今後、微生物によるジベンゾフランおよびジベンゾフラン類似化合物の生分解化合物をより詳細に検討し解明することは、ダイオキシン分解機構に関する知見を得るために重要であろう。

#### D. 引用文献

Wittich R.-M., Wilkes H., Sinnwell V., Francke W., and Fortnagel P. (1992) Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1005-1010.

#### F. 既出論文

なし。

*Sphingomonas* RW1株の表層構造 に関する研究

（分担）研究者 川原一芳 北里研究所 基礎研究所 室長

研究要旨：ダイオキシン分解菌 *Sphingomonas* sp. RW1株のダイオキシン分解能にはダイオキシンおよびその他の疎水物質の菌体内への取込能が重要な因子の1つであると考えられる。さらに取込能には膜中の脂質成分の特性が関与すると考えられる。そこで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、他の *Sphingomonas* 菌株との比較を行った。その結果、RW1株は、*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 *Sphingomonas yanoikuyae* GIFU 9882株と同一であった。

A. 研究目的

本研究の最終目的は、ダイオキシン分解菌の基質取り込みと菌体表層構造との関係を明らかにし、この特性に関する育種を行うことである。

微生物のダイオキシン分解能には、ダイオキシンおよびその他の疎水物質の菌体内への取込能が重要な因子の1つであると考えられる。さらに取込能には膜中の脂質成分の特性が関与すると考えられる。そこで本研究では、ダイオキシン分解菌として知られている *Sphingomonas* sp. RW1株(Wittich et al. 1992)に注目し、この菌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、他の *Sphingomonas* 菌株との比較を行った。

B. 研究方法・結果

*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。

また新たなダイオキシン分解菌の分離を目的として、ダイオキシン汚染河川の泥および周辺の植物からの *Sphingomonas* 菌株の分離を試みた。*Sphingomonas* 菌株はポリミキシンB含有培地上で選択した後、菌体脂肪酸分析によって簡易同定した。

C. 結果およびD. 考察

C-1. スフィンゴ糖脂質の分析

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*Sphingomonas yanoikuyae* GIFU 9882株と同一であった。

2種類のGSLを各々GSL-RW-1、GSL-RW-2と命名し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、化学組成を分析した。その結果、両GSLとも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。

最近RW1株と同様のGSLパターンをもつ*S. yanoikuyae*のGSLについて、従来のグルクロン酸セラミドに加えてガラクトロン酸セラミドが報告されている(Naka et al. 2000)ので、GSL-RW-2がガラクトロン酸セラミドである可能性が示唆された。今後これらのGSLの詳細な構造を明らかにする予定である。

#### C-2. 新規*Sphingomonas*菌株分離の試み

環境試料から*Sphingomonas*菌株の分離を試みた結果、泥15サンプルから5株、植物6サンプルから3株の*Sphingomonas*を分離することができた。これら*Sphingomonas*菌株についてジベンゾフラン培地での生育試験を行ったが、生育はほとんど認められ

なかった。さらに泥10サンプルを直接ジベンゾフラン培地中で8日間振とうした後、培地中に生存する細菌を通常寒天培地上で32コロニー分離し、これらについてジベンゾフラン培地中での生育試験を行ったところ、わずかながら生育を認める2株（菌群）を得ることができた。これらにはいずれも*Sphingomonas*を含む2種類の菌が混在していた。今後さらにジベンゾフラン分解菌のスクリーニングを行うと共に、得られた*Sphingomonas*菌株についてその性状の検討を行う予定である。

#### E. 結論

DD, DF分解菌*Sphingomonas* sp. RW1株には、他の*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が存在する。このパターンと移動度は*S. yanoikuyae*と同一である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻数	ページ	出版年
Hiraishi, A., Kuraishi, H., and Kawahara, K.	Emendation of the description of <i>Blastomonas natatoria</i> (Sly 1985) and Cahill 1997 as an aerobic photosynthetic bacterium and reclassification of <i>Erythromonas ursincola</i> Yurkov et al. 1997 as <i>Blastomonas ursincola</i> comb. nov.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.	50	1113-1118	2000

19990682

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