

## 論文の内容の要旨

論文題目 微生物による難分解性物質トリクロロエチレンの分解に関する研究

氏名 高見和孝

今世紀初頭からの化学工業のめざましい発達とともに、自然界では存在していない化学物質が人為的に大量に生産され、自然環境中へも大量に放出されてきた。最近になり、これらの化学物質による環境汚染が明らかになると同時に、これら環境汚染化学物質のもつ毒性が深刻な社会問題になっている。これら環境汚染物質の中で、塩素系脂肪族化合物のトリクロロエチレン (TCE) (図1) は化学構造上安定かつ不燃性であることから、機械、電子工業、クリーニング分野で溶媒や脱脂剤として使用されているが、土壌や地下水の環境汚染を引き起こしており、その発がん性から深刻な問題になっている。これまでに、TCEはメタン資化性細菌

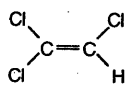


図1 トリクロロエチレン 菌 やトルエン、フェノール等の芳香族化合物資化性細菌が共酸化条件で分解することが知られており、これらの資化性細菌を利用したTCEの分解浄化の検討について多くの研究が行われている。しかし、これらの菌株は高濃度のTCEを分解するのは困難であり、また、共存するTCEによって菌体の生育も阻害される。この様な背景から、TCE分解酵素遺伝子を効率よく発現させる組換え体を用いて、TCE分解

浄化システムを構築することにより、高濃度のTCEを含んだ汚染水や排水の処理が可能になると考えられる。

本研究ではまず、TCE分解酵素遺伝子を取得するために、TCE分解能を有した微生物を、芳香族化合物又は低分子有機化合物資化性細菌の中から、分解基質にTCEを用いた休止菌体反応により探索した。その結果、ジメチルスルフィド (DMS) 資化性細菌 *Acinetobacter* sp. 20B株、クメン (イソプロピルベンゼン) 資化性細菌 *Pseudomonas fluorescens* IP01株、及びジベンゾフラン資化性細菌 *Terrabacter* sp. DBF63株がTCE分解能を有していることが明らかになった。これらの菌株の中では、*P. fluorescens* IP01株と *Terrabacter* sp. DBF63株がほぼ同等のTCE分解性を示し、TCE 1.5 mg/lを20時間で約90%分解した。*Acinetobacter* sp. 20B株は他の2株よりはTCE分解能は低く、同濃度のTCEを20時間で約25%分解した。TCE分解にはこれらの菌株の各資化性物質酸化酵素が関与していることが推測されたため、各資化物質酸化酵素を効率的に発現させることでTCE分解能が向上することが考えられた。この時点で *Acinetobacter* sp. 20B、及び *P. fluorescens* IP01株の各資化物質酸化酵素は既に同定されクローニングが終了していたが、*Terrabacter* sp. DBF63株のジベンゾフラン酸化酵素については同定されておらず、酸化酵素遺伝子も取得されていなかった。そこで、*Acinetobacter* sp. 20B、及び *P. fluorescens* IP01株の各酸化酵素遺伝子で形質転換した大腸菌 *E. coli* JM109株組換え体によるTCE分解の検討を行った。この結果、*Acinetobacter* sp. 20B株のDMSモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*dsoABCDEF*) を導入した組換え体 *E. coli* JM109 (pAU96)及び *P. fluorescens* IP01株のクメンジオキシゲナーゼ遺伝子 (*cumA1A2A3A4*) を導入した組換え体 *E. coli* JM109 (pIP107)は野生株よりも高いTCE分解性を示し、それぞれの組換え体はTCE 15 mg/lを20時間で約90%、及び100%分解した (図2)。これらの結果から組換え体は、野生株と比べ効率よく分解酵素を発現し高いTCE分解性を示すことが明らかになった。各組換え体によるTCE分解では、分解したTCEと化学量論的にほぼ等量の塩素イオンが検出されたが、分解代謝物と考えられる物質は検出されなかった。この結果より、TCEは各酸化酵素により酸化され、ほぼ分解代謝されたと考えられた。

DMSモノオキシゲナーゼ、及びクメンジオキシゲナーゼ遺伝子を組み込んだ組み換え体は、TCE以外の塩素化オレフィン類に対してもそれぞれ異なった酸化活性を示すことが示された。TCE、ジクロロエチレン類、ジクロロプロペン類及び

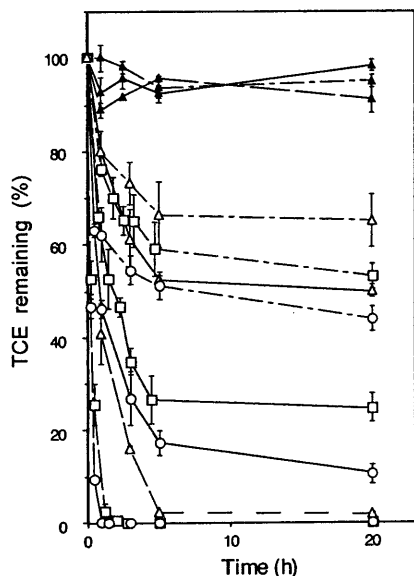


図2 組換え体によるTCE分解: *E. coli* (pAU96);  
 △, *E. coli* (pIP107); □, *E. coli* (pIO720);  
 ○, *E. coli* (pUC119); ▲.  
 TCE 濃度; 15 mg/l (---), 75 mg/l (—),  
 150 mg/l (---).

ジクロロブテン類に対する、DMSモノオキシゲナーゼとクメンジオキシゲナーゼの酸化活性は、TCEと1,3-ジクロロ-1-プロペンはクメンジオキシゲナーゼの方が高い酸化活性を示したが、これ以外の塩素化オレフィンに対してはDMSモノオキシゲナーゼが高い酸化活性を示した。DMSモノオキシゲナーゼによる塩素化オレフィン類の酸化では、酸化生成物としてほとんどの基質の一酸素原子添

加反応によるエポキシ体の生成が確認された。その他の検出された生成

物もエポキシ体が生成した後脱塩素化によって生成したものであることが示された。クメンジオキシゲナーゼの場合は、化合物の $sp^2$ 炭素原子に塩素原子が結合していない塩素化オレフィン、二酸素原子添加反応によりジオール体が生成する事が確認された。また、1,1-ジクロロ-1-プロペン、3,4-ジクロロ-1-ブテンを一酸素原子添加反応によるアルコール体へと変換することから、クメンジオキシゲナーゼは二酸素原子添加反応以外の多彩な酸化反応を示す能力を有していることが明らかになった。

このように、多彩な酸化反応を示すDMSモノオキシゲナーゼとクメンジオキシゲナーゼを同時に発現させた組換え体、*E. coli* JM109 (pIO720)は、TCEに対して、それぞれのオキシゲナーゼ遺伝子組み導入した組換え体よりも高いTCE分解活性を示し、両者の基質特異性を併せ持つことが示された(図2)。ところが、*E. coli* JM109 (pIO720)は、共存するTCEによるTCE分解阻害を受けることが示され、時間とともに組換え体のTCE分解活性が低下することが明らかになった。一方この組換え体は、150 mg/lのTCEが共存しても生育阻害の影響を受けないことも明らかとなった。これらの事から、TCE分解酵素の固定化、組換え体*E. coli* JM109 (pIO720)を用いたバッチ培養による方法では長時間、高濃度のTCEを分解させることが困難であると考えられた。しかし、この組換え体はTCEが共存していても菌体の生育阻害を受けにくいことから、この組換え体の速い増殖を利用し

た連続培養により効率的にTCE分解処理できる可能性が示唆された。そこで組換え体の連続培養によるTCE分解を試みた。

*E. coli* JM109 (pIO720)の連続培養はジャーファーメンテーターを用いて行い、連続培養におけるこの組換え体のTCE分解活性の検討を行った。プラスミドpIO720は、アンピシリン耐性遺伝子を保持していることから、供給培地にアンピシリンを添加して*E. coli* JM109 (pIO720)の連続培養を行った結果、培養中の生育菌体量の変化も少なく、一定の菌体量を保持したが、*E. coli* JM109 (pIO720)のTCE分解活性が急速に失われることが明らかになった(図3)。この原因は、培地にアンピシリンを添加しているにもかかわらず、連続培養中に宿主からプラスミドが消失するためであることが明らかになった。そこで、プラスミドpIO720が保持しているアンピシリン耐性遺伝子を、カナマイシン耐性遺伝子に変換したプラスミドpIO72Kを構築し大腸菌を形質転換したところ、*E. coli* JM109 (pIO72K)は連続培養中に宿主からプラスミドを消失させることなく、TCE分解活性を維持できることが示された。

また、*E. coli* JM109 (pIO72K)のTCE分解活性は、連続培養の希釈率などの培養条件の影響を受けることが示された(図3)。連続培養の希釈率が $0.2 \text{ h}^{-1}$ の時、TCE分解活性が最も高く、また少なくとも300時間は分解活性が保持されることが明らかになった。

以上の結果から、*E. coli* JM109 (pIO72K)は高濃度のTCEによる生育阻害を受けにくく、また連続培養によって長時間TCE分解能を有することから、今後この組換え体を利用したTCE分解浄化システムの実用化の研究が期待される。

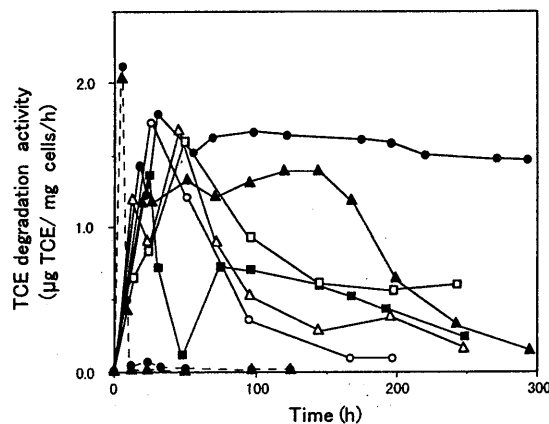


図3 連続培養による組換え体のTCE分解活性変化。  
連続培養希釈率 ( $\text{h}^{-1}$ ): 0.05; ■, 0.1; ▲, 0.2; ●, 0.3; □, 0.4; △, 0.5; ○. *E. coli* JM109 (pIO720); ---, *E. coli* JM109(pIO72K); ———.