

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 19 年度博士課程 入学

氏 名 堀寄 允文
指導教員 山根 久和

論文題目 有機ハロゲン化合物分解菌の単離と解析

有機ハロゲン化合物は、農薬、医薬品、界面活性剤など様々な場面で利用されているが、後に環境残留性や毒性を持つことが報告され、使用制限、使用禁止、排出規制といった措置がとられることもある。現在、有機ハロゲン化合物の中でも特に難分解性が高い化合物で汚染されている環境を低コストで効率よく修復する方法として、微生物を用いた **bioremediation**（特に分解菌を汚染現場に添加する **bioaugmentation**）や分解能を付与した組換え体植物を用いた **phytoremediation** が注目されている。しかし、これらの方法を用いる場合には、まず対象化合物を分解可能な微生物、分解酵素遺伝子を取得する必要がある。

本研究では、環境汚染物質の中でも環境中での残留性・生物蓄積性・生物毒性が高く、長距離移動性が懸念される残留性有機汚染物質 [**Persistent Organic Pollutans (POPs)**]に着目し、**POPs** 条約で製造及び使用の廃絶、排出の削減が規定されているドリリン系農薬、有機フッ素化合物で汚染された土壌、排水の浄化を最終目標とし、それら化合物そのもの、あるいは構造類似化合物の分解菌、分解酵素遺伝子を取得すると共に、その過程で得られる脱ハロゲン化酵素に関する基礎的知見を収集することを目的とした。

1. ドリリン系農薬分解菌の単離と解析（第 2 章）

ドリリン系農薬は、使用禁止から約 40 年が経過しているにも関わらず、今なお環境中より検出されていること、変異原性等の毒性を有することから **POPs** に指定されている化合物である。本章では、ドリリン系化合物を含む疎水性化合物吸収能が高いウリ科植物に微生物由来のドリリン分解酵素を発見させ、ドリリン分解のための **phytoremediation** 法を開発するために、ドリリン系農薬分解微生物の単離と解析を行った。

過去において、好氣的なドリリン系農薬分解菌の単離が多く試みられてきたにも関わらず強い分解

力を有する分解菌は報告されていないことから、通常的环境中にはドリリン系農薬分解菌の存在割合は非常に低いことが考えられたため、ドリリン系農薬 (dieldrin, DIL) で汚染させた土壌、堆肥を作製することで、DIL 分解菌の優占化を図ることとした。終濃度 400 ppm で汚染させた土壌、堆肥を作製し、汚染土壌、堆肥中の残存 DIL 量のモニタリングを行ったが、顕著な減少は見られなかった。しかし、DIL 汚染堆肥を単離源として DIL 分解菌の単離を試みた結果、DIL 懸濁三倍希釈 LB

(1/3LB) 寒天培地上で明瞭なクリアゾーンを形成する *Geobacillus* に属する細菌 (*Geobacillus* sp. DIL-1 株と命名) の取得に成功した。DIL-1 株は、液体培地で旺盛には生育できず、寒天培地上での培養が数日を超えると植え継ぎできないという性質を持っていた。DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地を用いて、DIL-1 株によるクリアゾーン形成部の DIL 残存量を非形成部と比較することで分解能を解析した。その結果、クリアゾーン形成部には非形成部の約 25% の DIL しか含んでおらず、有意に DIL が分解されていることが示された。また、DIL-1 株は endrin (END) で白濁させた懸濁 1/3LB 重層寒天培地上でもクリアゾーンを形成し、約 90% の END を分解していた。しかし、DIL、END ともに基質の分解は確認できるものの、分解産物を検出するには至らなかった。

次に、*Geobacillus* 属細菌が一般的に DIL を分解可能であるか否かを検証した。DIL-1 株近縁種を中心に 10 株の *Geobacillus* 属標準菌株のクリアゾーン形成能を確認したところ *G. jurassicus*、*G. toebii*、*G. thermoglucosidasius* が明確なクリアゾーンを、*G. caldxylyticus* が微弱なクリアゾーンを形成することが示された (図 1)。現在、DIL-1 株から分解酵素遺伝子を取得するため、ドラフトゲノム配列を決定すると共に、DIL-1 株全ゲノムライブラリーで形質転換した枯草菌のクリアゾーン形成能を指標としたショットガンスクリーニングを試みている。また、クリアゾーン形成能欠失変異株を自然変異・変異原処理により標準菌株 (寒天培地上での生育が容易) から取得し、変異点を同定するため、変異株の取得と上記 4 株の全ゲノム配列の決定を行っている。

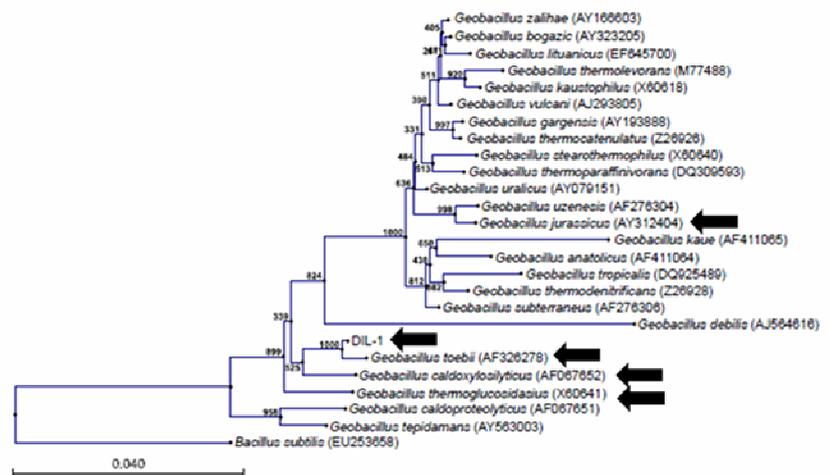


図 1. クリアゾーンを形成する *Geobacillus* 属細菌

クリアゾーン形成株を黒矢印で示した

2. Monochloroacetic acid (MCA)分解菌の単離と解析 (第 3 章)

脱ハロゲン化酵素を機能改変して新たな分解酵素を作出するには、脱ハロゲン化酵素に関する基礎的知見を収集する必要がある。そこで、単純な構造を持ち、容易に取得することが可能と予想された MCA に注目し、MCA 分解酵素を取得して、基質特異性を中心に既報の例と比較した。

300 種の土壌、活性汚泥を単離源とし、MCA を唯一の炭素源とする液体培地を用いて集積培養を行った結果、5 株の *Burkholderia* 属 MCA 資化菌を取得した。得られた 5 株の MCA 資化菌は、MCA を培養開始 25 時間以内に完全に分解すること、MCA の全ての塩素を脱離することが示された。MCA 脱ハロゲン酵素遺伝子内の部分配列を PCR 増幅し塩基配列を決定した結果、5 株とも Hill

ら (*J. Bacteriol.*, **181**, 2535-2547, 1999)の分類による group II 脱ハロゲン化酵素を持つことが明らかになった。分解菌培養液からの中間代謝物の同定には至らなかったが、PCR 増幅された部分配列は glycolic acid を生成する *Pseudomonas* sp. CBS-3 株由来の DehCI とアミノ酸レベルで 74.6%、*Burkholderia cepacia* MBA4 株由来の Hdl IVa と 65.2%と高い相同性を示したことから、中間代謝物は glycolic acid であることが示唆された。また、MCA 資化菌の生育基質特異性の解析から、脱ハロゲン酵素は monofluoroacetic acid を除く全てのモノハロゲン化酢酸を基質とするものの、ジハロゲン化酢酸、トリハロゲン化酢酸を基質としないことが示唆された。しかし、dichloroacetic acid (DCA)を基質とした休止菌体反応の結果、DCA から一つの塩素を脱離可能であることが示された。今後、変異酵素による基質特異性の解析を行うことで、多様なハロゲン化物の分解反応を触媒できる酵素の造成やスクリーニングのための基盤情報が得られると考える。

3. Monofluoroacetic acid (MFA)分解菌の単離と解析 (第4章)

Perfluorooctanoic acid (PFOA)や perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)等のパーフルオロカルボン酸化合物は、フッ素樹脂製造時の助剤や、界面活性剤等に使用されている。しかし、2000年に、世界的なフッ素化学メーカーである 3M 社が、世界各地の野生生物中に PFOS が高濃度に検出されたことを明らかにしたこと、デュポン社の中国工場の労働者の血中から高いレベルの PFOA を検出したことにより、2006年1月末、米国環境保護庁が 2010/2015 PFOA スチュワードシッププログラムを発表し、世界の主要フッ素化学メーカー8社に、PFOA、もしくは分解して PFOA を発生する前駆体物質、及びこれらより炭素数の多い類縁物質の、排出量、製品中含有量の両方について、2010年までに2000年比95%削減、2015年までに全廃すべく取り組んでいくことを定めた。現状では根本的な代替物質はなく、現在のところは炭素数を変えたパーフルオロカルボン酸を使用せざるを得ない。そのような背景から、パーフルオロカルボン酸類を微生物あるいは酵素によって分解するために、当該化合物分解菌の取得が求められている。本研究では、1,316種の土壌、活性汚泥を単離源とし、trifluoroacetic acid、pentafluoropropionic acid、あるいは heptafluorobutylic acid が唯一の炭素源となる液体培地を用いて集積培養を行って分解菌の取得を試みたが、いずれも成功しなかった。そこで、多置換有機フッ素化合物分解菌を環境中から直接単離することは困難であると考え、機能改変した脱フッ素化酵素を用いてそれらの化合物分解を目指すことにした。すなわち、その第一段階として monofluoroacetic acid (MFA)分解菌の単離と脱フッ素化酵素の取得・機能解析を目指し、300種の土壌、活性汚泥を単離源とし、MFA が唯一の炭素源・エネルギー源とした集積培養を行った。その結果、2株の *Burkholderia cenocepacia* 属 MFA 資化菌を取得した (F-1、F-2 株と命名)。得られた2株の MFA 資化菌は、菌体の生育に伴って培養開始48時間以内に MFA を完全に分解して全てのフッ素を脱離させていることが示された。

MFA 分解酵素をコードする遺伝子を取得するため、既知 MFA 分解酵素である FAc-DEX FA1 と FAc-DEX H1 の配列を基に作成した縮重プライマーを用いて縮重 PCR を行ったが、目的遺伝子断片の増幅には至らなかった。次に、トランスポゾン (Tn) 挿入変異による MFA 分解能欠失変異株の取得と Tn 挿入領域周辺の解析により、MFA 分解酵素遺伝子の取得を試みた。その結果、F-2 株から求める Tn 挿入変異株を1株取得したが、Tn は nitrite/sulfite reductase とされる酵素遺伝子内に挿入されており、Tn 挿入領域周辺約 4 kb には脱フッ素化酵素をコードする遺伝子は存在しな

った。そこで、次世代シーケンサーを用いて F1、F2 株ゲノムのドラフトシーケンスを行った結果、両ゲノムに全く同じ推定 MFA 脱フッ素化酵素遺伝子の存在が明らかとなり、それは FAc-DEX H1 と 82.5%のアミノ酸相同性を有していた。また、ゲノム解析の結果より Tn 挿入位置周辺の解析を行ったが、Tn 挿入位置上流約 7 kb、下流 14 kb の合計約 21 kb の領域に MFA 分解反応に直接関与すると考え得る酵素をコードする遺伝子が存在しないことから nitrite/sulfite reductase 遺伝子そのもの、あるいはその下流の遺伝子が MFA 分解に関与していることが示唆された。今後、推定 MFA 脱フッ素化酵素のパーフルオロカルボン酸類等を含む多種の基質に対する基質特異性の解析を行うことで、脱フッ素化酵素の機能評価を進める必要がある。また、F-2 株由来の Tn 変異株が MFA 分解能を失った原因を特定することで、未知の MFA 代謝に重要な因子を特定できる可能性がある。

4. Pentachlorophenol (PCP)分解菌群の単離と解析 (第 5 章)

芳香環からハロゲンを脱離させる酵素は基質特異性が広いことが知られている。そこで本章では、POPs 条約にて POPs に指定されている hexachlorobenzene (HCB)と、構造類似な PCP を対象に、好気条件下でそれらを唯一の炭素源・エネルギー源として生育する細菌を単離し、脱ハロゲン化酵素の基質特異性の解析を行うことで新たな基盤情報を得ることを目的とした。集積培養の結果、HCB 分解菌は取得できなかったが、約 14 日で 100 ppm の PCP を検出限界濃度以下まで分解する PCP 分解菌群を 10 種取得した。得られた 10 種の分解菌群の培養液中における塩化物イオン濃度は、濁度の増加と PCP の減少に伴い増加し、理論上 PCP の全ての塩素を脱塩素化していることが示された。そこで、様々な種類の寒天培地を用いて分解菌群の構成種の単離を行って PCP 分解能の確認を行うと共に、1000 ppm の PCP を加えた PCP 懸濁 R2A 寒天培地上でクリアゾーンを形成する構成種の単離も行った。液体培地にて PCP 分解能を確認できた株は現在までに得られていないが、寒天培地上でのクリアゾーン形成株は 12 種単離できた。16S rRNA 遺伝子の配列から、得られたクリアゾーン形成株のうち 9 株は *Pseudomonas* 属細菌、3 株は *Burkholderia* 属細菌であった。これら 12 株は、全て PCP を炭素源・エネルギー源として加えた無機培地で生育できず PCP を資化できないことが示された。現在、PCP の菌体への吸着の可能性を含めクリアゾーン形成株の PCP 分解能力を評価している。

5. 今後の展望

本研究により、DIL-1 株を含む 5 株の *Geobacillus* 属細菌が、難分解性のドリリン系農薬を分解できることが示された。これらから、ドリリン類分解酵素をコードする遺伝子を取得することができれば、好氣的なドリリン系農薬分解酵素としては初の報告となる。今後は、それらをウリ科植物に導入することで微生物機能-植物機能の長所を生かしたハイブリット型のドリリン系農薬汚染修復植物を作成し、農地土壌で問題となるドリリン系農薬汚染の修復に直接的に貢献したい。

また、本研究での有機ハロゲン化合物に対する脱ハロゲン酵素の取得とそれらの基質特異性の解析から、脱ハロゲン化酵素には既知酵素で報告される以上の多様性があることが明らかになり、さらに多様な基質に対しアタックできる酵素の存在が示唆された。今後、さらに基質特異性決定の分子機構を詳細に解明することで、各種のハロゲン化物による汚染浄化や変換反応への応用に適用可能な酵素の造成のための基盤情報を取得できることが期待される。