

有機ハロゲン化合物分解菌の単離と解析

応用生命工学 専攻
平成 19 年度博士課程 入学

指導教員 山根 久和
氏 名 堀寄 允文

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 ドリン系農薬分解菌の単離と解析	
2.1 緒言	23
2.2 材料と方法	
2.2.1 培地および培養条件	24
2.2.2 単離源としての土壌懸濁液の調製	24
2.2.3 Epoxyxyclohexane (ECH)分解菌群の取得	24
2.2.4 ECH 分解菌群による DIL、endrin (END)分解活性の測定	27
2.2.5 GC-MS による基質残存量の測定	27
2.2.6 DIL 汚染堆肥の作製	29
2.2.7 DIL 汚染土壌の作製	29
2.2.8 汚染堆肥中の残存 DIL 量の測定	29
2.2.9 汚染土壌中の残存 DIL 量の測定	29
2.2.10 DIL 分解菌の単離	29
2.2.11 DIL-1 株の生残性試験	30
2.2.12 菌体からの total DNA の抽出	30
2.2.13 16S rDNA 遺伝子の増幅	31
2.2.14 アガロースゲルからの DNA の回収	31
2.2.15 DNA の取り扱い	31
2.2.16 塩基配列の解析	33
2.2.17 寒天培地中の残存 DIL 量の測定	33
2.2.18 HPLC による DIL 分解産物の解析	33
2.2.19 他 <i>Geobacillus</i> 属細菌のクリアゾーン形成試験と生残性試験	33
2.2.20 大量培養条件の検討	35
2.2.21 DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地の作製	35
2.2.22 DIL 懸濁 LB 重層寒天培地の作製	35
2.2.23 END 懸濁 1/3LB 重層寒天培地の作製	35
2.2.24 ゲノムシーケンス解析	35
2.3 結果と考察	
2.3.1 DIL 分解菌の単離	36
2.3.2 DIL-1 株の取り扱い	41
2.3.3 DIL 分解能の確認	49
2.3.4 DIL 分解産物の同定の試み	52

2.3.5 他 <i>Geobacillus</i> 属細菌の DIL 分解能の確認、取り扱い	52
2.3.6 DIL-1 株大量培養条件の検討	56
2.3.7 DIL-1 株ゲノムの塩基配列決定	59
まとめと今後の方針	60
第 3 章 Monochloroacetic acid (MCA)分解菌の単離と解析	
3.1 緒言	63
3.2 材料と方法	
3.2.1 培地および培養条件	64
3.2.2 Monochloroacetic acid (MCA)分解菌の単離	64
3.2.3 MCA 分解の経時的モニタリング	64
3.2.4 GC-MS による MCA 残存量の測定	64
3.2.5 硝酸銀滴定	66
3.2.6 菌体からの total DNA の抽出	68
3.2.7 16S rDNA 遺伝子の増幅	68
3.2.8 アガロースゲルからの DNA の回収	68
3.2.9 DNA の取り扱い	68
3.2.10 塩基配列の解析	68
3.2.11 MCA 分解菌の生育基質特異性の解析	68
3.2.12 Group I、group II 脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の増幅	68
3.3 結果と考察	
3.3.1 MCA 分解菌の単離と解析	70
3.3.2 MCA 分解の経時的なモニタリング	70
3.3.3 MCA 分解菌の生育基質特異性の解析	74
3.3.4 脱ハロゲン化酵素の解析	78
まとめと今後の方針	78
第 4 章 Monofluoroacetic acid (MFA)分解菌の単離と解析	
4.1 緒言	82
4.2 材料と方法	
4.2.1 培地および培養条件	83
4.2.2 Trifluoroacetic acid (TFA)分解菌群の単離	83
4.2.3 Pentafluoropropionic acid (PFP)分解菌群の単離	83
4.2.4 Heptafluorobutylic acid (HFB)分解菌群の単離	83
4.2.5 Monofluoroacetic acid (MFA)分解菌の単離	83
4.2.6 MFA 分解の経時的なモニタリング	85

4.2.7 GC-MS による MFA 残存量の測定	85
4.2.8 菌体からの total DNA の抽出	87
4.2.9 16S rDNA 遺伝子の増幅	87
4.2.10 アガロースゲルからの DNA の回収	87
4.2.11 DNA の取り扱い	87
4.2.12 塩基配列の解析	87
4.2.13 プラスミドの構築	87
4.2.14 MFA 分解酵素をコードする遺伝子の取得	88
4.2.14-1 縮重 PCR	88
4.2.14-2 ショットガンクローニング	88
4.2.14-3 トランスポゾン挿入変異	88
4.2.15 サザンハイブリダイゼーション	90
4.2.16 推定 MFA 分解酵素の発現条件検討	92
4.2.17 SDS-PAGE	93
4.2.18 ゲノムシーケンス	94
4.3 結果と考察	
4.3.1 Perfluorocarboxylic acid 分解菌の単離	95
4.3.2 MFA 分解菌の単離	95
4.3.3 MFA 分解の経時的なモニタリング	95
4.3.4 MFA 分解酵素をコードする遺伝子の同定	99
4.3.4-1 縮重 PCR による MFA 分解酵素をコードする遺伝子の増幅	99
4.3.4-2. トランスポゾン挿入変異による MFA 分解能を失った菌株の取得	99
4.3.4-3 F-1 株の total DNA を用いたショットガンクローニング	102
4.3.4-4 F-1、F-2 株のゲノムシーケンス	102
4.3.5 推定 MFA 脱ハロゲン化酵素の発現条件検討	113
まとめと今後の方針	113

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

5.1 緒言	117
5.2 材料と方法	
5.2.1 培地および培養条件	118
5.2.2 単離源としての土壌懸濁液の調製	118
5.2.3 PCP 分解菌の集積培養	118
5.2.3-1 5 ml の培地をもちい、1/100 量植菌	118
5.2.3-2 200 ml の培地を用い、1/5 量植菌	118
5.2.3-3 4 ml の培地を用い 1/5 量植菌	120

5.2.4 Hexachlorobenzene (HCB)分解菌の集積培養	120
5.2.5 硝酸銀滴定	120
5.2.6 PCP 分解の経時的モニタリング	120
5.2.7 GC-MS による基質残存量の測定	120
5.2.8 PCP 分解菌群中に存在する PCP 分解菌に対する抗生物質耐性試験	121
5.2.9 PCP 分解菌の単離	121
5.2.10 寒天培地中の残存 PCP 量の測定	124
5.2.11 菌体からの total DNA の抽出	124
5.2.12 16S rDNA 遺伝子の増幅	124
5.2.13 アガロースゲルからの DNA の回収	124
5.2.14 DNA の取り扱い	124
5.2.15 塩基配列の解析	124
5.2.16 PCP 分解酵素をコードする遺伝子の増幅	124
5.2.17 PCP 分解産物の同定	125
5.3 結果と考察	
5.3.1 PCP 分解菌群の単離	127
5.3.2 HCB 分解菌群の単離	127
5.3.3 PCP 分解菌の経時的なモニタリング	127
5.3.4 PCP 分解菌に関与する細菌の分離の試み	130
5.3.5 クリアゾーン形成株の PCP 分解能の確認	142
5.3.5-1 PCR による既知 PCP 分解酵素をコードする遺伝子の増幅	142
5.3.5-2 PCP 分解産物の同定	142
まとめと今後の方針	148
第 6 章 総括と展望	158

参考文献

謝辞

略語表

ALD	Aldrin
Ap	Ampicillin
APS	Ammonium persulfate
Cm	Chloramphenicol
CTAB	Hexadecyltrimethyl ammonium bromide
DBA	Dibromoacetic acid
DCA	Dichloroacetic acid
DIL	Dieldrin
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
END	Endrin
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
Gm	Gentamicin
HCB	Hexachlorobenzene
HPLC	High performance liquid chromatography
HFB	Heptafluorobutylic acid
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Kilobase
Km	Kanamycin
MBA	Monobromoacetic acid
MCA	Monochloroacetic acid
MFA	Monofluoroacetic acid
MIA	Monoiodoacetic acid
NMM7	Nitrogen plus mineral medium 7
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCP	Pentachlorophenol
PCR	Polymerase chain reaction
PFOA	Perfluorooctanoic acid
PFOS	Perfluorooctanesulfonic acid
PFP	Pentafluoropropionic acid
POPs	Persistent organic pollutants
Rif	Rifampicin
R-2MCPA	(<i>R</i>)-2-monochloropropionic acid

rpm	Round per minute
SDS	Sodium dodecylsulfate
Sm	Streptomycin
S-2MCPA	(<i>S</i>)-2-monochloropropionic acid
TAE	Tris-acetate-EDTA (buffer)
TBA	Tribromoacetic acid
Tc	Tetracycline
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic acid
Tp	Trimethoprim
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethane

第1章 序論

有機ハロゲン化合物は、少なくとも1つの水素原子がハロゲン原子に置換された有機化合物の総称であり、農薬、医薬品、界面活性剤、プラスチックなど様々な場面で利用されているが (Fetzner and Lingens, 1994)、使用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残留性有機汚染物質 [**Persistent Organic Pollutans (POPs)**] と呼ばれ、近年、特に注目されている汚染物質群に着目し、下記に述べる **POPs** 汚染の改善を目的とする条約 (通称、**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。

残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約)

環境汚染物質の中でも、特に環境残留性、生物蓄積性、生物毒性が高く、長距離移動性が懸念され、遠方の環境にも影響を及ぼす化合物は、残留性有機汚染物質 [**Persistent Organic Pollutans (POPs)**] と呼ばれている。**POPs** は、環境と開発に関するリオ宣言の第15原則に規定する予防的な取り組み方法に留意しつつ、人の健康及び環境を保護することを目的に、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (**POPs** 条約) にて、国際的に、製造及び使用の廃絶、排出の削減が規定されている。2010年現在、**POPs** 条約指定物質は、付属書 A (製造、使用、輸出入の禁止)、付属書 B (製造、使用、輸出入の制限)、付属書 C (非意図的生成物の排出の削減及び廃絶) の3種に分類されており、2009年に開催された COP4 の段階で計23の化合物が **POPs** として指定されている (Table 1-1) (外務省, 2009)。

ドリリン系農薬 (dieldrin, endrin, aldrin) 分解菌について

Table 1-1. POPs 条約対象物質

化合物	付属書
アルドリン	A
ディルドリン	A
エンドリン	A
クロルデン	A
ヘプタクロル	A
トキサフェン	A
マイレックス	A
テトラブロモジフェニルエーテル	A
ペンタブロモジフェニルエーテル	A
クロルデコン	A
ヘキサブロモビフェニル	A
リンデン (γ -HCH)	A
α - ヘキサクロロシクロヘキサン	A
β - ヘキサクロロシクロヘキサン	A
ヘキサブロモジフェニルエーテル	A
ヘプタブロモジフェニルエーテル	A
パーフルオロオクタンスルホン酸	B
パーフルオロオクタンスルホン酸フルオリド	B
DDT	B
ペンタクロロベンゼン	A、C
ヘキサクロロベンゼン	A、C
ポリ塩化ビフェニル	A、C
ポリ塩化ジベンゾパラダイオキシン	A、C
ポリ塩化ジベンゾフラン	A、C

付属書 A : 製造、使用、輸出入の禁止

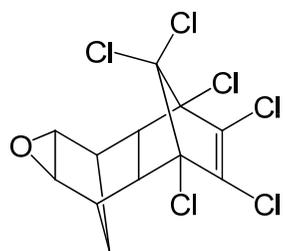
付属書 B : 製造、使用、輸出入の制限

付属書 C : 非意図的生成物の排出の削減及び廃絶

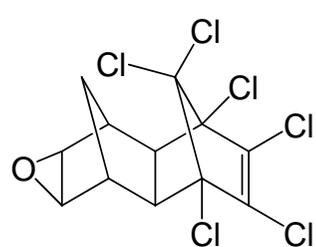
Dieldrin [DIL, Fig. 1-1(a)], endrin [END, Fig. 1-1(b)], aldrin [ALD, Fig. 1-1(c)]などのドリリン系農薬は、有機塩素系の農薬として使用されてきた化合物であるが、変異原性、催奇形性、発がん性等の毒性や、長期残留性の観点から日本では、1975年に農薬登録が失効とされた化合物である（農林水産消費安全技術センター, 2010）。ドリリン系農薬は、国内だけではなく、世界的にも1970年代に使用を制限された。しかし、ドリリン系農薬は、長期残留性・長距離移動性を有するため、使用禁止から約40年が経過した現在でも生物体内や世界各国から検出されている（Table 1-2, Table 1-3）。そのため、現在では、ドリリン系農薬類で汚染された環境を低コストで効率よく修復することがのぞまれている。わが国では、ドリリン系化合物の汚染は主に農地（畑作地）で見られることから、農林水産省が主導してドリリン系農薬汚染地の修復方法の開発が試みられている。このようなプロジェクトの一つとして、ドリリン系化合物を含む疎水性化合物吸収能が高いことが知られているウリ科植物に微生物由来のドリリン系農薬分解酵素を発現させ、ドリリン系農薬汚染環境の修復を図る **phytoremediation** 法を開発しようとする試みがなされており、ドリリン系農薬分解菌やドリリン系農薬分解酵素を単離・解析することが求められている。

これまでに、ドリリン系農薬分解菌や分解酵素の取得が試みられた結果、嫌気性の分解菌に関しては、分解産物や脱塩素化活性に関する報告があり、徐々に知見が集積されてきているが（Table 1-4）、好気性の分解菌に関しては、1960年代後半から1970年代前半にかけて数種取得されて以来（Table 1-5）、分解産物、分解酵素遺伝子に関する続報は無く、現在も研究が継続しているか不明である。そのような背景には、1975年に農薬登録が失効したことや、通常的环境中にはドリリン系農薬分解菌の存在割合が非常に低いため、分解菌を単離することが困難であることが挙げられる。しかし、近年 Table 1-2, Table 1-3 で示したように、40年前に使用禁止とされた農薬が環境中から未だ検出されることから再びドリリン系農薬類での環境汚染が問題視されるようになり、再度ドリリン系農薬分解菌に注目が集まることとなった結果、2008年にドリリン系農薬類の部分環構造化合物である epoxy cyclohexane 分解菌、*Burkholderia sp.* MED-7 株や *Cupriavidas sp.* MED-5 株が（Matsumoto et al., 2008）、2010年に *Phelebia brevispora* 近縁の真菌 YK543 株（Kamei et al., 2010）が DIL や END を分解するという分解菌取得の報告がなされた。しかし、依然分解酵素に関する知見は得られておらず、DIL 分解産物に関しても未知な部分が多く、**bioremediation** や **phytoremediation** に利用できるような分解菌・分解酵素は取得されていないのが現状である。

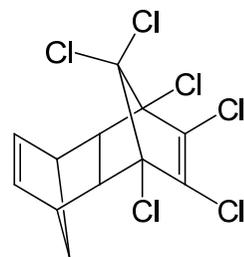
モノクロロ酢酸分解菌について



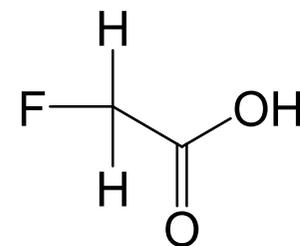
(a) Dieldrin



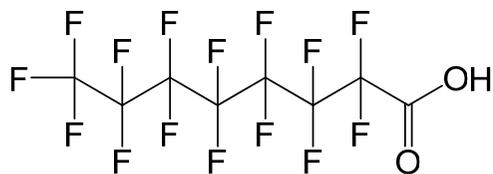
(b) Endrin



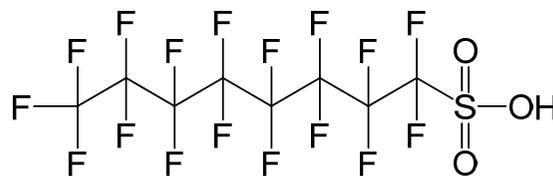
(c) Aldrin



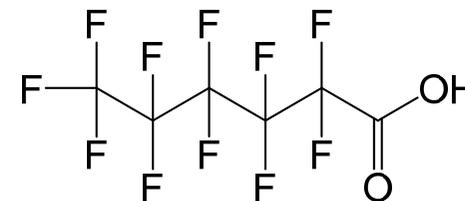
(d) Monofluoroacetic acid



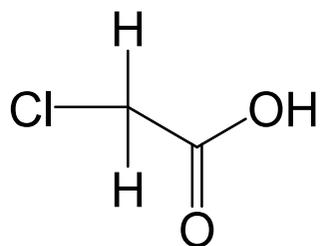
(e) Perfluorooctanoic acid



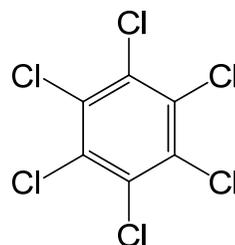
(f) Perfluorooctanesulfonic acid



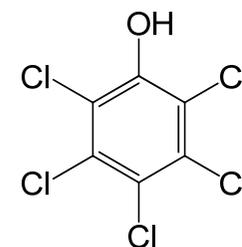
(g) Undecafluorohexanoic acid



(h) Monochloroacetic acid



(i) Hexachlorobenzene



(j) Pentachlorophenol

Fig. 1-1. 本研究で取り扱った化合物の構造式

Table 1-2. DIL, END の環境中からの検出例

場所	サンプル	DIL(ng/g or ng/L)	END (ng/g or ng/L)	参考文献
Switzerland	土壌	43	60	Hilber et al., 2008
BHG, Gambia	土壌	12	0.2	Marirakiza et al., 2003
Taihu, Chaina	土壌	3.01	1.64	Wang et al., 2007a
North Portugal	土壌 (表面)	286		Goncalves et al.,2007
	土壌 (10 cm)	340		
	土壌 (20 cm)	267		
Alabama, USA	土壌	5.19		Harner et al., 1999
Lower Fraser Valley, Canada	土壌	450	70	Wan et al., 2005
Agra, India	土壌	780		Singh et al., 2001
	地下水	230		
Karak, Jordan	土壌	12.6		Jiries et al., 2002
Czech Republic	土壌	1.78	1.05	Shegunova et al., 2007
Black Sea, Turkey	堆積物	4.3	8.2	Ozkoc et al., 2007
South Korea	堆積物	0.08	0.02	Hong et al., 2006
Daliaohe River, China	堆積物	0.05	0.29	Wang et al., 2007
Wuchuan River, China	堆積物	0.06	0.06	Zhang et al., 2002
	河川水	6.98	7.15	
Gomti River, India	堆積物	0.19	0.54	Malik et al., 2009
	河川水	5.72	0.17	
Red river, Vietnam	河川水 (乾季)	4.92	34.8	Hung et al., 2002
	河川水 (雨季)	5.77	26.0	
Tana River, Kenya	河川水		484	Lalah et al., 2003
Varanasi, India	地下水 (田舎)	830		Singh et al., 2006
	地下水 (都市)	200		

Table 1-3. DIL、END の野生生物体内からの検出例

	化合物	濃度	SD or Range	参考文献
<i>Bubulus Ibis</i> (Cattle Egret) blood plasm	DIL	3.0 ng/ml	<1-7.9 ng/ml	Dhananjayan and Muralidharan, 2010
<i>Mycteria leucocephala</i> (Painted Stork) blood plasm	DIL	10.5 ng/ml	6.2-19 ng/ml	
<i>Pseudibis papillosa</i> (Black Ibis) blood plasm	DIL	9.9 ng/ml	5.1-15 ng/ml	
<i>Milvus migrans govinda</i> (Pariah Kite) blood plasm	DIL	9.1 ng/ml	<1-68.5 ng/ml	
<i>Accipiter virgatus</i> (Besra Sparrow-hawk) blood plasm	DIL	4.7 ng/ml	<1.0-9.0 ng/ml	
<i>Pavo cristatus</i> (Indian Peafowl) blood plasm	DIL	15 ng/ml	1.0-53 ng/ml	
<i>Grus antigone</i> (Sarus Crane) blood plasm	DIL	5.7 ng/ml	<1.0-10 ng/ml	
<i>Columba livia</i> (Blue Rock Pigeon) blood plasm	DIL	7.8 ng/ml	<1.0-37.7 ng/ml	
<i>Streptopelia senegalensis</i> (Little Brown Dove) blood plasm	DIL	3.8 ng/ml	1 羽のみ	
<i>Eudynamys scolopacea</i> (Asian Koel) blood plasm	DIL	6.7 ng/ml	<1.0-19 ng/ml	
<i>Tyto alba</i> (Barn Owl) blood plasm	DIL	6.3 ng/ml	1 羽のみ	
<i>Corvus splendens</i> (House Crow) blood plasm	DIL	4.1 ng/ml	2.9-6.3 ng/ml	
Jordanian adipose tissue / males :age0-14	DIL	60 μ g/kg	>0.5-300 μ g/kg	
	END	150 μ g/kg	>0.5-320 μ g/kg	
Jordanian adipose tissue / females :age0-14	DIL	20 μ g/kg	>0.5-100 μ g/kg	
	END	126 μ g/kg	>0.5-440 μ g/kg	
Human milk in Hong Kong	DIL	1.0 ng/g	0-2.0 ng/g	Hedley et al., 2010

Table 1-4. 嫌気微生物による DIL、END 分解例

Anaerobic communities or microorganism	Growth substrate	Target compound	Initial concentration (μ g/ml)	%Removal	Incubation time	Metabolites produced	参考文献
Enriched anaerobic microbial; population	Sodium acetate, sodium formate, yeast extract, pepton	DIL	10	96	7 days	Syn- and anti-monodechlorodieldrin	Maule et al. 1987
		Formate	10	90	4 days		
		Formate	10	99.7	4 days	Monodichlorinated product	
<i>Clostridium</i> spp.	Formate	DIL	10	80	54-95 days		Maule et al. 1987
Butch culture with methanogenic granular sludge		DIL	9	88	90 days	Monodechlorinated products	Baczynski et al. 2004
		END	7	99	28 days	Monodechlorinated products	
		ALD	7	75	110 days	Monodechlorinated products	
Enriched anaerobic microbial population	Yeast extract	DIL	0.5	100	70 days	Aldrin	Chiu et al. 2005
			2.0	100	84 days	Aldrin	
			10	100	140 days	Aldrin	
Butch culture with digesting sludge		DIL	50	26	>75 days (Lag)		Battersby et al. 1989
Unidentified HCB-degrading bacteria		DIL	100	24.4-67.2	14 days		Watanabe et al. 2008
		END	100	1.2-60	14 days		

Table 1-5. 好気微生物による DIL、 END 分解例

Aerobic community or microorganism	Source of isolation	Target compound	参考文献
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Trichoderma varied</i> <i>Bacillus</i> sp.	Soil heavily contaminated with various insecticides from dieldrin factory yards and orchard area	DIL	Matumura et al. 1967
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Trichoderma varied</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> 204 <i>Arthrobacter</i>	Soil heavily contaminated with various insecticides from dieldrin factory yards and orchard area	END, ALD	Patil et al. 1970
<i>Aerobacter aerogenes</i>		DIL	Wedemeyer et al. 1968
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. Unidentified yeast	Soil heavily contaminated with various insecticides from dieldrin factory yards and orchard area	END	Matsumura et al. 1971
<i>Phanerochate chrysosporium</i>		DIL	Kenedy et al. 1990
ECH enrichment culture <i>Burkholderia</i> sp. <i>Cupriavidus</i> sp.	Uncontaminated forest soil	DIL, END	Matumoto et al. 2008

Monochloroacetic acid [MCA, Fig. 1-1. (d)]は、除草剤や医薬品、界面活性剤等に使用されている化合物である。また、水道原水中の有機物質や臭素及び消毒剤（塩素）と反応して生成される消毒副生成物の 1 つでもある（厚生労働省, 2003）。MCA は、発がん性は認められないものの、ヒトに対して腎不全、肺水腫、心不全を引き起こすことが示されているため、国内では水道法により、水道水に 0.02 mg/l 以上の MCA を含んではいけないと規定が設けられている。また、世界的にも WHO が飲料水に対して 0.02 mg/l という基準値を設けている。

MCA 分解菌には、*Pseudomonas* sp. CBS3 株 (Kiages et al., 1983)、*Pseudomonas* sp. YL 株 (Liu et al., 1994)、*Pseudomonas putida* PP3 株 (Weightman et al., 1985)、*Xanthobacter autrohicus* GJ10 株 (Van et al., 1991)、*Burkholderia cepacia* MBA4 (Tsang et al., 1988)株等多数の報告があるが、X線結晶構造解析等詳細な解析のされているハロゲン化カルボン酸類脱ハロゲン化酵素を持つ菌株は、*Pseudomonas* sp. YL 株と *Burkholderia cepacia* MBA4 株のみである。

Pseudomonas sp. YL 株は 1994 年に単離された菌株で、DL-DEX YL と L-DEX YL の 2 つの脱ハロゲン化酵素を持つことが示されており、DL-DEX YL は (*R*)-2-monochloropropionic acid を (*S*)-2-hydroxypropionic acid に、(*S*)-2-monochloropropionic acid を (*R*)-2-hydroxypropionic acid に変換する両反応を触媒する酵素であるが、L-DEX YL は、(*S*)-2-monochloropropionic acid を (*R*)-2-hydroxypropionic acid に変換する反応しか触媒できない酵素であることが示されている (Liu et al., 1994)。L-DEX YL は、H₂¹⁸O の取り込み実験、X線結晶構造解析により、Fig. 1-2 に示すような反応を触媒することが示されている (Liu et al., 1995; Li et al., 1998)。さらに、X線結晶構造解析の結果から、12 残基目のチロシン、42 残基目のグルタミン酸、45 残基目のロイシン、60 残基目のフェニルアラニン、151 残基目のリシン、177 残基目のアスパラギン、179 残基目のトリプトファンが基質ポケットを構成し、41 残基目のアルギニンは基質であるハロゲン原子を引き付け、118 残基目のセリンは基質のカルボキシル基と結合することが示されている (Li et al., 2003)。また、基質特異性の解析より、1 置換ハロゲン化酢酸の中では、MFA のみ分解しないこと、2-bromotetradecanoic acid や 2-bromohexadecanoic acid 等の鎖長の長い化合物に対しても変換活性を有することが示されている (Liu et al., 1994)。

Burkholderia cepacia MBA4 株由来の Hdl4a に関しては、L-DEX YL と同様の反応を触媒すること、基質ポケットを構成するアミノ酸残基や活性に必須なアミノ酸残基は完全に保存されていることが明らかとなっている。しかし、基質を菌体内に取り込むために permease である Hdl4p が必須であることが示されており (Yu et al., 2007)、permease である Hdl4p は、脱ハロゲン化酵素であ

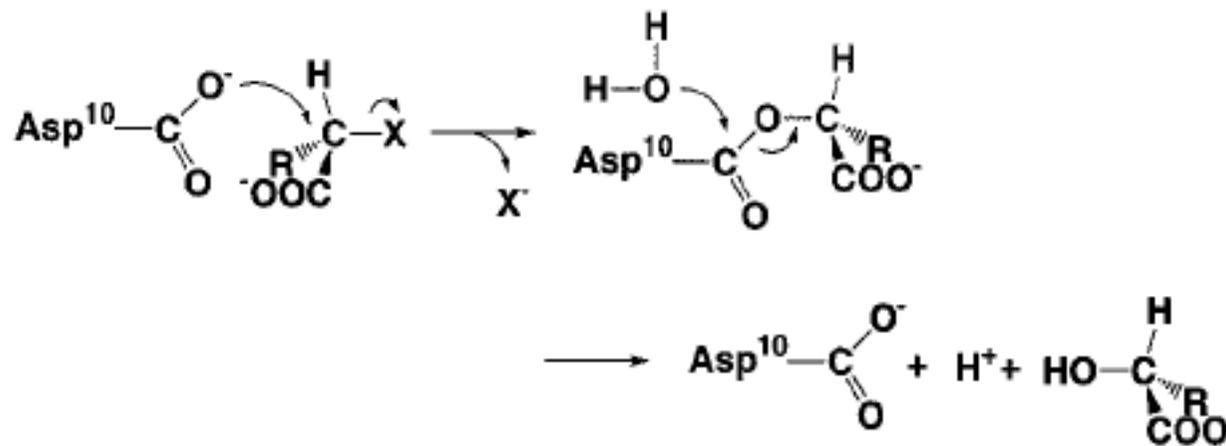


Fig. 1-2. L-DEX YL のハロゲン化カルボン酸類分解機構
(Liu et al., 1995; Li et al., 1998)

る Hdl4a の 353 bp 下流に位置し、*deh4a* とともにオペロンとして転写されることが示されている (Yu et al., 2007)。

また、ハロゲン化カルボン酸類脱ハロゲン化酵素は、Hillらによって group I、group II の 2 つのグループに分類されており (Hill et al, 1999)、group II に属する脱ハロゲン化酵素は、(*S*)-2-monochloropropionic acid を (*R*)-2-hydroxypropionic acid に変換する反応しか触媒できない特徴を持つことが示されている。本項目で述べた DL-DEX YL は group I に、L-DEX YL、Hdl4a は group II に属する脱ハロゲン化酵素となっており、その立体選択性も一致していることが明らかとなっている。

パーフルオロカルボン酸類分解菌について

有機フッ素化合物は、他の物質では実現できない特異な性質 (耐熱、耐薬品性に優れ過酷な条件でも使用可能、光吸収能がない等) を持つため、界面活性剤、乳化剤、撥水剤、消火剤、ワックス、カーペットクリーニング剤、コーティング剤等、様々な用途に用いられている。中でも、全ての水素を置換したパーフルオロカルボン酸、perfluorooctanoic acid [PFOA, Fig. 1-1. (e)] や perfluorooctanesulfonic acid [PFOS, Fig. 1-1. (f)] は、母体炭化水素にない性質を持ち、クロロフルオロカーボン (フロン、エアゾールなど)、フッ素樹脂の製造時に重合乳化剤、フッ素系界面活性剤などに使用されている。しかし、世界的化学・電気素材メーカーである 3M 社が 2000 年に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、また、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、さらなる調査が行われた結果、これらの化合物が我が国を含めて世界規模で環境中に存在していることが明らかとなった。その結果、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、設備から環境中への排出量、製品中含有量の両方について、2010 年までに 2000 年比 95%削減すること。更にこれらの物質を 2015 年までに全廃すべく取り組んでいくことを定めた。また、PFOS に関しては、ストックホルム条約第 4 回締約国会議 (COP4) にて付属書 B に分類された。現状では、PFOA や PFOS の根本的な代替物質は無く、炭素数を変えたパーフルオロカルボン酸 undecafluorohexanoic acid [Fig. 1-1. (g)] を使用せざるを得ないが、今後、PFOA や PFOS と同様に排出規制の対象となることも十分考えられる。そこで、現在、パーフルオロカルボン酸類を工場排水などから微生物、あるいは酵素を用いて低コストで効率よく分解する方法が着目されており、このようなパーフルオロカルボン酸類分解する微生物が求めら

れている。しかし、これまでにパーフルオロカルボン酸類分解菌・分解酵素に関する報告はない。そのため、早急にパーフルオロカルボン酸類分解菌、分解酵素（機能改変した酵素を含め）を単離することが求められている。

モノフルオロ酢酸分解菌について

1943年に南アフリカの植物 *Dichapetalum cymosom* から初めて発見された MFA [MFA, Fig. 1-1. (h)]は (Marais, 1943)、数少ない天然有機フッ素化合物であると同時に、非常に毒性の強い化合物である（日本では特定毒物に指定されている）。MFAの毒性は、MFAが、生体内でフルオロクエン酸に変換された結果、TCA サイクル上のアコニターゼを阻害することが原因であることが明らかとされている (Fig. 1-3)。非常に毒性の強い化合物であるが、現在でもアメリカやイギリスなどでは殺鼠剤として、オーストラリアやニュージーランドでは、ウサギやシカなどの数をコントロールする目的で使用されている。国内においては、MFAは殺鼠剤の有効成分として登録されているが、現在ではその毒性からあまり使用されていない。その毒性の高さが原因なのか、MFAを分解可能な微生物に関する報告は少なく、中でも詳細な解析のされている菌株は、*Delftia acidovorans* B株 (Kawasaki et al., 1981)、*Burkholderia* sp. FA1株 (Kurihara et al., 2003)のみである。

1981年に単離の報告がなされた *Delftia acidovorans* B株由来の MFA 脱フッ素化酵素 FAc-DEX H1 (Kawasaki et al., 1981)は、1998年に報告された H₂¹⁸Oの取り込み実験により、105残基目のアスパラギン酸と MFA がエステル中間体を形成した後、271残基目のヒスチジンにより活性化された水分子により加水分解される2段階の反応で MFA を分解すると推測されていた (Fig. 1-4) (Liu et al., 1998)。より詳細な反応機構を解明するため、FAc-DEX H1の推定活性部位に変異を加えた酵素を用いた活性測定、FAc-DEX H1のX線結晶構造解析が試みられた (Ichiyama et al., 2004)。その結果、105残基目のアスパラギン酸に変異を導入した変異酵素が MFA 分解活性を失ったことにより Fig. 1-4を支持する結果が得られたものの、X線結晶構造解析では、FAc-DEX H1の結晶が得られず反応機構の完全な解明には至っていない。

一方で、2003年に、FAc-DEX H1とアミノ酸レベルで61%の相同性を持つ新規 MFA 分解酵素 FAc-DEX FA1 (*Burkholderia* sp. FA1株由来)が単離され (Kurihara et al., 2003)、FAc-DEX FA1でも FAc-DEX H1と同様に変異酵素を用いた活性測定、X線結晶構造解析が試みられた。その結果、FAc-DEX FA1の立体構造が明らかとなり、Fig. 1-5に示した基質ポケット近傍のアミノ酸残基に変異を導入すると MFA 分解活性を失うことが示された。FAc-DEX H1のように H₂¹⁸Oの取り込み実験は行われていないが、アミノ酸の相同性、また、104

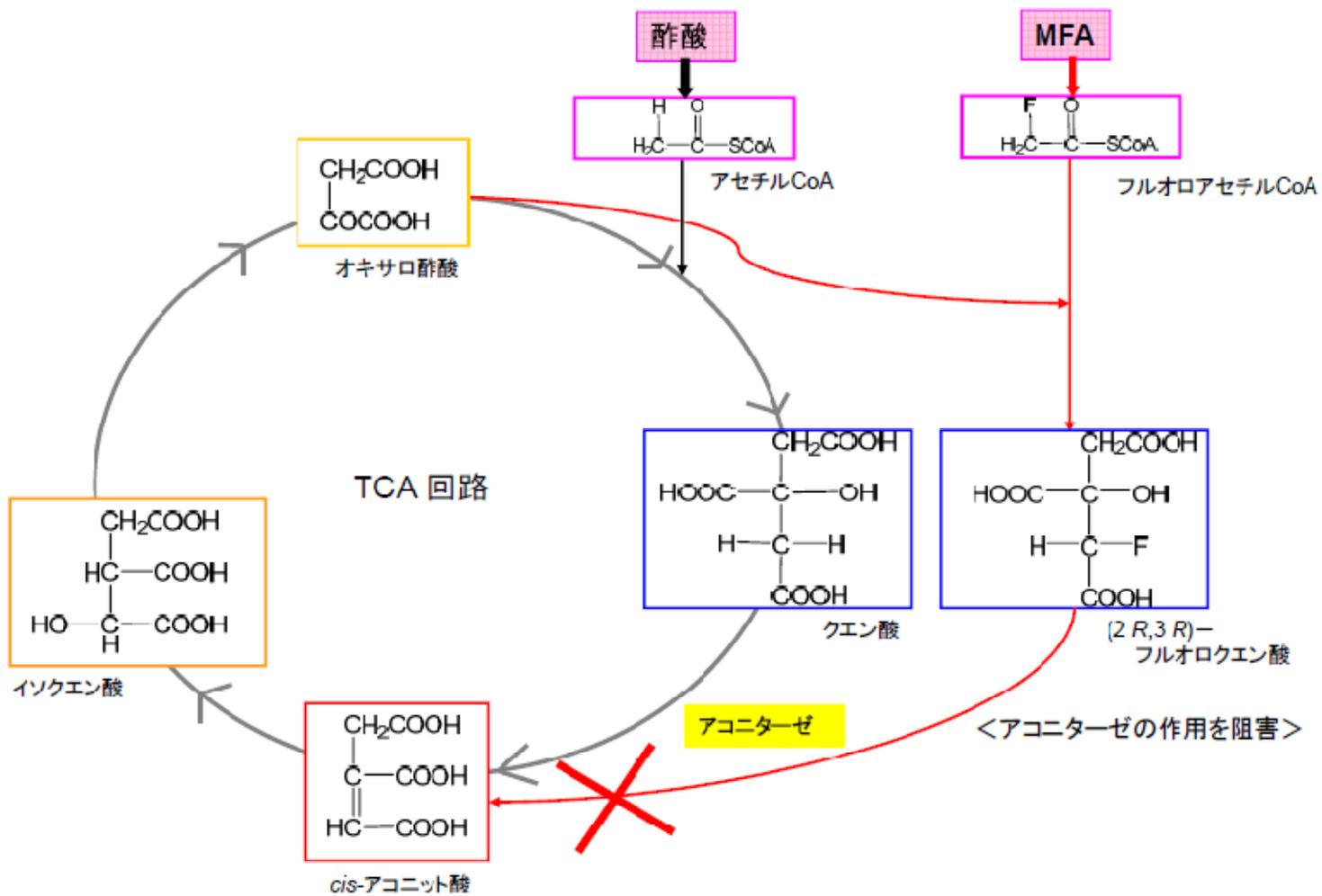


Fig. 1-3. MFAの作用機序

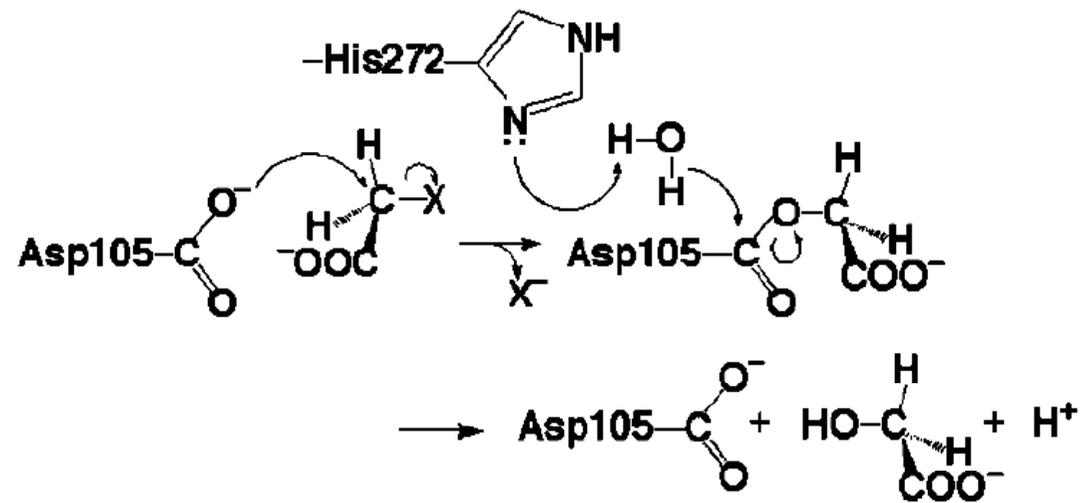


Fig. 1-4. FAc-DEX H1のハロゲン化酢酸類分解機構
(Liu et al., 1998)

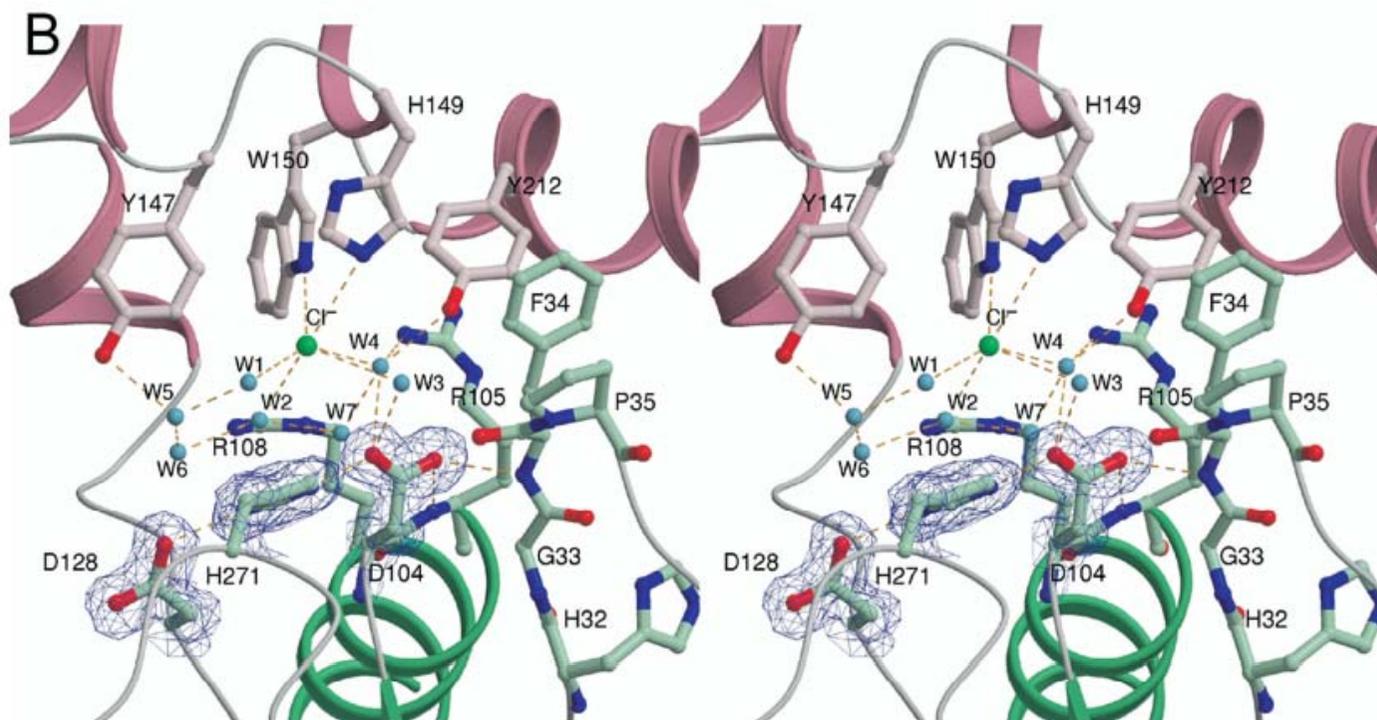


Fig. 1-5. FAc-DEX FA1の基質ポケット周辺の構造
(Jitsumori et al., 2009)

残基目のアスパラギン酸を含む活性に必須であるアミノ酸残基、基質ポケットを構成するアミノ酸残基も保存されていることから、FAc-DEX H1と同様の反応機構であるとされている。また、基質特異性の解析が行われた結果、monochloroacetic acid、monobromoacetic acid に対する分解活性は有するが、MFA の分解活性と比較すると約 20%と非常に低いことが示されている。

現状では、MFA 分解機構に関しては上記 2 例で知見が集積されているが、MFA 分解酵素を機能改変してパーフルオロカルボン酸類分解酵素を作出する手がかかりを得るような解析はなされていない。そのため、新規 MFA 脱フッ素化酵素を取得し基質特異性の解析を中心に行い、MFA 脱フッ素化酵素の基盤情報を収集することが求められている。

ヘキサクロロベンゼン分解菌について

Hexachlorobenzene [HCB, Fig. 1-1. (i)]は、穀物種子や木材の防腐剤・防かび剤、色素合成の中間体として使用されてきたが、難分解性で、蓄積性があり、ヒトでの発がん性も疑われていることから、国内では 1973 年に第一種特定化学物質に指定され、世界的にも、POPs 条約で付属書 A、C に分類されている環境汚染物質である（環境省, 2002）。

2008 年までに HCB 分解菌に関する報告は、*Dehalococoides* sp. CBDB1 株 (Jayachandran et al., 2003) などによる嫌気性分解菌の報告しかなく、なかったが (Gorisch and Adrian, 2003)、2009 年に、初の好気性分解菌として、*Nocardioides* sp. PD653 株が報告された (Takagi et al., 2009)。PD653 株は、分解酵素をコードする遺伝子の同定はされていないものの、中間代謝物として pentachlorophenol、tetrachlorohydroquinone (TeCH)、2,6-dichlorohydroquinone (DiCH) を生成すること、¹⁴C ラベルされた HCB を唯一の炭素源とする培地で培養することで ¹⁴CO₂ を検出したことから Fig. 1-6 に示すような代謝経路が予想されている。

後に詳細に述べるが、これまでに、芳香環からハロゲン原子を引き抜く脱ハロゲン化酵素は基質特異性が広いことが示されている。しかし、芳香環からハロゲンを脱離させる酵素を持つ菌株のなかでも HCB を分解可能である菌株は PD653 株のみである。そのため、より多くの HCB を分解可能な脱ハロゲン化酵素に関する知見を収集するために新規 HCB 分解菌を単離・解析することが求められている。

ペンタクロロフェノール分解菌について

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ため、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約) にて

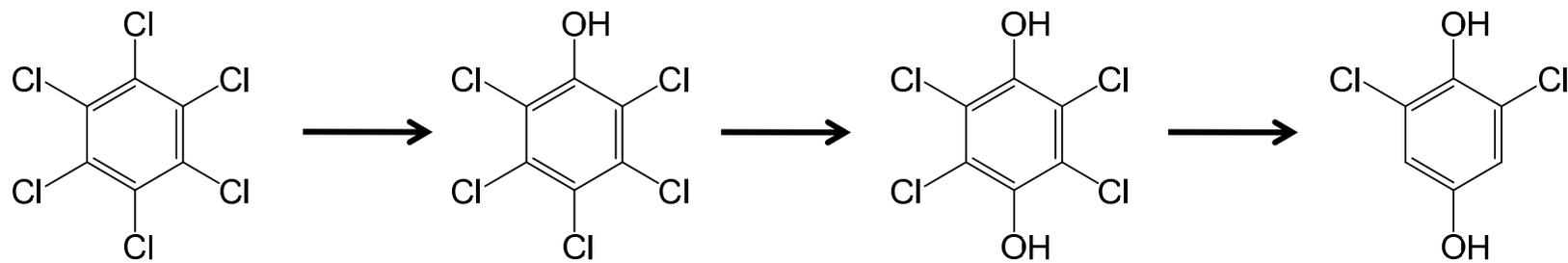


Fig. 1-6. *Nocardioides* sp. PD653株のHCB予想代謝経路
(Takagi et al., 2009)

POPs に指定されている HCB と構造類似な pentachlorophenol [PCP, Fig. 1-1. (j)] 脱塩素化酵素の、基質特異性の解析を行うことは、芳香環脱ハロゲン化酵素に関する新たな基盤情報を得るために重要である。

PCP は、水田用除草剤やイネいもち病等の殺菌剤、防腐剤などに使用されていた化合物で、1955 年に殺菌剤として、また 1957 年に除草剤として農薬登録された化合物である。しかし、1963 年に指定農薬、1971 年に水質汚濁性農薬となり一部使用が禁止され、さらにその後、農薬製剤の副生成物としてヘキサクロジベンゾダイオキシンを含むことが問題となり、1990 年に農薬登録が失効された化合物である（農林水産消費安全技術センター, 2010）。

PCP 分解菌は、*Kocuria* 属細菌 (Karn et al., 2011)、*Arthrobacter* 属細菌 (Schnk et al., 1989)、*Pseudomonas* 属細菌 (Nam et al., 2003)、*Burkholderia* 属細菌 (Karns et al., 1983)、*Sphingobium* 属細菌 (Xun et al., 1992)、*Streptomyces* 属細菌 (Golovleva et al., 1991) など多数の報告がされているが、PCP の減少・遊離塩化物イオン濃度の増加のみを示した報告も多く、分解産物、分解酵素、代謝経路等の詳細な解析がなされている菌株は少ない。

最も研究が先行している、*Sphingobium chlorophenolica* ATCC39723 株は PCP を唯一の炭素源・エネルギー源とする培地で生育可能な菌株で、Fig. 1-7 に示すような代謝経路まで明らかとなっている (Huang et al., 2008; Su et al., 2008)。また、PcpB を用いて行った基質特異性の解析より、Table 1-6 に示したように様々な塩素化芳香族化合物を分解することが示されている。

Pseudomonas veronii PH-05 株や、*Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 株等の他の菌株に関しては、PCP 分解産物に関する報告に止まっている。これまでに、PCP 分解産物としては、tetrachloro-*p*-hydroquinone や、tetrachloro-*o*-hydroquinone が報告されているが、これまでに tetrachloro-*o*-hydroquinone を生成する菌株は、*P. veronii* PH-05 株のみである (Nam et al., 2003) (Table 1-7)。

R. chlorophenolicus PCP-1 株においても、PCP だけではなく 2,3,4,5-tetrachlorophenol、2,3,4,6-tetrachlorophenol、2,3,6-trichlorophenol 等の塩素化芳香族化合物を分解することが示されている。さらに、*Arthrobacter* sp. 33790 株の粗酵素抽出液においても、2,3,4,5-tetrachlorophenol、2,4,6-trichlorophenol 等の塩素化芳香族化合物を分解することが示されている。他にも、2,4,6-trichlorophenol を唯一の炭素源とする培地を用いて単離された *Ralstonia pickettii* DTP0602 株が、休止菌体反応にて 4 置換、5 置換 (PCP) の塩素化芳香族化合物も分解可能であることが示されていることから (Kiyohara et al., 1992)、芳香族脱ハロゲン化酵素は基質特異性が広いことが明らかとされている。

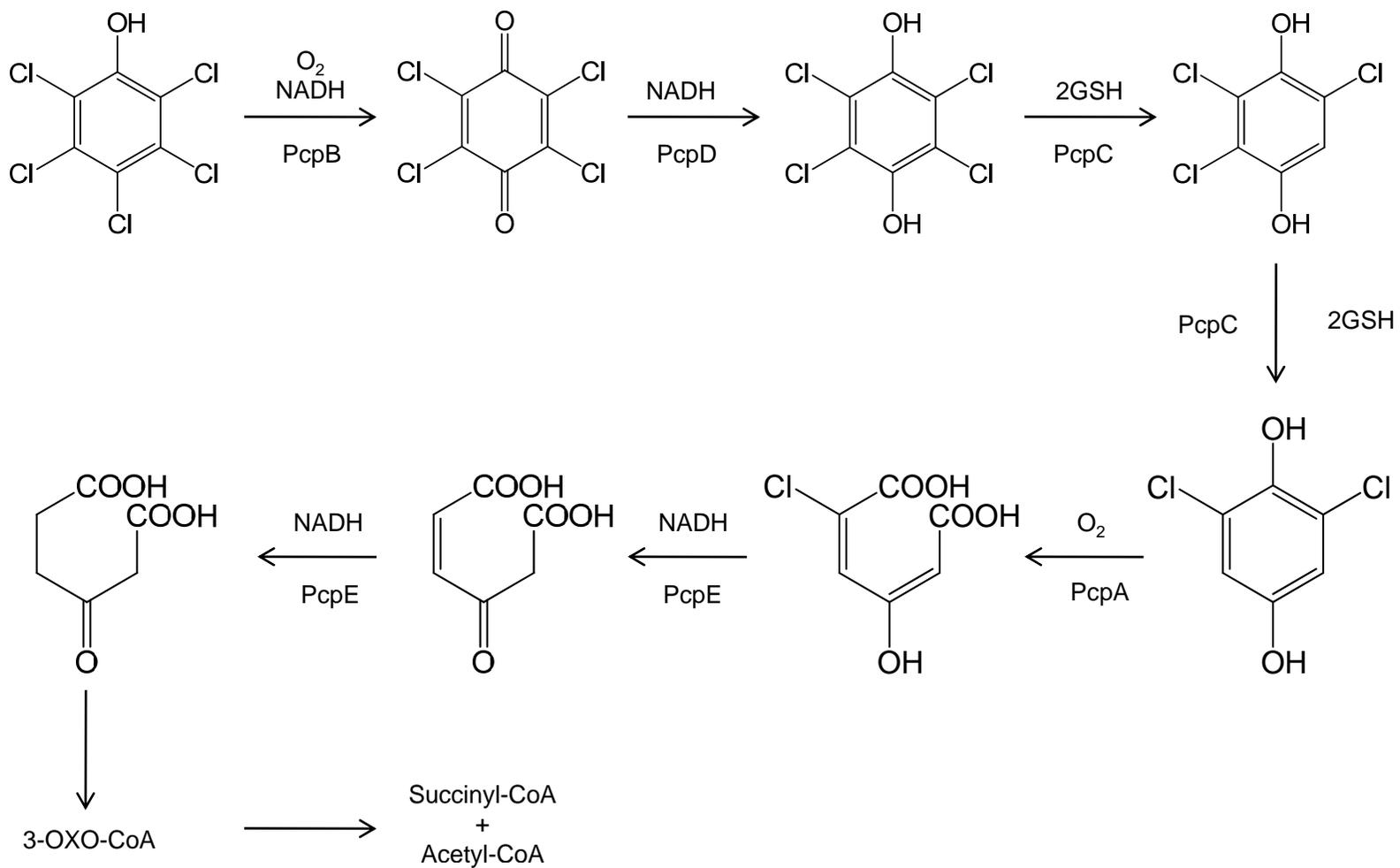


Fig. 1-7. *Shingobium chlorophenolica* ATCC39723株のPCP代謝経路
(Su et al., 2008; Huang et al., 2008)

Table 1-6 *Sphingobium chlorophenolica* ATCC39723 株の PCP 初発分解酵素 PcpB を用いた基質特異性の解析

基質	分解率	反応産物
pentafluorophenol	47	NI
2,3,5,6-tetrachlorophenol	1,212	tetrachlorohydroquinone
2,4,6-tribromophenol	35	2,6-dibromo- <i>p</i> -hydroquinone
2,4,6-trichlorophenol	29	2,6-dichloro- <i>p</i> -hydroquinone
2,3,6-trichlorophenol	302	2,3,6-trichloro- <i>p</i> -hydroquinone
2,3,4-trichlorophenol	29	NI
3,4,5-trichlorophenol	0	None
2,6-dibromophenol	605	2,6-dibromo- <i>p</i> -hydroquinone
2,6-dichlorophenol	344	2,6-dichloro- <i>p</i> -hydroquinone
2,3-dichlorophenol	24	NI
3,5-dichlorophenol	0	None
4-amino-2,6-dichlorophenol	93	2,6-dichloro- <i>p</i> -hydroquinone
2,6-dibromo-4-nitrophenol	62	2,6-dibromo- <i>p</i> -hydroquinone

^a分解率は PCP の分解活性を 100 として相対値を記している

NI, not identified

Table 1-7. PCP 分解産物に関する報告例

菌株名	分解産物	参考文献
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i> PCP-1 株	tetrachloro- <i>p</i> -hydroquinone	Apajalahti and Salkinoja-Salonen, 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 属細菌	tetrachloro- <i>p</i> -hydroquinone	Shah and Thakur, 2003
<i>Sphingobium chlorophenolica</i> ATCC39723 株	tetrachloro- <i>p</i> -hydroquinone	Xun et al., 1992
<i>Arthrobacter</i> sp. 33790 株	tetrachloro- <i>p</i> -hydroquinone	Schnk et al., 1989
<i>Pseudomonas veronii</i> PH-05 株	tetrachloro- <i>o</i> -hydroquinone	Nam et al., 2003

PCP 分解酵素をコードする遺伝子に関しては、近年、ゲノム解析が盛んに行われた結果、PCP-4-monooxygenase をコードする遺伝子と推定されているものや、遺伝子のみ登録されている未発表データは多数存在するが、PCP 分解能等詳細な解析が行われているのものは、*Sphingobium chloropenolicum* ATCC39723 株と *Sphingobium chloropenolicum* UG30 株の *pcpB* (Leung et al., 1999) のみである。

本研究の内容

有機ハロゲン化合物は、その特異な性質から農薬、医薬品、界面活性剤等様々な用途で利用されているが、同時に環境残留性や毒性等のマイナスの面も持つ。今後も、有用な性質を持つ有機ハロゲン化合物を利用していくためには、効率よくそれら化合物を分解することが必要となる。また、現在、これまで利用してきた結果汚染されてしまった環境を修復することも同時に求められている。

そこで、本研究では、環境低負荷な温和な条件かつ低コストで環境浄化に利用できる「酵素」に注目し、ドリン系農薬、パーフルオロカルボン酸類そのもの、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。

第 2 章 ドリン系農薬類分解菌の単離と解析

2.1 緒言

本章では、POPs 条約にて付属書 A (製造、使用、輸出入が禁止) に分類されている環境残留性の高い有機塩素系農薬であるドリン系農薬で汚染された土壌を、ドリン系農薬分解菌を用いた **bioremediation** (特に分解菌を汚染現場に添加する **bioaugmentation**) や、ドリン系農薬分解能を付与した組換え体植物を用いた **phytoremediation** を用いて低コストで効率よく環境修復する手法を開発するため、**dieldrin (DIL)** 分解菌を単離し、DIL 分解産物や DIL 分解酵素をコードする遺伝子の同定を試みた。

2.2 材料と方法

本研究で使用した試薬の調製法は、新細胞工学実験プロトコール（東京大学医科学研究所制癌研究部編，第1版，1993）及びクローニングとシークエンス（杉浦昌弘編，1989）に従って行った。また、制限酵素およびその他の酵素類は宝酒造、東洋紡、ニッポンジーン、ロシュ・ダイアグノスティック社のいずれかのものを使用し、説明書の指示に従って使用した。

2.2.1 培地および培養条件

本章で使用した液体培地を Table 2-1 に、炭素源として用いた化合物を Table 2-2 に示した。培養は、スクリーキャップ式試験管（5 ml）、スクリーキャップ式バッフル付き三角フラスコ（250 ml）、または、丸菱バイオエンジニアリング社製ジャーファーマンター [卓上型培養システム Bioneer-C500 型 5L (S)] を用いて行った。ジャーファーマンターを用いた場合は、pH の調整は行わず、通気量は 0 あるいは 1.0 l/min (standard) の条件で行った。振とうは、スクリーキャップ式試験管を用いる場合は、300 strokes/min、スクリーキャップ式バッフル付き三角フラスコ、ジャーファーマンターを用いる場合は共に 120 strokes/min の条件で行った。

寒天培地は、各液体培地に対して微生物培養用精製寒天末（ナカライテスク社製）を 16 g/l となるように加え、オートクレーブを用いて溶解・滅菌し、必要に応じて Table 2-2 に示した炭素源や、抗生物質を添加した後、シャーレに分注したものをを用いた。

2.2.2 単離源としての土壌懸濁液の調製

環境中の土壌を 15 ml のコーニングチューブに約 3 g 採り、それを CF buffer (Na_2HPO_4 2.2 g/l, KH_2PO_4 0.8 g/l, NH_4NO_3 3.0 g/l) で懸濁することで土壌懸濁液（単離源）とした。

2.2.3 Epoxycyclohexane (ECH) 分解菌群の取得

ECH（終濃度 1000 ppm）が唯一の炭素源・エネルギー源となるように添加された 5 ml の NMM7 液体培地（Table 2-1 参照）に対し、単離源として 50 μl の土壌懸濁液（2.2.2 参照）を加え、25°C で 7 日培養した。土壌由来の褐色が消失するまで 7 日おきに同組成の新規液体培地に 50 μl 植菌することで植え継ぎを行い、土壌由来の褐色が消失した後のサンプルにおいて、培地の白濁（菌体の生育）を指標に分解菌群の取得を行った。

Table 2-1. 本章で使用した液体培地の組成

NMM7		SB	
Na ₂ HPO ₄	2.2 g	Yeast extract	24.0 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g	Bactotryptone	12.0 g
NH ₄ NO ₃	3.0g	Glycerol	5.0 ml
per liter 超純水		per 900 ml イオン交換水	
上記培地をオートクレーブした後に Fe、Mg、Ca 成分としてあらかじめ調製しておいた下記に示したミネラルストックを添加した			
50 mg/ml FeSO ₄	1 ml	K ₂ HPO ₄	12.5 g
100 mg/ml MgSO ₄	1 ml	KH ₂ PO ₄	3.8 g
50 mg/ml Ca(NO ₃) ₂	1 ml	per 100 ml イオン交換水	
		* オートクレーブ後に両溶液を混和	
LB		1/3 LB	
Yeast extract	5.0 g	Yeast extract	1.67 g
Bactotryptone	10.0 g	Bactotryptone	3.34 g
NaCl	10.0 g	NaCl	3.34 g
per liter イオン交換水		per liter イオン交換水	
2 × YT		R2A	
Yeast extract	10.0 g	Yeast extract	0.5 g
Bactotryptone	16.0 g	Peptone	0.5 g
NaCl	5.0 g	Casamino acid	0.5 g
per liter イオン交換水		Dextrose	0.5 g
		Soluble starch	0.5 g
		Sodium pyruvate	0.3 g
		K ₂ HPO ₄	0.3 g
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
		per liter イオン交換水	

Table 2-2. 本章で炭素源として用いた化合物

試薬	ストック濃度	溶媒
ECH (東京化成)	100 mg/ml	DMSO
DIL (東京化成)	10 mg/ml	DMSO
DIL (東京化成)	500 µg/ml	DMSO
END (東京化成)	10 mg/ml	DMSO
END (東京化成)	500 µg/ml	DMSO

2.2.4 ECH 分解菌群による DIL、endrin (END)分解活性の測定

2.2.3 で得られた ECH 分解菌群を ECH (終濃度 1000 ppm)と DIL (終濃度 5 ppm)あるいは END (終濃度 5 ppm)を加えた NMM7 液体培地に植菌することで生育させ、25°C 下で 7 日間培養した後、培養液全量 (5 ml)に対し、内部標準物質として、基質に DIL を用いている場合には、25 µg の END を、基質に END を用いている場合には 25 µg の DIL を加えた。内部標準物質の添加は、500 µg/ml の END あるいは、500 µg/ml の DIL を 50 µl 加えることで行った。その後、3 ml の酢酸エチルによる 2 回抽出 (2.2.5 参照)で有機溶媒抽出画分サンプルを調製し、GC-MS に供した。測定条件を Table 2-3 に、昇温条件は 2.2.5 に示した。

2.2.5 GC-MS による基質残存量の測定

[試薬]

- ・ 酢酸エチル
- ・ 500 µg/ml DIL
- ・ 500 µg/ml END
- ・ 無水硫酸ナトリウム

[操作]

- ① 測定サンプル 5 ml に対して内部標準物質として 500 µg/ml の DIL、あるいは 500 µg/ml の END を 50 µl 添加し vortex mixer を用いて攪拌した。
- ② 酢酸エチルを 3 ml を添加し、1 分間 vortex mixer を用いて攪拌した。
- ③ 3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル層の有機層を新しい 16 φ × 100 mm のガラス製ディスポーザブル試験管に分取した。
- ④ 下層に酢酸エチルを再度 3 ml 添加し、③と同様の条件で遠心分離後、有機層を分取した。
- ⑤ 合計 6 ml の分取した酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC-MS 用サンプルとした。
- ⑥ ⑤で調製したサンプル 1 ml をバイアル瓶に移し、GC-MS に供した。測定条件を Table 2-3 に、昇温条件を下記に示した。

80°C で 2 分間保持

↓

16°C/min で 280°C まで昇温

↓

280°C で 3 分間保持

Table 2-3. GC-MS 測定条件

イオン化電流	200 μ A
イオン化エネルギー	70 eV
検出器電圧	-1300 V
イオン源温度	250 °C
GCITF 温度	250 °C
注入体積	1 μ l
カラム	GL サイエンス社製 Inert Cap 5MS/Sil capillary column

2.2.6 DIL 汚染堆肥の作製

日立社製家庭用バイオ式生ゴミ処理機 BGD-V18 に、ドックフード 200 g、高温バイオ剤（生ゴミ処理機付属の微生物源）100 g、神奈川県大磯町よりサンプルリングした堆肥 200 g、終濃度 400 ppm となるように、酢酸エチルに溶解させた DIL を加えたのち、乾燥させ酢酸エチル成分を揮発させたおがくず 500 g、水 600 ml を投入した。生ゴミ処理機は、24 時間おきに水 200 ml を添加すると同時に、約 70°C まで生ゴミ処理機内の温度を上昇させ（ゴミ処理機による加温）、5 時間攪拌することで運転した。また、栄養源として 1 週間おきにドックフードを 100 g 添加した。

2.2.7 DIL 汚染土壌の作製

ホーロータンクに、土壌を 500 g 量り取り、水 100 ml、終濃度 400 ppm となるように DIL を添加した後良く攪拌し 30°C 下に置いた。7 日置きに乾燥しない程度に水を加え、よく攪拌することで汚染土壌の維持を行った。

2.2.8 汚染堆肥中の残存 DIL 量の測定

1 週間おきに 2.2.6 で作製した汚染堆肥 1 g を 4 ml の CF buffer (Na_2HPO_4 2.2 g/l, KH_2PO_4 0.8 g/l, NH_4NO_3 3.0 g/l) で懸濁し、内部標準物質として 10 mg/ml の END を 50 μl 添加した後、3 ml の酢酸エチルによる 2 回抽出 (2.2.5 参照) で有機溶媒抽出画分サンプルを調製し、GC-MS に供した。測定条件、昇温条件は 2.2.5 と同様の方法で行った。

2.2.9 汚染土壌中の残存 DIL 量の測定

2.2.7 で作製した汚染土壌 1 g を用いて 2.2.8 に準じて GC-MS サンプルを調製し、GC-MS に供した。

2.2.10 DIL 分解菌の単離

2.2.6 で作製した汚染堆肥 1 g を 4 ml の CF buffer に懸濁し、堆肥懸濁液を DIL 懸濁 NMM7、DIL 懸濁 LB、DIL 懸濁三倍希釈 LB (1/3LB)、DIL 懸濁 R2A 寒天培地（終濃度はともに 300 ppm）に塗布し、60°C でインキュベートした。分解菌単離の際は、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地、Ap（終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ ）、Km（終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ ）、Gm（終濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ ）、Tp（終濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ ）、Cm（終濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ ）、あるいは Tc（終濃度 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ）を添加した DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地を用いて 60°C でインキュベートした。

2.2.11 DIL-1 株の生残性試験

寒天培地での生残性は、DIL-1 株懸濁液を DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地に塗布し、60°C の条件下で、インキュベート後、コロニー形成日を 0 日目として、24 時間、72 時間、120 時間経過したコロニーを再度 CF buffer (2.2.2 参照)で懸濁し、DIL 懸濁 1/3LB、あるいは 1/3LB 寒天培地にスプレッドすることで CFU/ml を算出した。

液体培地での生残性は、終濃度 300 ppm となるように LB 液体培地、あるいは 1/3LB 液体培地に DIL を添加した液体培地に DIL-1 株懸濁液を植菌し、60°C の条件下で培養開始 0 時間目、24 時間目、72 時間目、120 時間目の培養液を DIL 懸濁 1/3LB、あるいは 1/3LB 寒天培地にスプレッドすることで CFU/ml を算出した。

2.2.12 菌体からの total DNA の抽出

菌体からの total DNA の抽出は、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1990)の方法を以下に示すように一部改変して行った。

[試薬]

- 10% (wt/vol) Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
- 5 M NaCl
- TE buffer
1 ml の 1 M Tris-HCl (pH 8.0)に 200 μ l の 0.5 M EDTA (pH 8.0)を加え、dH₂O で 100ml にフィルアップした。攪拌した後、オートクレーブで滅菌し (Tris-HCl の終濃度は 10 mM、EDTA の終濃度は 1 mM)常温で保存した。
- フェノール/クロロホルム
TE 飽和フェノールとクロロホルムを等量混合した。これをフェノール/クロロホルムとした。
- 10% (wt/vol) Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 2-プロパノール
- 10 μ g/ μ l Proteinase K 溶液
- クロロホルム
- 70% エタノール
- 10 mg/ml RNase A 溶液 (Nippon Gene)

[操作]

- ① 100 ml の LB、あるいは 2 \times YT 液体培地で培養した DIL 分解菌を 50 ml 容量コーニングチューブに移し、6,000 rpm、4°C の条件下で 5 分間遠心分離することで集菌した。

- ② 上清を除いた後、11.34 ml の TE buffer を加え懸濁した。
- ③ 10% SDS 溶液 600 μ l、Proteinase K 溶液 60 μ l を加え、55°C で 24 時間インキュベートした。
- ④ 5 M NaCl 溶液 2.4 ml、CTAB/NaOH 溶液 4.4 ml を加え、65°C で 15 分間インキュベートした。
- ⑤ クロロホルム 19 ml を加え、室温で 30 分間ローテーションした後、8,000 rpm、24°C の条件下で 10 分間遠心分離した。
- ⑥ 上清 15 ml に対し、等量のフェノール/クロロホルムを加え、24°C で 30 分間ローテーションした後、8,000 rpm、24°C の条件下で 10 分間遠心分離した。
- ⑦ 上清 10.5 ml に対し、等量の 2-プロパノールを加えよく懸濁した後、8,000 rpm、24°C の条件下で 10 分間遠心分離した。
- ⑧ 上清を除去後、70% エタノール 5 ml を加えリンスした。
- ⑨ 8,000 rpm、24°C の条件下で 10 分間遠心分離した後、上清を除き、dry up した。
- ⑩ TE/RNaseA 溶液 1.5 ml (TE buffer 3 ml に 10 mg/ml RNaseA 溶液 1 μ l を加えた溶液)に溶解させ、37°C で 20 時間、インキュベートした。

2.2.13 16S rRNA 遺伝子の増幅

Polymerase chain reaction (PCR)は、Ex Taq (Takara)を DNA polymerase として用い、添付のプロトコールに従って行った。また、サーマルサイクラーとしては、PCR Thermal Cycler Dice TP600 (Takara)を使用した。16S rRNA 遺伝子の増幅は、大腸菌の 8 bp から 27 bp、1,378 bp から 1,389 bp に相当する 27 F、1378 R のプライマーを用いた。用いたプライマーの塩基配列を Table 2-4 に示した。

2.2.14 アガロースゲルからの DNA の回収

アガロース電気泳動用のゲルは、Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer を溶媒として agarose ME (Nacalatesque、Tokyo、Japan)を用いて作製した。電気泳動は Mupid-2 plus を用いて 100 V で行った。マーカーには OneSTEP Maker 5、OneSTEP Maker 6 (Nippon Gene)を用い、アガロースゲルからの DNA 回収には、OMEGA bio-tek 社製 Gel Extraction Kit D2501-02 を用い、操作は添付プロトコールに従った。

2.2.15 DNA の取扱

制限酵素処理、大腸菌からのプラスミドの回収、大腸菌の形質転換等、特に

Table 2-4. 16S rRNA 遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

27F	5'-AGAGTTTGATC (C/A)TGGCTCAG-3'
1378R	5'-ACGG (T/C)TACCTTGTTACGACTT-3'

記述しない基本的な操作は Sambrook and Russell, 2001 に記されている方法に準じて行った。

2.2.16 塩基配列の解析

塩基配列の解析には DNASIS Mac ver.3.7 (Hitachi Software Engineering Co.,Ltd)、Finch TV (Genospiza Inc.)、分子系統解析、アライメントには CLC bio 社 CLC Sequence Viewer を使用した。

2.2.17 寒天培地中の残存 DIL 量の測定

直径 6 mm となるようにクリアゾーン形成部をコロニーごと、あるいは非形成部を打ち抜き、加温することで 5 ml の CF buffer に溶解させた後、ニッポンジーン社製 thermostable β -agarase を 5 μ l 添加し、60 °C 下で 30 分アガラーゼ処理を行った。その後、内部標準物質として 10 mg/ml の END を 30 μ l 加え、2.2.5 と同様の方法で酢酸エチルによる 2 回抽出を行い、GC-MS に供した (測定プログラムは 2.2.5 参照)。

2.2.18 HPLC による DIL 分解産物の解析

2.2.17 に準じて寒天培地を溶解させ、アガラーゼ処理を行った後、Waters 社製 Sep-Pak C18 固相抽出カラムにサンプル中の DIL を吸着させた後、2 ml の超純水で夾雑物を洗い流し、次いで、2 ml のアセトニトリルで溶出させ HPLC のサンプルとした。

分離カラムには逆相モードでは、センシユー科学社製 PEGASIL-B ODS (4.6 mm \times 250 mm) を、逆逆相モードでは資生堂社製 PC HILIC (4.6 mm \times 250 mm) を用いた。両測定モードにおいて、流速は 1 ml/min、カラムオープン温度は 40 °C、注入量は 50 μ l で行った。溶離液には、逆逆相モードは 90%アセトニトリル溶液を用いた。逆相モードでは下記に示した濃度勾配条件で測定した。

時間 (min)	アセトニトリル (%)	水 (%)
0	40	60
10	90	10
50	90	10

2.2.19 他 *Geobacillus* 属細菌のクリアゾーン形成試験と生残性試験

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (JCM)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) より購入した 10 株の *Geobacillus* 属細菌 (Table 2-5) を、DIL 懸濁 LB 寒天培地 (終濃度 300 ppm) に植菌し、*G. thermodenitrificans* は 60 °C で、残りの菌株は全て

Table 2-5. 本章で用いた *Geobacillus* 属細菌

菌株名	購入先
<i>Geobacillus vulcani</i> JCM12214	JCM
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> JCM2501	JCM
<i>Geobacillus kaustophilus</i> JCM20319	JCM
<i>Geobacillus jurassicus</i> DSM15726	DSMZ
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM465	DSMZ
<i>Geobacillus debilis</i> DSM16016	DSMZ
<i>Geobacillus toebii</i> DSM14590	DSMZ
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> DSM2542	DSMZ
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> DSM12041	DSMZ
<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i> DSM15730	DSMZ

55°下でインキュベートを行った。

生残性試験は、寒天培地上でクリアゾーンを形成している8個のシングルコロニーを、白金耳を用いて同組成の寒天培地に植菌し、生育するコロニーの割合を算出することで行った。

2.2.20 大量培養条件の検討

ジャーファーマンターを用いて、培養条件の検討を行った。振とうは、120 strokes/min の条件で行い、培養液の pH 調整は行わなかった。

2 l の LB 液体培地に、60°C 下で DIL-1 株を LB 液体培地で培養した前培養液 500 ml を植菌し、通気量 1.0 l/min (standard) の条件下で 55°C あるいは 60°C で培養し 24 時間後、48 時間後の OD₆₀₀、pH の値を測定した。次いで、2 l の LB 液体培地に、500 ml の DIL-1 株前培養液を植菌し、60°C 下で、通気量が 0 あるいは 1.0 l/min (standard) の条件で 24 時間後、48 時間後の OD₆₀₀、pH の値を測定した。最後に、60°C、通気量 1.0 l/min (standard) の条件下で、2 l の LB 液体培地、2 × YT 液体培地、SB 液体培地に、DIL-1 株前培養液 500 ml を植菌し、24 時間後、48 時間後の OD₆₀₀、pH の値を測定することで培地の条件検討を行った。

2.2.21 DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地の作製

直径 90 mm、高さ 15 mm のアズワン社製滅菌シャーレに、下層に 10 ml の 1/3LB 寒天培地を注ぎ固化させた。次いで、上層に終濃度 300 ppm となるように DIL を添加した 1/3LB 寒天培地を 5 ml を均一な厚さになるように重層し固化させた。

2.2.22 DIL 懸濁 LB 重層寒天培地の作製

LB 寒天培地を用いて 2.2.21 に準じて作製した。

2.2.23 END 懸濁 1/3LB 重層寒天培地の作製

上層が、終濃度 300 ppm となるように END を添加した 1/3LB 寒天培地となるように 2.2.21 に準じて作製した。

2.2.24 ゲノムシーケンス解析

共同研究先である東京農業大学/生物資源ゲノム解析センター（吉川 博文教授、松本 貴嗣研究員）の協力によって、illumina 社製次世代シーケンサー Genome Analyzer II を用いて DIL-1 株の塩基配列を解析した。

2.3 結果と考察

2.3.1 Dieldrin (DIL)分解菌の単離

Burkholderia や *Cupriavidus* に属する epoxy cyclohexane (ECH)分解菌が DIL を分解するという報告例 (Matsumoto et al., 2008)を参考に、ECH 分解菌の単離を試みた。ECH が唯一の炭素源・エネルギー源となる NMM7 液体培地を用いて、135 サンプルの土壌を単離源として集積培養を行った結果、114 種の ECH 分解菌群を得た。そこで、得られた 114 種の ECH 分解菌群を、NMM7 液体培地に ECH (終濃度 1000 ppm)と DIL (終濃度 5 ppm)、あるいは ECH (終濃度 1000 ppm)と END (終濃度 5 ppm)を加えた培地で培養し、培地中の残存 DIL、END 量を GC-MS にてまず 1 連で測定した。その結果、Fig. 2-1 に示した S60、Fig. 2-2 に示した S2、S13、S15、S16、S25 おいて DIL、あるいは END を分解している可能性が考えられたため、これらのサンプルのみ再度 3 連で DIL、END に対する分解活性の測定を行った。しかし、DIL、END に対して明確に強力な分解活性を示す分解菌群サンプルは得られなかった (Fig. 2-3)。強い分解力を示す細菌 (あるいは細菌群) でなければ、さらに分解遺伝子の単離を行って行くにあたり困難が予想されたため、ECH 分解菌群からのドリソ系農薬分解菌の単離は断念した。

これまでに、上の例も含めて、好気的なドリソ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、好気性分解菌の報告例が少ないことは、環境中に存在する分解菌の割合が非常に低いことが原因として考えられた。そこで、ドリソ系農薬で汚染させた土壌、堆肥を作製することでまず、DIL 分解菌の優占化を図ることとした。

DIL 分解菌を優占化させるため、終濃度 400 ppm で汚染させた土壌、堆肥を作製し、土壌、堆肥中の残存 DIL 量を GC-MS にて測定した。汚染堆肥では 120 日間、汚染土壌では 78 日間モニタリングを行ったが、Fig. 2-4 に示すように土壌、堆肥中の残存 DIL 量の定量においては定量性が悪く、かつデータのブレを上回るような顕著な減少は見られなかった。原因としては、均一に汚染化が出来ておらず、測定試料間で誤差が生まれていることが考えられた。しかし、汚染堆肥のモニタリング後期において、堆肥中の成分 (未同定)が増加し、GC-MS 分析において DIL のピークと重なってしまうため、正確に DIL 残存量が測定できていないことも明らかとなった。そこで、モニタリングを中止し、DIL 汚染堆肥を単離源として DIL 分解菌の単離を試みることにした。

作製した DIL 汚染堆肥を CF buffer (2.2.2 参照)に懸濁し、DIL 懸濁 NMM7 寒天培地、DIL 懸濁 LB 寒天培地、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地、DIL 懸濁 R2A 寒天培地 (終濃度はともに 300 ppm)に塗布し、60°C でインキュベートを開始

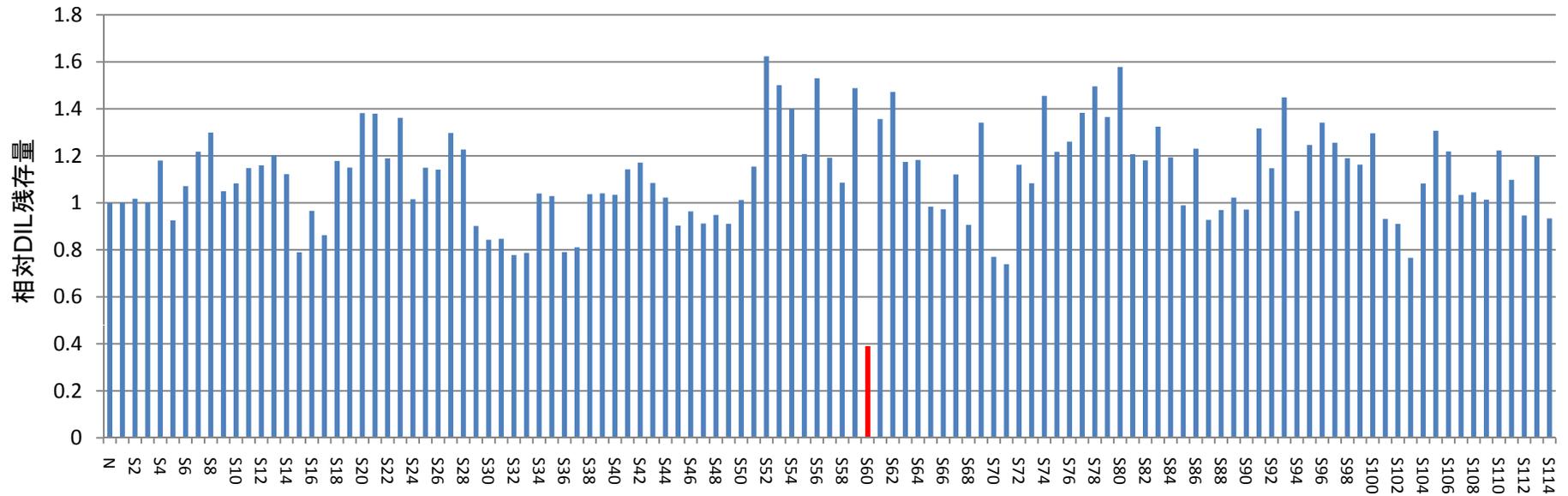


Fig. 2-1. ECH分解菌群によるDILの分解活性

1連での実験結果を示してある。
 Nはネガティブコントロール (菌群無)、
 Sは114サンプルの各菌群を表している。
 相対DIL残存量はネガティブコントロールの値
 を1として算出した。

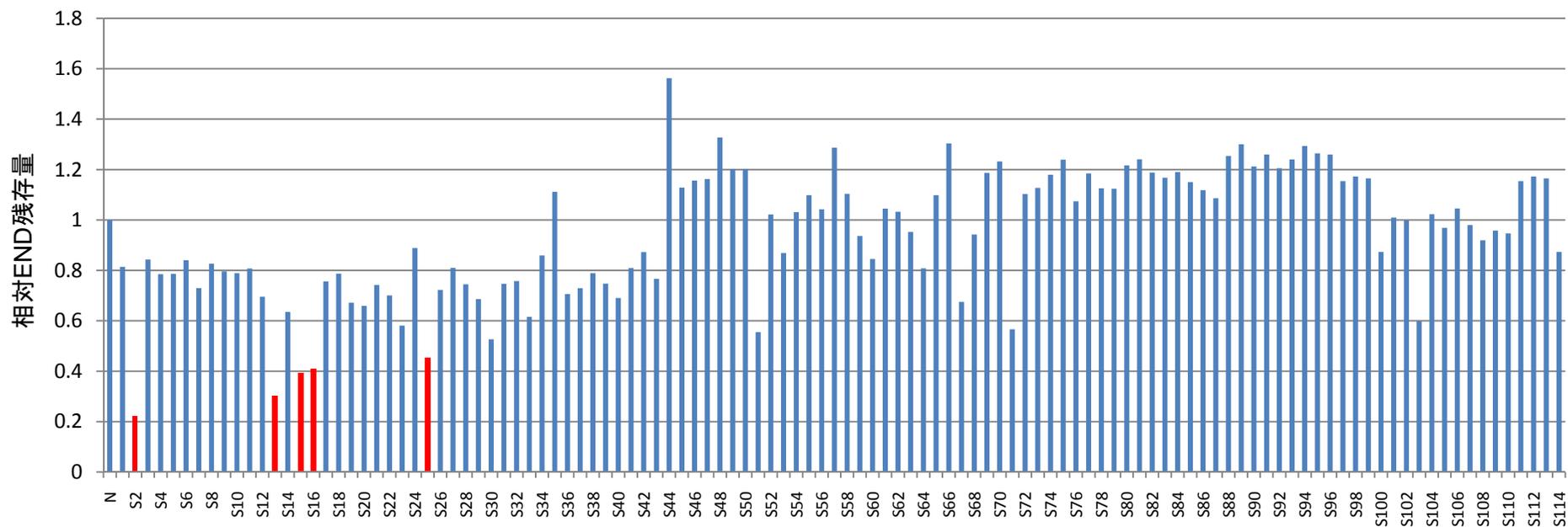


Fig. 2-2. ECH分解菌群によるENDの分解活性

1連での実験結果を示してある。

Nはネガティブコントロール (菌群無)、

Sは114サンプルの各菌群を表している。

相対DIL残存量はネガティブコントロールの値を1として算出した。

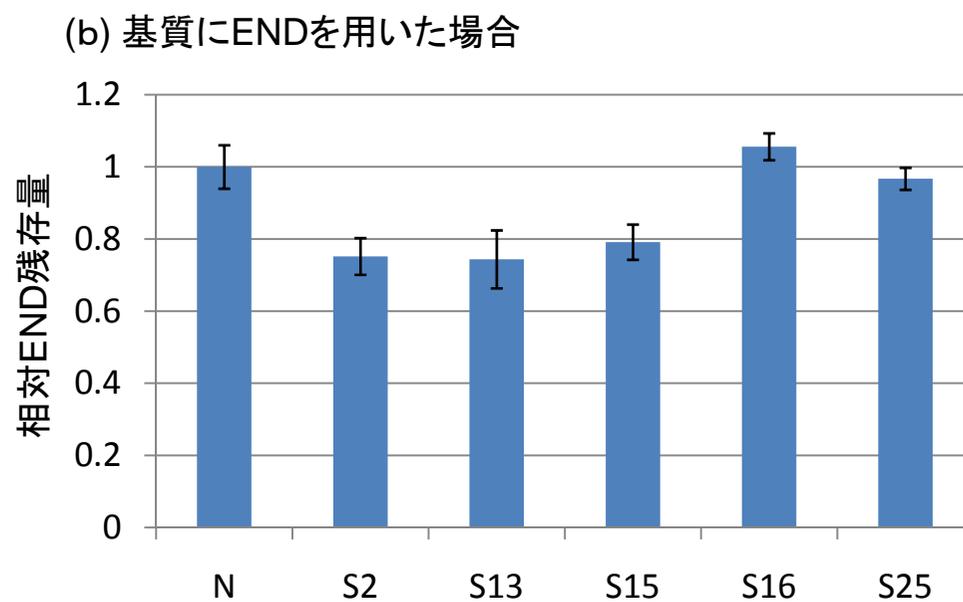
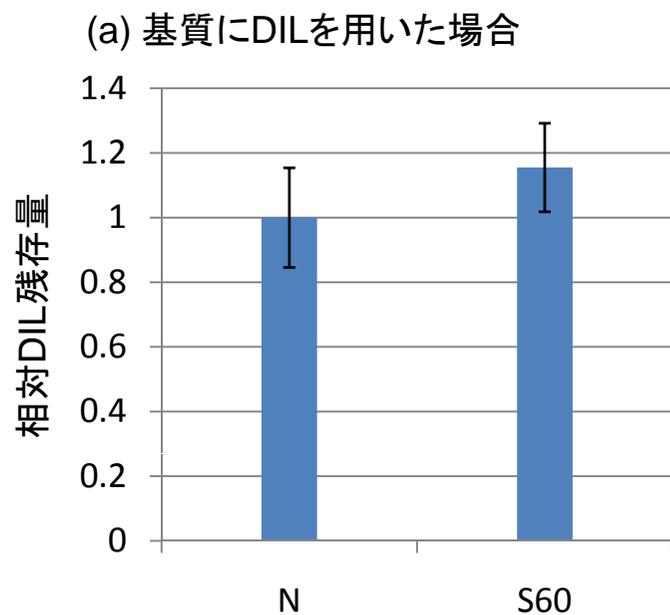


Fig. 2-3. ECH分解菌群によるDIL、END分解活性測定

3連での実験結果を示してある。

エラーバーは3連での標準偏差を表している。

Nはネガティブコントロール (菌群無)、

SはFig. 2-1、Fig. 2-2でDIL、END分解活性があると思われる各菌群を表している。

相対残存量は、ネガティブコントロールにおける定量値の平均を1として算出した。

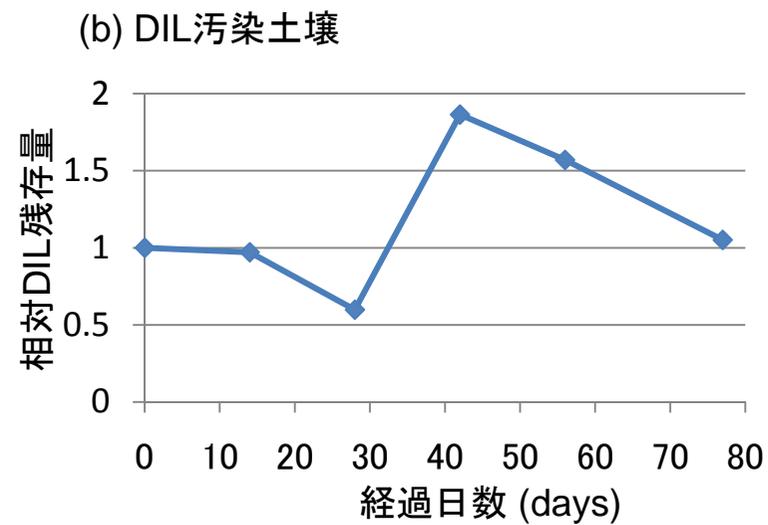
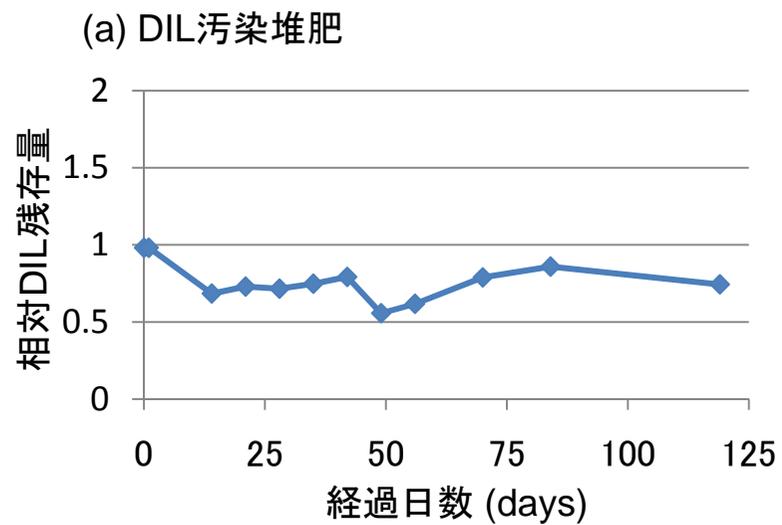


Fig. 2-4. DIL汚染土壌、汚染堆肥中の残存DIL量

相対DIL残存量は、汚染土壌、堆肥
作製時の残存DIL量を1として算出した。

した。インキュベートを開始してから 24 時間後に、DIL 懸濁 NMM7 寒天培地を除く全ての寒天培地上に複数のコロニーが観察された。さらに 10 日間インキュベートを続けたところ、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地上の一部のコロニーがクリアゾーンを形成していることが明らかとなった (Fig. 2-5)。DIL 懸濁 NMM7 寒天培地 (DIL を唯一の炭素源とする寒天培地) ではインキュベートを開始して 10 日経過してもコロニーは確認できなかった。クリアゾーンを形成する菌株を単離するため、クリアゾーンを形成しているコロニーを 3 日おきに同組成の寒天培地に植え継ぐことで、クリアゾーン形成株の取得を試みた。しかし、何度植え継ぎを繰り返し行っても、色の異なるコロニーが混在してしまい、単一の菌体にはすることはできなかった。そこで、抗生物質耐性能を利用してクリアゾーン形成株を単離するため、Ap (終濃度 50 µg/ml)、Km (終濃度 50 µg/ml)、Gm (終濃度 30 µg/ml)、Tp (終濃度 25 µg/ml)、Cm (終濃度 30 µg/ml)、あるいは Tc (終濃度 12.5 µg/ml) を添加した DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地を作製し、各寒天培地にシングルコロニーを植菌することで、クリアゾーン形成能を確認した。その結果、Tp を含む寒天培地を用いた場合のみコロニーが生育し、かつクリアゾーンを形成することが示された。そこで、Tp を添加した DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地を用いて植え継ぎを繰り返し行った結果、クリアゾーンを形成するシングルコロニーを取得した (Fig. 2-6)。クリアゾーンを形成しているコロニーより total DNA を抽出した後、16s rRNA による属種の同定 (Table 2-6)、分子系統解析 (Fig. 2-7) を行った結果、*Geobacillus toebii* と近縁な *Geobacillus* に属する細菌であることが示された。そのため、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地上でクリアゾーンを形成する菌株を *Geobacillus* sp. DIL-1 株 (以後 DIL-1 株) と命名した。

2.3.2 DIL-1 株の取り扱い

2.3.1 で植え継ぎを繰り返し行っている過程で、インキュベートを開始して約 7 日経過したコロニーからは安定して植え継ぎが行えないことが明らかとなった。そこで、DIL-1 株の培養法、取り扱い方を検討することとした。その際、DIL-1 株が死滅しやすい (あるいは、dormant な状態になりやすい) ことが予想されたため、DIL-1 株単離の過程では DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地を用いていたが、クリアゾーンを明確に、かつ早く観察できるよう DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地 (2.2.21 参照) を用いることとした。

DIL-1 株を DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地上 (終濃度 300 ppm) に植菌すると、24 時間でコロニーを形成する。そこで、コロニーを形成した 24 時間目を 0 時間目とし、24 時間、72 時間、120 時間経過したコロニーを CF buffer で懸濁し同組成の寒天培地にスプレッドすることで CFU/ml を算出し、DIL-1 株の寒天培地上での生残性を確認した。なお、本実験は同寒天培地上の 3 個のシングル

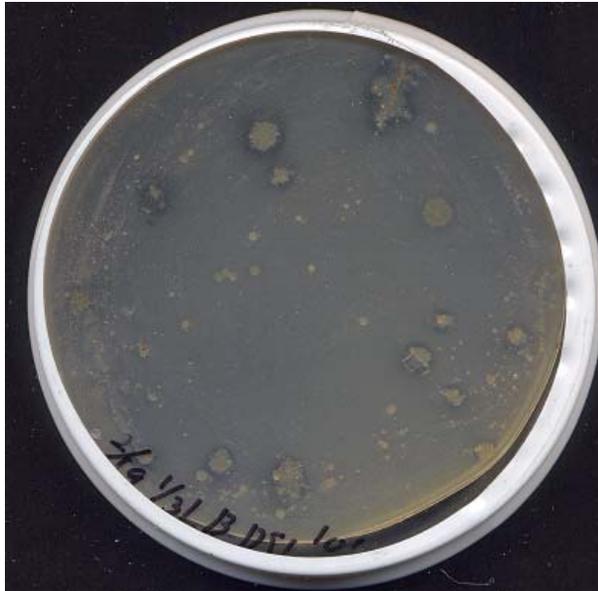


Fig. 2-5. 堆肥懸濁液をDIL懸濁1/3LB寒天培地に塗布して生育したコロニー

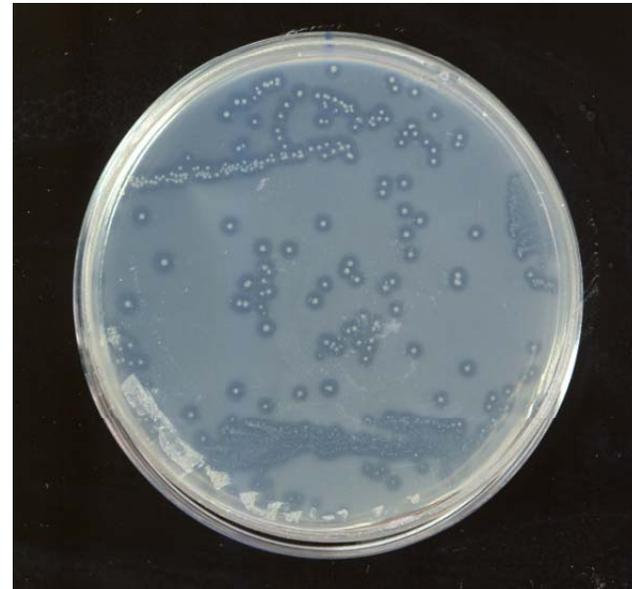


Fig. 2-6. 単離した菌株 (DIL-1株) をDIL懸濁1/3LB寒天培地に塗布して生育したクリアゾーン形成を伴うコロニー

Table 2-6. 16S rDNA による DIL-1 株の属種の同定

相同性	上位 3 株の近縁種 ^a
99.2%	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 (CP001638)
99.2%	<i>Geobacillus</i> sp. 6k51 (DO141699)
99.1%	<i>Geobacillus</i> sp. MJU 148-2 (EU093964)

^a括弧内には accession number を示した。

シーケンスの比較には大腸菌の 27~1378 塩基目に相当する部分を用いた。

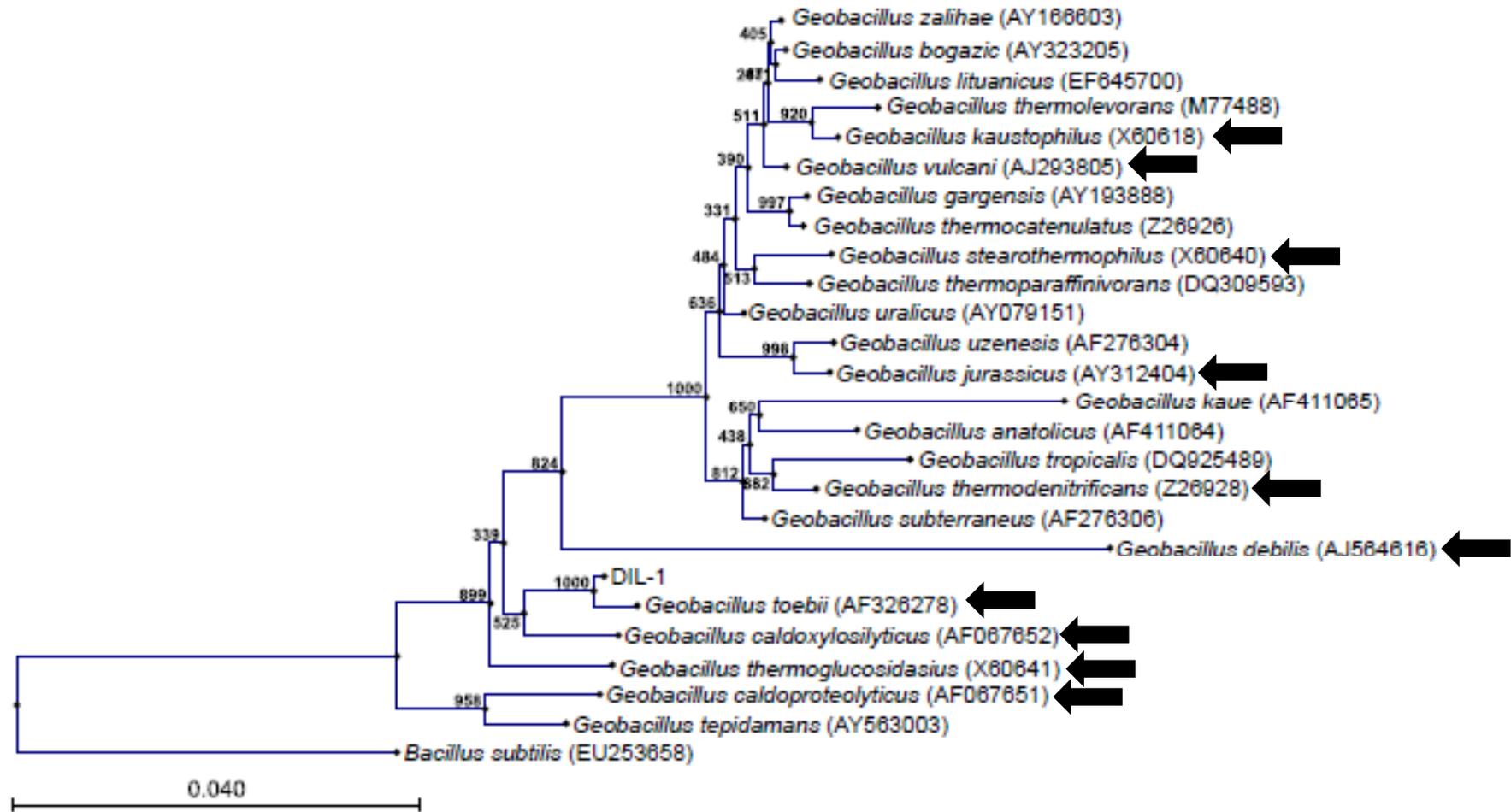


Fig.2-7. *Geobacillus*属細菌との分子系統樹

括弧内にはaccession numberを示した。
 シークエンスの比較には大腸菌の27~1378塩基目に相当する部分を用い、
 アウトグループには*Bacillus subtilis*を用いた。
 また、タイプストレインのみを用いて系統樹の作製を行い、
 分岐部にはブートストラップ値を示した(500以上の結果のみを示した)。
 矢印で示した菌株は、クリアゾーン形成試験を行った菌株である。

コロニーを用いて行った。その結果、Fig. 2-8 に示したように、DIL-1 株はコロニー形成から 72 時間経過（インキュベート開始から計 96 時間）すると安定して植え継ぎが行えなくなることが示された。DIL の毒性が原因であることも考えられたため、1/3LB 寒天培地上でインキュベートを行った寒天培地上の 2 個のシングルコロニーを用いて同様の実験を行ったが 1/3LB 寒天培地を用いても 72 時間経過したコロニーを安定して植え継ぐことができなかった (Fig. 2-9)。また、グリセロールストック（グリセロール終濃度は 40%）を作製し、DIL-1 株の保存を試みたが、 -80°C 下で 7 日間保存したグリセロールストックより DIL-1 株を生育させることができなかった。このため、DIL-1 株は、48 時間ごと（コロニーを形成してから 24 時間後）に植え継ぎを行うことで維持することとした。

DIL-1 株の液体培地での生育を確認するため、DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地上のコロニー（コロニー形成から 24 時間経過したもの）を CF buffer に懸濁し、DIL-1 株懸濁液を、DIL が唯一の炭素源・エネルギー源となるように DIL を加えた NMM7 液体培地（終濃度 5 ppm）、LB 液体培地、1/3LB 液体培地に植菌したところ、培養開始 48 時間後の OD_{600} の値が、NMM7 に DIL を添加した培地では 0.003、1/3LB 培地では 0.07、LB 培地では 0.12 と LB 培地での生育が最も良かった。そのため、以降、DIL-1 株の液体培地での培養には LB 液体培地を用いることとした。

LB 液体培地、終濃度 300 ppm で DIL を添加した LB 液体培地に DIL-1 株を植菌し、培養開始より 24 時間、72 時間、120 時間経過したそれぞれの培養液を 1/3LB 寒天培地、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地に植菌することで CFU/ml を算出したところ、DIL を含む LB 液体培地では DIL-1 株は生育していないこと、LB 液体培地では生育はしているものの、24 時間後の OD_{600} の値が 0.2 と旺盛な生育はしない、かつ寒天培地と同様に 72 時間経過すると安定して DIL-1 株の植え継ぎが行えないことが示された (Fig. 2-10)。

DIL-1 株は、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地上でインキュベートを開始して 96 時間経過すると安定に植え継ぎが行えなくなるものの、クリアゾーンの形成は、インキュベート開始から 10 日付近で観察され、徐々に明瞭になっていく。この結果から、DIL 分解酵素は菌体外に存在することが示唆された。また、植え継ぎが安定して行えない理由としては、死滅している、あるいは、*dormant* な状態になっている、また、他の *Geobacillus* 属細菌の様に孢子を形成して休眠状態に入っている (Banat et al., 2004; Sung et al., 2002) という可能性が考えられた。今後 DIL 分解酵素が、DIL-1 株が菌体外に分泌している酵素なのか、溶菌に伴って菌体外に放出されている酵素なのかを粗酵素抽出液を用いたクリアゾーン形成試験を行うなどの解析を行うと共に、孢子染色を行うことによって DIL-1 株の孢子形成能を確認し、DIL-1 株が安定して維持できていない原因を

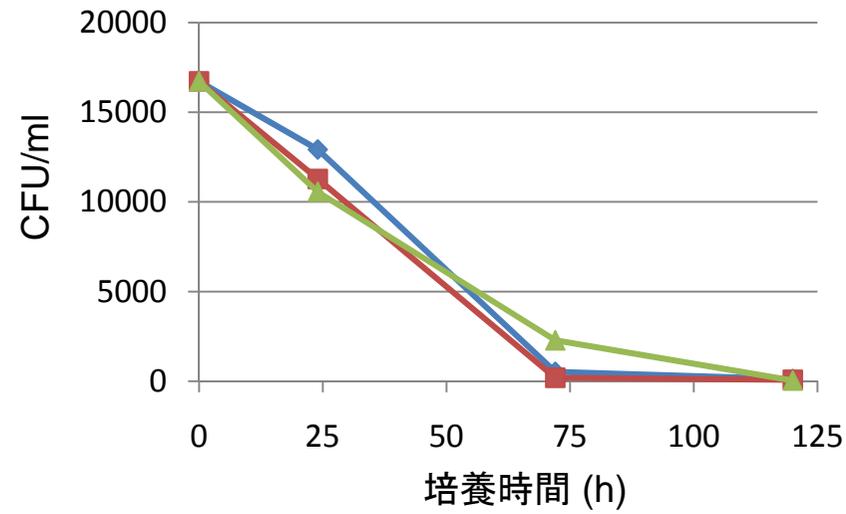


Fig. 2-8. DIL-1株のDIL懸濁1/3LB寒天培地上での生残性
3連で行ったそれぞれの実験結果を示している。

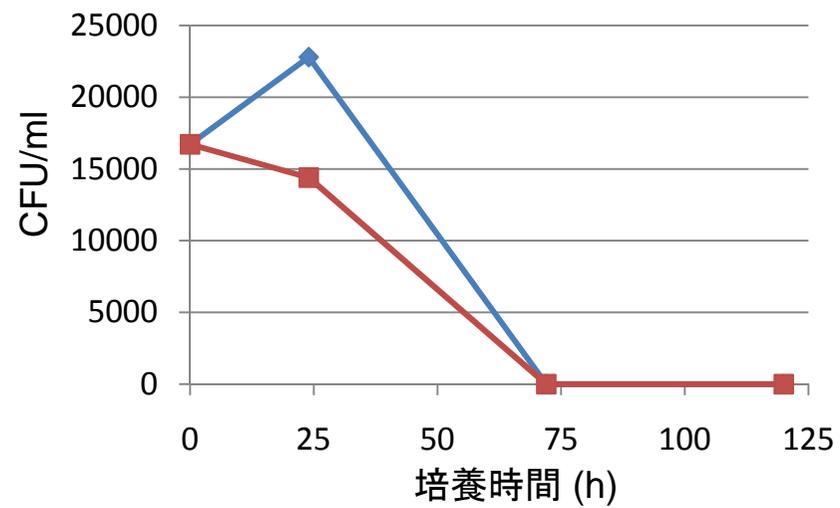


Fig. 2-9. DIL-1株の1/3LB寒天培地上での生残性
2連で行ったそれぞれの実験結果を示している。

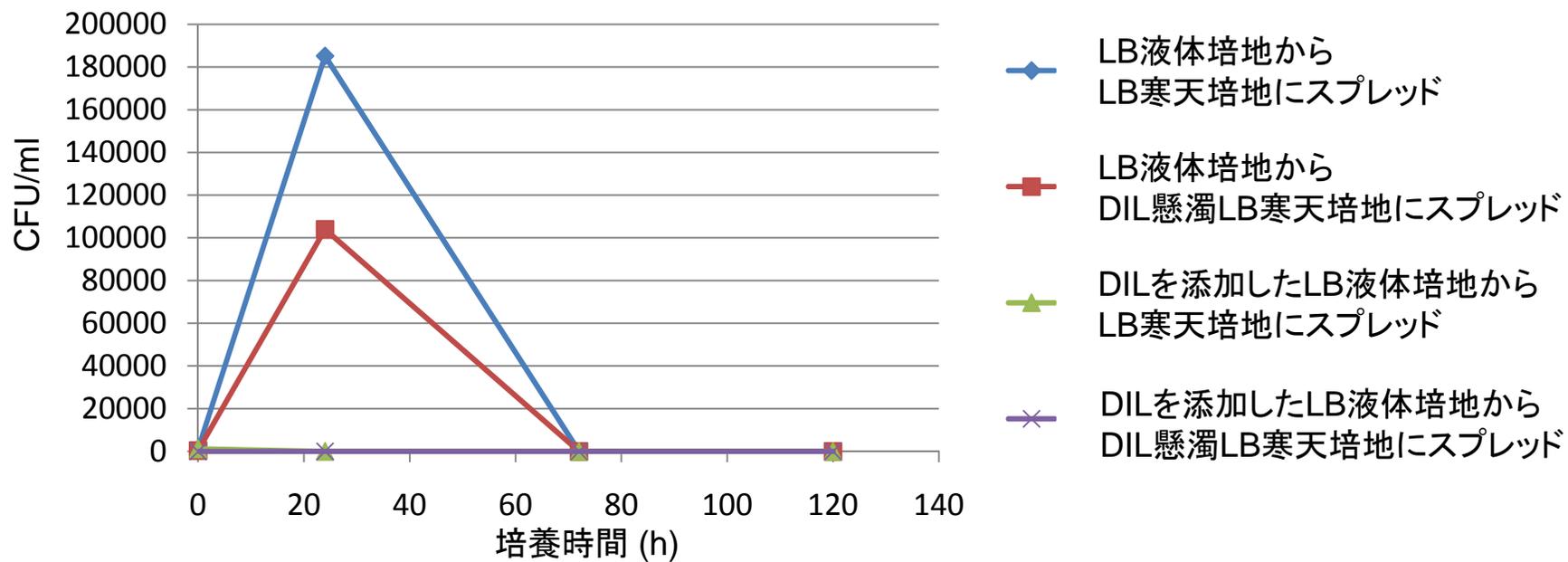


Fig. 2-10. 液体培地でのDIL-1株の生残性試験

解明する必要がある。

2.3.3 DIL 分解能の確認

DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地上で DIL-1 株が形成するクリアゾーンが DIL 分解に由来するものか、菌体への吸着に由来するものかを確認するため、DIL-1 株の DIL 分解能の確認を行うこととした。

DIL-1 株を、DIL が唯一の炭素源・エネルギー源となるように終濃度 5 ppm、あるいは 300 ppm となるように添加した NMM7 液体培地に植菌したが、菌体の顕著な生育も認められず、GC-MS にて DIL 分解活性を測定したが、DIL 分解活性も検出できなかった。微量元素成分として、50 mg/l となるように乾燥酵母エキスを添加した培地でも同様の結果が得られた。DIL-1 株は、2.3.2 で示したように、LB 液体培地を用いても最大の OD₆₀₀ が約 0.1 と液体培地で生育しにくい菌株である可能性が考えられたため、同組成の寒天培地に DIL-1 株懸濁液を塗布したが、2.3.1 で示した汚染堆肥懸濁液を塗布した結果同様に、NMM7 に DIL を添加した寒天培地での菌体の生育は観察できなかった。これより、DIL-1 株は、DIL を生育基質として利用できないこと（DIL-1 株は DIL 資化菌ではないこと）が示された。

2.3.2 より、DIL-1 株は、DIL を含む 1/3LB 液体培地でも生育しないことが示されているため、DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地のクリアゾーン形成部を直径 6 mm となるようにコロニーごと打ち抜き、クリアゾーン非形成部との DIL 残存量を GC-MS にて比較することで DIL 分解活性の測定を行った。インキュベーション開始より 20 日経過した DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地上の、クリアゾーン形成部、非形成部における残存 DIL 量をそれぞれ 20 ヶ所分析したところ、寒天培地を均一に作製することが困難なため、クリアゾーン非形成部において測定誤差が生じてしまっているが、クリアゾーン形成部は非形成部と比較して約 25%と有意に DIL が減少していることが示された (Fig. 2-11)。コロニーごと抽出を行っているため、菌体への吸着の可能性が否定されたので、DIL-1 株は DIL 分解菌であることが示された。また、DIL-1 株は END で白濁させた END 懸濁 1/3LB 重層寒天培地（終濃度 300 ppm）上でもクリアゾーンを形成し、GC-MS 分析で約 90%の END を分解することが明らかとなった (Fig. 2-12)。しかし、GC-MS 分析では、DIL、END とともに基質の分解（減少）は確認できるものの、DIL 分解産物を検出することはできなかった。原因として、DIL、END 分解産物の水溶性が高く、酢酸エチルで抽出を行う GC-MS 分析では検出できない可能性が考えられたため、HPLC を用いて分解産物の同定を行うこととした。

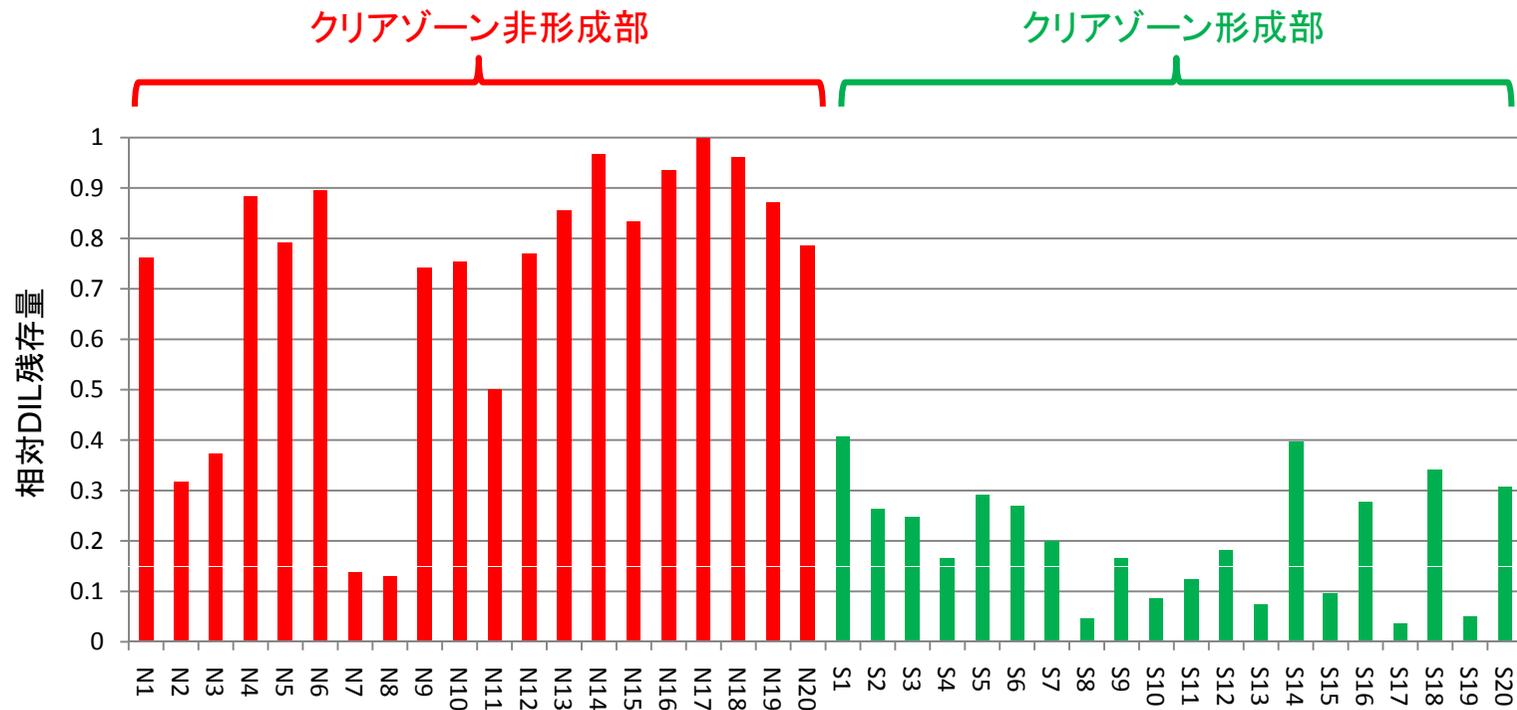


Fig. 2-11. クリアゾーン形成部のDILの減少

N1～20は直径6 mmとなるようにクリアゾーン非形成部を打ち抜いた20カ所の相対DIL残存量を、S1～20は直径6 mmとなるようにクリアゾーン形成部を打ち抜いた20カ所の相対DIL残存量を表している。相対DIL残存量はN17のDIL残存量を1として算出した。

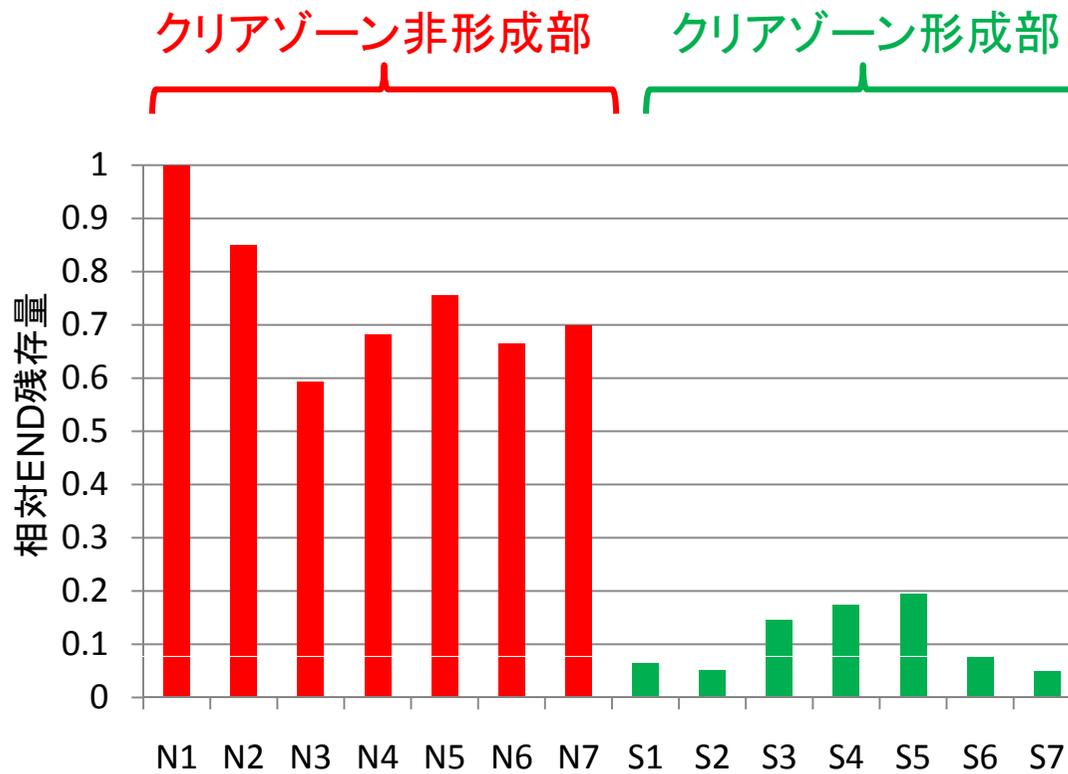


Fig. 2-12. クリアゾーン形成部のENDの減少

N1～7は直径6 mmとなるようにクリアゾーン非形成部を打ち抜いた7カ所の相対END残存量を、S1～7は直径6 mmとなるようにクリアゾーン形成部を打ち抜いた7カ所の相対END残存量を表している。相対END残存量はN1のEND残存量を1として算出した。

2.3.4 DIL 分解産物の同定の試み

GC-MS 分析同様、寒天培地上のクリアゾーン形成部と非形成部をコロニーごと打ち抜き、加温することで CF buffer に溶解させた後、アガラーゼ処理を行い、固相抽出を行うことでサンプル調製を行った。調製したサンプルを逆相モード、逆逆相モード (Hydrophilic Interaction Chromatography) で分析を行ったが、両方法とも GC-MS 分析の結果と同様に DIL の減少は確認できたものの、DIL 分解産物を検出するには至らなかった (Fig. 2-13)。Fig. 2-13 (c) における 44 分付近のピークと、Fig. 2-13 (d) における 41 分付近のピークは、リテンションタイムがずれているが、両ピークの面積値は、Fig. 2-13 (c) においては 1,254,591、Fig. 2-13 (d) においては 1,321,454 とクリアゾーン形成部と非形成部で差が見られないこと、紫外吸収スペクトルが一致すること (Fig. 2-14) から同一化合物である (DIL 分解産物でなはい) と判断した。また、クリアゾーン形成部にのみ確認できるピークも存在するが、DIL 減少の割合と比較すると極端に小さいこと、少量であることから同定が困難であるため現在は、詳細な解析は行っていない。

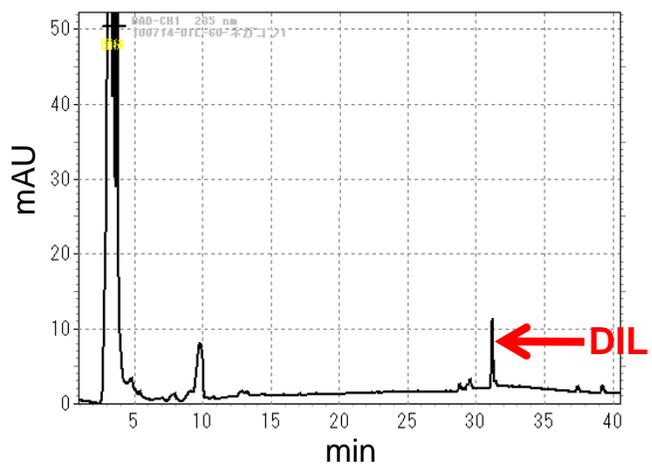
約 75% の DIL が分解しているにもかかわらず、分解産物が検出できないということから、DIL 分解の過程で、酵素：基質複合体を形成した後反応が進まないこと、あるいは、一般的な xenobiotics 資化菌が持つような、いわゆる “DIL 分解酵素” という特異的な酵素は存在せず、*Geobacillus* 属細菌が一般的に持つ (複数の) 酵素が、複数の微量の分解産物を生成している可能性が考えられた。そこで、*Geobacillus* 属細菌が一般的に DIL を分解可能であるか否かを検証することとした。

2.3.5 他 *Geobacillus* 属細菌の DIL 分解能の確認、取り扱い

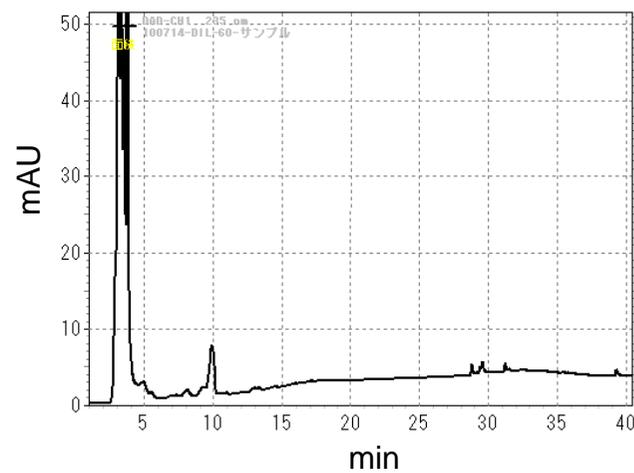
DIL-1 株近縁種を中心に 10 株の *Geobacillus* 属標準菌株を独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (JCM)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) より購入した (Table 2-5)。それら *Geobacillus* 属細菌を DIL 懸濁 LB 寒天培地 (終濃度 300 ppm) 上で生育させ、クリアゾーン形成能を確認したところ、*G. jurassicus*、*G. toebii*、*G. thermoglucosidasius* が明瞭なクリアゾーンを、*G. caldoxyliticus* が微弱なクリアゾーンを形成することが示された (Fig. 2-15)。分子系統解析 (Fig. 2-7) の結果と合わせて考えると、*G. jurassicus* を除く 3 株は DIL-1 株と近縁であったことから、*G. jurassicus* 近縁細菌の *G. uzennsis* もクリアゾーン形成能を有しているかもしれない。

DIL 分解酵素をコードする遺伝子を取得する 1 つの方法として、クリアゾーン形成株に変異を導入することで、クリアゾーンを形成しない変異株を取得し、

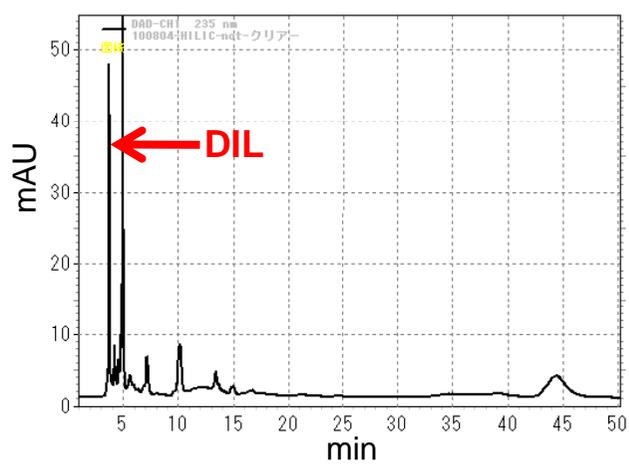
(a) 逆相モードクリアゾーン非形成部



(b) 逆相モードクリアゾーン形成部



(c) 逆逆相モードクリアゾーン非形成部



(d) 逆逆相モードクリアゾーン形成部

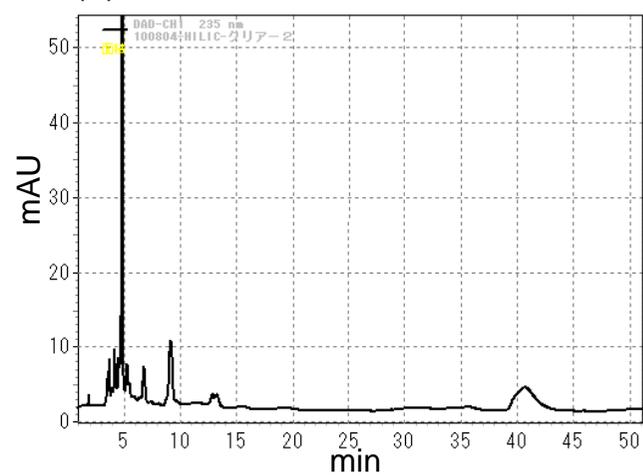
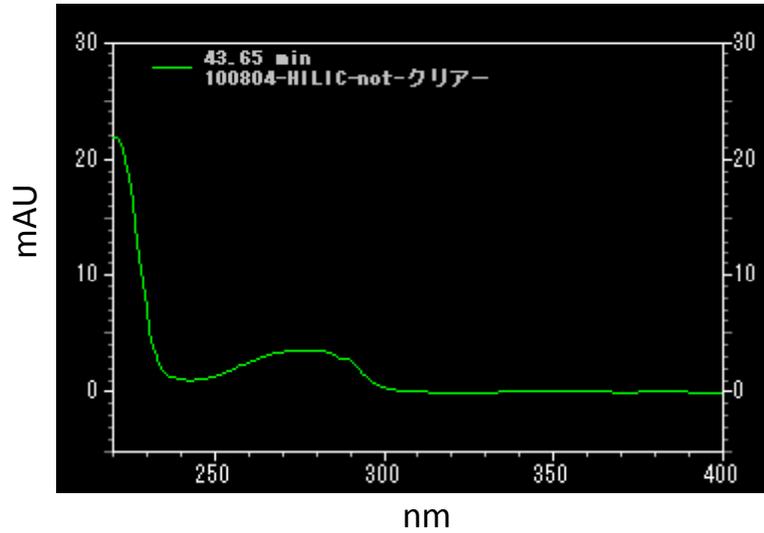


Fig. 2-13. HPLC分析の結果

(a) Fig. 3-10(c)における44分付近のピーク



(b) Fig. 3-10(d)における41分付近のピーク

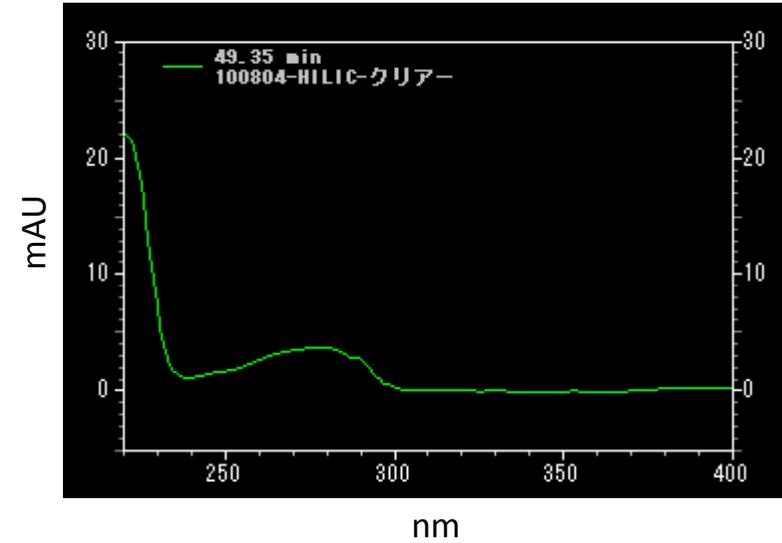


Fig. 2-14. Fig. 3-10 (c)における44分付近のピークと、
Fig. 3-10 (d)における41分付近のピークの
紫外吸収スペクトル

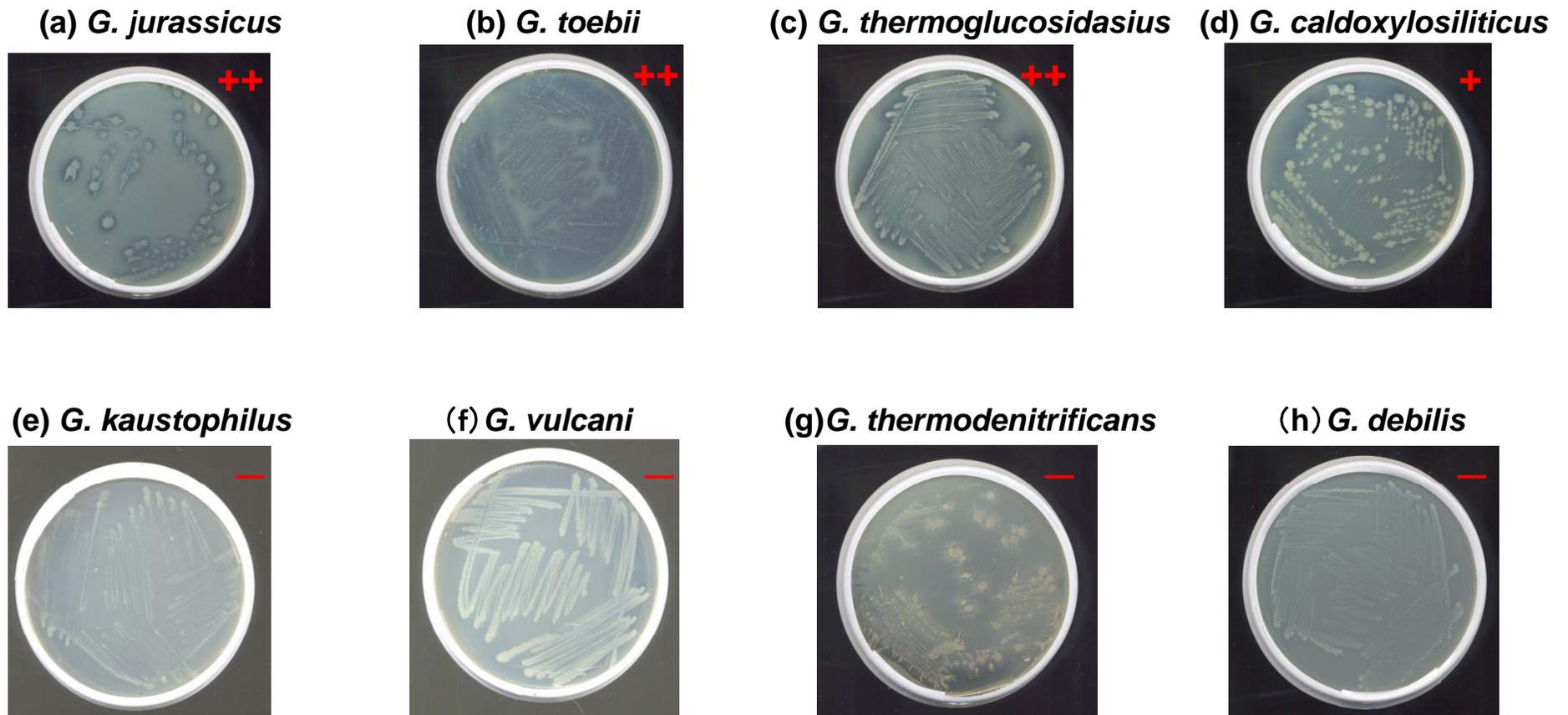


Fig. 2-15. 他*Geobacillus*属細菌のクリアゾーン形成能

- ++ : クリアゾーン形成能有
- + : 微弱なクリアゾーン形成能有
- : クリアゾーン形成能無

変異点を同定する方法が考えられた。しかし、DIL-1 株のようにコロニーを形成してからしばらく経つと植え継ぎが困難になり、クリアゾーン形成時には植え継ぎができないような菌株ではこの手法は使えない。そこで、比較的シングルコロニーを取得しやすく（コロニーが大きく成長せず、近隣のコロニーと重ならない）、明瞭なクリアゾーンを形成する *G. jurassicus*、*G. thermoglucosidasius* に対して生残性試験を行った。その結果、インキュベート開始 14 日目で明瞭なクリアゾーンの形成を確認できた *G. thermoglucosidasius* に関しては、クリアゾーンを形成した 8 個のシングルコロニーを、同組成の寒天培地に植え継ぎを行うことで 8 個全てのコロニーが全て植え継ぎ可能であることが示された (Fig. 2-16)。このことから、*G. thermoglucosidasius* を用いれば、クリアゾーンを形成しない変異株を取得後、変異点を同定することで DIL 分解酵素をコードする遺伝子を同定することが可能であると考えられた。一方で、*G. jurassicus* に関しては、今回の生残性試験では、菌体密度が低すぎたためコロニーが広がってしまい明瞭なクリアゾーンを確認するまでに 30 日要したことが原因で、植え継ぎを行っても生育が見られないという結果が得られた (data not shown)。

今回行った生残性試験・クリアゾーン形成試験の条件では、*G. jurassicus* を用いて DIL 分解酵素をコードする遺伝子を同定することはできないが、クリアゾーン形成試験時の菌体密度の条件検討を行い、明瞭なクリアゾーンを早期に観察できる条件を見つけることで、*G. jurassicus* を用いた場合でも DIL 分解酵素をコードする遺伝子を同定することが可能になると考えており、現在、*G. thermoglucosidasius*、*G. jurassicus* のクリアゾーン形成能欠失変異株を自然変異・変異原処理により取得することを試みると同時に、変異点を同定するため、クリアゾーン形成株 3 株の全ゲノム配列の決定を行っている。

2.3.6 DIL-1 株大量培養条件の検討

DIL-1 株より直接 DIL 分解酵素をコードする遺伝子を取得する方法としてショットガンクローニングがあるが、大量の DIL-1 株の total DNA が必要となる。しかし、これまでの結果では、DIL-1 株を液体培地で旺盛に生育させることができていない。そこで、ジャーファーメンターを用いて大量培養条件の検討を行うこととした。DIL-1 株生育の指標には、OD₆₀₀ の値を用いた。

培養条件の検討としてまず、LB 液体培地に、通気量 1.0 l/min (standard) で酸素を供給する条件の下、培養温度の検討を行った。培養を、55°C あるいは 60°C で行ったが、両条件で培養開始 24 時間目の OD₆₀₀ は約 0.2、48 時間目で 0.1 と顕著な変化は見られなかった (Table 2-7)。次に、培養温度 60°C の条件の下、酸素の供給の有無を検討したが、温度条件の検討時と同様、24 時間目の OD₆₀₀

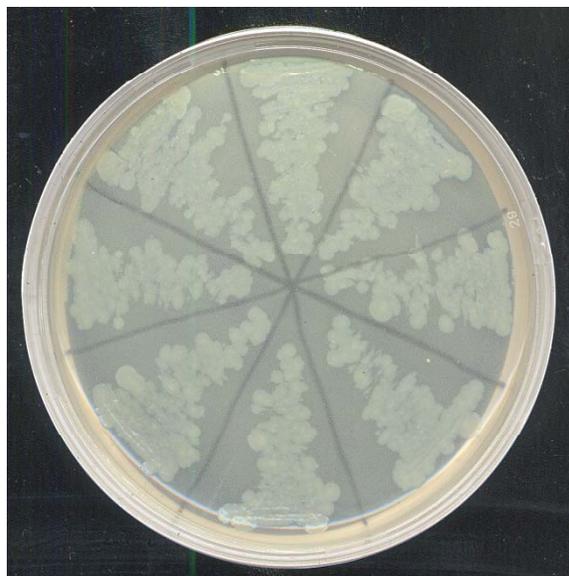


Fig. 2-16. *G. thermoglucosidasius*の生残性試験の結果

クリアゾーンを形成した8個のコロニーを白金耳を用いて同組成の寒天培地に植菌した。

Table 2-7. DIL-1 株培養温度条件の検討

培養温度	OD ₆₀₀			pH		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
55 °C	0.02	0.18	0.11	7.02	6.12	6.01
60 °C	0.02	0.21	0.11	6.93	6.02	5.98

Table 2-8. DIL-1 株培養時の酸素の供給の検討

酸素供給	OD ₆₀₀			pH		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
有り	0.02	0.20	0.11	6.86	6.10	6.01
無し	0.02	0.19	0.11	6.40	5.70	5.67

Table 2-9. DIL-1 株培養時の培地の検討

酸素供給	OD ₆₀₀			pH		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
LB	0.02	0.20	0.11	6.85	6.06	6.02
2×YT	0.02	0.32	0.23	6.89	5.90	5.88
SB	0.02	0.04	0.04	7.27	6.90	6.88

は約 0.2、48 時間目で 0.1 と顕著な変化は見られなかった (Table 2-8)。そこで、60°C、酸素の供給が有る状態 [通気量 1.0 l/min (standard)] で培地の検討を行った。培地は、LB、2×YT、SB 液体培地を用いた。その結果を Table 2-9 に示した。2×YT 培地での生育が最も良かったため、以降の DIL-1 株の培養は 60°C、酸素の供給あり、2×YT 培地を用いて行うこととした。また、Table 2-7、2-8、2-9 に示してある pH の変化を見ると、全ての条件にて培養開始 24 時間後で約 1 下がっていることがわかる、本研究では、充分量の DIL-1 株の total DNA を取得する目的で培養条件の検討を行ったため、これ以上の検討は行わないが、今後、さらなる通気量の条件検討、pH の制御を行うことでさらに良い培養系を構築できる可能性がある。

2.3.7 DIL-1 株ゲノムの塩基配列決定

DIL-1 株のゲノムライブラリーを枯草菌-大腸菌のシャトルベクターを用いて作製し、DIL 懸濁 1/3LB 重層寒天培地 (終濃度 300 ppm) 上でのクリアゾーン形成を指標に DIL 分解酵素をコードする遺伝子の取得を試みることを、現在計画しており、陽性クローンが得られた際に周辺遺伝子領域の情報を得るため、DIL-1 株のゲノムシーケンスを行った。

共同研究先である東京農業大学/生物資源ゲノム解析センター (吉川 博文教授、松本 貴嗣研究員) の協力によって、illumina 社製次世代シーケンサー Genome Analyzer II を用いて DIL-1 株の塩基配列を解析した。現在までに、約 513 万リードの解析から 598 のコンティグが形成されており、598 のコンティグ中の塩基数は 3,355,151 塩基となっている。

ゲノム情報が既知である *Geobacillus* 属細菌、*Geobacillus kaustophilus* HTA426 株、*Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 株、*Geobacillus* sp. C56-T3 株、*Geobacillus* sp. Y412MC61 株、*Geobacillus* sp. Y412MC10 株、*Geobacillus* sp. WCH70 株のゲノムに対し、解読した DIL-1 株のリード配列をマッピングした結果、それぞれ 6.0%、2.7%、4.7%、4.4%、0.2%、79% の領域をカバーしたことから、*Geobacillus* sp. WCH70 株と最も類縁であると考えられた。*Geobacillus* sp. WCH70 株は 3.46 Mbp の染色体のほかに 34 kbp の pWCH7001 と 10 kbp の pWCH7002 という 2 つのプラスミドを持つことが明らかとなっているが、DIL-1 株由来のリードは、pWC7002 に相同性を含むリードは含まれていなかった。これより、DIL-1 株は、pWC7001 と類似なプラスミドを持つ一方で、pWC7002 を持たないことが示唆された。さらに、DIL-1 株のゲノムサイズを *Geobacillus* sp. WCH70 株との相同性から推定すると、3.58 Mbp となることが予想された。

また、DIL-1 株の 598 のコンティグ (3,355,151 塩基) には、2,794 の CDS が

含まれることが明らかとなっている。2,794 個の CDS のうち機能の推測された 2100 個を分類した結果を Fig. 2-17(a)に示した。同様に、*Geobacillus* sp. WCH70 株の 1,845 個の、*Geobacillus kaustophilus* HTA426 株の 2,657 個の、*Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 株の 2,400 個の CDS を機能ごとに分類した結果を Fig. 2-17(b)-(d)に示した。その結果、ゲノムサイズは DIL-1 株が推定 3.58 Mbp、WCH70 株が 3.46 Mbp、HTA426 株が 3.54 Mbp、NG80-2 株が 3.55 Mbp と大きな差はないものの、WCH70 株、DIL-1 株では機能の推測されている CDS の数が少ないことが示された。また、4 株に共通して炭化水素の代謝に関わる carbohydrate、アミノ酸やその派生物の代謝・合成に関わる amino acid and derivatives が全体の約 1/3 を占めていること、miscellaneous を除いた他の CDS の割合は同じ傾向にあることが示された。

今後、DIL-1 株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行い、陽性クローンを取得することで、DIL 分解酵素をコードする遺伝子、さらには、その周辺領域の塩基配列の情報が得られると考えている。

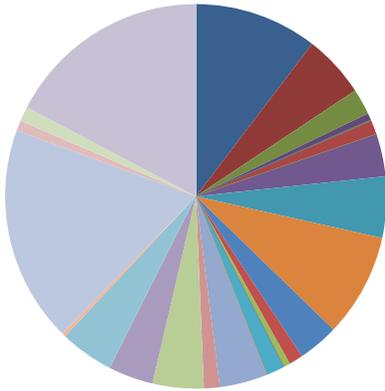
まとめと今後の方針

第 2 章では、DIL 汚染堆肥より、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地上でクリアゾーンを形成し、約 75%の DIL を分解する *Geobacillus* に属する細菌 DIL-1 株を単離した。DIL-1 株は、液体培地では DIL 分解能を示さなかったが、寒天培地上では、DIL だけでなく END も分解することを明らかとした。また、他の *Geobacillus* 属細菌を用いてクリアゾーン形成試験を行った結果、*G. jurassicus*、*G. tobi*i、*G. thermoglucosidasius* が明瞭なクリアゾーンを、*G. caldoolyticus* が微弱なクリアゾーンを形成することを示した。

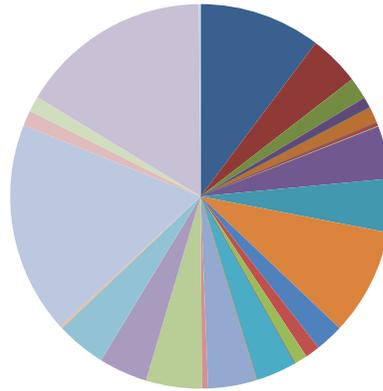
今後は、DIL 分解産物、DIL 分解酵素をコードする遺伝子を同定するために、DIL-1 株ゲノムライブラリーで形質転換した枯草菌のクリアゾーン形成能を指標としたショットガンスクリーニング、*G. thermoglucosidasius*、*G. jurassicus* のクリアゾーン形成能欠失変異株を自然変異・変異原処理により取得し、変異点の同定を行うことで DIL 分解酵素をコードする遺伝子の取得を試みる。

現在、DIL-1 株を含むクリアゾーン形成株 4 株のゲノムシーケンスを illumina 社製、Roche 社製の 2 つのシーケンサーを用いて行っており、ショットガンスクリーニングでの陽性クローン、あるいはクリアゾーン形成能欠失変異株が取得されれば、DIL 分解酵素をコードする遺伝子、さらには周辺遺伝子の情報が得られるため、ドリン系農薬分解菌を用いた bioremediation や、ドリン系農薬分解能を付与した組換え体植物を用いた phytoremediation などの低コストで効率よくドリン系農薬汚染土壌を環境修復する手法の開発に大きく前

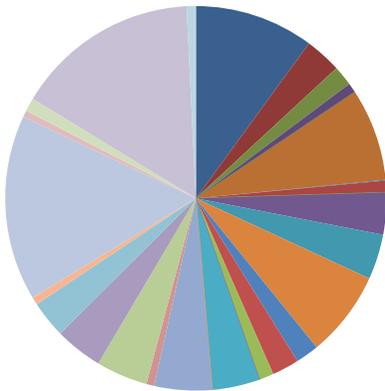
(a) DIL-1株



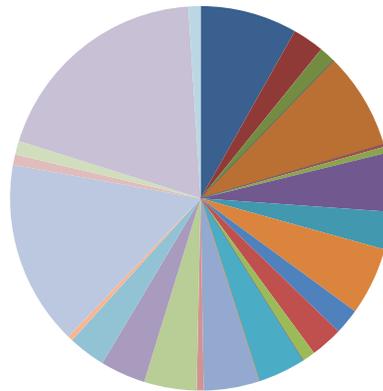
(b) WCH70株



(c) HTA426株



(d) NG80-2株



- cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments
- cell wall and capsule
- virulence, disease and defense
- potassium metabolism
- photosynthesis
- miscellaneous
- phages, prophages, transposable elements, plasmids
- membrane transport
- iron acquisition and metabolism
- RNA metabolism
- nucleosides and nucleotides
- protein metabolism
- cell division and cell cycle
- motility and chemotaxis
- regulation and cell signaling
- secondary metabolism
- DNA metabolism
- protein, nucleoprotein transport
- fatty acid, lipids, and isoprenoids
- nitrogen metabolism
- dormancy and sporulation
- respiration
- stress response
- metabolism of aromatic compounds
- amino acid and derivatives
- sulfur metabolism
- phosphorus metabolism
- carbohydrates
- protein transport

Fig. 2-17. 各株のCDSを推定される機能ごとに分類した結果
機能未知のものは除いている。

進すると考えられる。

第3章 モノクロロ酢酸分解菌の単離と解析

3.1 緒言

脱ハロゲン化酵素は、基質特異性が広いことが多く、環境低負荷な温和な条件かつ低コストで医薬品の合成や、環境浄化に利用できるため実用的な面からも注目されている酵素である。脱ハロゲン化酵素を効果的に利用していくためには、様々な脱ハロゲン化酵素の触媒作用のメカニズムや基質特異性の解析を行い、より多くの基礎的知見が必要となる。そこで本章では、詳細な解析がいくつかの既知の酵素でなされており、かつ分解菌や分解酵素が比較的取得しやすいと考えられた **monochloroacetic acid (MCA)** 分解酵素に着目し、新たな MCA 分解菌を単離し、基質特異性、脱ハロゲン化酵素の解析を行った。

3.2 材料と方法

本章で使用した試薬の調製は、第2章に準じて行った。制限酵素、その他の酵素類は第2章と同様のものを使用し、操作はその添付のプロトコールに従って行った。

3.2.1 培地および培養条件

本章で使用した液体培地を Table 3-1 に示した。培養は、スクリーキャップ式試験管 (5 ml)、または、スクリーキャップ式バツフル付き三角フラスコ (250 ml)、スクリーキャップ式試験管は、300 strokes/min、スクリーキャップ式バツフル付き三角フラスコは 120 strokes/min の条件で行った。

寒天培地は、各液体培地に対して微生物培養用精製寒天末 (ナカライテスク社製) を 16 g/l となるように加え、オートクレーブを用いて滅菌・溶解し、必要に応じて MCA、抗生物質を添加した後、シャーレに分注したものをを用いた。

3.2.2 Monochloroacetic acid (MCA)分解菌の単離

MCA (終濃度 1,000 ppm) が唯一の炭素源・エネルギー源となるように添加された 5 ml の NMM7 液体培地 (Table 3-1 参照) に対し、単離源として 50 μ l の土壌懸濁液 (2.2.2 参照) を加え、30°C で 7 日間培養した。土壌由来の褐色が消失するまで 7 日おきに同組成の新規液体培地に 50 μ l 植菌することで植え継ぎを行い、土壌由来の褐色が消失した後のサンプルにおいて、培地の白濁 (菌体の生育) を指標に MCA 分解菌群の取得を行った。得られた MCA 分解菌群培養液を終濃度 1,000 ppm の MCA を含む NMM7 寒天培地に塗布し、得られたシングルコロニーを、同組成の寒天培地、LB 寒天培地と数回植え継ぎを行った後、MCA が唯一の炭素源・エネルギー源となる液体培地 (NMM7 に終濃度 1,000 ppm となるように MCA を添加した液体培地) に植菌することで、得られた菌体の生育を確認した。

3.2.3 MCA 分解の経時的モニタリング

250 ml の MCA を唯一の炭素源・エネルギー源とする NMM7 液体培地 (終濃度 1,000 ppm) に対して MCA 分解菌前培養液 2.5 ml を植菌し、経時的に OD₆₀₀、GC-MS による基質残存量の測定 (3.2.4 参照)、硝酸銀滴定による遊離塩化物イオン濃度の測定 (3.2.5 参照) を行った。

3.2.4 GC-MS による MCA 残存量の測定

[試薬]

・酢酸エチル

Table 3-1. 本章で使用した液体培地の組成

NMM7		LB	
Na ₂ HPO ₄	2.2 g	Yeast extract	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g	Bactotryptone	10.0 g
NH ₄ NO ₃	3.0g	NaCl	10.0 g
per liter 超純水		per liter イオン交換水	
<p>上記培地をオートクレーブした後に Fe、Mg、Ca 成分としてあらかじめ調製しておいた下記に示したミネラルストックを添加した</p>			
50 mg/ml FeSO ₄	1 ml		
100 mg/ml MgSO ₄	1 ml		
50 mg/ml Ca(NO ₃) ₂	1 ml		

- ・ HCB
- ・ 無水硫酸ナトリウム
- ・ 1 N 塩酸

[操作]

- ① 測定サンプル 2 ml を、1N 塩酸を用いて pH2.0 とし、内部標準物質として 100 mg/ml の MFA を 20 μ l 添加し vortex mixer を用いて攪拌した。
- ② 酢酸エチルを 1.5 ml を添加し、1 分間 vortex mixer を用いて攪拌した。
- ③ 3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル層を新しい 16×100 mm のガラス製ディスポーザブル試験管に分取した。
- ④ 下層に酢酸エチルを再度 1.5 ml 添加し、③と同様の条件で遠心分離後、酢酸エチル層に分取した。
- ⑤ 合計 3 ml の分取した酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC-MS 用サンプルとした。
- ⑥ ⑤で調製したサンプル 1 ml をバイアル瓶に移し、GC-MS に供した。測定条件を Table 3-2 に、昇温条件を下記に示した。

30°C で 2 分間保持
 ↓
 1°C/min で 40°C まで昇温
 ↓
 16°C/min で 280°C まで昇温
 ↓
 280°C で 3 分間保持

3.2.5 硝酸銀滴定

[試薬]

- ・ 10 mM AgNO₃
- ・ 20 mg/ml K₂CrO₄

[操作]

測定サンプル 2 ml を 16×100 mm のガラス製ディスポーザブル試験管に取り、指示薬として K₂CrO₄ を 50 μ l 添加し、AgNO₃ を滴下した。測定サンプルが赤色を呈した時点を終点とした。

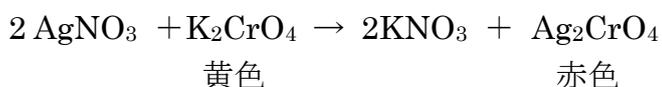


Table 3-2. GC-MS 測定条件

イオン化電流	200 μ A
イオン化エネルギー	70 eV
検出器電圧	-1300 V
イオン源温度	250 °C
GCITF 温度	250 °C
注入体積	1 μ l
カラム	GL サイエンス社製 Inert Cap 5MS/Sil capillary column

3.2.6 菌体からの total DNA の抽出

2.2.12 に準じて行った。

3.2.7 16S rRNA 遺伝子の増幅

2.2.13 に準じて行った。

3.2.8 アガロースゲルからの DNA の回収

2.2.14 に準じて行った。

3.2.9 DNA の取扱

2.2.15 に準じて行った。

3.2.10 塩基配列の解析

2.2.16 に準じて行った。

3.2.11 MCA 分解菌の生育基質特異性の解析

NMM7 液体培地に終濃度 1.0 mg/ml となるように dichloroacetic acid (DCA)、TFA、monobromoacetic acid (MBA)、dinobromoacetic acid (DBA)、tribromoacetic acid (TBA)、MFA、trifluoroacetic acid (TFA)、monoiodoacetic acid (MIA)、(S)-2-monochloropropionic acid (S-2MCPA)、(R)-2-monochloropropionic acid (R-2MCPA)を加え、MCA 分解菌をそれぞれ植菌して、その後の培養液の OD₆₀₀ を測定した。

3.2.12 Group I、group II 脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の増幅

Group I 脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の増幅には、Hill らによって作製された dehI_{for1}、dehII_{rev2} プライマーを group II 脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の増幅には dehII_{for1}、dehII_{rev1} プライマーを用いた。各プライマーの塩基配列を Table 3-3 に、PCR 反応条件を下記に示した (Hill et al., 1999)。

Group I 脱ハロゲン化酵素
をコードする遺伝子の増幅

94 °C 2 min
94 °C 20 sec }
55 °C 30 sec } 20 cycles
75 °C 30 sec }
75 °C 5 min
4 °C Hold

Group II 脱ハロゲン化酵素
をコードする遺伝子の増幅

94 °C 10 min
94 °C 45 sec }
55 °C 2 min } 36 cycles
75 °C 45 sec }
75 °C 5 min
4 °C Hold

Table 3-3. Group I、group II 脱ハロゲン化酵素遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

dehI _{for1}	5'-ACGYTNSGSGTGCCNTGGGT-3'
dehI _{rev2}	5'-SGCMAKSRCNYKGWARTCACT-3'
dehII _{for1}	5'-TGGCGVCARMRDCARCTBGARTA-3'
dehII _{rev1}	5'-TCSMADSBRTTBGASGANACRAA-3'

B = C, G, or T; D = A, G, or T; K = G or T; M = A or C; N = A, C, G or T; R = A or G; S = C or G; W = A or T; Y = C or T

3.3 結果と考察

3.3.1 MCA 分解菌の単離と解析

300 種の土壌、活性汚泥を単離源とし、終濃度 1.0 mg/ml となるように MCA を添加した NMM7 液体培地を用いて集積培養を行った結果、5 種の MCA 分解菌群サンプルを取得した。そこで、MCA 分解菌単離のため、終濃度 1.0 mg/ml となるように MCA を添加した NMM7 寒天培地に菌群培養液を塗布し、得られたシングルコロニーを同組成の寒天培地と LB 寒天培地に交互に植え継ぎを行うことで 5 株の MCA 分解菌候補株を取得した。得られた MCA 分解菌候補株を、再度、MCA を添加した NMM7 液体培地に植菌した後、培地中の残存 MCA 量を測定したところ、培養開始約 24 時間で終濃度 1.0 mg/ml の MCA を GC-MS にて検出限界以下まで分解していることが示された。得られた 5 株の MCA 分解菌の total DNA を抽出した後、16s rRNA による属種の同定 (Table 3-4)、分子系統解析 (Fig. 3-1)を行った結果、5 株全てが *Burkholderia* に属する細菌であり、*B. glathei* と *B. sordidicola* に比較的近縁な細菌であることが示された。また、5 株の MCA 分解菌は、栃木県鹿沼市、福島県白河市、東京都新宿区・渋谷区、大阪府吹田市で採取した異なる環境試料より単離したが、分子系統解析の結果から極めて近縁な関係にあることが示された (Fig. 3-1)。得られた 5 株の MCA 分解菌を、*Burkholderia* sp. CL-1、*Burkholderia* sp. CL-2、*Burkholderia* sp. CL-3、*Burkholderia* sp. CL-4、*Burkholderia* sp. CL-5 と命名した。

3.3.2 MCA 分解の経時的なモニタリング

3.3.1 で得られた 5 株の MCA 分解菌を終濃度 1.0 mg/ml の MCA を含む NMM7 培地に植菌し、経時的に OD₆₀₀、残存 MCA 量、遊離塩化物イオン濃度を測定した結果を Fig. 3-2 に示した。5 株の MCA 分解菌は、いずれも菌体濃度の上昇に伴って、GC-MS 分析では MCA を培養開始 25 時間以内に完全に分解していること、硝酸銀滴定では、MCA の減少に伴って遊離塩化物イオン濃度が上昇していること、また、理論上 MCA の全ての塩素が脱離していることが示された。これまでに、MCA 分解菌を用いた解析では MCA 分解産物を検出したという報告はないが、*Pseudomonas* sp. YL 株由来の L-DEX YL を用いた解析で MCA 分解産物は glycolic acid であると報告されている (Liu et al, 1995)。しかし、今回モニタリングを行った過程で glycolic acid や他の中間代謝物を検出することはできなかった。本研究で単離した 5 株の MCA 分解菌は、後述 3.3.4 で詳細に記すが、MCA 分解産物として glycolic acid を生成する MCA 分解酵素とアミノ酸レベルで高い相同性を示す酵素を持っていることから、これら 5 株が生成する MCA 分解産物も glycolic acid である可能性が非常に高い。先にも述べた

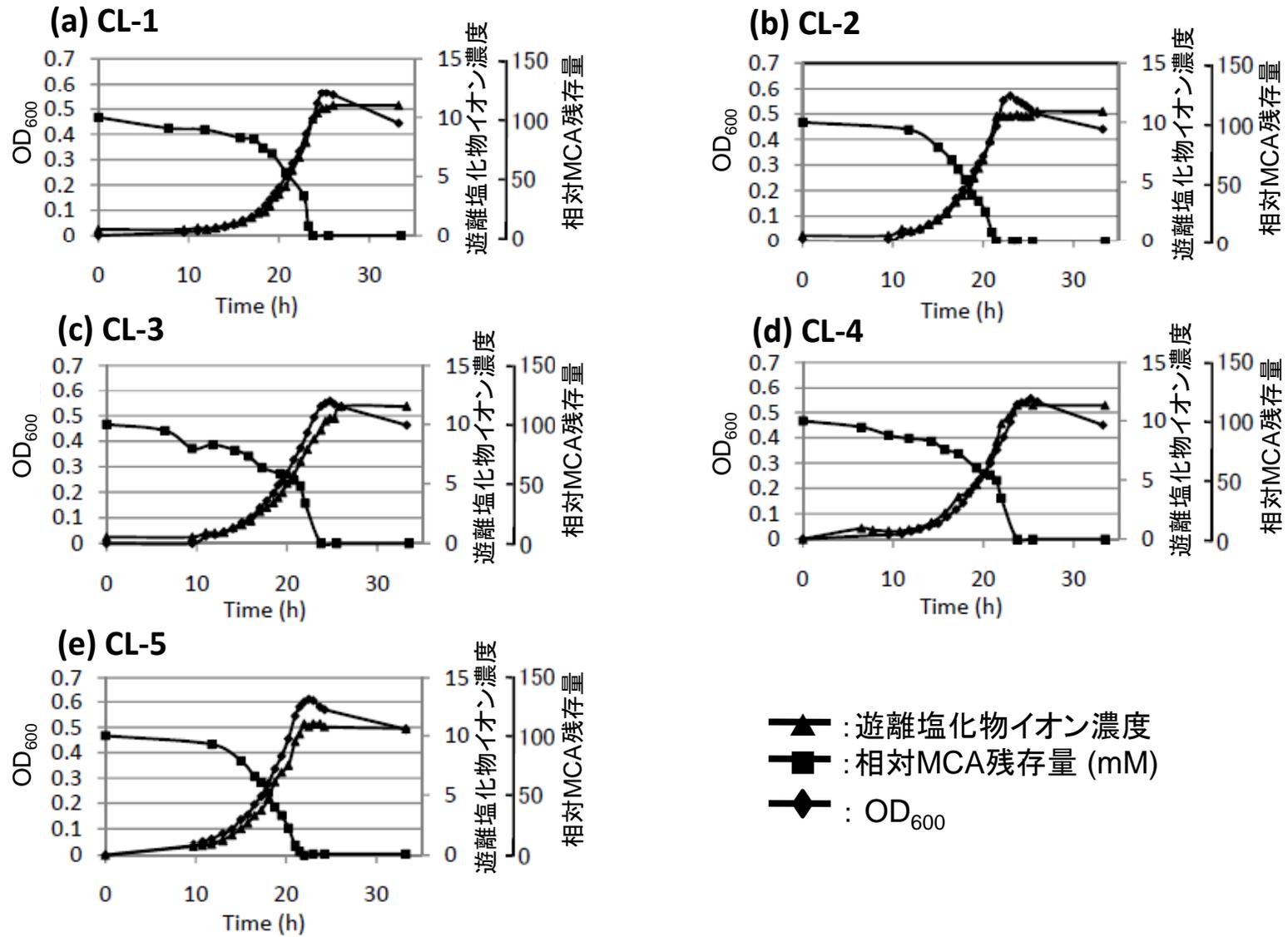


Fig. 3-2. 各MCA分解菌によるMCA分解プロフィール

相対MCA残存量は培養開始0時間目のMCA量を100として算出した。

Table 3-4. 16S rRNA による属種の同定

菌株名	相同性		上位 3 株の近縁種 ^a
CL-1	1363/1366	99.8%	<i>Burkholderia</i> sp. LCH76 (AB558213)
	1363/1366	99.8%	<i>Burkholderia</i> sp. NK8 (AB208548)
	1362/1366	99.7%	<i>Burkholderia</i> sp. THE68 (AB558184)
CL-2	1363/1366	99.8%	<i>Burkholderia</i> sp. LCH76 (AB558213)
	1363/1366	99.8%	<i>Burkholderia</i> sp. NK8 (AB208548)
	1362/1366	99.7%	<i>Burkholderia</i> sp. THE68 (AB558184)
CL-3	1364/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. LCH76 (AB558213)
	1364/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. NK8 (AB208548)
	1363/1366	99.8%	<i>Burkholderia</i> sp. THE68 (AB558184)
CL-4	1365/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. LCH76 (AB558213)
	1365/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. NK8 (AB208548)
	1364/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. THE68 (AB558184)
CL-5	1364/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. LCH76 (AB558213)
	1364/1366	99.9%	<i>Burkholderia</i> sp. NK8 (AB208548)
	1363/1366	99.8%	<i>Burkholderia</i> sp. THE68 (AB558184)

^a 括弧内には accession number を示した

シーケンスの比較には大腸菌 16S rRNA 遺伝子の 27~1378 塩基目に相当する部分を用いた

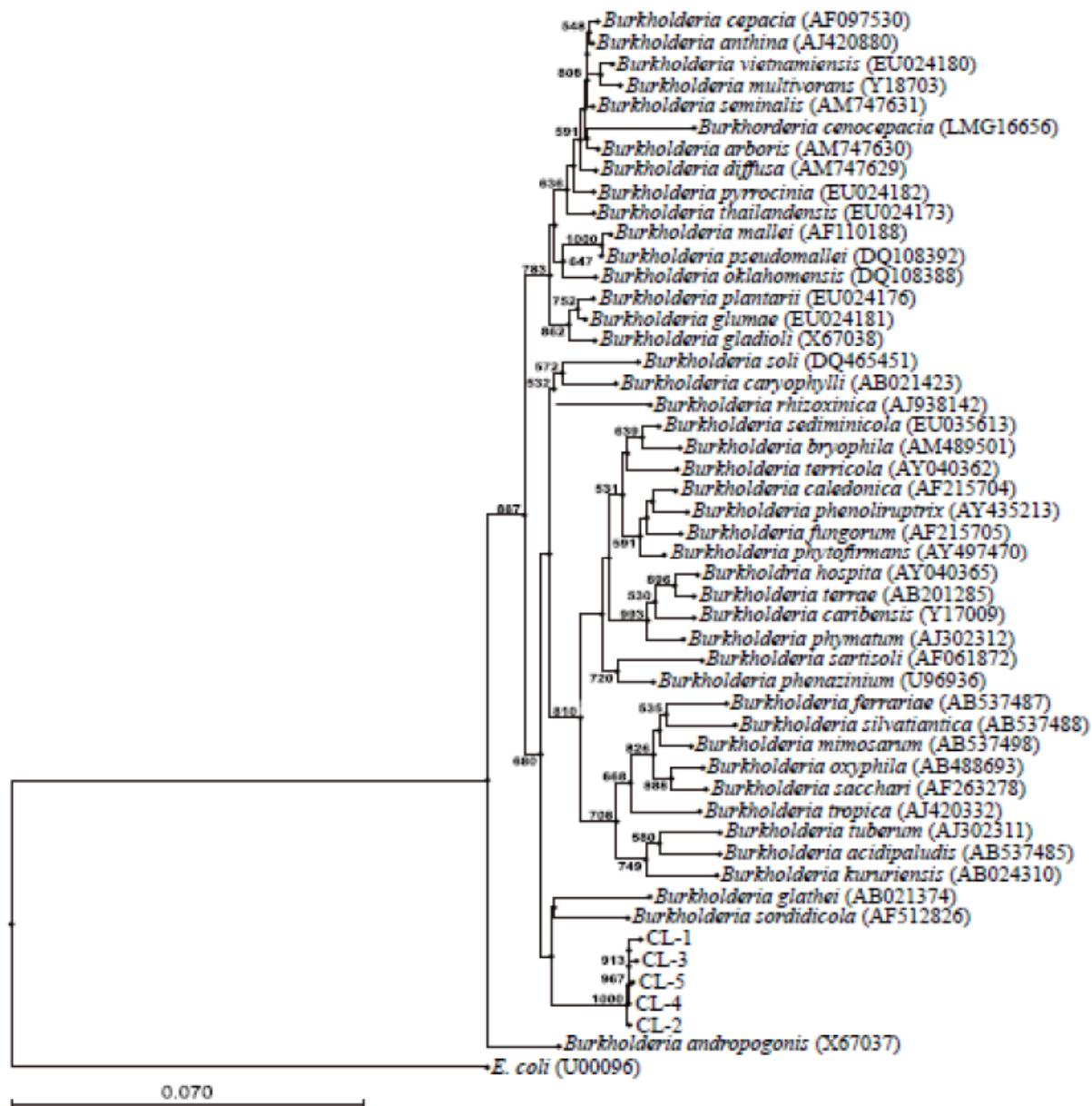


Fig. 3-1. *Burkholderia*属細菌との系統樹

括弧内はaccession numberを示した。

シークエンスの比較には大腸菌16S rRNA遺伝子の27~1378塩基目に相当する部分を用い、アウトグループには大腸菌を用いた。

また、分岐部にはブートストラップ値を示してあり500以上の結果のみを示した。

ように、MCA 分解菌を用いた解析では、これまでに glycolic acid や他の中間代謝物を検出している報告はない。その原因としては、glycolic acid が菌体内で素早く glyoxalic acid に変換され TCA 回路を経由して代謝されてしまうためだと考えている。今後、中間代謝物を同定するためには、MCA 分解酵素の精製酵素を用いて MCA を変換する必要がある。

3.3.3 MCA 分解菌の生育基質特異性の解析

得られた 5 株の MCA 分解菌を終濃度 1.0 mg/ml となるように dichloroacetic acid (DCA)、trichloroacetic acid (TFA)、monobromoacetic acid (MBA)、dinobromoacetic acid (DBA)、tribromoacetic acid (TBA)、monofluoroacetic acid (MFA)、trifluoroacetic acid (TFA)、monoiodoacetic acid (MIA)、(*S*)-2-monochloropropionic acid (S-2MCPA)、(*R*)-2-monochloropropionic acid (R-2MCPA)を加えた NMM7 液体培地にそれぞれ植菌し、培養液の OD₆₀₀ を測定することで各 MCA 分解菌の生育基質特異性の解析を行った。その結果、5 株の MCA 分解菌は、Table 3-5 に示した化合物のうち、MBA のみを生育基質とすることが示された。Table 3-5 には培養開始 24 時間目の OD₆₀₀ の値しか示していないが、48 時間目、72 時間目、96 時間目の値も測定している。しかし、Table 3-5 に示した化合物のうち、MBA を除く全ての化合物において菌体の生育は見られなかった。Table 3-5 中では示していない MIA、S-2MCPA、R-2MCPA を基質として用いた場合は、MIA と S-2MCPA を用いたときのみ再現よく菌体の生育が確認できた。しかし、Fig. 3-3 にその一例として CL-3 株を NMM7 液体培地に MIA を添加した培地で培養した結果を示したが、化合物の毒性に由来するものなのか複数回の実験において生育速度に大きなばらつきがみられた。そのため、MIA、S-2MCPA、R-2MCPA に関しては、Table 3-5 から除外している。生育基質特異性の解析、3.3.2 で行った経時的な MCA 分解プロファイルの結果は、5 株ともに同様の傾向が見られた。

また、NMM7 に MCA を加えた液体培地で各菌体を培養後、OD₆₀₀ を 5.0 に揃え、基質に MCA、DCA、TCA を用いて休止菌体反応を行い、硝酸銀滴定にて遊離塩化物イオンの測定を行った結果、TCA を基質として用いた場合には、基質の分解は見られなかったが、MCA を用いた場合には、MCA を完全に分解したときに生じる遊離塩化物イオン濃度の近似値が、DCA を用いた場合には完全分解の理論値に対して約 50%の遊離塩化物イオンが生じていることが示された (Table 3-6)。CL-1 株と CL-2 株のみ休止菌体反応液を GC-MS 分析しており、その結果 85~100%の DCA を分解していることが示された (data not shown)。先に述べたように MCA 分解産物が glycolic acid である可能性が高いことを考えると、GC-MS 分析、硝酸銀滴定の結果から DCA 分解産物は、

Table 3-5. MCA 分解菌の生育基質特異性

炭素源として 用いた基質	24 時間後の OD ₆₀₀				
	CL-1	CL-2	CL-3	CL-4	CL-5
DCA	0.019	0.025	0.009	0.014	0.025
TCA	0.012	0.011	0.004	0.019	0.013
MBA	0.316	0.338	0.326	0.344	0.314
DBA	0.023	0.037	0.027	0.030	0.036
TBA	0.015	0.013	0.008	0.008	0.021
MFA	0.010	0.003	0.013	0.001	0.006
TFA	0.007	0.016	0.009	0.014	0.007

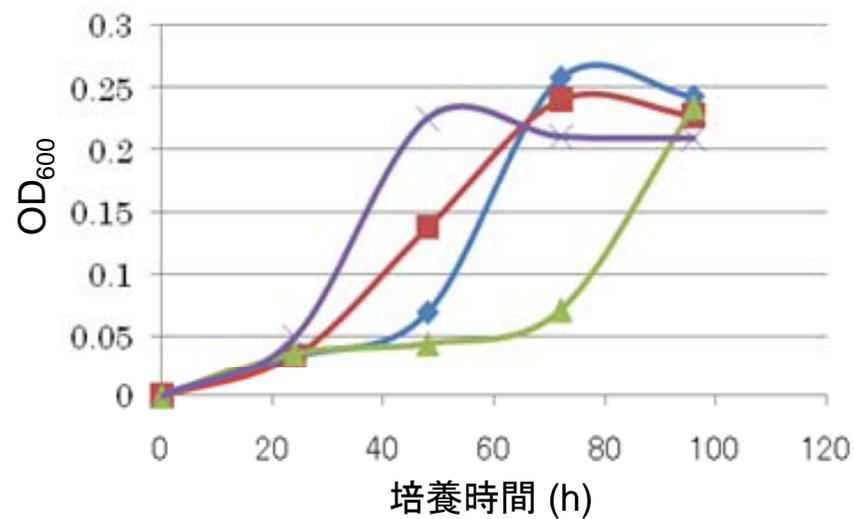


Fig. 3-3. CL-3株をMIAを添加したNMM7培地で培養した結果
グラフ中には4連で行った結果を示している。

Table 3-6. 休止菌体反応後の培養液中の遊離塩化物イオン濃度 (mM)^a

基質	菌株					理論値
	CL-1	CL-2	CL-3	CL-4	CL-5	
MCA	10.3 ± 0.5 (97.2 ± 4.72)	10.7 ± 0.5 (100.9 ± 4.72)	10.7 ± 0.4 (100.9 ± 3.77)	10.7 ± 0.3 (100.9 ± 3.77)	10.7 ± 0.8 (100.9 ± 7.55)	10.6
DCA	8.0 ± 1.2 (51.6 ± 7.74)	8.3 ± 0.4 (53.5 ± 2.58)	6.8 ± 0.2 (43.9 ± 1.29)	8.0 ± 1.4 (51.6 ± 9.03)	8.0 ± 0.5 (51.6 ± 4.72)	15.5
TCA	0.3 ± 0.03 (1.63 ± 0.16)	0.3 ± 0.03 (1.63 ± 0.16)	0.2 ± 0.03 (1.08 ± 0.16)	0.3 ± 0.03 (1.63 ± 0.16)	0.3 ± 0.04 (1.63 ± 0.22)	18.4

^a 表中の数字は3連で行った実験結果より算出した平均値±相対標準偏差を示している。
括弧内の数字は理論値に対する遊離塩化物イオン濃度の百分率を表している。

monochloroglycolic acid であると推測された。しかし、GC-MS 分析では monochloroglycolic acid は検出できていない。原因として水溶性の高さから酢酸エチルによって抽出できていない可能性が考えられた。今後は、MCA 脱塩素化酵素を取得し、酵素レベルでより広範な基質（鎖長の長い基質等）に対する反応特性を評価することで、より多様な基質を分解可能な変異酵素を作製する手がかりが得られると考えている。

3.3.4 脱ハロゲン化酵素の解析

Hill らによって脱ハロゲン化酵素は group I、あるいは group II 脱ハロゲン化酵素の 2 つに分類されている (Hill et al., 1999)。そこで、本研究で単離した 5 株の MCA 分解菌の total DNA をテンプレートとし、Hill らによって作製された group I、group II 脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の一部を増幅する縮重プライマーを用いて PCR を行った。その結果、単離された 5 株全てにおいて、group II に属する脱ハロゲン化酵素は持つが、group I に属する脱ハロゲン化酵素は持たないことが示された (Fig. 3-4)。Group II に属する脱ハロゲン化酵素は、S-体の基質から R-体の反応産物を生成する特徴がある。本研究で単離した 5 株の MCA 分解菌が group II に属する脱ハロゲン化酵素しか持たないという結果は、3.3.3 で示した S-2MCPA は生育基質として利用可能だが、R-2MCPA は生育基質として利用できないという結果と一致する。また、得られた 5 株由来の group II に属する脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の一部の断片 414 bp の解析を行った結果、5 株の持つ脱ハロゲン化酵素は、アミノ酸配列レベルで完全に一致することが示された。そこで、これ以降は、CL-1 株由来の脱ハロゲン化酵素についてのみ言及することとする。

CL-1 株由来脱ハロゲン化酵素 Deh_{CL} は、アミノ酸レベルで *Pseudomonas* sp. CBS-3 株由来の脱ハロゲン化酵素 Deh_{CI} (Schneider et al., 1991) と 74.6% の、*Burkholderia cepacia* strain MBA4 株由来の脱ハロゲン化酵素 Hdl IVa (Murdiyatmo et al., 1992) と 65.2% と高い相同性を示した。Fig. 3-5 には CL-1、Deh_{CI}、Hdl IVa に加え、他の group II に属する脱ハロゲン化酵素とのアライメント結果を示した。その結果、HAD superfamily に保存されている二次構造モチーフ (Koonin et al., 1994)、これまでに報告されている基質ポケットを構成するアミノ酸残基、活性に必須なアミノ酸残基 (Ridder et al., 1997) は全て保存されていることが示された。この結果は、CL-1~CL-5 株の MCA 分解産物が glycolic acid であることを強く示唆している。

まとめと今後の方針

本章では、異なる環境試料中より、菌体濃度の上昇に伴って、MCA を培養開

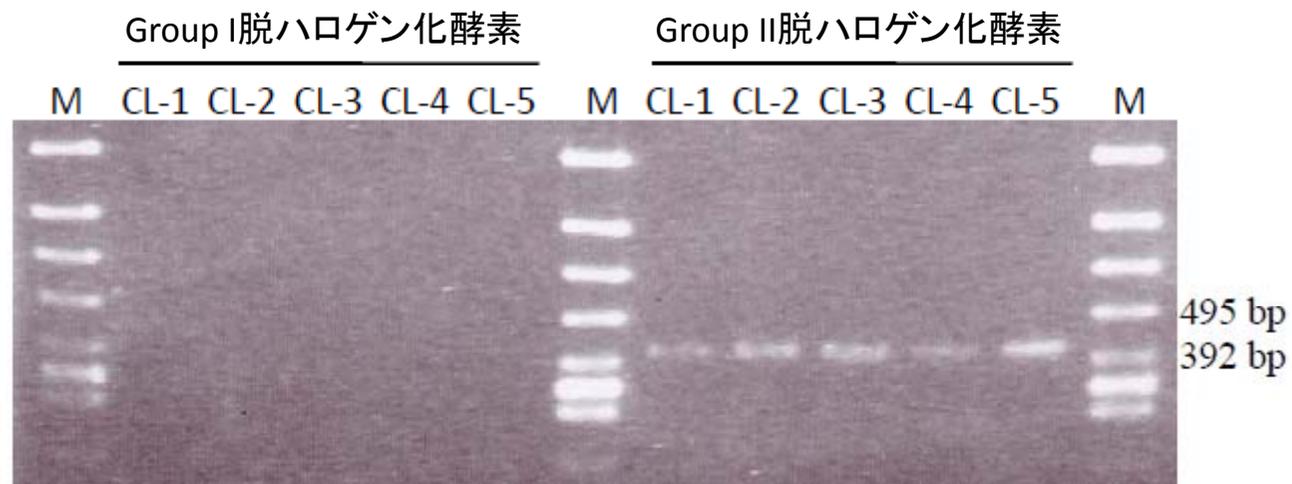


Fig. 3-4. Group I、group II脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の増幅

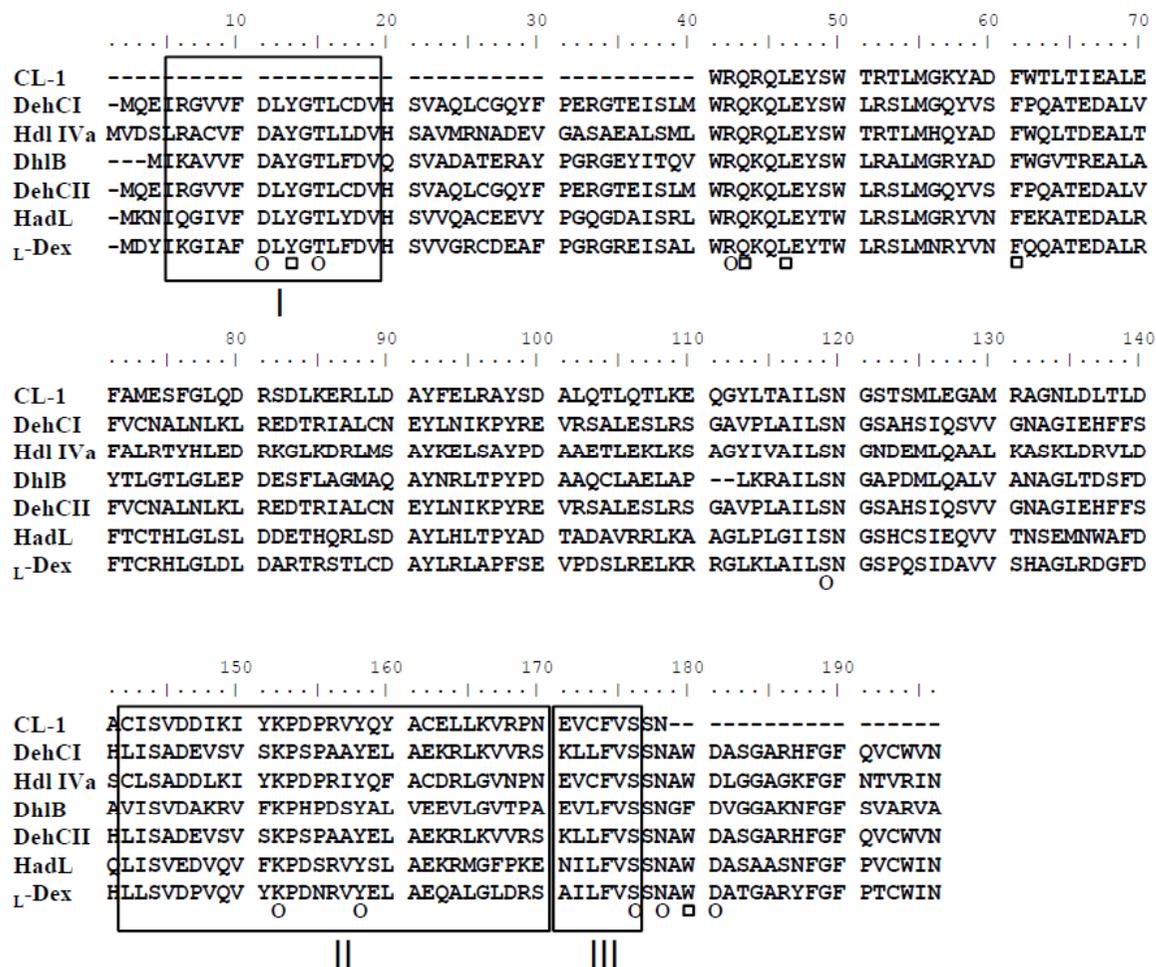


Fig. 3-5. CL-1と他のgroup IIに属する脱ハロゲン化酵素のアライメント

○: 活性に必須なアミノ酸残基

□: 基質ポケットを構成するアミノ酸残基

線で囲まれた部分はHAD superfamilyの2次構造モチーフ

始 25 時間以内に完全に分解し、理論上 MCA の全ての塩素を脱離させる 5 株の MCA 分解菌を単離した。また、これら 5 株は、MCA の他に、MBA、MIA、2-MCPA を生育基質として利用可能であり、休止菌体反応により生育基質としては利用できない DCA も分解可能であることを示した。さらに、Hill らによって作製された group I、group II 脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子の一部を増幅する縮重プライマーを用いて PCR を行うことで 5 株の持つ脱ハロゲン化酵素の解析を行った結果、単離された 5 株全てにおいて、group II に属する脱ハロゲン化酵素のみ持ち、また、5 株の持つ脱ハロゲン化酵素 (Deh_{CL}) は、アミノ酸配列レベルで完全に一致することを示した。Deh_{CL} は、アミノ酸レベルで *Pseudomonas* sp. CBS-3 株由来の脱ハロゲン化酵素 DehCI (Schneider et al., 1991) と 74.6% の、*Burkholderia cepacia* strain MBA4 株由来の脱ハロゲン化酵素 Hdl IVa (Murdiyato et al., 1992) と 65.2% と高い相同性を示し、これまでに報告されている基質ポケットを構成するアミノ酸残基、活性に必須なアミノ酸残基 (Ridder et al., 1997) は全て保存されていることが示された。

今後は、Deh_{CL} をコードする遺伝子の全長を取得し、Deh_{CL} の大量発現系を構築した後、長鎖カルボン酸等他の基質に対する分解特性を評価し、既存の MCA 脱塩素化酵素との比較を行うことで、MCA 脱ハロゲン化酵素に関する基盤情報を収集し、より多様な基質を分解可能な変異酵素を作製する手がかりを得ようと考えている。

第4章 モノフルオロ酢酸分解菌の単離と解析

4.1 緒言

Ammoniumperfluorooctanoic acid (APFO)や perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)等の有機フッ素化合物は、半導体の表面処理剤やポリテトラフルオロエチレン (テフロン)製造時の乳化剤等様々な用途で利用されてきたが、近年、環境残留性や毒性の観点から、排出規制や製品中の含有量を削減する取り組みがなされている。これら化合物を微生物や酵素によって分解、環境浄化を行う方法が注目されているが、これまでに APFO や PFOS のようなパーフルオロカルボン酸類を分解する微生物、酵素の報告はない。そこで、本章では、APFO や PFOS 等のパーフルオロカルボン酸類を分解可能な微生物のスクリーニングや、脱ハロゲン化酵素を機能改変して APFO や PFOS 等のパーフルオロカルボン酸類を分解するための有用な情報を得るため、monofluoroacetic acid (MFA)分解菌を単離し、脱ハロゲン化酵素の解析を行った。

4.2 材料と方法

本章で使用した試薬の調製は、第2章に準じて行った。制限酵素、その他の酵素類は第2章と同様のものを使用し、操作はその添付のプロトコールに従って行った。

4.2.1 培地および培養条件

本章で使用した液体培地を Table 4-1 に炭素源として用いた化合物を Table 4-2 に示した。培養は、30°C にて、スクリーキャップ式試験管 (5 ml)、または、スクリーキャップ式バツフル付き三角フラスコ (250 ml) を用いて行った。スクリーキャップ式試験管は、300 strokes/min、スクリーキャップ式バツフル付き三角フラスコは 120 strokes/min の条件で行った。

寒天培地は、各液体培地に対して微生物培養用精製寒天末 (ナカライテスク社製) を 16 g/l となるように加え、オートクレーブを用いて溶解・滅菌し、必要に応じて Table 4-2 に示した炭素源、抗生物質を添加した後、シャーレに分注したものをを用いた。

4.2.2 Trifluoroacetic acid (TFA) 分解菌群の単離

炭素源として、TFA を終濃度 1,000 ppm となるように添加した 5 ml の NMM7 液体培地 (Table 4-1 参照) に対し、分解菌単離源として 50 μ l の土壤懸濁液 (2.2.2 参照) を加え、30°C で 14 日間培養した。土壤由来の褐色が消失するまで 14 日おきに同組成の新規液体培地に 50 μ l 植菌することで植え継ぎを行い、土壤由来の褐色が消失した後のサンプルにおいて、培地の白濁 (菌体の生育) を指標に分解菌群の取得を行った。得られた分解菌群候補サンプルに対しては、培養液中の遊離フッ化物イオン濃度の測定を行った。

4.2.3 Pentafluoropropionic acid (PFP) 分解菌群の単離

炭素源に PFP を用いた以外は 4.2.2 と同様の方法で行った。

4.2.4 Heptafluorobutylic acid (HFB) 分解菌群の単離

炭素源に HFB を用いた以外は 4.2.2 と同様の方法で行った。

4.2.5 Monofluoroacetic acid (MFA) 分解菌の単離

MFA (終濃度 1,000 ppm) が唯一の炭素源・エネルギー源となるように添加された 5 ml の NMM7 液体培地 (Table 4-1 参照) に対し、分解菌単離源として 50 μ l の土壤懸濁液 (2.2.2 参照) を加え、30°C で 7 日間培養した。土壤由来の褐色が消失するまで 7 日おきに同組成の新規液体培地に 50 μ l 植菌することで植え継ぎ

Table 4-1. 本章で使用した液体培地の組成

NMM7		LB	
Na ₂ HPO ₄	2.2 g	Yeast extract	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g	Bactotryptone	10.0 g
NH ₄ NO ₃	3.0g	NaCl	10.0 g
per liter 超純水		per liter イオン交換水	
<p>上記培地をオートクレーブした後に Fe、Mg、Ca 成分としてあらかじめ調製しておいた下記に示したミネラルストックを添加した</p>			
50 mg/ml FeSO ₄	1 ml		
100 mg/ml MgSO ₄	1 ml		
50 mg/ml Ca(NO ₃) ₂	1 ml		

Table 4-2. 本章で炭素源として用いた化合物

化合物	ストック濃度	溶媒
monofluoroacetic acid (MFA) (東京化成)	100 mg/ml	超純水
trifluoroacetic acid (TFA) (東京化成)	100 mg/ml	超純水
pentafluoropropionic acid (PFP) (東京化成)	100 mg/ml	超純水
heptafluorobutylic acid (HFB) (東京化成)	100 mg/ml	超純水

を行い、土壌由来の褐色が消失した後のサンプルにおいて、培地の白濁（菌体の生育）を指標に分解菌群の取得を行った。得られた MFA 分解菌群培養液を終濃度 1,000 ppm の MFA を含む NMM7 寒天培地に塗布し、得られたシングルコロニーを、同組成の寒天培地、LB 寒天培地と数回植え継ぎを行った後、MFA が唯一の炭素源・エネルギー源となる液体培地（NMM7 に終濃度 1,000 ppm となるように MFA を添加した液体培地）に植菌することで、得られた菌体の生育を確認した。

4.2.6 MFA 分解の経時的なモニタリング

終濃度 1,000 ppm の MFA を唯一の炭素源・エネルギー源として加えた NMM7 液体培地（250 ml）に対して MFA 分解菌前培養液 2.5 ml を植菌し、経時的に OD₆₀₀、GC-MS による基質残存量の測定（4.2.7 参照）を行った。培養液中の遊離フッ化物イオン濃度は、共同研究先であるダイキン工業株式会社に委託し、培養開始 72 時間目の培養液のみイオンクロマトグラフィーにて測定した。

4.2.7 GC-MS による MFA 残存量の測定

[試薬]

- ・酢酸エチル
- ・HCB
- ・無水硫酸ナトリウム
- ・1 N 塩酸

[操作]

- ① 測定サンプル 2 ml を、1N 塩酸を用いて pH2.0 とし、内部標準物質として 100 mg/ml の monochloroacetic acid (MCA) を 20 μ l 添加し vortex mixer を用いて攪拌した。
- ② 酢酸エチルを 1.5 ml を添加し、1 分間 vortex mixer を用いて攪拌した。
- ③ 3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル層を新しい 16×100 mm のガラス製ディスポーザブル試験管に分取した。
- ④ 下層に酢酸エチルを再度 1.5 ml 添加し、③と同様の条件で遠心分離後、酢酸エチル層に分取した。
- ⑤ 合計 3 ml の分取した酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC-MS 用サンプルとした。
- ⑥ ⑤で調製したサンプル 1 ml をバイアル瓶に移し、GC-MS に供した。測定条件を Table 4-3 に、昇温条件を下記に示した。

Table 4-3. GC-MS 測定条件

イオン化電流	200 μ A
イオン化エネルギー	70 eV
検出器電圧	-1300 V
イオン源温度	250 °C
GCITF 温度	250 °C
注入体積	1 μ l
カラム	GL サイエンス社製 Inert Cap 5MS/Sil capillary column

30°C で 2 分間保持
↓
1°C/min で 40°C まで昇温
↓
16°C/min で 280°C まで昇温
↓
280°C で 3 分間保持

4.2.8 菌体からの total DNA の抽出

2.2.12 に従って行った。

4.2.9 16S rRNA 遺伝子の増幅

2.2.13 に従って行った。

4.2.10 アガロースゲルからの DNA の回収

2.2.14 に従って行った。

4.2.11 DNA の取扱

2.2.15 に従って行った。

4.2.12 塩基配列の解析

2.2.16 に従って行った。

4.2.13 プラスミドの構築

・ pTnMod-OTp'-Gm

pUCGm (Schweizer, 1993) を *Sma*I で制限酵素処理を行うことで得た Gm cassette を pTnMod-OTp' (Dennis and Zylstra, 1998) の *Swa*I サイトに挿入することで作製した。

・ pColdII-MFA

*Eco*RI、*Bam*HI サイトを付加した F-2 株由来の推定 MFA 分解酵素をコードする遺伝子を、*Eco*RI、*Bam*HI で切断した pColdII (タカラバイオ株式会社) ベクターに挿入することで作製した。

・ pColdIV-MFA

*Eco*RI、*Bam*HI サイトを付加した F-2 株由来の推定 MFA 分解酵素をコードする遺伝子を、*Eco*RI、*Bam*HI で切断した pColdIV (タカラバイオ株式会社)

ベクターに挿入することで作製した。

4.2.14 MFA 分解酵素をコードする遺伝子の取得

4.2.14-1 縮重 PCR

F-1 株、F-2 株由来の MFA 分解酵素をコードする遺伝子の増幅には、既知の MFA 分解酵素 FAc-DEX H1 をコードする遺伝子の 160 bp~179 bp に相当する FAc-F1、280 bp~299 bp に相当する FAc-F2 の 2 種のフォワードプライマーと、441 bp~461 bp に相当する FAc-R1、809 bp~828 bp に相当する FAc-R2 の 2 種のリバースプライマーを用いた。用いたプライマーの塩基配列を Table 4-4 に示した。PCR は以下の条件で行った。

94 °C 5 min
94 °C 30 sec } 30 cycles
X °C 30 sec }
72 °C 1 min }
72 °C 7 min
4 °C Hold

X = 52.0, 52.6, 53.2, 54.4, 55.8, 57.2,
58.7, 60.1

4.2.14-2 ショットガンクローニング

- ① F-2 株の total DNA を、*EcoRI* を用いて制限酵素処理を行った。
- ② 800 bp~5,000 bp 付近のバンドを切り出し、精製した。
- ③ *EcoRI* を用いて制限酵素処理をした後、CIAP 処理によって脱リン酸化した pBluescript KS(-) (ストラタジーン)に②で得られた断片を挿入した。
- ④ ③で作製したプラスミドを用いて *E. coli* DH5 α を形質転換した。
- ⑤ 終濃度 1,000 ppm となるように MFA を添加した LB 液体培地に、④で得た形質転換体を 8 株ずつ植菌し、4.2.7 に従って MFA 分解活性の測定を行った。

4.2.14-3 トランスポゾン挿入変異

- ① 供与菌として *E. coli* S17-1 λ pir を Tp (終濃度 25 μ g/ml) と Gm (終濃度 30 μ g/ml) を含む LB 液体培地で、受容菌として F-1、F-2 株を終濃度 1,000 ppm となるように MFA を添加した NMM7 液体培地で培養した。
- ② 受容菌、供与菌を 2 ml 容チューブで集菌し (3,000 rpm、10 min)、400 μ l の LB で再懸濁した。

Table 4-4. MFA 分解酵素遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

FAc-F1	5'-ACCGTSGTSTGTGCSGAYCT-3'
FAc-F2	5'-CTGGGGTTCGAGCGSTTYCA-3'
FAc-R1	5'-AGRAAATACCAATGCCAGTA-3'
FAc-R2	5'-ATCSACGAAGAARTGSCCWC-3'

R = A or G; S = C or G; W = A or T; Y = C or T

- ③ ②で作製した菌懸濁液を良く混合し、LB 寒天培地上においたフィルターの上に菌懸濁液をのせ 30°C で 24 時間インキュベートした。
- ④ フィルターごと滅菌済み 15 ml 容コーニングチューブに移し、1 ml の LB を加えて vortex mixer で懸濁した。
- ⑤ *Pseudomonas* isolation agar (PIA) (DIFCO) に Tp (終濃度 25 µg/ml) と Gm (終濃度 30 µg/ml) 加えた寒天培地に④で作製した菌懸濁液を塗布し接合伝達体の選抜を行った。
- ⑥ ⑤で得られた接合伝達体を、LB 液体培地、終濃度 1,000 ppm となるように MFA を添加した NMM7 液体培地の両培地で培養することで MFA 資化能の有無の確認を行った。

4.2.15 サザンハイブリダイゼーション

[試薬]

- Denaturation buffer
 - 0.5 M NaOH
 - 1.5 M NaCl
- Neutralization buffer
 - 0.5 M Tris
 - 3 M NaCl
 - HCl で pH 7.0 に調整した。
- Buffer 1 (100 ml あたり)
 - 0.1 M Maleic acid
 - 0.15 M NaCl
 - NaOH で pH 7.5 に調整した。
- Blocking stock solution
 - Blocking reagent を Buffer 1 で 10% (w/v) となるように熱を加えながら攪拌して溶解させた (4°C 保存)。
- Buffer 2
 - Blocking stock solution を Buffer 1 で 10 倍希釈した (要時調製)。
- 20×SSC
 - 3 M NaCl
 - 0.3 M Na₃ · citrate · 2 H₂O
- Hybridization buffer (-20°C 保存)
 - 5×SSC
 - 1% (w/v) Blocking stock solution
 - 0.1% (w/v) N-Laurorylsarcosine

0.2% (w/v) SDS

・希釈抗体溶液

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche Diagnostics)を Buffer 2 で 150 mU/ml となるように希釈した (要時調製)。

・ Buffer 3

0.1 M Tris

0.1 M NaCl

pH 9.5 に調整した (4°C 保存)。

・ 発色溶液

200 μ l の NBT/ BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics) を 10 ml の Buffer 3 に溶解した (要時調製)。

[操作]

<プローブの作製>

- ① 300 ng~1 μ g のラベルする DNA 断片と滅菌 MilliQ 水で計 16 μ l の溶液を調製し、99°C のヒートブロックで 10 min 加熱し、すみやかに氷上に移して 3 min (以上)急冷し変性させた。
- ② 4 μ l の DIG-High Prime (ランダムプライマー、dNTP、DIG 結合 dUTP、Klenow fragment、buffer 成分が混合されている)を加えて 37°C で 4-20 h 反応させた。
- ③ 0.8 μ l の 0.5 M EDTA を加えて混合し、65°C (ヒートブロック)で 10 分間加熱することで反応を停止した。
- ④ ハイブリダイゼーションの前に 98°C で 5 分間加熱し、ただちに氷上に移して変性させてから使用した。

<アガロースゲルからメンブレンへの転写>

VacuGene XL Vacuum Blotting System (Amersham Biosciences, LTD., Buckinghamshire, UK)を用いて行い、操作手順はそのプロトコールを一部改変して行った。

- ① 電気泳動後のゲルを VacuGene XL Vacuum Blotting System にセットし、0.2 規定の塩酸をゲルの表面を覆う様に加え、50 ヘクトパスカルの圧力で 15 分吸引した。
- ② ゲル表面より HCl 液を除いた後、Denaturation buffer を加えて 15 分吸引した。
- ③ Neutralization buffer を加えて 15 分吸引した後、20 \times SSC buffer をゲル高の 2 倍程度の位置まで加えて 45 分間吸引した。

- ④ 装置よりメンブレンを取り出し、UV を 5 分間照射した。
- ⑤ すぐにハイブリダイゼーションに供さない場合は、メンブレンをキムタオルの間に挟んで 4°C で保存した。

<プレハイブリダイゼーション・ハイブリダイゼーション>

- ① メンブレンを 100 cm²あたり 20 ml の hybridization buffer とともにハイブリダイゼーションバッグ (以下バッグ)に封入し、68°C で 60 分穏やかに振とうした (以後、反応液に加える液量はメンブレン 100 cm² あたりの量で示す)。
- ② メンブレンを新しいバッグに移し、Hybridization buffer 1 ml あたり 1 μl のプローブを加えたプローブ液 15 ml とともに封入して、68°C で 8 時間以上穏やかに振とうした。

<洗浄・検出>

- ① バッグを切り開きプローブ液を回収した。取り出したメンブレンをタッパーに移し、終濃度 0.1%(w/v)の 10% SDS 溶液を加えた 2×SSC buffer を加え室温で 5 分間振とうした (2 回)。
- ② 同様に 0.1%(w/v)SDS、0.1×SSC 溶液で 68°C、15 分間穏やかに振とうした (2 回)。
- ③ Buffer 1 でメンブレンを 1 分間洗浄した。
- ④ 90 ml の Buffer 2 に浸し、30 min 振とうした。
- ⑤ 10 ml の希釈抗体溶液に浸し、室温で 30 min 振とうした。
- ⑥ メンブレンを 100 ml の終濃度 0.3% (v/v) Tween 20 を加えた Buffer 1 中で 15 min 振とうした (2 回)。
- ⑦ メンブレンを 20 ml の Buffer で 2 分間平衡化させ、発色溶液 10 ml と共にバッグに封入し遮光して平らな場所に静置した。
- ⑧ 望ましいシグナルが得られたら、メンブレンを取り出して、脱イオン水で洗浄した (3 回)。

4.2.16 推定 MFA 分解酵素の発現条件の検討

条件検討は 250 ml の LB 培地を用いて行った。形質転換大腸菌を 37°C で培養し OD₆₀₀ が 0.5 となった時点で 30 分間 15°C 下に置き、IPTG を終濃度 0、0.1、0.25、0.5、1.0 mM となるように添加し、15°C で 24 時間培養することで IPTG 濃度の検討を行った。また、OD₆₀₀ が 0.3、0.4、0.5 となった時点で 30 分間 15°C 下に置き IPTG を終濃度 1.0 mM となるように添加し、15°C で 24 時間培養することで誘導開始時間の検討を行った。全てのサンプルは、4.2.17

に示す方法で SDS-PAGE を行った。

4.2.17 SDS-PAGE

[試薬]

- 30% (wt / vol) acrylamide / bisacrylamide (19:1) (Bio-Rad Lab.)
- 4×Tris-HCl / SDS (pH 6.8) :濃縮ゲルバッファー
Tris 6.05 g を蒸留水に溶かして pH を 6.8 に調整する。その後、SDS を 0.4 g 加える。
- 4×Tris-HCl / SDS (pH 8.8) :分離ゲルバッファー
Tris 91 g を蒸留水に溶かして pH を 8.8 に調整する。その後、SDS を 2 g 加える。
- *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 10% (wt / vol) Ammonium persulfate (APS)
- 2×SDS sample buffer

4×Tris-HCl / SDS (pH 6.8)	25 mL
Glycerol	20 mL
SDS	4 g
Mercaptoethanol	2 mL
Bromophenol blue	1 mg

蒸留水を加えた後、100 mL に fill up する。

- 水飽和 isobutyl alcohol
- 分子量マーカー
Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare)
- SDS / electrophoresis buffer
Tris 30.2 g、Glycine 144.0 g、SDS 10.0 g を蒸留水で溶解し 1000 mL に fill up する。用事に 10 倍希釈して泳動用 buffer とする。
- 染色液
SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen)

[操作]

- ① 30% (wt / vol) acrylamide/bis 水溶液 4.0 mL、分離ゲル buffer 2.5 mL、滅菌水 3.5 mL を混ぜ合わせ分離ゲル液を調製し、これを 20 分間脱気した。
- ② Bio-Rad のミニプロティアンセル II-D セットを組み立てた。
- ③ 10% APS 溶液 80 μ l と TEMED 17 μ l を穏やかに加え攪拌し、分離ゲル溶液を未にプロティアンセル II-D セットに流し込み固化させた。このとき、上部に水飽和 isobutyl alcohol を重層する。30-60 分間室温でゲルを固め、

その後、水飽和 isobutyl alcohol を捨て上部を滅菌水でリンスした。

- ④ 30% (wt / vol) acrylamide/bis 水溶液 0.34 mL、濃縮ゲル buffer 0.75 mL、滅菌水 1.83 mL を混ぜ合わせ、20 分ほど脱気することで、濃縮ゲル液を調製した。
- ⑤ 分離ゲルと同様に 10% APS 溶液 15 μ L と TEMED 3 μ L を加え、穏やかに攪拌した。ゲル溶液を分離ゲルの上に流し込み、コームを差し込んだ。
- ⑥ アプライするサンプルに等量の 2 \times SDS サンプル buffer を加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間 boiling することによりタンパク質を変性させた。
- ⑦ ウェルにサンプルをアプライし、電気泳動を行った。サンプルが濃縮ゲル中に存在するときは 120 V、分離ゲルに移り次第 200 V に設定を変え、色素マーカーが分離ゲルの下端まできたら泳動を終了した。
- ⑧ 濃縮ゲルを切り取り、ゲルを滅菌水に移し、電子レンジで沸騰する程度まで暖めて振盪器で 1 分間攪拌した。
- ⑨ 滅菌水を交換し、⑧を 2 回繰り返した。
- ⑩ ゲルを染色液に浸し、電子レンジで沸騰する程度まで暖め、振盪器で 5 分間攪拌し、染色を行った。
- ⑪ ゲルを滅菌水に浸して脱色を行った。適宜滅菌水を交換しながら一晩振盪器で攪拌を行った。
- ⑫ 滅菌水で浸したセロファンとゲルの間に気泡が入らないように注意しながらセロファンの上にゲルをのせ、ゲルの上にもう一枚滅菌水で塗らしたセロファンをのせた。
- ⑬ ゲルエアドライヤー (Bio-Rad Lab.)の中にセロファンを挟んだゲルを入れて 3 時間ほど乾燥させた。

4.2.18 ゲノムシーケンス

共同研究先である東京農業大学/生物資源ゲノム解析センター (吉川 博文教授, 松本 貴嗣研究員)の協力によって、illumina 社製次世代シーケンサー Genome Analyzer II を用いて F-1、F-2 株の塩基配列を解析した。

4.3 結果と考察

4.3.1 Perfluorocarboxylic acid 分解菌の単離

1,316 種の土壌、活性汚泥を単離源とし、trifluoroacetic acid (TFA)、pentafluoropropionic acid (PFP)、あるいは heptafluorobutylic acid (HFB)、を終濃度 1.0 mg/ml となるように添加した NMM7 液体培地 (Table 4-1 参照)を用いて集積培養を行った。その結果、PFP 分解菌群候補株を 2 種、HFB 分解菌群候補株を 2 種取得した。得られた 4 種の分解菌群候補株の培養液中の残存 PFP、HFB 量を GC-MS にて、遊離フッ化物イオン濃度をダイキン工業株式会社に委託し、イオンクロマトグラフィーにて測定したが、PFP、HFB の分解は見られなかった。

多置換有機フッ素化合物分解菌を環境中より直接単離することは困難であると考え、機能改変した脱ハロゲン化酵素を用いてそれら化合物を分解する方法に着目し、まず monofluoroacetic acid (MFA)分解菌を単離し、脱ハロゲン化酵素の解析を行うこととした。

4.3.2 MFA 分解菌の単離

300 種の土壌、活性汚泥を単離源とし、終濃度 1.0 mg/ml となるように MFA を添加した NMM7 液体培地を用いて集積培養を行った結果、2 種の分解菌群サンプルを取得した。そこで、終濃度 1.0 mg/ml となるように MFA を添加した NMM7 寒天培地に培養液を塗布し、得られたシングルコロニーを同組成の寒天培地と LB 寒天培地に交互に植え継ぐことで 2 株の分解菌候補株を取得した。得られた分解菌候補株を、再度 MFA を添加した NMM7 液体培地に植菌した後、培地中の残存 MFA 量を測定したところ、培養開始約 48 時間で終濃度 1.0 mg/ml の MFA を GC-MS にて検出限界以下まで分解していることが明らかとなった。得られた 2 株の MFA 分解菌の total DNA を抽出した後、16s rRNA 遺伝子の配列による属種の同定 (Table 4-5)、分子系統解析 (Fig. 4-1)を行った結果、2 株ともに *Burkholderia cenocepacia* に属する細菌であることが示された。そこで、得られた 2 株の MFA 分解菌を、*Burkholderia cenocepacia* F-1、*Burkholderia cenocepacia* F-2 株と命名した。

4.3.3 MFA 分解の経時的なモニタリング

4.3.2 で得られた 2 株の MFA 分解菌を終濃度 1.0 mg/ml で MFA を含む NMM7 培地に植菌し、経時的に OD₆₀₀、残存 MFA 量を測定した結果を Fig. 4-2 に示した。2 株の MFA 分解菌は、MFA を菌体の生育に伴って培養開始 48 時間以内に完全に分解していることが示された。また、培養開始後 72 時間目の培養液のみ、

Table 4-5. 16S rDNA による F-1、F-2 株の属種の同定

菌株名	相同性	上位 3 株の近縁種 ^a
F-1	99.7%	<i>Burkholderia</i> sp. 383 chromosome 1 (CP000152)
	99.7%	<i>Burkholderia</i> sp. 383 chromosome 2 (CP000151)
	99.6%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 chromosome 2 (AM747721)
F-2	99.7%	<i>Burkholderia</i> sp. 383 chromosome 1 (CP000152)
	99.7%	<i>Burkholderia</i> sp. 383 chromosome 2 (CP000151)
	99.6%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 chromosome 2 (AM747721)

^a 括弧内には accession number を示した

シーケンスの比較には大腸菌 16S rRNA 遺伝子の 27~1378 塩基目に相当する部分を用いた



Fig. 4-1. *Burkholderia*属細菌との系統樹

シーケンスの比較には大腸菌16S rRNA遺伝子の27~1378塩基目に相当する部分を用い、アウトグループには大腸菌を用いた。また、系統樹はタイプストレインのみを用いて作製し、分岐部にはブートストラップ値を示した(500以上の結果のみを示した)。

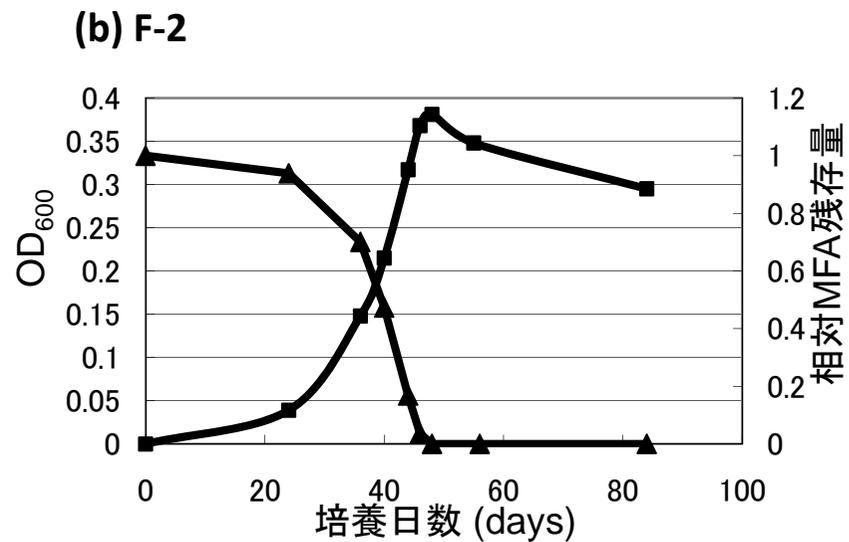
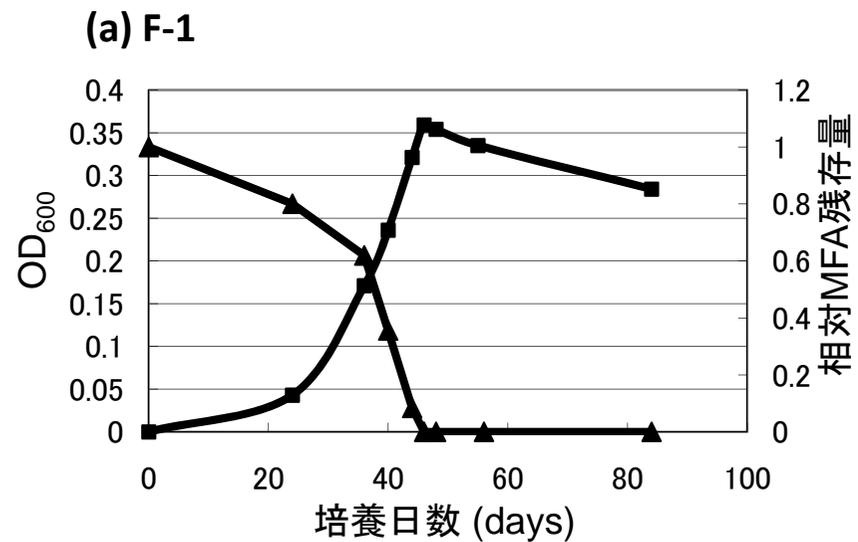


Fig. 4-2. 各MFA分解菌のMFA分解プロフィール

▲ : 相対MFA残存量

■ : OD₆₀₀

相対MFA残存量は培養開始時のMFA量を1として算出した

イオンクロマトグラフィーを用いて培養液中の遊離フッ化物イオン濃度の測定を行った結果、13.2 mM と MFA を完全に分解したときに生じる遊離フッ化物イオン濃度の理論値 (12.8 mM) とほぼ等量の値であることが示された。MFA 分解菌である *Delftia acidovorans* B 株由来の MFA 分解酵素 FAc-DEX H1 は分解産物として glycolic acid を生成することが報告されているが (Liu et al., 1998)、今回行ったモニタリングの過程では、glycolic acid や他の中間代謝物を検出することはできなかった。しかし、後述 4.3.4-4 で詳細に記すが、F-1、F-2 株は、MFA 分解酵素である FAc-DEX H1 と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を持っていることから、MFA 分解産物は glycolic acid であることが強く示唆された。Glycolic acid を検出できなかった原因としては、glycolic acid が菌体内で素早く代謝されてしまうためだと考えられる。今後、代謝物を同定するために、精製した MFA 分解酵素を用いる必要がある。

4.3.4 MFA 分解酵素をコードする遺伝子の同定

F-1 株、F-2 株の MFA 分解酵素をコードする遺伝子を同定するために下記 4 つの実験を行った。

4.3.4-1 縮重 PCR による MFA 分解酵素をコードする遺伝子の増幅

詳細な解析のなされている MFA 分解酵素 *Burkholderia* sp. FA1 株由来の FAc-DEX FA1 と *Delftia acidovorans* B 株由来の FAc-DEX H1 の塩基配列情報をもとに設計した縮重プライマーを用いて、縮重 PCR により MFA 分解酵素をコードする遺伝子の増幅を試みた。設計した縮重プライマー FAc-F1 と FAc-R1 の組み合わせでは約 300 bp の、FAc-F1 と FAc-R2 の組み合わせでは約 670 bp の、FAc-F2 と FAc-R1 の組み合わせでは約 180 bp の、FAc-F2 と FAc-R2 の組み合わせでは約 550 bp の断片が増幅されることが期待されたが、目的遺伝子断片の増幅には至らなかった (Fig. 4-3)。

4.3.4-2 トランスポゾン挿入変異による MFA 分解能を失った菌株の取得

E. coli S17-1 λ pir(pTnMod-OTp'-Gm) と F-1 あるいは F-2 株をフィルター上で接合させることで、MFA 分解能を失った F-2 変異株を 1 株取得した。トランスポゾン内部に存在する Gm カセットの配列の一部を利用してプローブを作製し、サザンハイブリダイゼーションを行った結果、トランスポゾンは 1 ヲ所にしか挿入されていないことが示されたため (Fig. 4-4)、トランスポゾン挿入位置周辺の塩基配列のシーケンス解析を行った。その結果、トランスポゾンは nitrite/sulfite reductase とアノテーションされている遺伝子に挿入されていることが示された。トランスポゾンが挿入されて

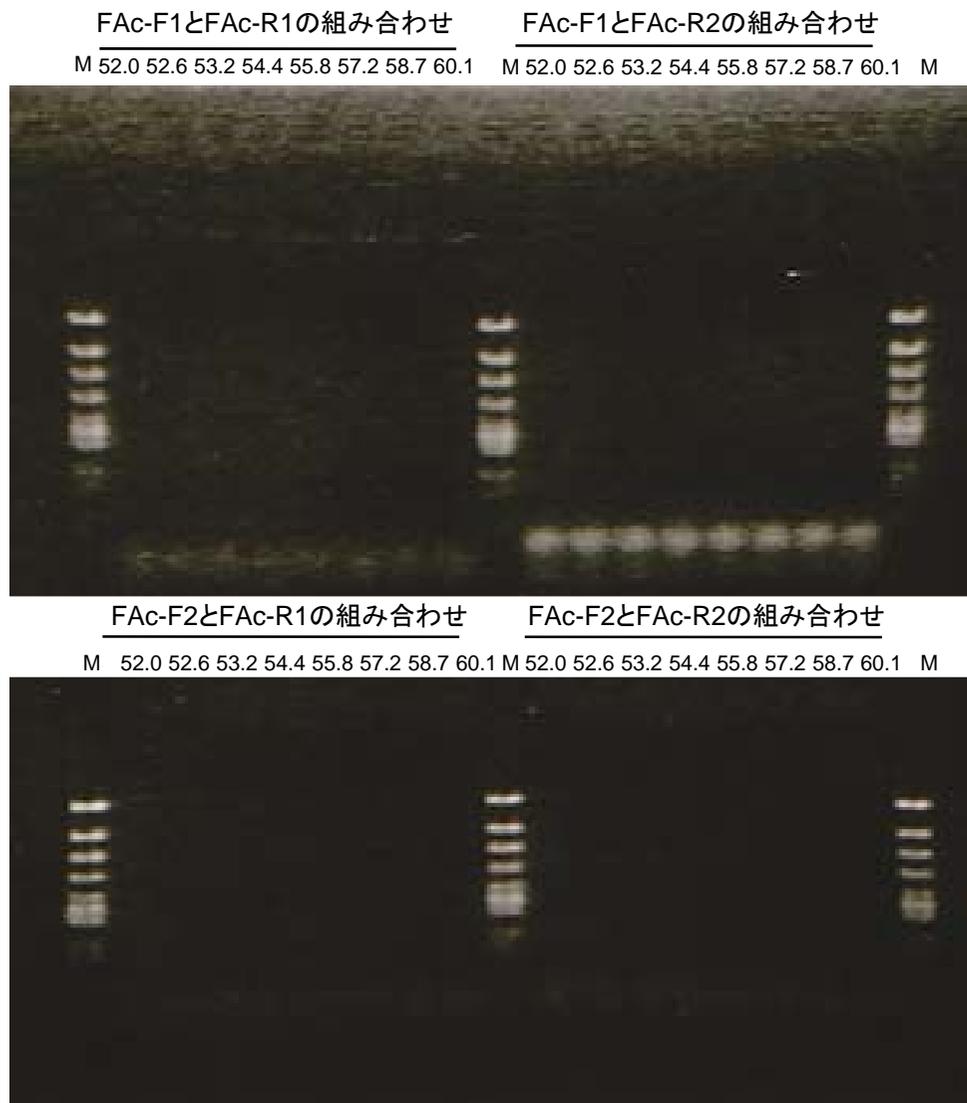


Fig. 4-3. 縮重PCRの結果

Mは ϕ X174/*Hinc* II digestを、
数字はPCRにおけるアニール温度を表している。

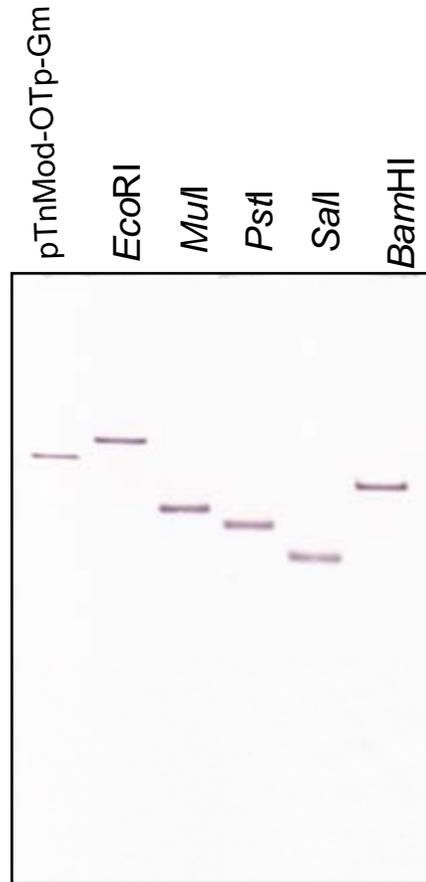


Fig. 4-4. サザンハイブリダイゼーションの結果

pTnMod-OTp'-Gmはポジティブコントロールとして用いた。
制限酵素名は、各制限酵素でF-2変異株のtotal DNAを
処理したことを表している。

いる遺伝子は、MFA 脱フッ素化酵素をコードする遺伝子ではなかったが、トランスポゾンが挿入されたことによる極性効果によって MFA 脱フッ素化酵素をコードする遺伝子の転写が影響を受けている可能性もある。そこで、トランスポゾン挿入位置周辺の塩基配列の解析を行うこととした。その結果、トランスポゾン挿入位置上流約 2 kbp、下流約 2 kbp の合計約 4 kbp には MFA 脱フッ素化酵素をコードする遺伝子は存在しなかった (Fig. 4-5)。Table 4-6 には、Fig. 4-5 中の各 ORF を Blast 検索した結果を示した。しかし、さらに下流に MFA 分解酵素をコードする遺伝子が存在する可能性も考えられるため、引き続き周辺領域の塩基配列の解析を行う必要がある (周辺領域の塩基配列は 4.3.4-4 のゲノムシーケンスにて解析を行った)。

4.3.4-3 F-1 株の total DNA を用いたショットガンクローニング

F-1 株の total DNA を、*EcoRI* を用いて制限酵素処理を行い、pBluescript KS (-) のマルチクローニングサイトにライゲーションした後、*E. coli* DH5 α を形質転換し、得られた形質転換体の MFA 分解活性の測定を行った。その結果、92 株の形質転換体を取得し、得られた形質転換体の MFA 分解活性の測定を行ったが、全ての菌株は MFA 分解能を有していなかった。少数の形質転換体に対しての MFA 分解活性しか測定していないが、同時に行っていたトランスポゾン挿入変異で MFA 分解能を失った変異株を取得したこと (4.3.4-2)、ゲノムシーケンスを行うこと (4.3.4-4) が決定したため、ショットガンスクリーニングはこれ以上行わないこととした。

4.3.4-4 F-1、F-2 株のゲノムシーケンス

F-1、F-2 株の MFA 脱フッ素化酵素をコードする遺伝子を同定するため、共同研究先である東京農業大学/生物資源ゲノム解析センター (吉川 博文教授、松本 貴嗣研究員) の協力によって、illumina 社製次世代シーケンサー Genome Analyzer II を用いて F-1、F-2 両株のゲノムシーケンス解析を行った。その結果、現在までに、F-1 株では、約 466 万リードの解析から 2667 のコンティグが、F-2 株では、約 310 万リードの解析から 2706 のコンティグが形成されている。F-1 株のコンティグに F-2 株のリードをマッピングすると 96.3% の領域がカバーされたことから F-1 株と F-2 株は非常に似ていることが示された。また、ゲノム既知の *Burkholderia* 属細菌、*B. ambifaria* AMMD 株、*B. cenocepacia* AU1054 株、*B. cenocepacia* J2315 株、*B. cenocepacia* HI2424 株、*B. cenocepacia* PC184 株と F-2 株をリファレンスとして F-1 株の ORF 毎のアミノ酸配列を比較した結果を Fig. 4-6 に示した。アミノ酸配列での相同性が非常に高いことから、今後ギャップ

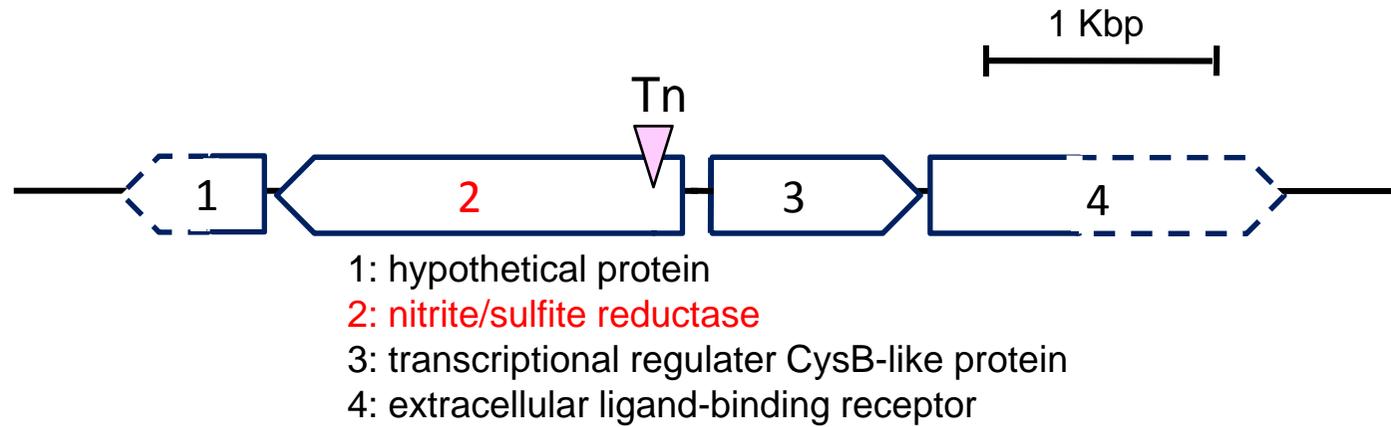
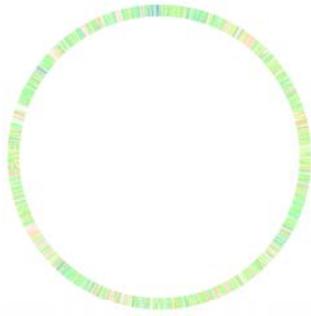


Fig. 4-5. F-2変異株におけるトランスポゾン挿入位置周辺の遺伝子構造

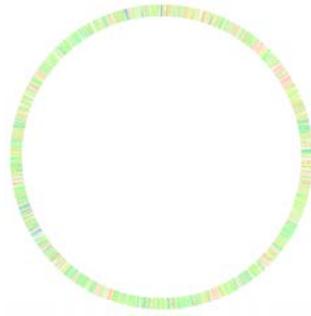
Table 4-6. トランスポゾン挿入位置周辺 (Fig. 4-5 中)の各 ORF を Blast 検索した結果

Fig. 4-5 における ORF 番号	由来	遺伝子名	相同性 (%) 塩基配列レベル
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3		97.6
1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	hypothetical protein	96.8
	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6		96.5
	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6		96.3
2	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	nitrite/sulfite reductase	96.3
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315		95.4
	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD		97.2
3	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	transcriptional regulator CysB-like protein	97.0
	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6		96.8
	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD		96.6
4	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	extracellular ligand-binding receptor	95.6
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315		95.4

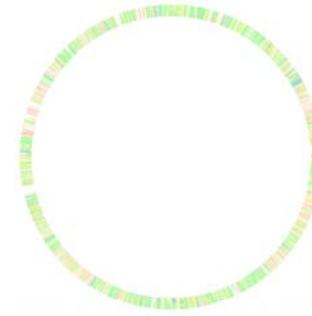
(a) *B. ambifaria* AMMD



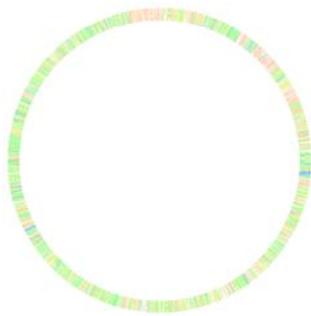
(b) *B. cenocepacia* AU 1054



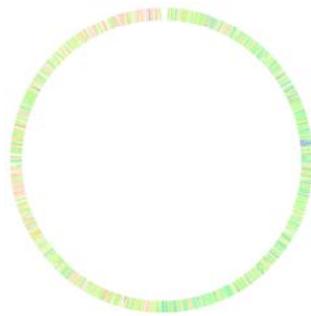
(c) *B. cenocepacia* J2315



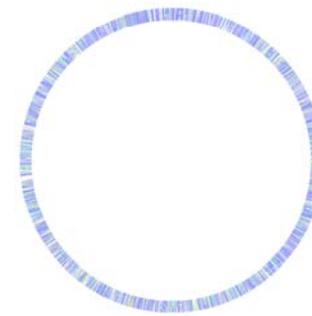
(d) *B. cenocepacia* HI2424



(e) *B. cenocepacia* PC184



(f) *B. cenocepacia* F2



Percent protein sequence identity

Bidirectional best hit	100	99.9	99.8	99.5	99	98	95	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Unidirectional best hit	100	99.9	99.8	99.5	99	98	95	90	80	70	60	50	40	30	20	10

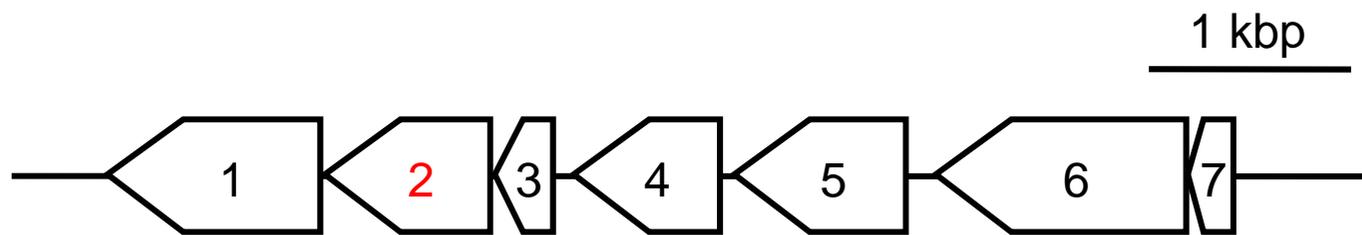
Fig. 4-6. *Burkholderia*属細菌をリファレンスとしてF-1株のアミノ酸配列を比較した結果

を埋める際の有用な情報となる可能性が高い。

F-1株のコンティグに対して既知のMFA分解酵素であるFAc-DEX H1のアミノ酸配列をクエリとしてBlast検索を行った結果、82.5%の相同性を、FAc-DEX FA1のアミノ酸配列をクエリとして検索した結果63.3%の相同性を持つ領域が見出された。F-2株に対しても同様の方法でBlast検索を行ったところ、FAc-DEX H1と82.5%の、FAc-DEX FA1と63.3%の相同性を持つ領域が見出された。F-1、F-2両株の推定MFA脱フッ素化酵素は、塩基配列レベルで完全に一致していた。Fig. 4-7に推定MFA分解酵素をコードする遺伝子周辺の遺伝子構造を、Fig. 4-8にFAc-DEX H1、FAc-DEX FA1とF-1、F-2株が有する推定MFA分解酵素のアミノ酸配列のアライメントを示した（Fig. 4-7中に示した各ORFをBlast検索した結果をTable 4-7に示した）。その結果、基質ポケットを構成するアミノ酸残基、活性に必須であるアミノ酸残基は保存されていることが示された。これより、F-1株、F-2株の持つ推定MFA分解酵素は、FAc-DEX H1と同様に、MFAをglycolic acidに変換していると考えられた。

また、ゲノム解析の結果より、4.3.4.2で示したトランスポゾン挿入位置周辺の遺伝子構造はFig. 4-9に示したようになっていたことが示された（Fig. 4-9中に示した各ORFをBlast検索した結果をTable 4-8に示した）。また、Fig. 4-9より、トランスポゾン挿入位置上流約7 kb、下流14 kbの合計約21 kbの領域に、MFA脱ハロゲン化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。そこで、今後は、nitrite/sulfite reductaseをコードする遺伝子周辺のオペロン構造を同定したのち、各遺伝子の破壊株を作製し、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。

また、MCA分解菌である*Burkholderia cepacia* MBA4株において、脱ハロゲン化酵素をコードする遺伝子である*deh4a*の約350 bp下流にはpermeaseをコードする*deh4p*が存在することが明らかとされている。*deh4p*は*deh4a*とともにオペロンとして転写され、MCAを菌体内に取り込むために必要な酵素であると報告されている。これまでに報告されているMFA分解菌においてpermeaseに関する報告はないが、F-1、F-2両株において*deh4p*と78.9%の相同性を持つ配列が、推定MFA脱フッ素化酵素をコードする遺伝子が存在するコンティグとは別の約8,000塩基で構成されているコンティグに存在していた（Fig. 4-10）。Fig. 4-10(a)における3・3'は、シーケンス解析の結果Nで連結されていたため2つのORFに、

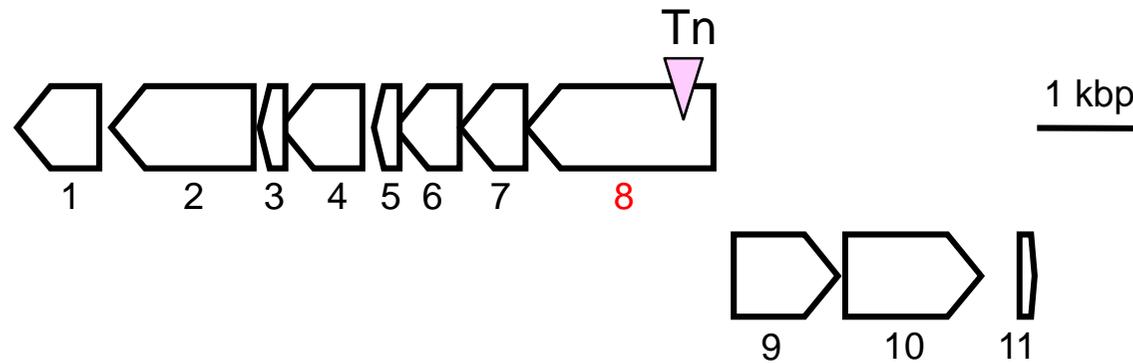


- 1: acyl-CoA dehydrogenase domain protein
- 2: **fluoroacetate dehalogenase**
- 3: hypothetical protein
- 4: hypothetical protein
- 5: hypothetical protein
- 6: putative regulatory protein
- 7: XRE family transcriptional regulator

Fig. 4-7. 推定MFA分解酵素周辺の遺伝子構造

Table 4-7. 推定 MFA 分解酵素をコードする遺伝子周辺 (Fig. 4-7 中)の各 ORF を Blast 検索した結果

Fig. 4-7 における ORF 番号	由来	タンパク質名	相同性 (%)
1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	acyl-CoA dehydrogenase domain protein	75.1
2	<i>Delftia acidovorans</i> pUO1	fluoroacetate dehalogenase	82.5
3	<i>Delftia acidovorans</i>	hypothetical protein	81.0
4	<i>Delftia acidovorans</i>	hypothetical protein	80.5
5	<i>Delftia acidovorans</i>	hypothetical protein	66.4
6	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	putative regulatory protein	93.0
7	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	XRE family transcriptional regulator	62.7



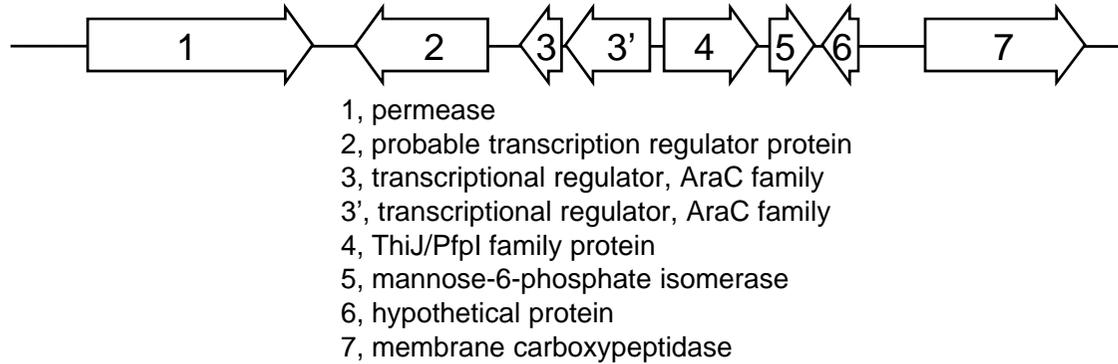
- 1: uroporphyrin-III C-methyltransferase
- 2: sulfate adenylyltransferase, large subunit
- 3: sulfate adenylyltransferase, subunit 2
- 4: sulfate adenylyltransferase, small subunit
- 5: phosphoadenylyl-sulfate reductase
- 6: phosphoadenosine phosphosulfate reductase
- 7: hypothetical protein
- 8: nitrite/sulfite reductase**
- 9: transcriptional regulator CycB-like protein
- 10: extracellular ligand-binding receptor
- 11: hypothetical protein

Fig. 4-9. ゲノム解析より明らかとなったトランスポゾン挿入位置周辺の遺伝子構造

Table 4-8. トランスポゾン挿入位置周辺 (Fig. 4-9 中)の各 ORF を Blast 検索した結果

Fig. 4-9 における ORF 番号	由来	タンパク質名	相同性 (%)
1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	uroporphyrin-III C-methyltransferase	96.4
2	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	sulfate adenylyltransferase, large subunit	97.7
3	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	sulfate adenylyltransferase subunit2	97.7
4	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	sulfate adenylyltransferase small subunit	100
5	<i>Burkholderia cenocepacia</i> PC184	phosphoadenylyl-sulfate reductase	98.6
6	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	99.2
7	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	hypothetical protein	91.7
8	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	nitrite/sulfite reductase	95.8
9	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	transcriptional regulator CycB-like protein	99.4
10	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	extracellular ligand-binding receptor	86.7
11	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	hypothetical protein	71.7

(a) F-1株



(b) F-2株

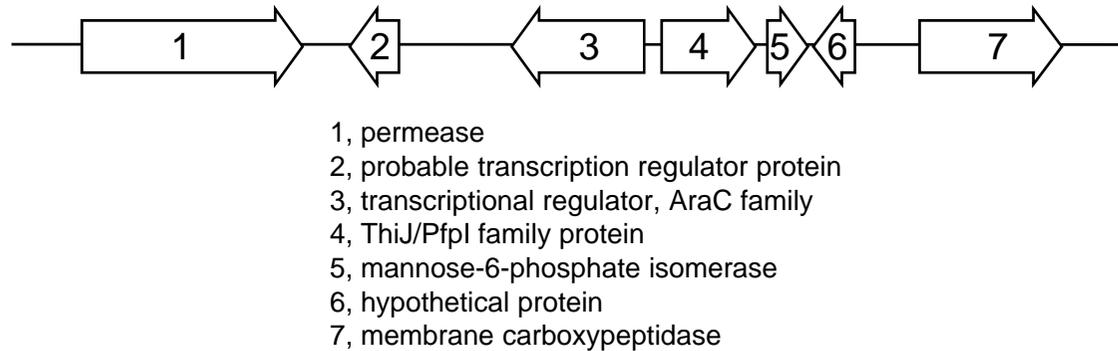


Fig. 4-10. Permeaseであるdeh 4pホモログ周辺の遺伝子構造

(a)における3、3'は、シーケンス解析の結果Nで連結されているために2つのORFに、
(b)における2はNで連結されているためにORFが小さく予測された。

Fig. 4-10 (b)における2は、Nで連結されているためにORFが小さく予測されたと考えている。今後、MFAの菌体内への取り込みに関与する酵素であるか否か解析する必要がある。

4.3.5 推定MFA脱ハロゲン化酵素の発現条件検討

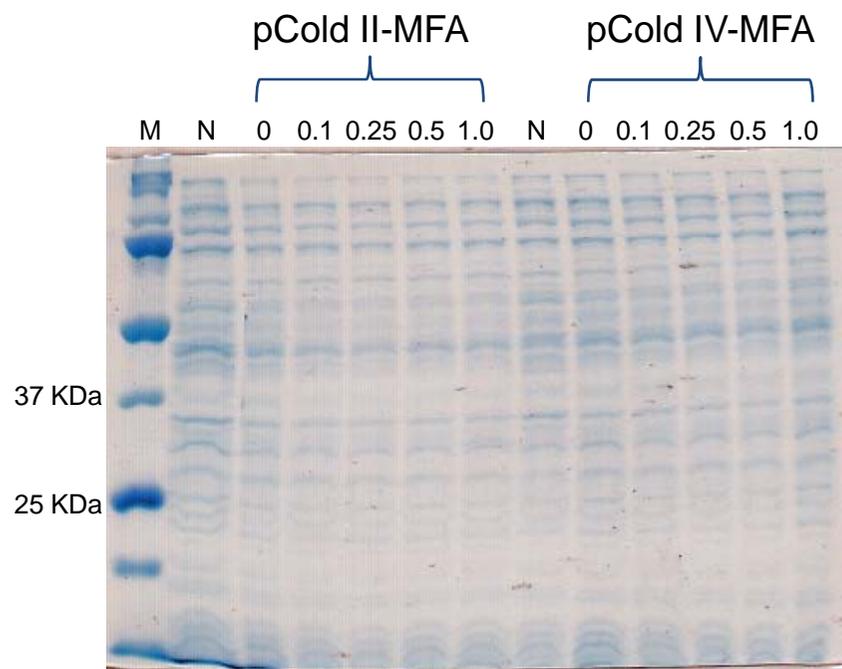
pCold II、pCold IVベクターに、F-2株由来の推定MFA分解酵素遺伝子を挿入したMFA分解酵素発現用プラスミド(pCold II-MFA、pCold IV-MFA)を作製し、*E. coli* BL21(DE3)を形質転換した。OD₆₀₀が0.5となった時点で終濃度が0、0.1、0.25、0.5、1.0 mMとなるようにIPTGを添加することで、発現誘導を行った後SDS-PAGEにて目的タンパク質の発現確認を行った。その結果、いずれの濃度でも可溶性画分には推定MFA分解酵素(約34 kDa)の発現は認められなかった[Fig. 4-11 (a)]。pCold IIベクターに推定MFA分解酵素遺伝子を挿入したMFA分解酵素発現用プラスミドを用いた場合にのみ不溶性画分に推定MFA分解酵素の発現が認められたため[Fig. 4-11 (b)]、pCold II-MFAを用いて形質転換した*E. coli* BL21(DE3)のみ、IPTG終濃度を0.1 mMに固定し、OD₆₀₀が0.3、0.4、0.5に到達した時点でそれぞれ発現誘導を行うことでさらなる条件検討を行った。しかし、可溶化させることはできなかった(Fig. 4-12)。現在、SDS-PAGE上では可溶性画分での発現は認められていないが、粗酵素抽出液でのMFA分解活性を指標に可溶性画分でのMFA分解酵素の発現確認を行うと同時に、シャペロン共発現系での可溶化を試みている。今後、推定MFA分解酵素のMFA分解能が確認されたら、多置換、あるいは長鎖のフッ素化カルボン酸類に対する基質特異性の解析を行うことでパーフルオロカルボン酸分解酵素作出への知見が得られるのではないかと考えている。

まとめと今後の方針

第4章では、菌体濃度の上昇に伴って、MFAを培養開始48時間以内に完全に分解し、理論上MFAの全てのフッ素を脱離させる*Burkholderia cenocepacia*に属する2株のMFA分解菌を単離し、ゲノムシーケンス解析より推定MFA脱フッ素化酵素、monochloroacetic acid (MCA)分解菌である*Burkholderia cenocepacia* MBA4株においてMCAを菌体内に取り込むために必須であるといわれているpermease (*deh 4p* 遺伝子産物)ホモログの存在を見出し、さらに、トランスポゾン挿入変異により、これまでに知られていないMFA代謝に関わる新しい因子が存在する可能性を示した。

今後は、推定MFA脱フッ素化酵素のMFA分解活性を明らかとし、多置換、あるいは長鎖のフッ素化カルボン酸類に対する基質特異性の解析を行うことで、パーフルオロカルボン酸類分解酵素を作出するための基盤情報が得られるので

(a) 可溶性画分



(b) 不溶性画分

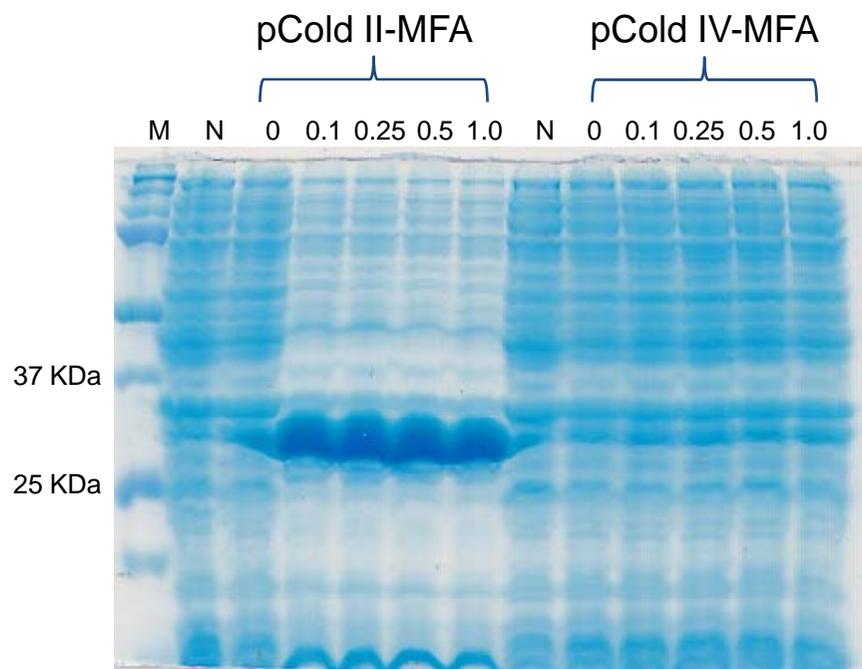


Fig. 4-11. IPTG濃度の検討

Mはマーカ、Nはベクターコントロール、
数字はIPTG終濃度の値を示している。

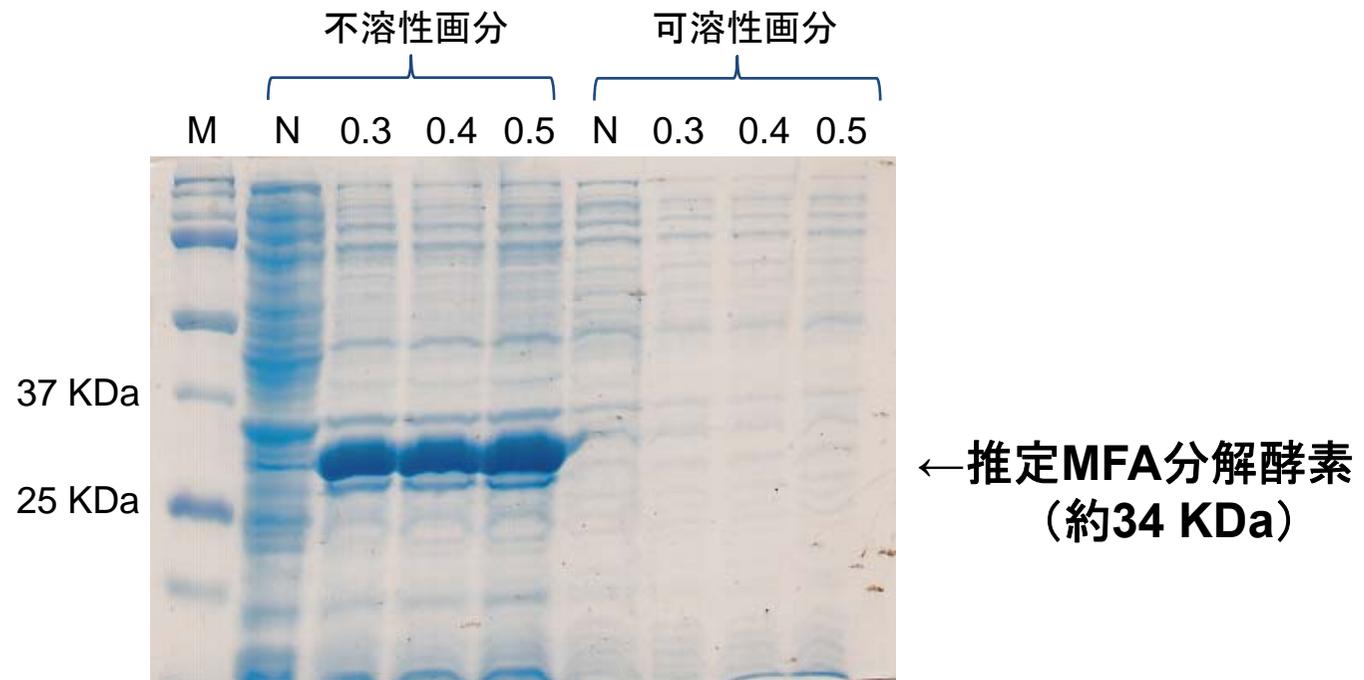


Fig. 4-12. 誘導開始時のOD₆₀₀の検討

Mはマーカー、Nはベクターコントロール、
数字は誘導開始時のOD₆₀₀の値を示している。

はないかと考えている。さらに、本章で見出した推定 MFA 脱フッ素化酵素は、X線結晶構造解析にて立体構造が明らかとなっている既知の MFA 脱フッ素化酵素 FAc-DEX FA1 (Kurihara et al., 2003) と 63.3% の相同性を示しており、基質ポケットを構成するアミノ酸残基、活性に必須であるとされているアミノ酸残基は保存されていることから、基質ポケット周辺のアミノ酸残基に変異を導入し、機能改変した MFA 脱フッ素化酵素を用いて基質特異性の解析を行うことでさらなる知見が得られると考えている。

また、トランスポゾン挿入変異によって得られた MFA 分解能を失った変異株に対して、トランスポゾン挿入位置 (nitrite/sulfite reductase をコードする遺伝子) 周辺のオペロン構造を同定したのち、各遺伝子の破壊株を作製し、未知の MFA 代謝に関わる重要な因子を同定することや、MFA の菌体内への取り込みと *deh 4p* 遺伝子産物の関係を解析することで、MFA 脱フッ素化酵素を実際の汚染環境中で効率よく利用できる知見が得られるかもしれない。

第5章 塩素化芳香族化合物分解菌群の単離と解析

5.1 緒言

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、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約) にて POPs に指定されている hexachlorobenzene (HCB) と、HCB と構造類似な pentachlorophenol (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、芳香環脱ハロゲン化酵素を取得した後、基質特異性の解析を行うことで、芳香環脱ハロゲン化酵素に関する新たな基盤情報を得ることを目的とした。

5.2 材料と方法

本章で使用した試薬の調製は、第 2 章に準じて行った。制限酵素、その他の酵素類は第 2 章と同様のものを使用し、操作はその添付のプロトコールに従って行った。

5.2.1 培地および培養条件

本章で使用した液体培地を Table 5-1 に炭素源として用いた塩素化芳香族化合物を Table 5-2 に示した。培養は、スクリーキャップ式試験管 (5 ml)、スクリーキャップ式バッフル付き三角フラスコ (250 ml)、または、二槽式透析培養器 (50 ml) を用いて、スクリーキャップ式試験管は、300 strokes/min、スクリーキャップ式バッフル付き三角フラスコ、二槽式透析培養器はともに 120 strokes/min の条件で行った。

寒天培地は、各液体培地に対して微生物培養用精製寒天末 (ナカライテスク社製) を 16 g/l となるように加え、オートクレーブを用いて滅菌・溶解し、必要に応じて Table 5-2 に示した塩素化芳香族化合物、抗生物質を添加した後、シャーレに分注したものをを用いた。

5.2.2 単離源としての土壌懸濁液の調製

2.2.2 に準じて行った。

5.2.3 PCP 分解菌の集積培養

下記に示した 3 種類の方法で PCP 分解菌の集積培養を行った。

5.2.3-1 5 ml の培地を用い、1/100 量植菌

PCP (終濃度 100 ppm) が唯一の炭素源・エネルギー源となるように添加された 5 ml の NMM7 液体培地 (Table 5-1 参照) に対し、単離源として 50 μ l の土壌懸濁液 (5.2.2 参照) を加え、25°C で 7 日間培養した。土壌由来の褐色が消失するまで 7 日おきに同組成の新規液体培地に 50 μ l (1/100 量) 植菌することで植え継ぎを行い、土壌由来の褐色が消失した後のサンプルにおいて、PCP 分解活性の測定を行った。

5.2.3-2 200ml の培地を用い、1/5 量植菌

PCP (終濃度 100 ppm) が唯一の炭素源・エネルギー源となるように添加された 200 ml の NMM7 液体培地に対し、単離源として 50 ml の土壌懸濁液を加え、30°C で 21 日間培養した。土壌由来の褐色が消失するまで 21 日おきに同組成の新規液体培地に 50 ml (1/5 量) 植菌することで植え継ぎを行い、

Table 5-1. 本章で使用した液体培地の組成

NMM7		R2A	
Na ₂ HPO ₄	2.2 g	Yeast extract	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g	Peptone	0.5 g
NH ₄ NO ₃	3.0g	Casamino acid	0.5 g
per liter 超純水		Dextrose	0.5 g
上記培地をオートクレーブした後に Fe、Mg、Ca		Soluble starch	0.5 g
成分としてあらかじめ調製しておいた下記に示し		Sodium pyruvate	0.3 g
たミネラルストックを添加した		K ₂ HPO ₄	0.3 g
50 mg/ml FeSO ₄	1 ml	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
100 mg/ml MgSO ₄	1 ml	per liter イオン交換水	
50 mg/ml Ca(NO ₃) ₂	1 ml		
LB		1/3 LB	
Yeast extract	5.0 g	Yeast extract	1.67 g
Bactotryptone	10.0 g	Bactotryptone	3.34 g
NaCl	10.0 g	NaCl	3.34 g
per liter イオン交換水		per liter イオン交換水	

Table 5-2. 本章で用いた塩素化芳香族化合物

試薬	ストック濃度	溶媒
PCP (90%) (東京化成)	10 mg/ml	DMSO
PCP (98%) (Aldrich)	10 mg/ml	DMSO
HCB (99%) (東京化成)	10 mg/ml	Benzene

[試薬]

- ・酢酸エチル
- ・HCB
- ・無水硫酸ナトリウム

[操作]

- ① 測定サンプル 5 ml に対して内部標準物質として 10 mg/ml の HCB を 30 μ l 添加し vortex mixer を用いて攪拌した。
- ② 酢酸エチルを 3 ml を添加し、1 分間 vortex mixer を用いて攪拌した。
- ③ 3000 rpm で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル層を新しい 16×100 mm のガラス製ディスポーザブル試験管に分取した。
- ④ 下層に酢酸エチルを再度 3 ml 添加し、③と同様の条件で遠心分離後、酢酸エチル層に分取した。
- ⑤ 合計 6 ml の分取した酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC-MS 用サンプルとした。
- ⑥ ⑤で調製したサンプル 1 ml をバイアル瓶に移し、GC-MS に供した。測定条件を Table 5-3 に、昇温条件を下記に示した。

80°C で 2 分間保持

↓

16°C/min で 280°C まで昇温

↓

280°C で 3 分間保持

5.2.8 PCP 分解菌群中に存在する PCP 分解菌に対する抗生物質耐性試験

[試薬]

Table 5-4 に示した濃度で各抗生物質高濃度ストックを調製後、0.22 μ m の親水性ポリエーテルスルホンフィルターを用いて滅菌してマイクロチューブへ分注後-30°C で保存した。

[操作]

- ① 終濃度 100 ppm となるように PCP を添加した 4 ml の NMM7 液体培地に、抗生物質を、5 ml の液体培地に対して Table 5-5 に示した終濃度になるように添加した後 1 ml の分解菌群を植菌した。
- ② PCP 分解活性を硝酸銀滴定 (5.2.5 参照)にて測定した。

5.2.9 PCP 分解菌の単離

Table 5-3. GC-MS 測定条件

イオン化電流	200 μ A
イオン化エネルギー	70 eV
検出器電圧	-1300 V
イオン源温度	250 °C
GCITF 温度	250 °C
注入体積	1 μ l
カラム	GL サイエンス社製 Inert Cap 5MS/Sil capillary column

Table 5-4. 本章で使用した抗生物質

試薬	ストック濃度	溶媒
Ap	50 mg/ml	超純水
Cm	30 mg/ml	100%エタノール
Gm	30 mg/ml	超純水
Km	50 mg/ml	超純水
Rif	25 mg/ml	100%エタノール
Sm	50 mg/ml	超純水
Tc	12.5 mg/ml	50%エタノール
Tp	25 mg/ml	超純水

Table 5-5. 培地に添加した抗生物質の終濃度

抗生物質	終濃度 (μg/ml)			
Ap	25	50	100	200
Cm	15	30	60	120
Gm	7.5	15	30	60
Km	25	50	100	200
Rif	12.5	25	50	100
Sm	25	50	100	200
Tc	6.25	12.5	25	50
Tp	12.5	25	50	100

寒天培地を用いて PCP 分解菌群より PCP 分解菌の単離を行った。

- ① PCP 分解菌群を CF buffer で任意の倍率に希釈し、LB、1/3LB、R2A、NMM7 に終濃度 100 ppm となるように PCP を添加した寒天培地、1/3LB、R2A、NMM7 に終濃度 100 ppm となるように PCP を、さらに終濃度 200 µg/ml となるように Ap を添加した寒天培地に塗布し 30 °C の条件下で静置培養した。
- ② 寒天培地上にコロニーの形成を確認した後、同組成の寒天培地に繰り返し植え継ぎを行うことで PCP 分解菌候補株の取得を行った。
- ③ 5 ml の NMM7 に終濃度 100 ppm、50 ppm、10 ppm となるように PCP を添加した液体培地に②で得られた分解菌候補株を、白金耳を用いて植菌した。
- ④ 硝酸銀滴定、GC-MS 分析にて PCP 分解活性の測定を行った。

5.2.10 寒天培地中の残存 PCP 量の測定

直径 6 mm となるようにクリアゾーン形成部と非形成部をコロニーごと打ち抜き、加温することで 5 ml の CF buffer に溶解させた後、ニッポンジーン社製 thermostable β-agarase を 5 µl 添加し、60 °C 下で 30 分アガラーゼ処理を行った。その後、内部標準物質として 10 mg/ml の HCB を 30 µl 加え、5.2.7 と同様の方法で酢酸エチルによる 2 回抽出を行い、GC-MS に供した（測定プログラムは 5.2.7 参照）。

5.2.11 菌体からの total DNA の抽出

2.2.12 に準じて行った。

5.2.12 16S rRNA 遺伝子の増幅

2.2.13 に準じて行った。

5.2.13 アガロースゲルからの DNA の回収

2.2.14 に準じて行った。

5.2.14 DNA の取扱

2.2.15 に準じて行った。

5.2.15 塩基配列の解析

2.2.16 に準じて行った。

5.2.16 PCP 分解酵素をコードする遺伝子の増幅

既知の PCP 分解酵素と類似な酵素を、本章で単離した細菌が持つか否かを確認するため、*pcpB* 相同遺伝子の PCR 増幅を試みた。プライマーには、*Sphingomonas* sp. UG30 株由来 *pcpB* の 373~394 bp に相当する S-PcpB-F1、549~568 bp に相当する S-PcpB-F2 の 2 種のフォワードプライマーと 1114~1136 bp に相当する S-PcpB-R1、1353~1373 bp に相当する S-PcpB-R2 の 2 種のリバースプライマーを、*Burkholderia thailandensis* E264 株由来 *pcpB* の 137~158 bp に相当する B-PcpB-F1、466~485 bp に相当する B-PcpB-F2 の 2 種のフォワードプライマーと 828~848 bp に相当する B-PcpB-R1、1171~1190 bp に相当する S-PcpB-R2 の 2 種のリバースプライマーを用いた。用いたプライマーの塩基配列を Table 5-6 に示した。PCR は以下に示す条件で行った。

<i>Sphingomonas</i> 属細菌由来 <i>pcpB</i>	<i>Burkholderia</i> 属細菌由来 <i>pcpB</i>
94 °C 5 min	94 °C 5 min
94 °C 30 sec	94 °C 30 sec
X °C 30 sec	X °C 30 sec
72 °C 1 min	72 °C 1 min
72 °C 7 min	72 °C 7 min
4 °C Hold	4 °C Hold
X = 60, 60.5, 61, 62, 63.2, 64.4, 65.6, 66.8, 68, 69, 69.5, 70	X = 62.0, 62.4, 62.8, 63.6, 64.5, 65.5, 66.4, 67.4, 68.4, 69.2, 69.6, 70

5.2.17 PCP 分解産物の同定

二槽式透析培養器 (別府フラスコ) を用いて、終濃度 100 ppm となるように PCP を添加した NMM7 液体培地 50 ml で片側にクリアゾーン形成株を、もう片側で PCP 分解菌群を培養した。得られたクリアゾーン形成株を集菌後、5 ml の CF buffer (2.2.2 参照) で懸濁した。菌懸濁液に対して終濃度 100 ppm になるように PCP を添加し、30 °C 条件下でインキュベーションを開始し、7 日おきに GC-MS 分析、硝酸銀滴定を行った。

Table 5-6. PCP 分解酵素遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

B-PcpB-F1	5'-ATTCGCGCGCGATCGGCATCCA-3'
B-PcpB-F2	5'-TGCAGCCGTCGTACGTCGTC-3'
B-PcpB-R1	5'-ACGCGCAGCTTCGCGACCAT-3'
B-PcpB-R2	5'-TTCCGATACTGGATCGCGAG-3'
S-PcpB-F1	5'-ATCTGGAGGCGACCTACAGCT-3'
S-PcpB-F2	5'-GGCATCGCCTATGAAGGCGA-3'
S-PcpB-R1	5'-GCCTGCGTCAATTCGATGCG-3'
S-PcpB-R2	5'-TCGCGCAGCTTCTCCGCTTCC-3'

5.3 結果と考察

5.3.1 PCP 分解菌群の単離

212 サンプルの土壌を単離源として、5.2.3-1 に示した 5 ml の NMM7 液体培地に対し、50 μ l (1/100 量)を新しい同組成の培地に植え継ぎを行う方法で集積培養を行ったが、PCP 分解活性を示すサンプルは得られなかった。原因として、7 日という培養期間の短さ、初期植菌量の少なさ、PCP の毒性の高さから植え継ぎ時の菌体量が少ないと分解菌数が少なくなるために毒性に耐えられない可能性が考えられた。そこで、5.2.3-2 に示したように植菌量を 1/100 量から 1/5 量に、培養期間を 7 日から 21 日に、また、脱塩素活性の測定が複数回可能な様に培養スケールを 5 ml から 250 ml に変更した系で 8 サンプルの土壌を単離源として集積培養を行った結果、PCP 分解活性を示すサンプルを 1 種 (K-1 菌群) 取得することに成功した。K-1 菌群の植え継ぎを行う際、NMM7 培地 4 ml に対して 1 ml の培養液を植菌することで菌群を安定に維持できることが明らかとなったため、以降の PCP 分解菌の集積培養には、5.2.3-3 に示した方法 (NMM7 培地 4 ml、1/5 量植菌、14 日間培養)で行うこととした。5.2.3-3 の方法で、218 サンプルの土壌を単離源として集積培養を行ったところ、9 種の PCP 分解菌群を得ることに成功した。本研究にて得られた PCP 分解菌群を Table 5-7 にまとめた。

5.3.2 HCB 分解菌群の単離

212 サンプルの土壌を単離源として、5.2.4 に示した 5 ml の HCB が唯一の炭素源・エネルギー源となる液体培地に対し、50 μ l (1/100 量)を新しい同組成の培地に植え継ぎを行う方法で集積培養を行ったが、HCB 分解活性を示すサンプルは得られなかった。HCB 分解菌群が取得できなかった原因には、環境中に存在する HCB 分解菌の存在割合が非常に低いことも挙げられるが、PCP 分解菌群の単離でも記したように、培養期間の短さや、初期植菌量の少なさも考えられた。そのため、5.2.3-3 で示した NMM7 培地 4 ml に対して、1/5 量を植菌し、14 日間培養する方法を用いることで今後 HCB 分解菌群を取得できる可能性を高めることができるのではないかと考えている。

5.3.3 PCP 分解の経時的なモニタリング

5.3.1 で得られた計 10 種の各 PCP 分解菌群を同組成の新しい培地に植菌し、経時的に残存 PCP 量、遊離塩化物イオン濃度を測定した結果を Fig. 5-1 に示した。IN-10 菌群は、菌群を安定して維持することができていないため、経時的なモニタリングは行えていないが、他の 9 種の PCP 分解菌群は、GC-MS 分析で

Table 5-7. 本研究にて取得された PCP 分解菌群

サンプリング地	菌群名	取得日	集積培養方法
茨城県竜ヶ崎市	K-1	2009/2/12	5.2.3-2
埼玉県さいたま市	B-8	2009/7/13	5.2.3-3
埼玉県さいたま市	B-4	2009/9/3	5.2.3-3
茨城県取手市	T-3	2009/9/25	5.2.3-3
茨城県取手市	T-15	2009/10/8	5.2.3-3
茨城県取手市	T-21	2009/10/8	5.2.3-3
東京都多摩市	S-19	2010/1/12	5.2.3-3
東京都多摩市	S-21	2010/1/12	5.2.3-3
神奈川県川崎市	IK-25	2010/1/18	5.2.3-3
東京都稲城市	IN-10	2010/2/23	5.2.3-3

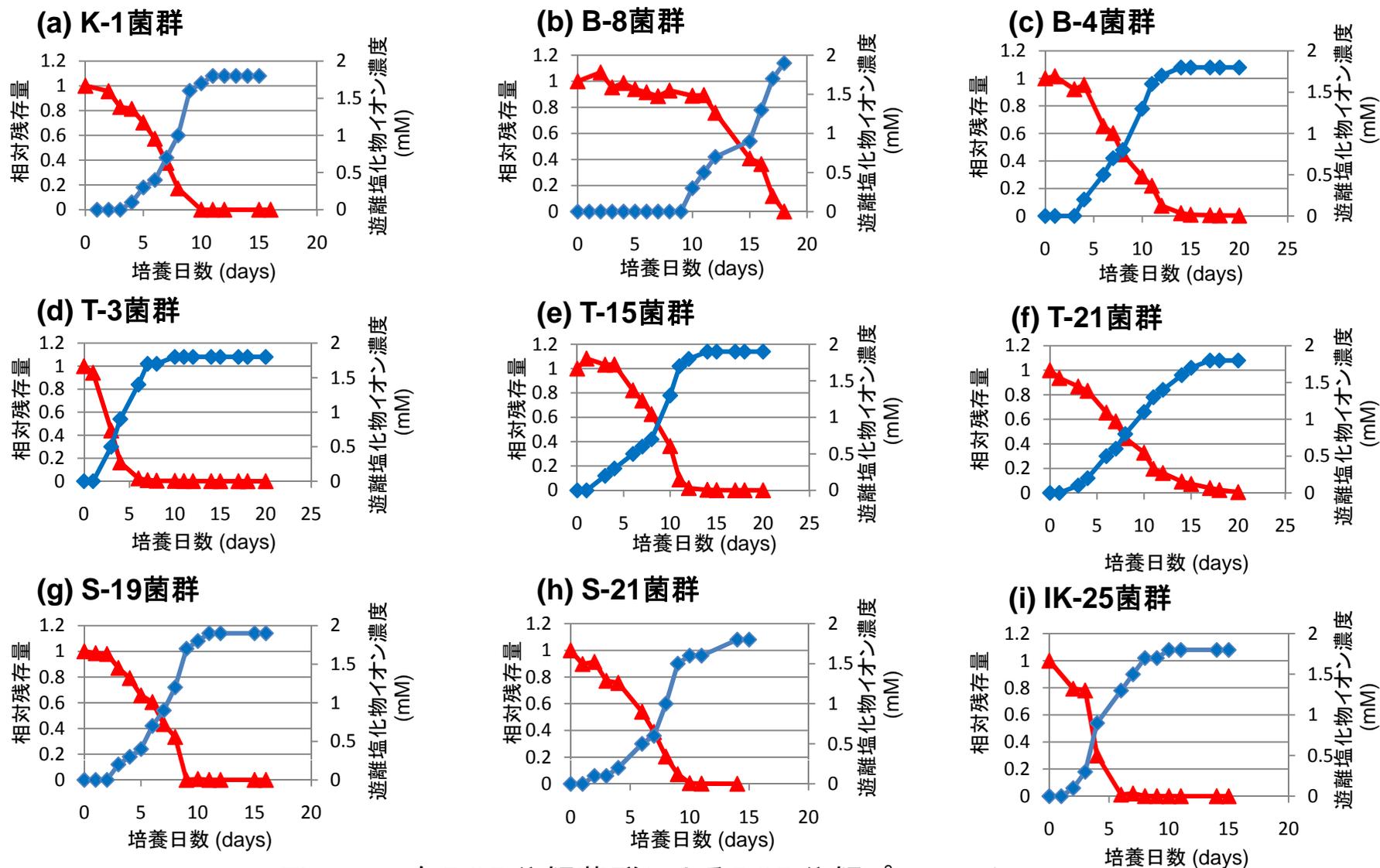


Fig. 5-1. 各PCP分解菌群によるPCP分解プロフィール

▲ : PCP残存量

◆ : 遊離塩化物イオン濃度

相対残存量は、培養開始時のPCP量を1として算出した。

は PCP を完全に分解していること、硝酸銀滴定では、PCP の減少に伴って遊離塩化物イオン濃度が上昇していること、また、PCP の全ての塩素が脱離していることが示された。これまでに、PCP 分解産物としては tetrachloro-*p*-hydroquinone (Schnk et al., 1989) や tetrachloro-*o*-hydroquinone (Nam et al., 2003)等が報告されているが (Table 1-7)、今回モニタリングを行った 9 種の PCP 分解菌群サンプルにおいては中間代謝物を検出することはできなかった。

集積培養初期に取得された K-1 菌群のみ、東京化成工業株式会社製純度 90%PCP (GC-MS による実測値は純度約 85%)を用いて同様の実験 (PCP 分解の経時的なモニタリング)を行った。その結果、K-1 菌群は、純度 85%の PCP 中に含まれる 2,3,5,6-tetrachlorophenol (TeCP)も分解していることが示された (Fig. 5-2)。これまでに、PCP を唯一の炭素源とする培地で生育可能な *Arthrobacter* sp. 33790 株の粗酵素抽出液や *Sphingobium chlorophenolica* ATCC39723 株由来 PcpB 等の塩素化芳香族化合物分解酵素は、基質特異性が広く、TeCP や、2,4,6-trichlorophenol (TCP)等、様々なハロフェノール類を分解することが示されている (Schnk et al., 1989; Xun et al., 1992)。また、TCP を唯一の炭素源とする培地で単離された *Ralstonia pickettii* DTP0602 株においても、より多く塩素置換された PCP や TeCP を分解することが示されている (Kiyohara et al., 1992)。本研究で単離された K-1 菌群が TeCP も分解可能であったことは、K-1 菌群培養液中に存在する芳香環脱ハロゲン化酵素も基質特異性が広いことを示唆している。今後、PCP 分解酵素の基質特異性の解析や、PCP 分解産物を同定するために、K-1 菌群を含むすべての PCP 分解菌群より PCP 分解菌を単離し、さらなる解析を行う必要がある。

5.3.4 PCP 分解に関与する細菌の分離の試み

集積培養初期に単離された K-1 菌群より PCP 分解菌を単離するため、LB、1/3LB、R2A、NMM7 に終濃度 100 ppm となるように PCP を添加した寒天培地に、K-1 菌群培養液を塗布した結果、LB 寒天培地より 1 種の、1/3LB 寒天培地より 2 種の、R2A 寒天培地より 3 種の、NMM7 に PCP を添加した寒天培地より 2 種の形状の異なるコロニーを取得した (Fig. 5-3)。各シングルコロニーの植え継ぎを繰り返し行うことで得た、計 8 種の PCP 分解菌候補株の PCP 分解能を確認するため、PCP が唯一の炭素源・エネルギー源となる NMM7 液体培地に植菌し、PCP 分解活性を測定したが、全ての菌株が PCP 分解能を示さなかった。

そこで、抗生物質を添加し、PCP 分解菌以外の菌体の増殖を抑えることで PCP 分解菌を単離できるのではないかと考え、まず、抗生物質を添加した培地を用

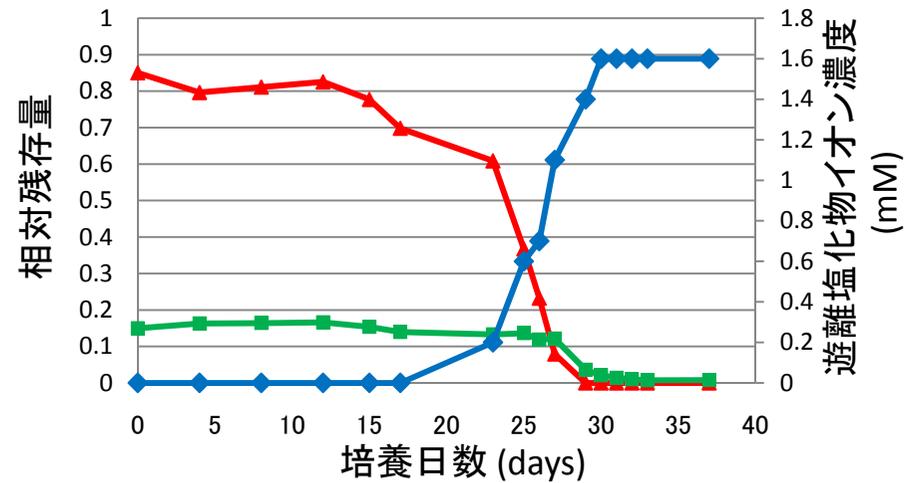
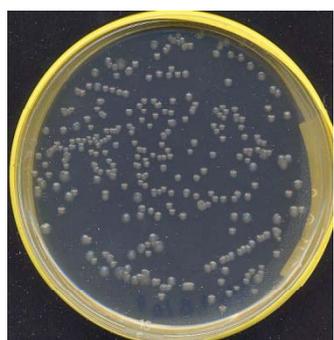


Fig. 5-2. K-1菌群による85%PCP分解プロフィール

- ▲ : PCP残存量
- : TeCP残存量
- ◆ : 遊離塩化物イオン濃度

相対残存量は、培養開始時のPCP量とTeCP量の合計を1として算出した。



(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 5-3. K-1菌群を各寒天培地 (抗生物質無し)に塗布して生育したコロニー
(a): LB, (b) : 1/3LB, (c): R2A, (d): NMM7にPCPを添加

いて K-1 菌群の PCP 分解活性の測定を行った。その結果、K-1 菌群は Ap 存在下においても PCP 分解活性を失わず、理論上全ての塩素を脱離させていることが示された (Table 5-8)。この結果は、K-1 菌群中の PCP 分解菌、あるいは PCP 分解に関与する全ての細菌が Ap 非感受性だが、他の Gm、Km、Sm、Tp には感受性である可能性を示している。なお、Table 5-8 では示されていない Cm と Tc は溶媒として用いているエタノールを資化する菌株が優占化してしまうために、Rif は培地が Rif 由来の赤色に着色してしまい硝酸銀滴定による分解活性の測定が行えないため PCP 分解菌を単離する用途では利用できないことも示された。この結果を受け、形状の異なるコロニーが観察できた 1/3LB、R2A、NMM7 に Ap (終濃度 200 µg/ml) と PCP (終濃度 100 ppm) を添加した寒天培地を作製し、同様の操作を行うことで、異なる 5 株の PCP 分解菌候補株を得たが (Fig. 5-4)、5 株とも PCP を唯一の炭素源・エネルギー源とする液体培地での生育は認められなかった。

次に、PCP の毒性を利用して分解菌以外の菌株の増殖を抑えると同時に、寒天培地を白濁させることで PCP の減少によるクリアゾーンが観察できるのではないかと考え、PCP 懸濁 R2A 寒天培地 (終濃度 1000 ppm) を用いたところ、Fig. 5-5 に示すように、PCP 懸濁 R2A 寒天培地上でクリアゾーンを形成するコロニーの取得に成功した。この結果を受け、他 9 種の分解菌群においても同様に PCP 懸濁 R2A 寒天培地に培養液を塗布した結果、S-19 菌群と T-21 菌群を除く 7 種の菌群培養液よりクリアゾーンを形成するコロニーが観察できた。R2A 寒天培地と PCP 懸濁 R2A 寒天培地に菌群培養液を塗布することで菌群中に存在するクリアゾーンを形成する菌株の割合を算出した結果、Table 5-9 に示したように最大でも R2A 寒天培地で生育する菌株の約 10% という低い値であった。この結果には、R2A 寒天培地で生育できない菌株の数は含まれていないため、DAPI 染色を行い、全菌体数に対するクリアゾーン形成株の割合を算出すると、Table 5-9 に示した割合よりも少なくなると考えられる。

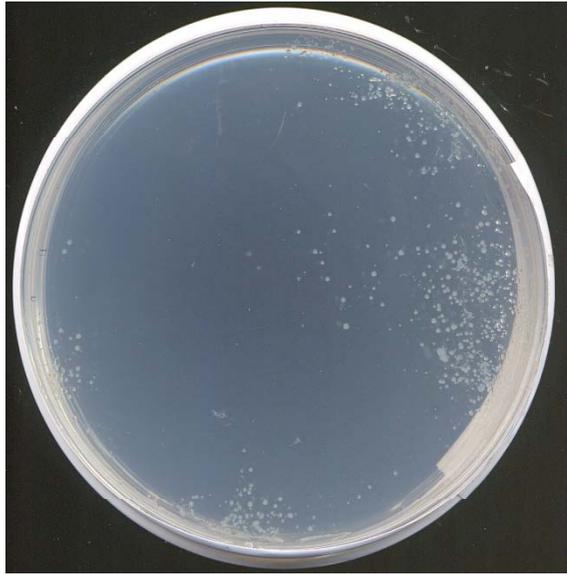
クリアゾーン形成を指標に分解菌の単離を進めた結果、S-19 菌群と T-21 菌群を除く 8 種の分解菌群より計 12 種のクリアゾーン形成株を単離した (Fig. 5-6)。クリアゾーンを形成する 12 株のクリアゾーン形成株の属種の同定を行ったところ 9 株が *Pseudomonas* に、3 株が *Burkholderia* に属する細菌であることが示された (Table 5-10)。さらに、分子系統解析を行ったところ、*Burkholderia seminalis*、*Burkholderia arboris* に近縁関係にある IK-25-1、IN10-1、IK25-1、*Pseudomonas teessidea* に近縁関係にある B-8-1、B-8-2、*Pseudomonas panipatensis* に近縁関係にある B-4-1、B-4-2、IK25-2、K-1、T-3、T-15、S-21 の 3 つのグループに大別できることが示された (Figs. 5-7 and 5-8)。S-19 菌群と T-21 菌群に関しては、培養液を PCP 懸濁 R2A 寒天培地に塗

Table 5-8. 抗生物質耐性試験

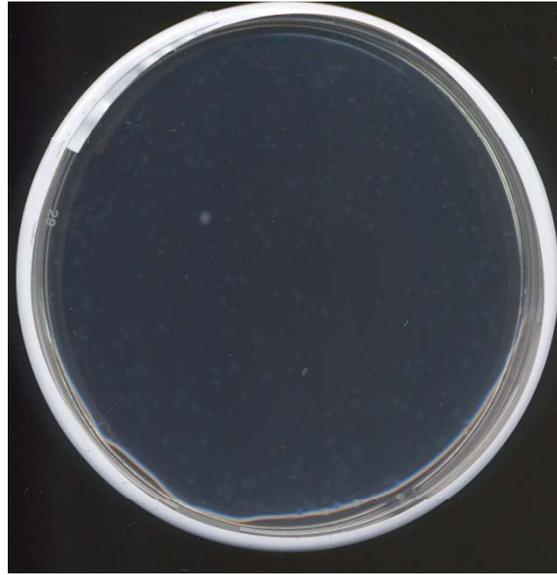
Ap	25	50	100	200
	+	+	+	+
Gm	7.5	15	30	60
	-	-	-	-
Km	25	50	100	200
	-	-	-	-
Sm	25	50	100	200
	-	-	-	-
Tp	12.5	25	50	100
	-	-	-	-

+: 硝酸銀滴定にて PCP 分解活性有
(理論上全ての塩素を脱離)

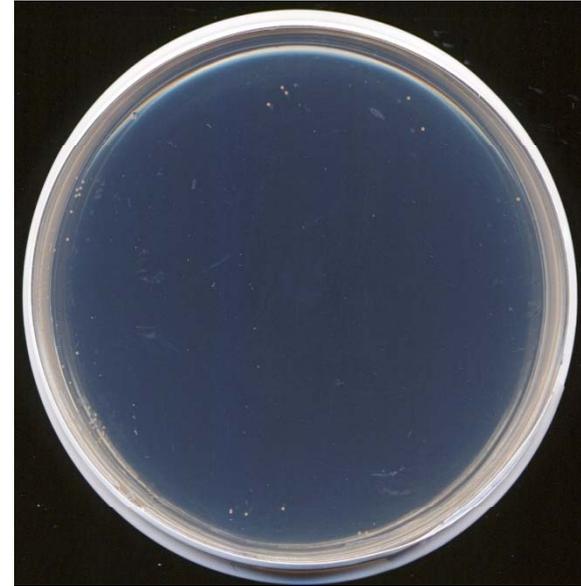
-: 硝酸銀滴定にて PCP 分解活性無



(a)



(b)



(c)

Fig. 5-4. K-1菌群を各寒天培地 (抗生物質有り)に塗布して生育したコロニー
(a): 1/3LBにApとPCPを添加 ,(b): R2AにApとPCPを添加, (c): NMM7にApとPCPを添加

Table 5-9. PCP 分解菌群中に存在するクリアゾーン形成株の割合

菌群名	クリアゾーン形成株
K-1	5%以下
B-4	5%以下
B-8	5×10^{-3} %以下
T-3	10%以下
T-15	5%以下
S-21	5%以下
IK-25	5×10^{-3} %以下

クリアゾーン形成株の割合は、各菌群培養液を PCP 懸濁 R2A 寒天培地、R2A 寒天培地上にそれぞれ塗布することで算出した CFU/ml の割合を示している



Fig. 5-5. K-1菌群をPCP懸濁R2A寒天培地に塗布して
生育したクリアゾーン形成を伴うコロニー



(a) K-1



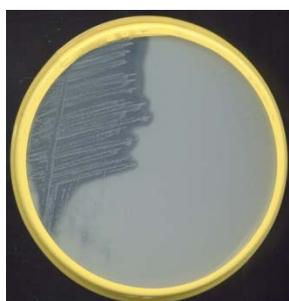
(b) B-4-1



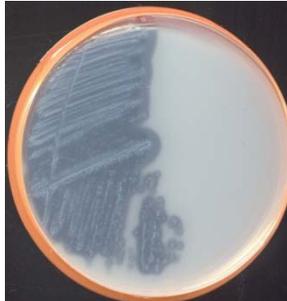
(c) B-4-2



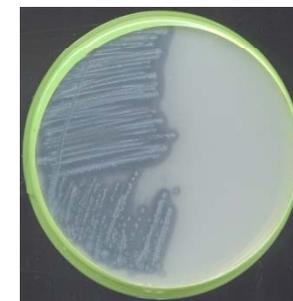
(d) B-8-1



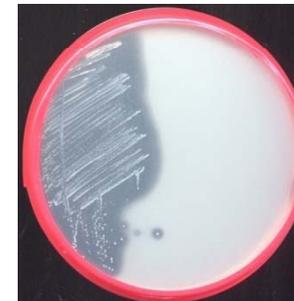
(e) B-8-2



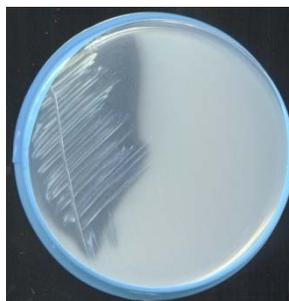
(f) T-3



(g) T-15



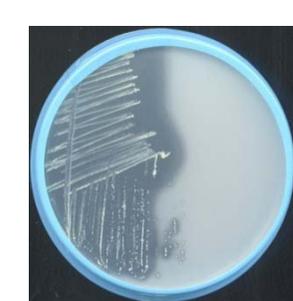
(h) S-21



(i) IK25-1



(j) IK25-2



(k) IK25-3



(l) IN-10

Fig. 5-6. 12株のクリアゾーン形成株

Table 5-10. 16S rRNA による属種の同定

菌株名	相同性	上位 2 株の近縁種 ^a
K-1	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. F25 (DQ127532)
	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. P400Y-1 (AB076857)
B-4-1	99.9%	<i>Pseudomonas</i> sp. WAI-21 (AY520572)
	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. F25 (DQ127532)
B-4-2	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. WAI-21 (AY520572)
	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. F25 (DQ127532)
B-8-1	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1 (CP000094)
	99.9%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Mc07 (EF672049)
B-8-2	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1 (CP000094)
	99.9%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Mc07 (EF672049)
T-3	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. FP1-3 (DQ118952)
	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. AT (AM088476)
T-15	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. GD (EU233276)
	99.7%	<i>Pseudomonas</i> sp. J12 (EU099378)
S-21	99.9%	<i>Pseudomonas azelaica</i> (AM088475)
	99.6%	<i>Pseudomonas</i> sp. FP1-3 (DQ118952)
IK-25-1	99.8%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 (CP000458)
	99.7%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 (CP000378)
IK-25-2	99.8%	<i>Pseudomonas</i> sp. WAI-21 (AY520572)
	99.6%	<i>Pseudomonas</i> sp. F25 (DQ127532)
IK-25-3	99.8%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 (CP000458)
	99.7%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 (CP000378)
IN-10	99.8%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 (CP000458)
	99.8%	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 (CP000378)

^a 括弧内には accession number を示した。

シーケンスの比較には大腸菌 16S rRNA 遺伝子の 27~1378 塩基目に相当する部分を用いた



Fig. 5-7. *Burkholderia*属細菌との分子系統樹

シーケンスの比較には大腸菌16S rRNA遺伝子の27~1378塩基目に相当する部分を用いた。

アウトグループには大腸菌を用いた。

また、系統樹はタイプストレインのみを用いて作製し

分岐部にはブートストラップ値を示した (500以上の結果のみを示した)。

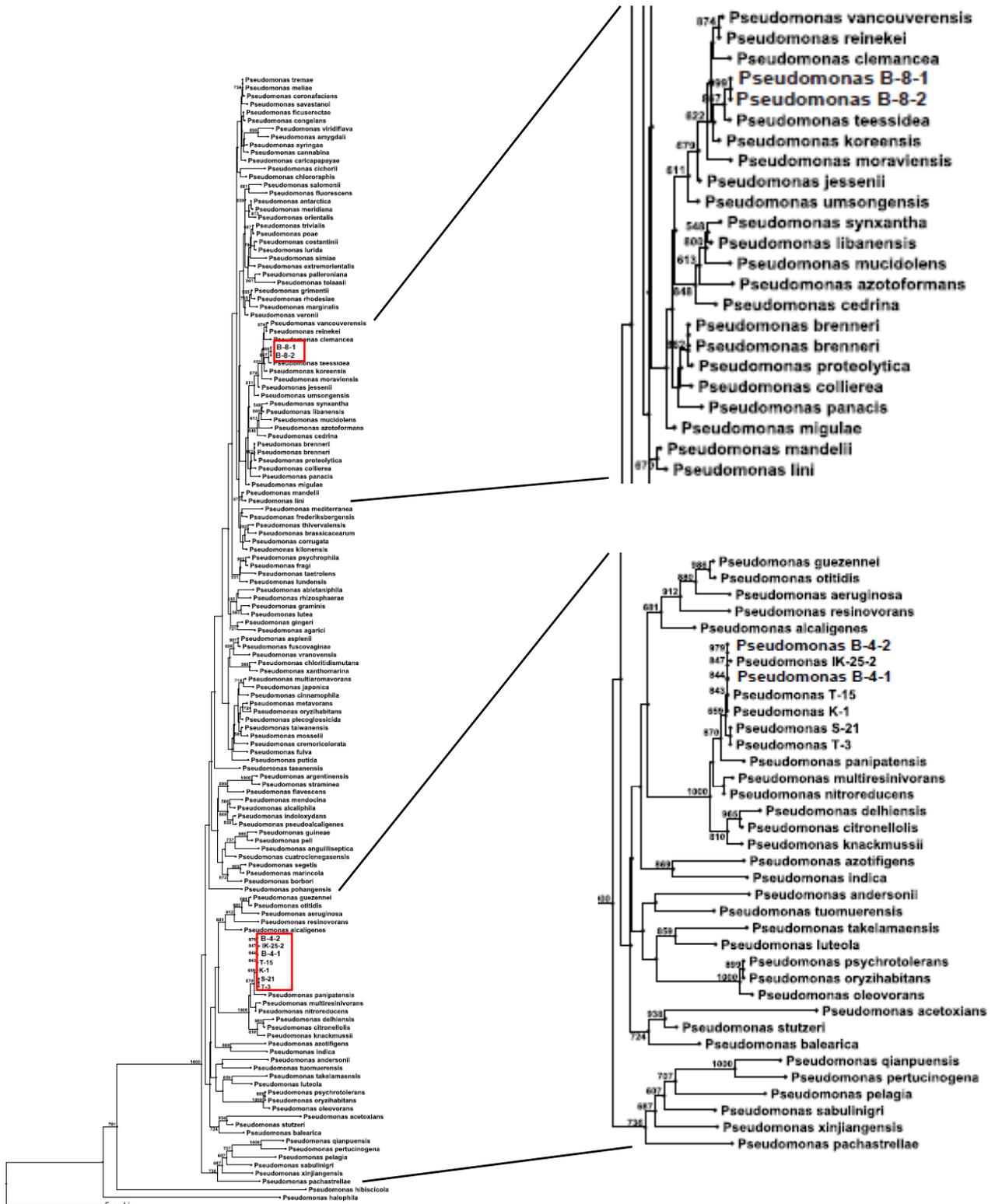


Fig. 5-8. *Pseudomonas*属細菌との分子系統樹

シーケンスの比較には大腸菌16S rDNA遺伝子の

27~1378塩基目に相当する部分を用いた。

アウトグループには大腸菌を用いた。

また、系統樹はタイプストレインのみを用いて作製し

分岐部にはブートストラップ値を示した(500以上の結果のみを示した)。

布しても菌体の生育が見られなかった。これは、高濃度の PCP が原因であると考えられるため、今後、これら 2 種の菌群からは LB や R2A 寒天培地を用いて分解菌を取得する必要がある。

得られたクリアゾーンを形成する 12 株の PCP 分解活性を確認するため、これまで同様 PCP を唯一の炭素源・エネルギー源とする NMM7 液体培地に植菌し、PCP を資化するか否か検討したが、PCP 資化能は示さなかった。この結果は、クリアゾーンを形成する 12 株は、本章で単離した PCP 分解菌群中における PCP 分解経路の最初の数段階のみを担っている可能性を示唆している。しかし、PCP 懸濁 R2A 寒天培地上のクリアゾーンは、PCP が菌体へ吸着したことによって観察された可能性も考えられる。そこで、PCP 懸濁 R2A 寒天培地上のクリアゾーンが PCP の分解によるものか、菌体に吸着することで減少しているのかを確認するため、分子系統解析により大別された 3 種のグループの代表株 IK25-1、B-4-1、B-8-1 において、コロニーを含むように寒天培地を打ち抜き、クリアゾーン形成部と非形成部の PCP 残存量を GC-MS にて測定した。その結果、B-4-1、B-8-1 にて若干の PCP 減少の傾向は見られるものの、GC-MS サンプル調製時の抽出時の誤差や菌体の吸着による PCP の減少を否定することはできなかった (Fig. 5-9)。そのため、PCP 懸濁 R2A 寒天培地上でクリアゾーンを形成する菌株が PCP 分解菌であるか否かを、PCP 分解産物を同定すること、既知の PCP 分解酵素と類似な酵素を持つかどうかを解析することによって確認することとした。

5.3.5 クリアゾーン形成株の PCP 分解能の確認

5.3.5-1 PCR による既知 PCP 分解酵素をコードする遺伝子の増幅

クリアゾーンを形成する 12 株が、既知の PCP 分解酵素をコードする遺伝子を持つか確認するため、Table 5-6 に示したプライマーを用いて、分子系統解析により大別された 3 種のグループの代表株 IK25-1、B-4-1、B-8-1 の total DNA をテンプレートに、既知の PCP 分解酵素をコードする遺伝子を増幅するための PCR を行った。その結果、用いたプライマーセットにより Table 5-11 に示した遺伝子断片が増幅することが期待されたが、目的遺伝子断片の増幅には至らなかった (Figs. 5-10、Fig. 5-11、Fig. 5-12)。

5.3.5-2 PCP 分解産物の同定

これまでの結果より、仮に、クリアゾーン形成株が PCP 分解菌であったとしても、PCP を唯一の炭素源・エネルギー源とする培地で生育しないことから、クリアゾーン形成株は、PCP は分解するが、PCP 分解産物を代謝できない可能性が高い。そこで、二槽式透析培養器 (別府フラスコ)を用いて、クリ

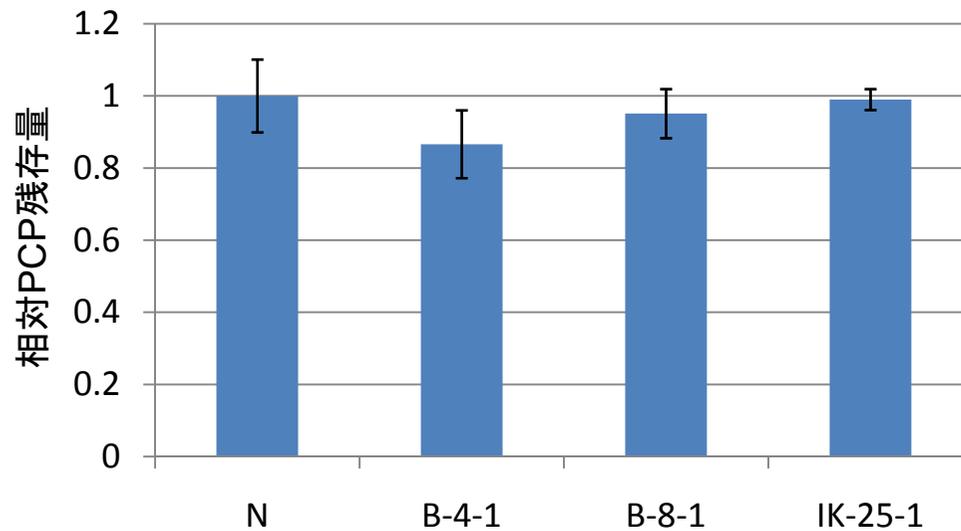


Fig. 5-9. 寒天培地中の残存PCP量

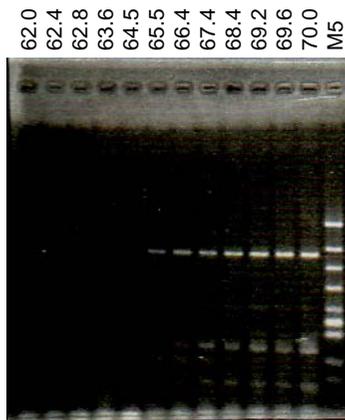
Nはネガティブコントロールを表している。

相対PCP残存量はネガティブコントロールにおける定量値の平均を1として算出した。

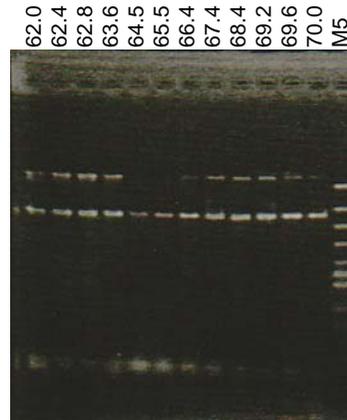
Table 5-11. 各プライマーセットを用いた場合に増幅が期待される遺伝子断片

フォワードプライマー	リバースプライマー	目的遺伝子断片の長さ (bp)
S-PcpB-F1	S-PcpB-R1	700
S-PcpB-F1	S-PcpB-R2	1000
S-PcpB-F-2	S-PcpB-R1	580
S-PcpB-F-2	S-PcpB-R2	820
B-PcpB-F1	B-PcpB-R1	700
B-PcpB-F1	B-PcpB-R2	1050
B-PcpB-F-2	B-PcpB-R1	380
B-PcpB-F-2	B-PcpB-R2	720

(a) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約700 bp



(b) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約1050 bp



(c) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約380 bp



(d) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約720 bp

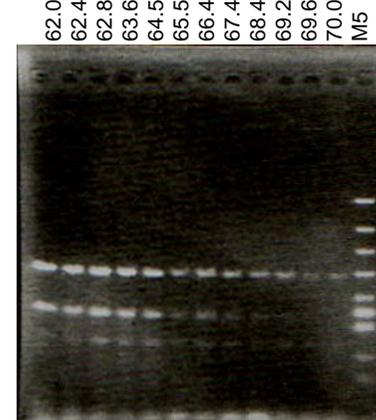
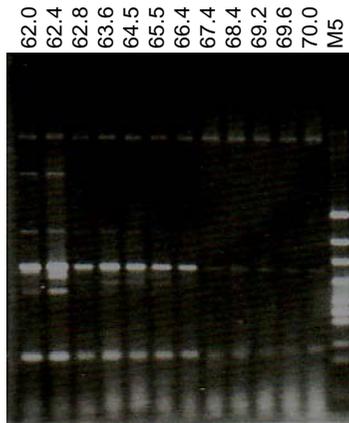


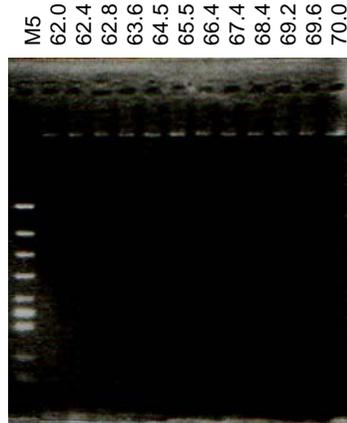
Fig. 5-10. IK-25-1株のtotal DNAをテンプレートに用いて*Burkholderia*属細菌由来*pcpB*に類似の配列をPCRによって増幅した結果

M5は ϕ X174/*Hinc* II digestを、
数字はPCRにおけるアニール温度を表している。

(a) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約700 bp



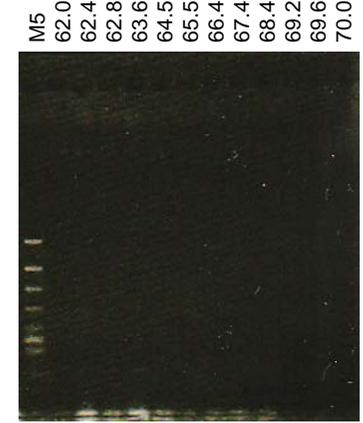
(b) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約1050 bp



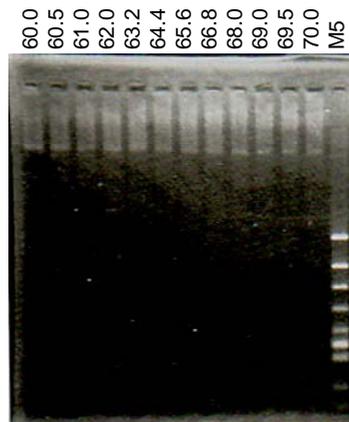
(c) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約380 bp



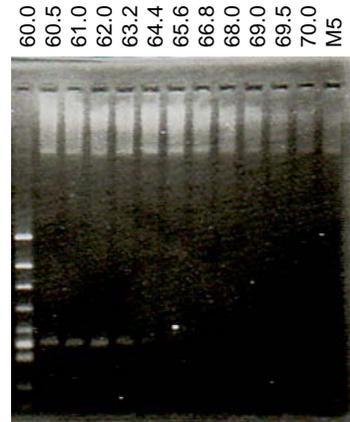
(d) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約720 bp



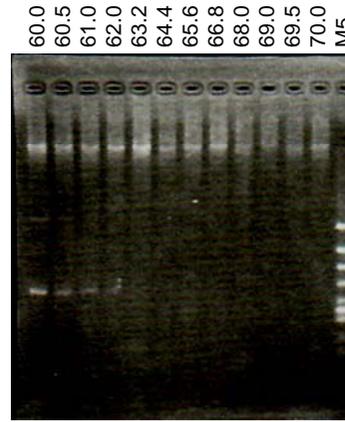
(e) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約700 bp



(f) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約1000 bp



(g) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約580 bp



(h) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約820 bp

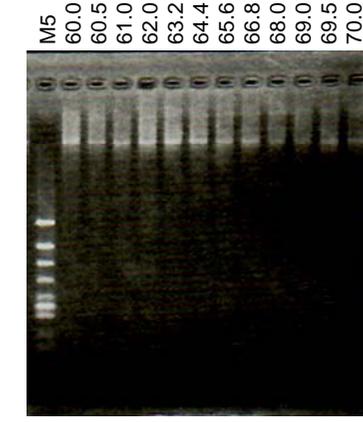
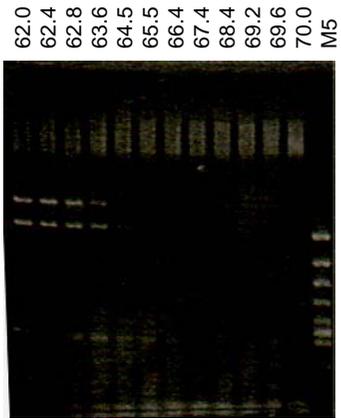
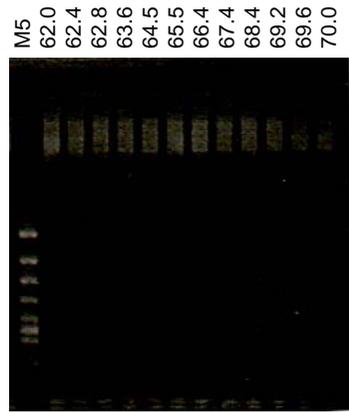


Fig. 5-11. B-4-1株のtotal DNAをテンプレートに用いて*Burkholderia*属細菌由来*pcpB*、*Sphingomonas*属細菌由来の*pcpB*の類似配列をPCRによって増幅した結果
M5は ϕ X174/*Hinc* II digestを、
数字はPCRにおけるアニール温度を表している。

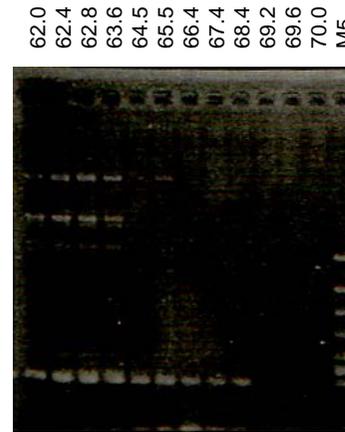
(a) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約700 bp



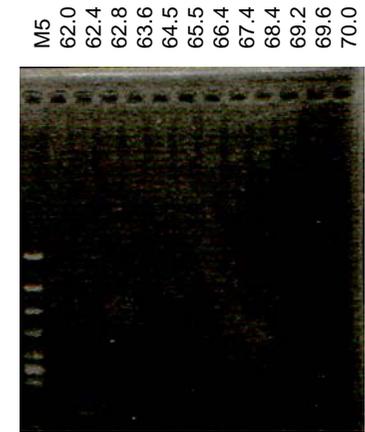
(b) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約1050 bp



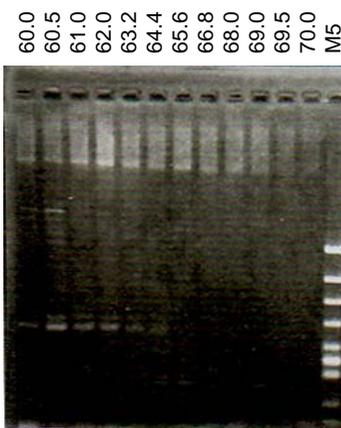
(c) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約380 bp



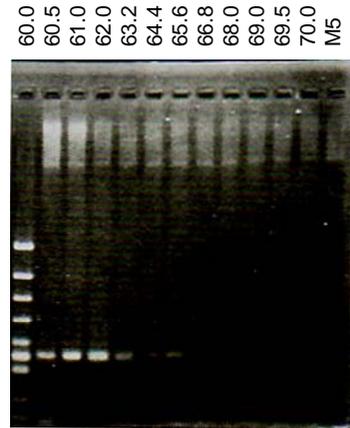
(d) B-PcpB-F1とB-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約720 bp



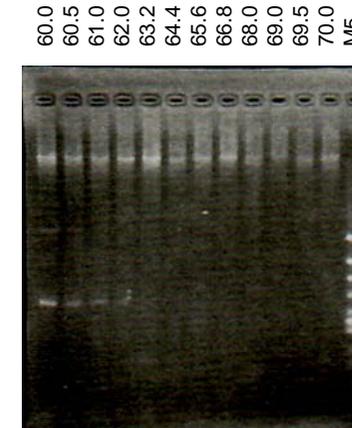
(e) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約700 bp



(f) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約1000 bp



(g) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約580 bp



(h) S-PcpB-F1とS-PcpB-R1
目的遺伝子断片:約820 bp

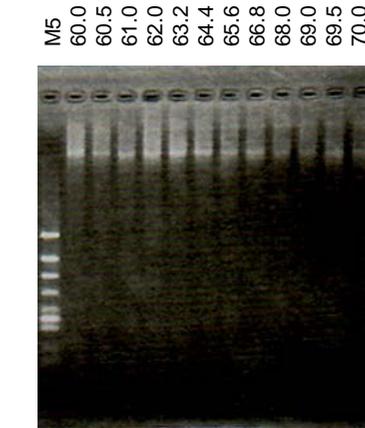


Fig. 5-12. B-8-1株のtotal DNAをテンプレートに用いて*Burkholderia*属細菌由来*pcpB*、*Sphingomonas*属細菌由来の*pcpB*の類似配列をPCRによって増幅した結果
M5は ϕ X174/*Hinc* II digestを、
数字はPCRにおけるアニール温度を表している。

アゾーン形成株のみを分離して培養し、得られた菌体を回収して PCP を基質とした休止菌体反応を行うことで、PCP 分解能の確認を行うと同時に PCP 分解産物の同定を試みた。

二槽式透析培養器での培養は、片側に終濃度 100 ppm となるように PCP を添加した NMM7 液体培地に S-21 分解菌群を、もう一方に同組成の液体培地に S-21 株を植菌し、30°C 下で 3 週間培養を行った。

二槽式透析培養器を用いて S-21 株の培養を行った菌群、S-21 株それぞれの培養液の OD₆₀₀ の変化を Table 5-12 に示した。また、S-21 株の培養液を PCP 懸濁 R2A 寒天培地に塗布したところ、クリアゾーンを形成するコロニーが観察された (data not shown)。

二槽式透析培養器を用いることで、由来する菌群と物質的なやり取りを確保しつつ S-21 株の分離培養が可能であることが示されたため (分解菌であれば、その活性を保ちつつ生育している可能性が高いと予想できる)、現在、5.3.4 で代表株とした IK25-1、B-4-1、B-8-1 株の培養を試みると同時に、S-21 株培養液を集菌した後 5 ml の CF buffer で再懸濁することによって得た濃縮 S-21 株懸濁液を用いて、PCP 分解活性の測定 (PCP 分解産物の同定)を行っている。

まとめと今後の方針

第 5 章では、終濃度 100 ppm の PCP を完全に分解し、PCP の全ての塩素を脱離させる 10 種の PCP 分解菌群を得た。これまでに、PCP 分解菌候補株として PCP 懸濁 R2A 寒天培地上でクリアゾーンを形成する菌株を 12 株単離しているが、現状では、PCP の減少が PCP 分解によるものか菌体への吸着によるものなのか、最終的な結論は出ていない。そこで、今後は、クリアゾーン形成株が PCP 分解菌であるかを確認するため、まずクリアゾーン形成株の PCP 分解能、さらには PCP 分解産物を二槽式透析型培養機を用いて明らかとすると共に、クリアゾーンを形成しているコロニーのみの懸濁液を作製し、懸濁液中の PCP 量を分析することによって菌体への吸着の有無を確認することが必要となる。

本章で単離したクリアゾーン形成株は、これまでに PCP 分解菌として報告されている *Pseudomonas* (Nam et al., 2003) や *Burkholderia* (Karns et al., 1983) に属する細菌であるが、これらの菌株は *Sphingobium* 属細菌 (Su et al., 2008; Huang et al., 2008) とは異なり詳細な解析はなされていない (Fig 1-7)。今後、クリアゾーン形成株が PCP 分解菌であることを明らかとし、基質特異性の解析などの詳細な解析を行うことで、芳香環脱ハロゲン化酵素に関する新たな基盤情報を得られるのではないかと考えている。

Table 5-12. 二槽式透析培養器を用いた培養を行った菌群、S-21 株それぞれの培養液の OD₆₀₀

	培養開始時の OD ₆₀₀	3 週間培養時の OD ₆₀₀
S-21 株	0.007	0.049
分解菌群	0.062	0.107

第6章 総括と展望

本研究では、環境汚染物質の中でも残留性有機汚染物質 [Persistent Organic Pollutants (POPs)] と呼ばれ、近年、特に注目されている汚染物質群に着目し、POPs 汚染の改善を目的とする条約 (通称、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した。

第2章では、dieldrin (DIL) で汚染した堆肥を作製し、DIL 分解菌を優占化させることで、*Geobacillus* に属する DIL 分解菌 DIL-1 株を単離することに成功した。DIL-1 株は、液体培地では旺盛に生育せず DIL 分解活性は示さないものの、DIL 懸濁 1/3LB 寒天培地 (終濃度 300 ppm)、endrin (END) 懸濁 1/3LB 寒天培地 (終濃度 300 ppm) 上でクリアゾーンを形成し、インキュベート開始から 20 日で寒天培地中の DIL を約 75%、END を約 90% 分解することを明らかとした。また、DIL-1 株の持つドリリン系農薬分解能は DIL-1 株特有のものでなく一部の *Geobacillus* 属細菌に共通の性質であり、*G. jurassicus*、*G. toebii*、*G. thermoglucosidasius* が明瞭なクリアゾーンを、*G. caldoxyliticus* が微弱なクリアゾーンを形成し分解力を有することを示した。

第3章では、*Burkholderia* に属する 5 株の monochloroacetic acid (MCA) 資化菌を単離した。得られた 5 株は共に、MCA の他に、monobromoacetic acid、monoiodoacetic acid、(S)-2-monochloropropionic acid を生育基質として利用可能であること、また、CL-1、CL-2 株に関しては生育基質として利用できない dichloroacetic acid も分解可能であることを示した。さらに、5 株の持つ脱ハロゲン化酵素 (Deh_{CL}) の部分配列の解析を行った結果、*Pseudomonas* sp. CBS-3 株由来の DehCI (Schneider et al., 1991) と 74.6% と高い相同性を示し、これまでに報告されている基質ポケットを構成するアミノ酸残基、活性に必須なアミノ酸残基 (Ridder et al., 1997) は全て保存されていることを示した。

第4章では、*Burkholderia cenocepacia* に属する 2 株の MFA 資化菌を単離し、ゲノムシーケンス解析より、既知の MFA 脱フッ素化酵素 FAc-DEX H1 と 82.5% の、*Burkholderia cepacia* MBA4 株において monochloroacetic acid

を菌体内に取り込むために必須であるといわれている permease (*deh 4p* 遺伝子産物)と 78.9%の相同性を持つ配列見出し、さらに、トランスポゾン挿入変異により、これまでに知られていない MFA 代謝に関わる新しい因子が存在する可能性を示した。

第 5 章では、終濃度 100 ppm の pentachlorophenol (PCP)を完全に分解し、PCP の全ての塩素を脱離させる 10 種の PCP 分解菌群を得た。得られた菌群より、PCP 懸濁 R2A 寒天培地上でクリアゾーンを形成する PCP 分解菌候補株を 12 株単離したが、現状では、PCP の減少が PCP 分解によるものか菌体への吸着によるものなのか、最終的な結論は出ていないため、今後は、二槽式透析型培養機を用いてクリアゾーン形成株の PCP 分解能、さらには PCP 分解産物を明らかとすると共に、クリアゾーンを形成しているコロニーのみの懸濁液中における PCP 量を分析することによって菌体への吸着の有無を確認し、クリアゾーン形成株が PCP 分解菌であるか判断する必要がある。

本研究では、POPs に指定されているドリ系農薬や有機フッ素化合物を、微生物 (bioremediation)や分解能を付与した組換え体植物 (phytoremediation)を用いて環境修復する手法を開発するための材料として DIL 分解菌、MCA 資化菌、MFA 資化菌、PCP 分解菌群を単離した。

DIL 分解菌、DIL-1 株は、60°Cで培養を行わないとにならないことから、農地などを対象にした bioremediation 法には適さない菌株であるが、今後、DIL 汚染土壌に DIL-1 株を摂取した後に堆肥を作製することで新たな DIL の浄化法が見出せるかもしれない。また、DIL 分解酵素をコードする遺伝子を取得することで、phytoremediation 法の開発に大きく近づくと考えられる。

MFA 脱フッ素化酵素に関しては、今後、多置換、長鎖のフッ素化カルボン酸類に対する基質特異性の解析を行い、変異を導入した MFA 脱フッ素化酵素と比較することで、脱フッ素化酵素に関する基礎的知見を収集し、パーフルオロカルボン酸類分解酵素の作出を目指していきたい。

また、芳香環脱塩素化酵素は、元来基質特異性が広いことが知られている酵素のため、機能改変を行うことで、より基質特異性の広い、かつ強力な分解酵素を作出できる可能性を秘めている。そのため、より多くの分解菌・分解酵素を取得し、基質特異性の解析を行い、芳香環脱塩素化酵素に関する基礎的知見を収集することで、様々な塩素化芳香族化合物分解酵素を自由自在に作出できるようにもかもしれない。

参考文献

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1990. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc., N. Y.
- Baczynski, T. P., Grotenhuis, T., and Kunipsscheer, P. 2004. The dechlorination of cyclodiene pesticides by methanogenic granular sludge. *Chemosphere*. 55:653-659
- Battersby N. S., and Wilson, V. 1989. Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:433-439
- Chen, X., Christopher, A., L. P. J., Bell S. G., Q. Guo, F. Xu, Z. Rao, and L.-L. Wong. 2002. Crystal structure of the F87W/Y96F/V247L mutant of cytochrome P-450cam with 1,3,5-trichlorobenzene bound and further protein engineering for the oxidation of pentachlorobenzene and hexachlorobenzene. *J. Biol. Chem.* 277:37519–37526.
- Chiu, T. C., Yen, J. H., Hsieh, Y. N, and Wang, Y. S. 2005. Reductive transformation of dieldrin under anaerobic sediment culture. *Chemosphere*. 60:1182-1189
- Dhananjayan, V., and Muralidharan, S. 2010. Levels of Organochlorine Pesticide Residues in Blood Plasma of Various Species of Birds from India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85: 129-136
- Fetzner, S., and Lingens, F. 1994. Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* 58: 641-685
- Goldman, P. 1965. The Enzymatic Cleavage of Carbon-Fruorine Bond in Fluoroacetate J. *Biol. Chem.* 240: 3434-3438
- Golovleva, L. A., Zaborina, O., Pertsova, R., Baskunov, B., Schurukhin, Y., and Kuzmin S. 1991. *Biodegradation* 2: 201-208
- Goncalves, C., and Alpendurada, M. F. 2007. Assesment of pesticide contamination in soil samles from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 65:1179-1189

Harner, T., Wideman, J. L., Jantunen, L. M. M, Bidleman, T. F, and Parkhurst, W. J. 1999. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Environ. Pollut.* 106:323–332

Hedley, A. J., Hui, L. L., Kypke, K., Malisch, R., Van Leeuwen F. X., Moy, G., Wrong, T. W., and Nelson, E. A. 2010. Residues of persistent organic pollutants (POPs) in human milk in Hong Kong. *Chemosphere.* 79: 259-265

Hilber, I., Mader, P., and Schulin, R. Wyss GS. 2008. Survey of organochlorine pesticides in horticultural soils and there grown Cucurbitaceae. *Chemosphere.* 73:954-961

Hill, K. E., Marchesi, J. R., and Weightman, A. J. 1999. Investigation of two evolutionarily halocarboxylic acid dehalogenase gene families. *J. Bacteriol.* 181: 2535-2547

Hong, S. H., Yim, U. H., Shim, W. J., Li, D. H., and Oh, J. R. 2006. Nationwide monitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediments from coastal environment of Korea. *Chemosphere.* 64: 1479–1488

Hung, D. Q., and Thiemann, W. 2002. Contamination by selected chlorinated pesticides in surface waters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere.* 47: 357–367

Huang, Y., Xun, R., Chen, G., and Xun, L. 2008. Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by *Sphingobium chlorophenicum* ATCC 39723. *J. Bacteriol.* 190: 7595-7600

Ichiyama, S., Kurihara, T., Kogure, Y., Tsunasawa, S., Kawasaki, H., and Esaki, N. 2004. Reactivity of asparagines residue at the active site of the D105N mutant of fluoroacetate dehalogenase from *Moraxella* sp. B. 2004. *Biochimi. Biophys. Acta.* 1698: 27-36

Jayachandran, G., H. Gorisch, and L. Adrian. 2003. Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. Strain CBDB1. *Arch. Microbiol.* 180:411–416.

Jiries, A. G, Nasir, F. M., and Beese, F. 2002. Pesticide and heavy metals residue in

wastewater, soil and plants in wastewater disposal site near Al-Lajoun Valley, Karak/Jordan. *Water, Air, Soil, Pollut.* 133:97–107

Jitsumori, K., Omi, R., Kurihara, T., Kurata, A., Mihara, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., and Esaki, N. 2009. X-ray crystallographic and mutational studies of fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. strain FA1. *J. Bacteriol.* 191: 2630-2637

Kamei, I., Takagi, K., and Kondo, R. 2010. Bioconversion of dieldrin by wood-rotting fungi and metabolite detection. *Pes. Manag. Sci.* 66: 888-91

Karn, S. K., Chakrabarti, S. K., and Reddy, M. S. 2011. Degradation of pentachlorophenol by *Kocuria* sp. CL2 isolated from secondary sludge of pulp and paper mill. *Biodegradation* 22: 63-69

Karns J. S., Duttgupta S., and Chakrabarty. 1983. Regulation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chlorophenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1182-1186

Kawasaki, H., Tone, N., and Tonomura, K. 1981. Plasmid-determined dehalogenation of haloacetates in *Moeaxella* species. *Agric. Biol. Chem.* 45: 29-34

Kennedy, D. W., Aust, S. D., and Bumpus, J. A.. 1990. Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2347–2353

Kiages, U., Krauss, S., and Lingens, F. 1983. 2-Haloacid dehalogenase from a 4-chlorobenzoate-degrading *Pseudomonas* spec. CBS 3. Hoppe. Seylers. *Z. Physiol. Chem.* 364: 529-535

Kiyohara, H., Hatta, T., Ogawa, Y., Kakuda, T., Yokoyama, H., and Takizawa, N. 1992. Isolation of *Pseudomonas pickettii* strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and their dechlorination of chlorophenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1276-1283

Kurihara, T., Yamauchi T., Ichiyama, S., Takehata, H., and Esaki, N. 2003. Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1. *J. Mol. Catal. B.* 23:347-355

- Lalah, J. O, Yugi, P. O, Jumba, I. O, and Wandiga, S. O. 2003. Organochlorine pesticide residues in Tana and Sabaki Rivers in Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 298–307
- Leung, K. T., Campbell, S., Gan, Y., White, D. C., Lee, H., and Trevors, J. T. 1999. The role of the *Sphingomonas* species UG30 pentachlorophenol-4-monooxygenase in p-nitrophenol degradation. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 247-253
- Li, Y. F., Hata, Y., Fujii, T., Hisano, T., Nishihara, M., Kurihara, T., and Esaki, N. 1998. Crystal structures of reaction intermediates of L-2-haloacid dehalogenase and implications for the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 273: 15035-15044
- Li, Y. F., Kurihara, T., Ichiyama, S., Miyagi, M., Tsunasawa, S., and Esaki, N. Mass spectrometric analysis of the reaction catalyzed by L-2-haloacid dehalogenase mutants and implications for the roles of the catalytic amino acid residues. 2003. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 23: 337-345
- Liu, J. Q., Kurihara, T., Hasan, A. K., Nardi-Dei, V., Koshikawa, H., Esaki, N., and Soda, K. 1994. Purification and characterization of thermostable and nonthermostable 2-haloacid dehalogenases with different stereospecificities from *Pseudomonas* sp. Strain YL. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2389-2398
- Liu, J. Q., Kurihara, T., Ichiyama, S., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Kawasaki, H., Soda, K., and Esaki, N. 1998. Reaction Mechanism of Fluoroacetate Dehalogenase from *Moraxella* sp. *J. Biol. Chem.* 273:30897-30902
- Liu, J. Q., Kurihara, T., Miyagi, M., Esaki, N., and Soda, K. 1995. Reaction mechanism of L-2-haloacid dehalogenase of *Pseudomonas* sp. YL. *J. Biol. Chem.* 270: 18309-18312
- Mabmoud A. Alawi, Salah Tamimi, and Madi Jaghabir. 1999. Storage of Organochlorine Pesticides in Human Adipose Tissues of Jordanian Males and Females. *Chemosphere.* 38: 2865-2873

Malik, A., Ojha, P., and Singh, K. P. 2009. Levels and distribution of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments of Gomti River (India)—a tributary of the Ganges River. *Environ. Monit. Assess.* 148:421–435

Manirakiza, P., Akinbamijo, O., Ovaci, A., Pitonzo, R., and Schepens, P. 2003. Assesment of organochlorine pesticide residues in west African city frams:Banjul and Dakar case study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 171-179

Marais, J.S.C. 1943. Isolation of the toxic principle “K cymosom” from “Gifblaar” *Dichapetalum cymosom*. *J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 18: 203-206

Matsumoto E., Kawanaka Y., Yun SJ., and Oyaizu H. 2008. Isolation of dieldrin- and endrin-degrading bacteria using 1, 2-epoxycyclohexane as a structural analog of both compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:1095–1103

Matsumura, F., and Boush, G. M. 1967. Dieldrin: degradation by soil microorganisms. *Science* 156:959–961

Matsumura, F, Khanvilkar, V. G., Patil, K. C., and Boush, G. M. 1971. Metabolism of endrin by certain soil microorganisms. *J. Agric. Food. Chem.* 19:27–31

Maule, A., Plyte, S., and Quirk, A. V. 1987. Dehalogenation of organochlorine insecticides by mixed anaerobic microbial populations. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27: 229-236

Murdiyatmo, U., Asmara, W., Tsang, J. S., Baines, A. J., Bull, A. T., and Hardman D. J. 1992. Molecular biology of the 2-haloacid halaidohydrolase IVa from *Pseudomona cepacia* MBA4. *Biochem. J.* 284: 87-93

Nam, I. H., Chang, Y. S., Hong, H. B., and Lee, Y. E. 2003. A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 284-290

Ozkoc, H. B., Bakan, G., and Ariman, S. 2007. Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides along the Black Sea coast. *Environ. Geochem. Health.* 29:59–68

Patil, K. C., Matsumura, F., and Boush, G. M. 1970. Degradation of endrin, aldrin, and DDT by soil microorganisms. *Appl. Microbiol.* 19: 879–881

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour, NY.

Schnk, T., Muller, R., Moreberger, F., Otto, M. K., and Lingens, F. 1989. Enzymatic Dehalogenation of Pentachlorophenol by Extracts from *Arthrobacter* sp. Strain ATCC33790. *J. Bacteriol.* 171:5487-5491

Shegunova, P., Klánová, J., and Holoubek, I. 2007. Residues of organochlorinated pesticides in soils from the Czech Republic. *Environ. Pollut.* 146: 257–261

Singh, R. P. 2001. Comparison of organochlorine pesticide levels in soil and groundwater of Agra, India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 126–132

Singh, S. K., Raha, P., and Banerjee, H. 2006. Banned organochlorine cyclodiene pesticide in ground water in Varanasi, India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 935–941

Su, Y., Chen, L., Bandy, B., and Yang, J. 2008. The catalytic product of pentachlorophenol 4-monooxygenase is tetrachlorohydroquinone rather than tetrachlorobenzoquinone. *Open Microbiol. J.* 2: 100-106

Takagi, K., Iwasaki, A., Kamei, I., Satsuma, K., Yoshioka, Y., and Harada, N. 2009. Aerobic mineralization of hexachlorobenzene by newly isolated pentachloronitrobenzene-degrading *Nocardioide*s sp. strain PD653. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4452-4458

Tsang, J. S., Sallis, P. J., Bull, A. T., and Hardman D. J. 1988. A monobromoacetate dehalogenase from *Pseudomonas cepacia* MBA4. *Arch. Microbiol.* 150: 441-446

Van Der Ploeg, J., Van Hall, G., and Janssen, D. B. Characterization of haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autrophicus* GJ10 and sequencing of the *dh1B* gene. *J. Bacteriol.* 1991. 24: 7925-7933

Wan, M. T., Kuo, J., and Pasternak, J. 2005. Residues of endosulfan and other selected organochlorine pesticides in farm areas of the lower Fraser valley, British Columbia, Canada. *J. Environ. Qual.* 34: 1186–1193

Wang, F., Jiang X, Bian, Y., Yao, F., Gao, H., Yu, G., Munch, J. C, and Schroll, R. 2007a. Organochlorine pesticides in soils under different land usage in the Taihu lake region, China. *J. Environ Sci.* 19:584-590

Wang, H., He., M, Lin, C., Quan, X., Guo, W., and Yang, Z. 2007b. Monitoring and assessment of persistent organochlorine residues in sediments from the Daliaohe river watershed, northeast of China. *Environ. Monit. Assess* 133: 231–242

Watanabe, K., Yoshikawa, H., Goto, M., and Furukawa, K. 2007. Enrichment and isolation of novel anaerobic microorganism capable of degrading various kinds of POPs. *Organohalogen. Compounds.* 69: 2500-2503

Wedemeyer, G. 1968. Partial hydrolysis of dieldrin by *Aerobacter aerogenes*. *Appl. Microbiol.* 16: 661–662

Weightman, A. J., Weightman, A. L., and Slater, J. H. 1985. Toxic effects of chlorinated and brominated alkanic acids on *Pseudomonas putida* PP3: Selection at High frequencies of mutation in genes encoding dehalogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1494-1501

Xun, L., Topp, E., and Orser, C. S. 1992. Diverse substrate range of a *Flavobacterium* pentachlorophenol hydroxylase and the reaction stoichiometries. *J. Bacteriol.* 174:2898–2902.

Yan, D. Z., Liu, H., and Zhou, N. Y. 2006. Conversion of *Sphingobium chlorophenicum* ATCC39723 to a Hexachlorobenzene Degradar by Metabolic Engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2283-2286

Yu, M., Faan, Y. W., Chung, W. Y. , and Tsang, J. S., Isolation and characterization of a novel haloacid permease from *Burkholderia cepacia* MBA4. 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4874-4880

Zhang, Z., Hong, H., Zhou, J. L., Yu, G., Chen, W., and Wang, X. 2002. Transport and fate of organochlorine pesticides in the River Wuchuan, Southeast China. J. Environ. Monit. 4:435-441

環境省 ホームページ COP2における成果報告

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/pops.html

環境省 ホームページ COP4における成果報告

<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=11117>

環境省

<http://www.env.go.jp/chemi/pops/kento/02/>

外務省

<http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/kankyo/jyoyaku/pops.html>

厚生労働省

水質基準の見直しにおける検討概要

農林水産消費安全技術センター

<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/index.htm>

新細胞工学実験プロトコール（東京大学医科学研究所制癌研究部編，第1版，1993）

クローニングとシーケンス（杉浦昌弘編，1989）

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導、ご協力を頂きました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

このようなすばらしい研究の場を与えていただき、また暖かくご指導頂きました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学研究室の山根久和教授に深く感謝申し上げます。また、同様にご指導頂きました同研究室の野尻秀昭准教授、岡田憲典助教に深く感謝申し上げます。

ゲノムシーケンス解析を行うにあたり、実験のご指導と貴重なご助言を頂きました東京農業大学 吉川博文教授、松本貴嗣博士に感謝いたします。

汚染堆肥の作製にあたり、実験のご指導と貴重なご助言を頂きました首都大学東京 春田伸准教授に感謝いたします

本研究の共同研究者であり、日々の研究に関して親身なご助言を頂き、討論をしてくださいました当研究室 沼田充氏、夏谷亮介氏、岩田修氏、に感謝いたします。

また、日々の研究生生活を行う上で環境保全工学研究室の皆様には大変お世話になりました。ありがとうございました。

最後に、常に暖かく見守り、経済面、精神面の支えとなってくれた家族に感謝し、この論文を捧げます。

2010年12月

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導、ご協力を頂きました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

このようなすばらしい研究の場を与えていただき、また暖かくご指導頂きました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学研究室の山根久和教授に深く感謝申し上げます。また、同様にご指導頂きました同研究室の野尻秀昭准教授、岡田憲典助教に深く感謝申し上げます。

ゲノムシーケンス解析を行うにあたり、実験のご指導と貴重なご助言を頂きました東京農業大学 吉川博文教授、松本貴嗣博士に感謝いたします。

汚染堆肥の作製にあたり、実験のご指導と貴重なご助言を頂きました首都大学東京 春田伸准教授に感謝いたします

本研究の共同研究者であり、日々の研究に関して親身なご助言を頂き、討論をしてくださいました当研究室 沼田充氏、夏谷亮介氏、岩田修氏、に感謝いたします。

また、日々の研究生生活を行う上で環境保全工学研究室の皆様には大変お世話になりました。ありがとうございました。

最後に、常に暖かく見守り、経済面、精神面の支えとなってくれた家族に感謝し、この論文を捧げます。

2010年12月