

微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究

研究代表者 国立環境研究所 矢木修身

Fundamental Studies on Bioremediation Technologies of Contaminated Soil Environment

Osami Yagi, *Research Director of CREST*

Team Leader, Biotechnology Products Assessment Research Team

Regional Environment Division

National Institute for Environmental Studies

1. 研究の概要

世界各地でトリクロロエチレン（TCE）、テトラクロロエチレン（PCE）、1,1,1-トリクロロエタン（TCA）およびPCB等の有機塩素化合物や水銀、6価クロム等の重金属による土壌・地下水汚染が顕在化し大きな問題となっている。有機塩素化合物による地下水の汚染対策として、主に地下水の揚水・ばっ気や土壌ガスの真空抽出等の物理化学的技術が用いられている。しかしながら、これらの処理法は、費用が高いことや有害物質を分解し無害化する技術でないため、より安価でかつ無害化処理技術である微生物を活用して汚染を修復するバイオレメディエーション技術の開発が期待されている。しかしながらバイオレメディエーション技術は新技術であるため、技術の有効性と安全性に関する基盤研究がほとんどなされていない。

本研究では、土壌・地下水汚染で大きな問題となっている有機塩素化合物および重金属の汚染に対し、それぞれのケーススタディとしてクロロエチレン類および水銀化合物類を中心として取り上げ、バイオレメディエーション技術を用いて汚染を修復する際のブレークスルーすべき以下の5つの課題について基盤的研究を実施する。

（1）分解能強化微生物の開発

有機塩素化合物としてTCE、PCE、TCA、PCB等を、また重金属として水銀化合物を対象に分解菌の探索・分離ならびに分解酵素遺伝子の単離、機能解析を行い、これらの結果をもとに、遺伝子操作等により分解能強化微生物の開発を行う。

（2）土壌中における微生物の挙動解析

土壌中に導入された微生物の安全性を調べるためには、環境中における生残・増殖性を明らかにする必要がある。そこで、培養を必要とせずかつ短時間で検出が可能な微生物特有のDNA塩基配列を対象としてPCR法による検出法を開発する。本計数法を用いて土壌中での微生物の生残性・増殖性および移動性、拡散性を明らかにし、土壌中における微生物の挙動モデルを開発する。

（3）微生物センサー機能を活用する有害物質モニタリング手法の開発

バイオレメディエーションによる有害代謝生産物の生成が懸念されているため、化学物質に対して集積、忌避する微生物のセンサー機能に着目し、画像処理による迅速高感度毒性試験法を開発する。

（4）分子生態学的手法を用いる生態影響評価システムの開発

バイオレメディエーション技術の土壌生態系への影響を評価するため、微生物生態系、特にエネルギー代謝、窒素代謝に関する微生物相等に着目し、これらに関する微生物およびその遺伝子のポピュレーションダイナミクスによる生態系影響評価法を開発する。

（5）土壌・地下水シミュレーターおよび現場における修復技術の適応性の評価

フラスコ・カラムレベルにおける微生物の有害物質分解能等に関する基礎データをふまえて、大型のシミュレータを用いて、汚染物質および浄化微生物の消長を明らかにすると共に、汚染現場に適応可能な技術を構築する。

以上の課題について、国立環境研究所、九州大学農学部 古川謙介教授、広島大学工学部大竹久夫教授、国立水俣病総合研究センター 中村邦彦室長、株式会社荏原製作所 宮晶子室長を代表とする各グループと共同で研究を実施する。

2. 現在までの中間成果報告

2. 1. 成果内容の要約

(1) 分解能強化微生物の開発

1) トリクロロエタン分解菌の分離同定：TCAおよびTCEを同時に分解できるエタン酸化細菌TA27株を土壤中より分離した。本菌は*Mycobacterium* sp.に属しており、高濃度のTCE (50mg/l) およびTCA (75mg/l) を分解できること、また種々のハロゲン化脂肪族炭化水素を分解できることが判明した。

2) トリクロロエチレン分解菌の分子育種：ピフェニル資化菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株はPCBを分解できるが、分解能は、ピフェニルジオキシゲナーゼに由来し、本酵素は鉄・硫黄タンパク (bphA1, bphA2) とフェレドキシン (bphA3) とフェレドキシン還元酵素 (bphA4) の4つのサブユニットから構成されていた。一方、トルエン資化性菌の *Pseudomonas putida* F1株のトルエンジオキシゲナーゼは、todC1, todC2, todB, todAから構成されている。この両酵素のサブユニット遺伝子を相互に置換して種々のハイブリッドを構築した(図1)。この遺伝子をKF707株の染色体に導入したKF707-D3株はピ

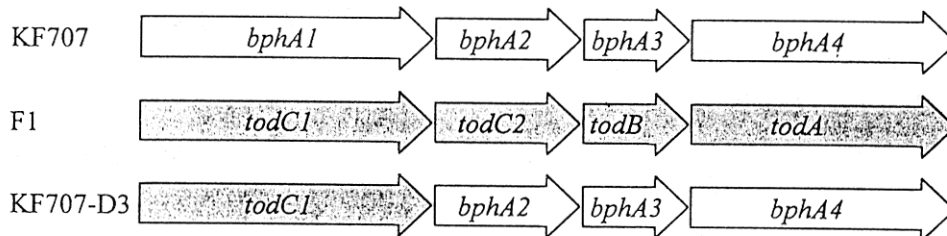


図1. ピフェニルオキシゲナーゼとトルエンジオキシゲナーゼ内でのハイブリッドジオキシゲナーゼの構築

フェニル資化能を保持したまま、10ppm TCEを6時間で完全分解した(図2)。遺伝子をハイブリッドすることにより、両者にはない新たな形質の発現が確認された。

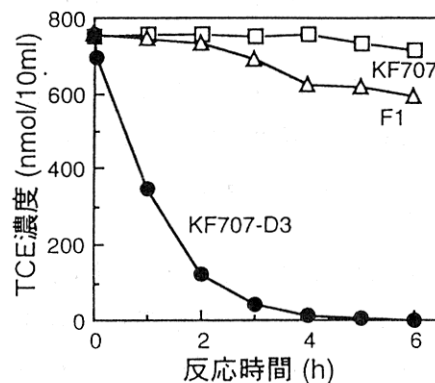


図2. ハイブリッドシュードモナス菌KF707-D3株によるTCEの分解

3) PCB分解菌の分子育種

PCB分解力の異なる二つの菌株、*P. pseudoalcaligenes* KF707 株と*Burkholderia cepacia* LB400 株に注目してPCB分解特性を詳細に検討した。KF707 株とLB400 株のbph遺伝子群の並びおよび塩基配列はきわめて類似していた。PCBの分解に参与する両株のピフェニルジオキシゲナーゼのサブユニット遺伝子をハイブリッドしたところ分解能の増大が確認された。

4) 水銀化合物分解菌の分離・同定

水俣湾海水、および水銀汚染のない対照地点等より計113株の水銀耐性細菌を分離した。水銀耐性の高い細菌を水俣湾35株、対照地点から10株の計45株を選び、水銀化合物に対する耐性を検討した。塩化第二水銀、塩化メチル水銀、塩化エチル水銀、酢酸フェニール水銀、パラクロロ安息香酸水銀、およびフルオレッセイン酢酸水銀を分解できる微生物が多数生息していることが判明した。ほとんどの細菌はグラム陰性の桿菌であった。次に、これら45株について各種のNaCl濃度およびpHにおける発育および塩化第二水銀の揮発化反応について検討した。いずれの細菌も、増殖至適NaCl濃度および至適pHで最も高い水銀還元能を示した。

(2) 土壌中における微生物の挙動解析

1) TCE分解菌 *Methylocystis* sp. M 株の検出法の開発

TCEを好氣的に分解するメタン酸化性菌 *Methylocystis* sp. M (M株) を環境浄化へ適用するためには、環境中での挙動を迅速に定量する必要がある。そこでM株のTCE分解のキーエンザイムであるメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) 遺伝子の一部をPCRで増幅することによるM株の検出を試みた。その結果、M株のみに特異性を有するCF2-CR3プライマーの組み合わせを見いだした(図3)。検出感度を高めるための前処理、プライマー濃度、緩衝液組成、温度条件等について検討した結果、反応液当たり5細胞までの検出が可能となった。M株を接種した土壌・地下水カラムの流出水試料のメタン酸化性菌数を培養MPN法及びPCR-MPN法で計数した結果、従来の計数で1ヶ月を要したものが1日で計数可能となった。

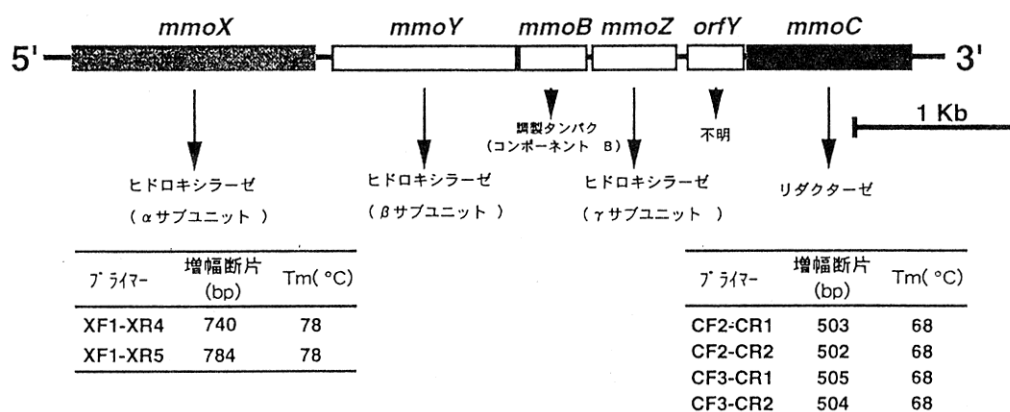


図3. メタンモノオキシゲナーゼ遺伝子の構造および検出に用いたプライマー

2) 塩化第二水銀還元菌 *Pseudomonas putida* の検出法の開発

塩化第二水銀還元菌 *P. putida* PpY101/pSR134 の水銀耐性遺伝子 (mer オペロン) の一部を標的DNAとし、菌体からのDNAの抽出を行わない直接PCR法で検出・定量する手法の検討を行った。最適検出条件の検討を行った結果、反応チューブ (50 μl) 当たり1細胞まで検出が可能となった。

3) 土壌中における微生物の生残性

土壌に添加した浄化微生物の生残、増殖に及ぼす土壌の性状および環境要因の影響を明らかにするため、*P. putida* の土壌中での増殖に及ぼすグルコース、酵母エキス、稲ワラ及び汚泥等の各種有機物、さらに消石灰を添加しpHと水分の影響さらに菌の局在性について調べた。*P. putida* は易分解性の有機態窒素の多い有機物を多く含み、pHが高く、やや湿った水分状態が最も生残に適していることが判明した。

(3) 微生物センサー機能を活用する有害物質のモニタリング手法の開発

多くの細菌には鞭毛があり、その基部にあるモーターを回転させて化学物質の濃度勾配を感知して、誘引物質に集積したり忌避物質から逃避したりする。そこで有害物質による回転運動の障害を細胞運動の停止により検知する手法の開発を試みた。

1) 運動停止細胞率画像計数法の開発

菌体懸濁液と化学物質の水溶液とを混合したものを、2枚のカバーガラスとU字型センサーから成るチャンバーに入れ、CCDカメラを装着した倒立位相差顕微鏡で菌体の運動をビデオ録画した。ビデオ画像を画像処理装置に取り込み、運動停止細胞計数用ソフトウェアプログラムで運動停止細胞の割合を測定した。即ち、デジタル画像上の細菌細胞の周りに小円を描きこれに5秒後の画像を重ね合わせて、小円内にとどまる細胞を運動停止細胞として計数した。運動性細菌として *P. aeruginosa* PA01株を用い、貴金属、有機溶媒、芳香族化合物について運動性障害と増殖障害との相互関係について調べた。それぞれ50%の障害をもたらす化学物質の濃度を比較したところ、相関係数0.91の高い相関が認められた。このことから、運動停止細胞率画像計数法が細菌に対する化学物質の有害性試験に利用可能であることがわかった。増殖障害率による有害性試験は結果を得るまで1晩を要するが、本法では1サンプルあたり数分で結果を得ることが可能となった。

2) 細菌行動的応答蛍光測定法の開発

大腸菌に green fluorescent protein (GFP) を過剰発現させ、細胞を蛍光ラベルした。24穴タイタープレートとケモタキセル (図4) からなる重層カップの下層に菌体懸濁液と化学物質の混合液を入れ、上層には強力な誘引物質を入れた。下層と上層はポアサイズ8 μ mのメンブレンフィルターで隔たれており、下層から上層に移動してくる細胞をプレート蛍光光度計により計測した。GFPで蛍光ラベルした大腸菌EJ500株を用い、プレート蛍光光度計で大腸菌によるL-セリンへの集積を検知できることを確認した。また、菌体懸濁液に有害物質を

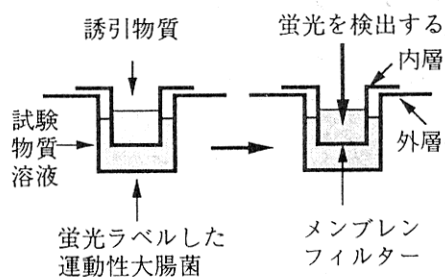


図4. ケモタキセル

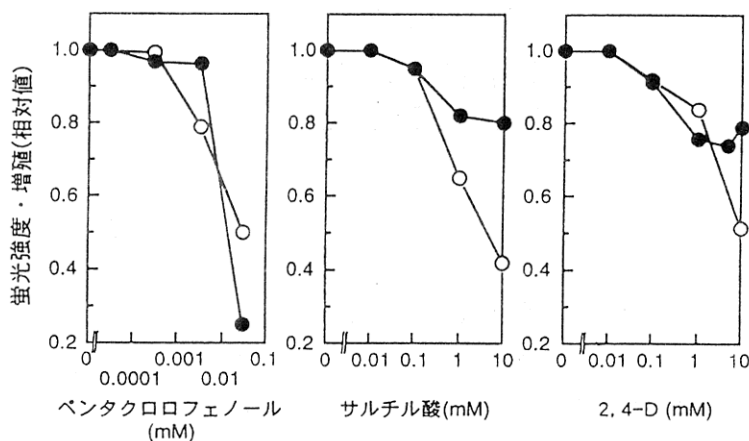


図5. 化学物質濃度の運動性及び増殖への阻害影響
●: 蛍光強度, ○: 増殖

様々な濃度で添加した後、蛍光測定法により大腸菌のL-セリンへの蛍光強度（集積速度）を測定した結果を図5に示す。有害物質の濃度が増加するに従って集積速度が低下することが認められた。このことから、蛍光計測法により化学物質の細菌に対する有害性を試験することも可能であることが示唆された。

（４）分子生態学的手法を用いる生態系影響評価システムの開発

バイオレメディエーションを実施した場合の生態系に与える影響を、微生物群集を解析するポピュレーションダイナミクスを活用した評価手法の開発を試みた。培養法による各種の土壤微生物の計数法について、より簡便で再現性のある方法の検討を行った。好気性一般従属栄養細菌、大腸菌群、蛋白質分解細菌、糸状菌、放線菌、フェノール資化性菌、メタノール資化性細菌、亜硝酸酸化細菌、アンモニア酸化細菌、メタン資化性細菌の計数法を改良した。これらの方法を用いてTCE汚染の土壤微生物数に与える影響評価を行った。好気性一般従属栄養細菌、蛋白質分解細菌、放線菌はTCEに対し影響を受けにくく、糸状菌、フェノール資化性菌、メタノール資化性菌、亜硝酸化細菌、アンモニア酸化細菌はより影響を受けやすい性質を有していた。重油の微生物生態系への影響を調べるため、ナホトカ号流出重油で汚染した三国サンセットビーチにおける微生物多様性を調べた。事故直後から重油を餌として微生物数が増加し、多様性が高くなったことから、重油により活発な生態系が作り出されたと考えられた。

（５）土壤・地下水シュミレーターおよび現場における修復技術の適応性の評価

１）バイオリアクターによる水銀除去

通気装置と攪拌・振盪装置を組み合わせた水銀除去バイオリアクターを設計し（図6）、腸内細菌のプラスミドNR1由来の水銀還元酵素遺伝子群（merオペロン）を組み込んだ組換え微生物を用いて水銀除去を行った。40ppmの塩化第二水銀を24時間で蒸留水から完全に除去でき

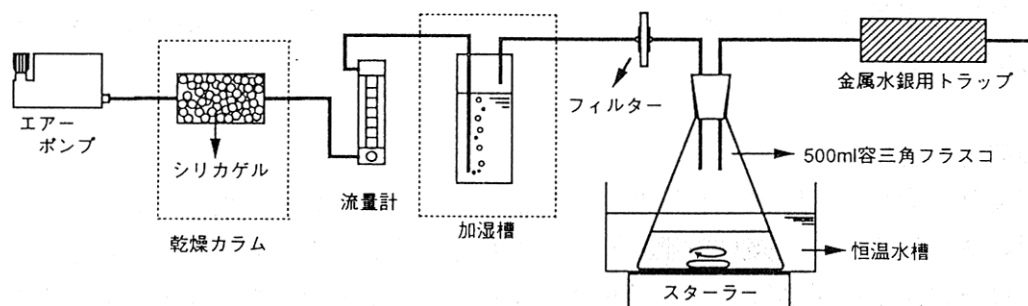


図6. バイオリアクターによる水銀の除去

ることが認められた。次いで、環境水中からの水銀除去能の評価を行い、土着の生物との相互作用あるいは懸濁物質への水銀吸着により除去が妨害されることが示された（図7）。さらに、土壤スラリー中からの水銀除去条件を検討し、チオールおよび塩化ナトリウムの添加が、土壤粒子に吸着した水銀の遊離に効果があることが認められ、添加した水銀の約70%が除去され、微生物による水銀汚染の浄化の可能性が示された（図8）。

２）M株を用いるバイオオーグメンテーション

M株を用いるバイオオーグメンテーションを実施する場合を想定して、土壤にM株菌体を添加し、土壤中でのM株の生残性・増殖性について検討を行った。土壤中濃度が 10^7 cells/g湿土となるように加え、気相のメタンガス濃度が3%となるようにし、28℃にて静置培養した。

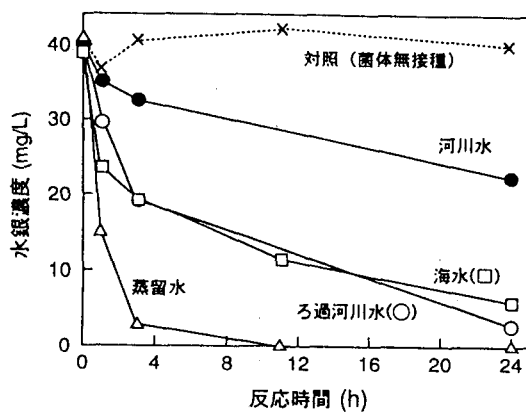


図7. 各種水中からの水銀の除去

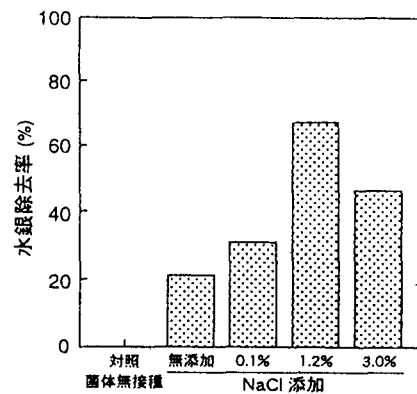


図8. 土壌スラリーからの水銀の除去に及ぼす塩化ナトリウムの添加効果

13日間培養を行なうことにより生菌数は 2.8×10^8 cells/g湿土まで増加した。M株は土壌中で増殖が可能であった。

2. 2. 発表論文等の記載

(1) Nature Biotechnology (1998) : Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by direct evolution of biphenyl dioxygenase : PCB分解特性の異なる二つのPCB分解菌の**bphA1**遺伝子をDNAシャフリング法によりランダムな組換えを行った。その結果、諸種のPCBに対して高い分解活性をもつ微生物の作成に成功した。

(2) Journal of Fermentation and Bioengineering (1998) : Purification and characterization of component B of a soluble methane monooxygenase from *Methylocystis* sp. M : メタン資化性トリクロロエチレン分解菌 *Methylocystis* sp M株の可溶性メタンモノオキシゲナーゼのコンポーネントBを精製し、その諸性質を調べた。コンポーネントBは分子量32,000で2個のサブユニットからなり、酵素の熱安定性と鉄イオンの保持に関与していた。

3. 今後の研究の方向

(1) 分解能強化微生物の開発 : 好気性TCEおよびTCA分解菌、嫌気性PCE分解菌、PCB分解菌、さらに各種の有機水銀を分解する微生物の分離および分解能の強化を行う。(2) 土壌中における微生物の挙動解析 : 特異的DNA遺伝子による微生物の検出法の開発と検出感度の向上化並びにこの手法を用いて環境中の微生物の挙動及び環境への導入微生物の挙動に及ぼす要因を解明する。(3) 微生物センサー機能を活用する有害物質モニタリング手法の開発 : 蛍光ラベル微生物を用いる有害物質の評価法の開発と有害物質認識機能の解析を行う。(4) 分子生態学的手法を用いる生態影響評価システムの開発 : 土壌中の主要微生物相を遺伝子レベルで解析し、バイオレメディエーション技術の生態影響を評価する。およびPCR法による検出法並びに有害物質の影響評価法を開発する。(5) 土壌・地下水シミュレータおよび現場における修復技術の適応性の評価 : 汚染現場の土壌・地下水調査を行うと共に、カラム、ライシメータを用いてバイオレメディエーション技術の適応性の評価を行い、現場に適応可能な技術を構築する。