

微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究

研究代表者 東京大学大学院工学系研究科 矢木修身

Fundamental Studies on Bioremediation Technologies of Contaminated Soil Environment

Osami Yagi, *Research Director of CREST*

Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

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)、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。これらの汚染の浄化に、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。本研究では、有機塩素化合物や重金属の中で特に問題となっているトリクロロエチレン及び水銀で汚染した土壌・地下水の修復をケーススタディとして取り上げ、バイオレメディエーション技術の実用化に際しブレークスルーすべき、(1) 分解能強化微生物の開発、(2) 土壌中における微生物の挙動解析、(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、(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、(5) 大型土壌・地下水シミュレータによるバイオレメディエーション技術の適応性の評価、の 5 課題に関する基盤研究を実施した。

2. 現在までの研究成果

2. 1 研究内容の要約

(1) 分解能強化微生物の開発

バイオレメディエーション技術を実施するためには有効な微生物を開発することが重要である。TCE、PCE、TCA、PCB 及び水銀等に関する分解微生物の分離・同定を行うとともに、分解特性、分解機構及び分解酵素の諸性質を調べ、さらに分解機能の向上化を試みた。

1) メタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M 株 (M株) による TCE の浄化

TCE を良く分解するメタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M 株を用いるバイオレメディエーション技術を確立することが本研究の大きな目的である。このため M 株について詳細な研究を実施した。M 株は、50mg/l の TCE を分解できること、分解能は可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) に由来すること、また sMMO は α 、 β 、 γ の 2 個ずつのサブユニットからなるマルチコンポーネント酵素であることを明らかにした。ついで sMMO の遺伝子をクローニングし全塩基配列を解読した。M 株の sMMO は全長が 6 kb で、mmoX, mmoY, mmoB, mmoZ, mmoC 及び機能不明な orfY の遺伝子群で構成されていた。sMMO はメタンで誘導され、メタノールの培養では誘導されないことが判明した。sMMO の発現は銅濃度に大きく影響を受け、銅濃度を低く保つことが重要であること、sMMO の mRNA 量は、TCE 分解活性と高い相関が認められたため、

mRNA の含量は、M株の活性の良い指標となることが判明した。sMMO 遺伝子のクローニングを行った。大腸菌ではいずれのサブユニットたん白質の生成が確認されたが、TCE の分解能は低く、分解能を親株より高めることはできなかった。

2) TCA 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から、複合汚染した汚染の浄化に有効な微生物であることが判明した。また、本菌の分解酵素はヒドロキシラーゼとリダクターゼから構成されていた。

3) TCE 分解菌の分子育種

ビフェニル資化菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株は PCB を分解できるが、分解能は、ビ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* Fl 株のトルエンジオキシゲナーゼは、todC1, todC2, todB, todA から構成されていた。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。この遺伝子を大腸菌及び KF707 株の染色体に導入した。組換え KF707 株は 10ppm の TCE を 6 時間で完全に分解できた。遺伝子のハイブリッド化は、新たな形質の発現に有効であることを明らかにした。

4) PCE 分解菌の分離

PCE 脱クロル化菌 *Desulfitobacterium* sp. Y51 を分離した。本菌から 2 種類の PCE デハロゲナーゼを精製し、酵素的性質を明らかにした。酵素 I および II はそれぞれ、分子量 60kDa & 55.4 kDa であり、本菌と M 株との共存により PCE の完全分解が可能であることが判明した。

5) 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 の分解に関与する両株のビフェニルジオキシゲナーゼのサブユニット遺伝子をシャフリングシキメラ構造を構築したところ分解能の著しい増大が確認された。

6) 水銀化合物分解菌の分離・同定

水俣湾から分離したグラム陰性の水銀耐性菌 103 株のうち 44 株がメチル水銀の分解能を示した。これらの細菌は、1mg/l のメチル水銀を分解し揮発除去する能力を有していた。微生物による有機水銀の除去が可能であることが明らかとなった。また分解酵素の精製にも成功した。

2. 2 土壤中における微生物の挙動解析

(1) M 株の検出法の開発

TCE を好氣的に分解するメタン酸化菌 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 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最適プライマーの組み合わせを見いだした。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中のM株を、従来の培養法及び今回開発したPCR法で計数した結果、従来の計数で1ヶ月を要したものが数時間で計数が可能となった。

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

塩化第2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 μ l) 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* の土壌中での生残性に及ぼす因子について検討した。微生物の生残・増殖には、土壌pH、水分含量が大きく影響することが判明した。

2.3 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

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の有無を明らかにするため、運動性を有する細菌のセンサー機能に着目し、迅速高感度毒性試験法の開発を試みた。緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein, GFP) により蛍光ラベルした *P. aeruginosa* を用い、化学物質に対する細菌の行動的応答を簡便に計測できる蛍光プレートリーダー法を開発した。本方法は、TCE及びTCE分解生産物であるクロラール、トリクロロエタノール、トリクロロ酢酸等の毒性を短時間で測定できた。また開発した蛍光プレートリーダー法は、多数の試料 (23試料まで) の有害性を同時に試験することができること、1mlの少量で有害性試験ができること、測定が自動化できること等の特徴を有し優れた有害性試験法であると考えられた。

また *P. aeruginosa* のゲノム情報を基に遺伝学的解析を進め、アミノ酸、リン酸、O₂のセンサー遺伝子の同定に成功した。*P. aeruginosa* の走化性遺伝子 *cherR* の変異株はトリクロロエチレン、クロロフォルム、2,4-Dに対して応答しなくなったことから、これら物質の感知は走化性トランスデューサーにより行われていることが示唆された。

2.4 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、微生物生態系に着目し、生態系の保全に関与する微生物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手法を開発した。メタン酸化細菌を対象とした場合、48穴のマイクロプレートを用いる繰り返し2倍希釈法による土壌中の優占種を解析した。分離したメタン酸化細菌の優占種について16SrRNA遺伝子、及び膜結合型と可溶性メタンモノオキシゲナーゼの *pmoA*、*mmoX*、*mmoB* 遺伝子に特異的なプライマーでPCR及びPCR産物のDGGE分析を行い、土壌中におけるメタン酸化細菌に関する優占種の生態的特性を把握することが可能となった。

また、培養法による各種の土壌微生物の計数法について、より簡便で再現性のある方法を開発した。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。さらに、M株を土壤・地下水環境中に導入する際の環境影響評価を行い、 10^7 cells/ml の濃度では土壤・地下水生態系に及ぼす影響はほとんどないものと考えられた。

2. 5 大型土壤・地下水シュミレーターによるバイオレメディエーション技術の適応性の評価

(1) 土壤中のM株の増殖

M株を用いるバイオレメディエーションを実施する場合を想定して、土壤にM株を添加し、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°C にて静置培養した。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株は土壤中で増殖が可能であった。

(2) 大型土壤・地下水ライシメータを用いた浄化試験

縦、横、高さ $1\text{m} \times 2\text{m} \times 1.5\text{m}$ からなるステンレス製の大型ライシメータを作成した。本ライシメータは、縦 1m の中央に壁があり、2 室に分かれている。これらに、川砂及び地下水を充填し、TCE 及び M株の挙動さらに M株の浄化効果について検討した。TCE の挙動については、 1.4m^3 のライシメータに 0.5mg/l の TCE 汚染水を 100L 添加し、 30cm/day の速度で通水し、TCE 濃度の変化を調べた。TCE は、 30cm ごとの移動で 74~94% の減少が観察され、かなり土壤中に残留することが確認された。次にライシメータに M株を添加し 30cm/day の速度で通水し、M株濃度の変化を調べた。M株は PCR 法と培養法を用いて計数した。M株の挙動はトレーサーとしての食塩ほどきれいな挙動を示さなかったが、地下水の流れと共に移動した。 30cm ごとの移動で、細胞数は 57~90% に減少した。 1ml の川砂土壤は 3.2×10^6 cells の M株を補足することが明らかとなった。ついで土壤・地下水をトリクロロエチレン 0.2mg/l で汚染した後、M株を 5×10^7 細胞/ml になるよう添加し、流速 0.63m/h の速度で地下水を循環し、トリクロロエチレンの濃度の変化を測定した。12 時間後には、検出限界の 0.003mg/l 以下となった。またメタン、酸素、窒素、リンを含んだ地下水を通水することにより、地下水・土壤中 M株は生存し続けけることが可能であった。 1g の M株は 0.1g の TCE を分解でき、TCE 汚染土壤・地下水の浄化に有効であることが判明した。

(3) M株の環境影響評価

M株について、人への安全性に関する経口、経気道、経皮、静脈内、皮膚への毒性試験ならびに生態系影響に関する魚、ミジンコ、藻類、土壤生態系への影響を調べ、環境への影響は問題ないものとかんがえられた。

5 年間の研究において、M株を用いて環境適用する際に必要なほとんどの基礎データを入手することができた。

2.2 発表論文等

論文

- 1) T. Kumamaru, H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe and K. Furukawa ①Nature Biotechnol., 16:663-666 (1998) ②Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase ③PCB分解性の異なる2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に対して高い分解性を持つ酵素が得られた。これらの酵素の遺伝子の塩基配列から、PCBおよびビフェニル関連化合物の基質特異性に関与するアミノ酸を特定した。

- 2) O. Yagi, A. Hashimoto, K. Iwasaki and M. Nakajima ①Appl. Environ. Microbiol., 65:4693-4696 (1999) ②Aerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane by *Mycobacterium* spp. isolated from soil ③土壤中より1,1,1-トリクロロエタン (TCA) 分解細菌を2株分離した。同定試験の結果、*Mycobacterium* に属する細菌であった。TA27株は、75mg/lと高濃度のTCAを分解可能であった。TCAの分解生産物として2,2,2-トリクロロエタノールが検出された。

- 3) H. Wu, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi and H. Ohtake ①J. Bacteriol., 182, 3400-3404 (2000) ②Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa* ③*Pseudomonas aeruginosa*のゲノム上に存在する26の走化性トランスデュサー様遺伝子からランダムに13遺伝子を選び、遺伝子破壊を行った。得られた遺伝子破壊株のリン酸走化性を調べた結果、*ctpH*および*ctpL*がリン酸の感知に関わる走化性トランスデュサー遺伝子であることがわかった。*ctpH ctpL*の2重破壊株はもはやリン酸走化性を示さないことから、リン酸走化性トランスデュサー遺伝子はこの2遺伝子のみであると考えられた。破壊株の解析から、*ctpH*は高濃度のリン酸の感知、*ctpL*は低濃度のリン酸の感知に関与していることが明らかとなった。

- 4) K. Iwasaki, O. Yagi, Y. Ishibashi and H. Seto ①Environ. Sci., 13, 483-489 (2000) ②Survival and effect of genetically engineered pseudomonades in the soil environment ③有用微生物の環境中での挙動を追跡するための水銀耐性マーカー遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドを作成し、土壤等の環境中に広く生息している各種シュードモナス属細菌に導入してマーカー付き組換え微生物を作成した。土壤マイクロコズム中での各種組換え微生物の生残性を調べ、本マーカー遺伝子は環境中の特定微生物のモニタリングに有効であることを示した。

- 5) A. Hashimoto, K. Iwasaki, M. Nakajima, O. Yagi ①Microb. Environ., 16, 109-116 (2001) ②Quantitative detection of trichloroethylene-degrading *Mycobacterium* sp. TA27 with a real-time PCR product detection system ③トリクロロエチレン等を好氣的に分解可能な *Mycobacterium* sp. TA27株の環境中での挙動解析を目的として、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした検出法の開発を行った。検出および定量には Sequence Detection System (ABI 7700)を使用した。PCR条件を検討し、類縁菌株は検出されないTA27株に特異的で高感度な検出条件を見いだした。

- 6) T. Kikuchi, K. Iwasaki, H. Nishihara, Y. Takamura, O. Yagi ①Boosci. Biotechnol. Biochem., 65,

2673-2681 (2001)②Quantitative and specific detection of a trichloroethylene-degrading methanotroph, *Methylosictic* sp. strain M, by a most probable number-polymerase chain reaction method③トリクロロエチレン (TCE) を分解するメタン酸化細菌 *Methylosictic* sp. strain M の最確値 PCR 法による計数法を開発した。TCE 分解に関与する可溶性メタンモノオキシゲナーゼをターゲットとして M 株に特異的なプライマーを設計し、PCR 条件検討を行った。本方法で TCE 汚染地下水中の M 株を迅速、簡便かつ特異的に計数することが可能となった。

特許

- 1) 岩崎一弘、矢木修身、内山裕夫、田中秀夫 ①特願平 9-302007、特開平 11-128904、特許番号 3227488 ②水銀汚染物の浄化法 ③水銀汚染物を、水銀化合物還元酵素遺伝子群を導入した組換え微生物により浄化する方法であって、前記組換え微生物が *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134 であり、かつその系中にチオール化合物を共存させることを特徴とする水銀汚染物の浄化法。
- 2) 古川謙介、熊丸哲也 ①特願平 10-297665 ②P C B および関連化合物を分解する酵素をコードする遺伝子 ③異種の P C B 分解菌由来のピフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子を DNA シャフリングにより組み換えることにより得られ、P C B および関連化合物を分解するピフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしていることを特徴とするキメラ遺伝子。
- 3) 大竹久夫 ①特願平 11-354381 ②運動性を有する微生物を用いる有害物質の検出方法 ③多くの細菌は、鞭毛モーターを回転運動させ水中を泳ぐ。鞭毛モーターの回転運動は、有害物質により極めて鋭敏かつ迅速に阻害され、その結果細菌の運動が停止する。有害物質により細菌が運動を停止する程度を蛍光測定により簡便に計測する手法を考案することにより、運動性細菌を用いて化学物質の毒性を迅速に試験する方法を発明した。
- 4) 古川謙介、陶山明子 ①特願 2000-085825 ②新規なテトラクロロエチレン脱塩素化酵素遺伝子 ③テトラクロロエチレン (PCE) 汚染土壌より分離した *Desulfitobacterium* 属 Y51 株は PCE を 0.6 μ M の低濃度から 960 μ M の高濃度にわたって *cis*-1,2-ジクロロエチレンへと完全に脱塩素化する。Y51 株から PCE 脱塩素化酵素を精製し、PCE 脱塩素化酵素遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。本遺伝子は *Desulfitobacterium* 属からはじめて単離された脱塩素化酵素遺伝子であり、広範な濃度の PCE の迅速な脱塩素化を示す遺伝子である。
- 5) 矢木修身、岩崎一弘、橋本顕子 ①特願 2000-115688 ②微生物による有機塩素化合物汚染環境の浄化方法 ③ *Mycobacterium gilvum* AK 株または *Mycobacterium duvalii* OS 株を有機塩素化合物による汚染土壌または汚染水に散布することを特徴とする浄化手法。
- 6) 中村邦彦 ①特願 2001-295761 ②水銀汚染物の浄化法とそれに用いる微生物 ③メチル水銀や 2 価の水銀イオンなどの水銀化合物に汚染した土壌に水銀化合物を水銀蒸気に変換できる海洋細菌を加え、土壌中の水銀化合物は、細菌の酵素により水銀蒸気に変換され除去される技術。