

「環境低負荷型の社会システム」
平成 8 年度採択研究代表者

矢木 修身

(東京大学大学院工学系研究科附属 水環境制御研究センター 教授)

「微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究」

1. 研究実施の概要

微生物を活用して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)、PCB、有機及び無機水銀化合物等で汚染した土壌を修復するバイオレメディエーション技術の確立を目的として研究を実施した。分解微生物の探索を行い、分解能を有する新たな種々の微生物を発見すると共に、組換え技術を用いて機能を強化した微生物を創生した。これらの微生物の有する分解特性、分解機構及び分解酵素遺伝子を解析すると共に、分解微生物の生態系への影響評価技術の開発を行うと共に、バイオレメディエーション技術の有効性を明らかにした。さらに、本技術の実用化を目指しパイロットスケールでの浄化効果を検討する。

2. 研究実施内容

世界各地で問題となっているTCE、PCE、TCA及びPCB等の有機塩素化合物並びに水銀等の重金属による土壌汚染を、微生物を用いて修復するバイオレメディエーション技術の実用に際しての重要な課題である、微生物の修復機能の向上化と修復技術の安全性評価手法の開発研究を行った。これらの問題を解決するため(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)土壌・地下水シミュレータを用いた修復技術の適応性の5課題について検討した。

(1) 分解能強化微生物の開発

TCE、PCE、TCA、トリクロロ酢酸、PCB及び水銀化合物を分解する各種の微生物を単離・同定すると共に、分解特性、分解機構及び分解酵素の諸性質を調べた。メタン酸化細菌*Methylocystis* sp. M(M株)のTCE分解機構を検討した。TCEの分解は、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)の酵素作用によるため、MMOのTCE分解活性、プロピレン酸化活性、ナフタレン酸化活性、及びMMOに関与するmRNAの生成量に及ぼす重金属の影響について検討した。M株のMMO活性は、銅濃度に大きく影響を受け、銅濃度を低く保つことが活性発現に重要であること、また培養に際しての窒素源の種類が活性の発現に重要であること、さらに

mRNA量は、TCE分解活性と高い相関があることが判明した。

新たに分離した強力なPCE脱クロル化菌*Desulfitobacterium* sp. Y51から2種類のPCEデハロゲナーゼを精製し、酵素的性質を調べた。酵素ⅠおよびⅡはそれぞれ、分子量60kDa & 55.4kDa, V_{max} 25,700 & 19,700 (nmol/mg蛋白)であり、微生物によるPCEの完全分解が可能であることが示唆された。

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、1 mg/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。

(2) 土壌中における微生物の挙動解析

汚染環境中に導入された微生物の安全性の評価項目として、環境中における生存・増殖性は重要である。それゆえ、培養を必要とせずかつ短期間で検出が可能な導入微生物の検出法を検討した。TCE分解能を有するメタン資化性菌(M株)のメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子の特異的な部分をPCR法で増幅し、M株を検出する手法を用いて、砂地土壌を充填した土壌・地下水カラム中でのM株の挙動を調べた。食塩を用いるトレーサ試験を対照実験としM株の挙動を解析した。食塩の土壌への吸着はほとんど認められなかったが、M株の移動速度は食塩の1/2程度で遅く、また土壌にかなり吸着されるものと考えられた。本PCR法は、地下水中的M株の挙動解析に有効であることが判明した。

(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、運動性を有する微生物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の毒性を短時間で測定できることがわかった。*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。

(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法を検討した。メタン酸化細菌を対象として、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の分離方法を検討し本法が有効であることを確認した。本法を用いて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が把握できることが明らかとなった。

(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

縦×横×高さが1.0×2.0×1.5mの大型のステンレス製土壌・地下水シミュレータを制作しM株のTCE汚染土壌に対する浄化効果を調べた。本シミュレータは中央で分離され、2室として利用できるように作られている。本装置に川砂を充填し、これにTCEを0.2mg/lとなるよう汚染させ、M株を5×10⁷コロニー/mlになるように添加し、TCEの分解を調べた。空隙率は約50%であり、汚染水をポンプで循環した。M株無添加系ではTCEの分解はほとんど認められなかったが、M株添加系では、12時間でTCE濃度が検出限界以下となった。砂地中ではM株がTCEを効率よく分解できることを確認した。

水銀還元酵素群(merオペロン)を組み込んだ組み換え微生物*Pseudomonas putida* PpY101/pSR134のアルギン酸ゲルの固定化菌体を用いて、バイオリアクターによる水中の塩化第二水銀除去速度を検討した。その結果、20mg/lの塩化第二水銀汚染水を半連続的に除去することが可能であることが明らかとなった。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

< 海外 >

- K. Furukawa, Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. Current Opinion in Biotechnology 11, 244-249(2000)
- T. Watanabe, R. Inoue, N. Kimura, K. Furukawa, Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 J. Biol. Chem 275(40) 31016-31023(2000)
- K. Nakamura, M. Hagimine, M. Sakai, K. Furukawa, Removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria Biodegradation 10, 443-447 (2000)
- S. Okino, K. Iwasaki, O. Yagi and H. Tanaka, Development of a biological mercury removal-recovery system, Biotechnol. Lett., Vol.22, 783-788(2000)
- H. Wu, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi and H. Ohtake, Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Bacteriology, Vol.182, 3400-3404(2000)
- K. Iwasaki, O. Yagi, Y. Ishibashi and H. Seto, Survival and effect of genetically engineered pseudomonades in the soil environment, Environ. Sci., Vol.13, 483-

489(2000)

- A. Hashimoto, K. Iwasaki, N. Nakasugi, M. Nakajima and O. Yagi, Degradation of irchloroethylene and related compounds by *Mycobacterium* spp. isolated from soil, Clean Products and Processes, Vol.2, 167-173(2000)
- A. Nishi, K. Tominaga, K. Frukawa, 90-kilobase conjutgative chromosomalel element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *pseudomonas putida* KF715. J. Bacteriol 182, 1949-1955(2000)
- K. Nakamura, J. Aoki, K. Morishita, M. Yamamoto, Mercury volatilization by the most mercury-resistant bacteria from the seawater of Minamata Bay in various physiological conditions Clean Products and Processes 2174-178(2000)

< 国内 >

- 矢木修身
微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究
用水と廃水42, 340-345(2000)
- 古川謙介、陶山明子
難分解性有機ハロゲン化合物の微生物分解の現状と展望
化学と生物38, 390-397(2000)
- 末永光、古川謙介
微生物によるPCBの分解
ファインケミカル29, 5 -16(2000)
- 矢木修身
遺伝子組換えは人類を救えるか？その必要性と問題点
続地球の限界 , 日科技練出版社, 127-133(2000)