

含塩素有機リン酸トリエステル分解菌の単離の試み

環境生物化学講座 瀬戸沙織

指導教官 山田良平、解良芳夫、高橋祥司

1 研究の背景および目的

有機リン酸トリエステル類は、殺虫剤などの農薬やプラスチック製品の可塑剤、難燃剤などとして幅広く用いられており、これまで大量に生産されてきた。これらの有機リン酸トリエステル類は、農薬を使用したり、プラスチックを廃棄処理したりすることによって地下水や河川に容易に溶け出し、水環境を汚染し、人体に悪影響を及ぼす可能性がある。有機リン酸トリエステル類の中でも Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (以下 TDCPP と略す) と Tris(2-chloroethyl)phosphate (以下 TCEP と略す) などの塩素を含むものは、毒性が強く発癌物質であることが知られている。また、それらは微生物分解に関する知見がこれまで知られておらず、分解が難しいことが示唆されている。

当研究室ではこれまで、野外採取試料から TDCPP に対して高い収着能を示す酵母と思われる菌株を単離することに成功し、その諸性質について調べてきた。しかし、収着では TDCPP 自体なんの変化も受けず、その特性や毒性は保たれたままであるため再び環境中に放出され、人体に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、TDCPP を無害な物質にまで変化させ無毒化する必要があると考え、含塩素有機リン酸トリエステル類を分解する可能性のある微生物を野外採取試料から単離することを目的とした。

2 研究内容

2-1 スクリーニング

工場、家庭排水、し尿処理場、埋立処分地浸出水、河川水などを中心に試料(土壌、水、泥など)採取を行い、含塩素有機リン酸トリエステルを分解する可能性のある微生物を探索した。

まず、採取した試料を、0.85 % NaCl に懸濁させ、微生物が増殖する際、含塩素有機リン酸トリエステルをリン源として摂取できるようなリン制限完全合成培地に添加し、振とう培養(140 r.p.m.、30、7日間)した。培養液中の TDCPP 濃度は 0.5 $\mu\text{g/ml}$ とした。振とう培養終了後、培養液中の TDCPP を酢酸エチルで抽出し、TDCPP 濃度をガスクロマトグラフィーにより定量した。ここで、30 試料のうち 6 試料において約 20 % 以上の TDCPP の減少がみられた(表 1)。次に、これら 6 試料の培養液中から TDCPP を分解する可能性のある微生物の単離を試みた。その結果、4 種の菌株の単離に成功した。

単離した菌株を図 1 に示す(顕微鏡写真は 7 日間培養後の培養液を撮影したもの)。菌株 No.9A、9B、14 は菌糸および孢子の生育が観察されたことから糸状菌、菌株 No.17A は、大きさや形状などから酵母であることが示唆された。

表 1 野外試料の培養における TDCPP 減少

野外試料 No.	培養期間	TDCPP 減少率
2	7 日間	26 %
7	7 日間	38 %
9	7 日間	23 %
14	7 日間	31 %
17	7 日間	20 %
18	7 日間	21 %

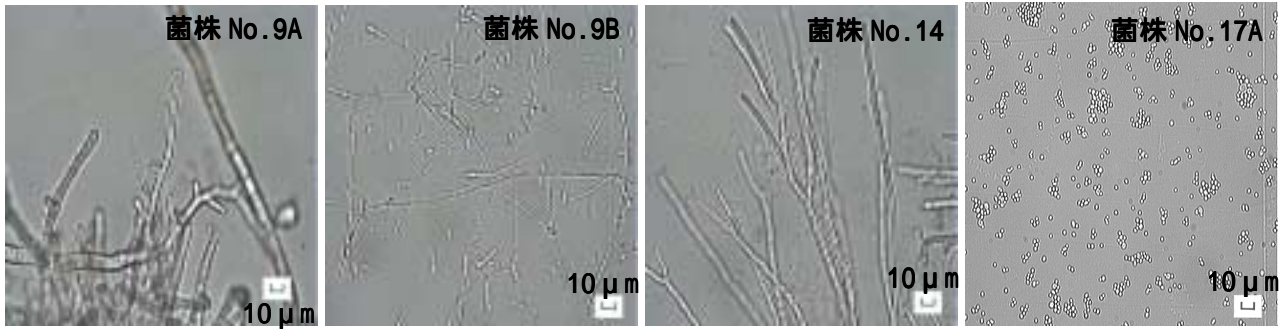


図1 単離した菌株

2-2 単離した菌株による TDCPP 減少

次に、単離した4菌株について、TDCPPの経日的な減少を解析した。添加したTDCPPの培養液中での濃度は0.5 μg/mlとし、30℃で振とう培養した。本培養の期間は12日間とした。培養終了後、培養液中のTDCPPを酢酸エチルで抽出し、TDCPP濃度をガスクロマトグラフィーにより定量した。測定は2日ごとに行った。この結果を図2に示す。4菌株のうち、最も高い減少率を示したものは菌株No.9Bで、12日間で59%の減少率であった。

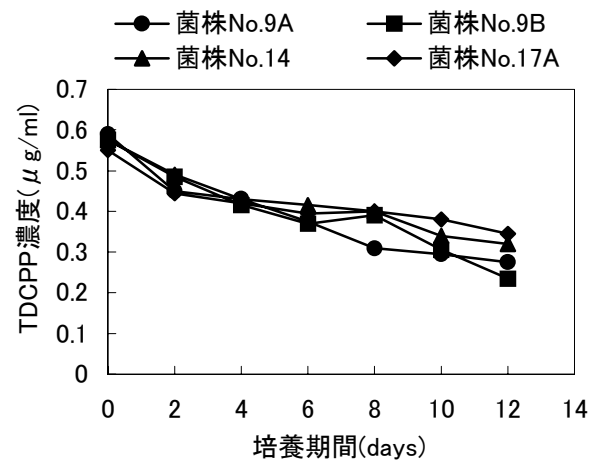


図2 各菌株におけるTDCPP減少の経日変化
縦軸は培養液中のTDCPP濃度、横軸は培養期間を示す。実験は1回行い、TDCPP濃度は同検体2本の平均値をデータとした。

2-3 単離菌の分子生物学的分類同定

2-2において、4菌株のうち最も高いTDCPP減少を示した菌株No.9Bを選抜し、さらに諸性質の検討を試みた。まず、この菌株がどのような微生物であるのかを明らかにするために、遺伝子の塩基配列に基づいた分類同定を行った。

本菌株を、リボソームRNA(以下rRNAとする)をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて同定するため、まず、純粋なゲノムDNAの調製を試みた。次に、調製したゲノムDNAを鋳型にして、polymerase chain reaction(以下PCRとする)を行い、rRNAをコードするrRNA遺伝子(以下rDNAとする)を増幅した。PCRを行うことにより、rDNAを大量に得ることが可能である。微生物をゲノム単位で系統的に分類を行う際、rRNAの中でも、small subunit rRNA(SSU rRNA)として分類される16S rRNA(原核生物)、18S rRNA(真核生物)の遺伝子(それぞれ16S rDNA、18S rDNAとする)の塩基配列解読がよく利用されている。それらの分子の両端には保存性の高い塩基配列領域が存在するので、これらを標的としたPCRプライマーを用いればSSU rRNAの遺伝子(SSU rDNA)のほぼ全領域を増幅することができる。ここで、本菌株は顕微鏡観察より、菌糸を形成する糸状菌(真核生物に分類される)であることが明らかになっ

たので、真核生物の 18S rDNA に対応するプライマーセット (forward 9-26、reverse 1533-1514) を使用した。PCR 後、増幅 DNA 産物を分離・精製するためにアガロースゲル電気泳動を行った。この結果、1800 塩基 (1800 bp) 付近に認められた単一のバンドは、真核生物の 18S rDNA の長さとも一致したので、分離・精製した増幅 DNA 産物は 18S rDNA 断片であると確定した。分離・精製した後、18S rDNA 断片をプラスミドにクローニングし、大腸菌へ導入した。その後、大腸菌を培養し、18S rDNA 断片を含むプラスミドを単離して、18S rDNA 断片の種々の長さの欠失体を構築した。次に、構築した 18S rDNA 断片を有するプラスミドの一本鎖 DNA を調製し、18S rDNA の塩基配列を解析した。解析した塩基配列のデータを、日本 DNA データバンク (DBJ) を利用して、データベース内にある既知データと相同性検索し、系統解析を行った。

その結果、*Ascomycota* (子のう菌門) *Euascomycetes* (真正子のう菌亜門) に属するカビである可能性が示唆された。また、*Paecilomyces tenuipes* との間にも最も高い 97 % の相同性を示した。図 3 に菌株 No.9B の系統樹を示す。

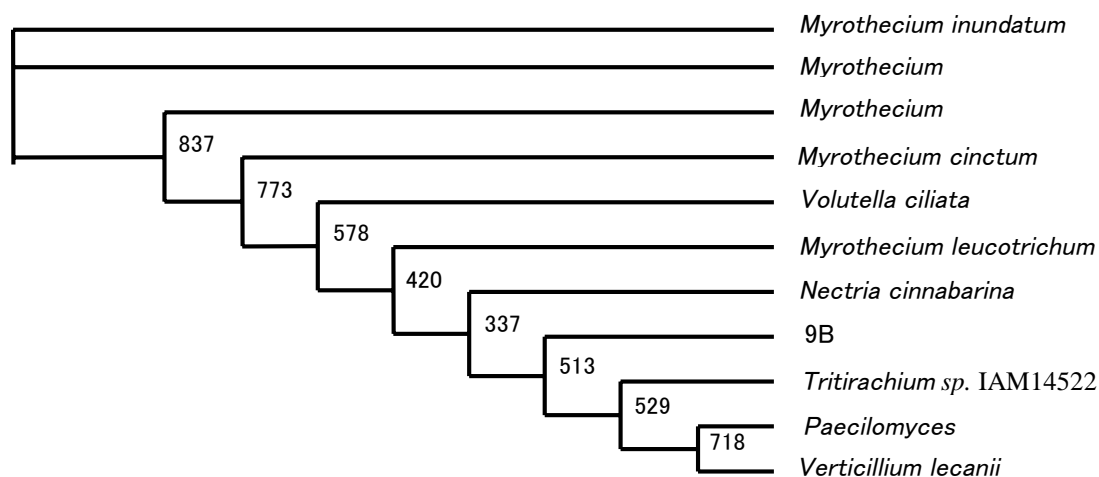


図 3 菌株 No.9B の系統樹

2-4 添加孢子数の違いが TDCPP 減少に及ぼす影響

次に、添加孢子数と TDCPP 減少との関係について検討した。菌体濃度の増加に伴う TDCPP 減少の増加を期待し、初期の添加孢子数を変化させ、それぞれの場合の TDCPP 減少を経日的に測定した。

保存していた孢子懸濁液 (310000 個/μl) を培地で希釈してその 0.5 ml が 30 個、3000 個あるいは 300000 個の孢子を含むようにした後、それぞれを本培地 4 ml に添加し、TDCPP 濃度は 0.5 μg/ml として、本培養 (140 r.p.m.、30、14 日間) を開始した。菌体重量は、メンブレンフィルターを用いて培養液全量を吸引し過して測定した。測定は 2 日ごとに行った。また、減少能を評価するためのブランクとして、孢子懸濁液を加えた直後にオートクレーブ滅菌し、同様に TDCPP を添加したものをを用いた。この結果を図 4 に示す。図 4 より、添加孢子数の違いに関わらず、30 % ~ 40 % の TDCPP 減少が認められた。しかし、菌体濃度の増加に伴う TDCPP 減少の増加が観察されなかったことから、菌体濃度と TDCPP 減少の関係を明確にすることはできなかった。従って、今後、培養中の培養液の性質を明らかにし、培養条件の向上の検討および本菌株が TDCPP に対する分解菌かどうかを究明することが必要であると考えられる。

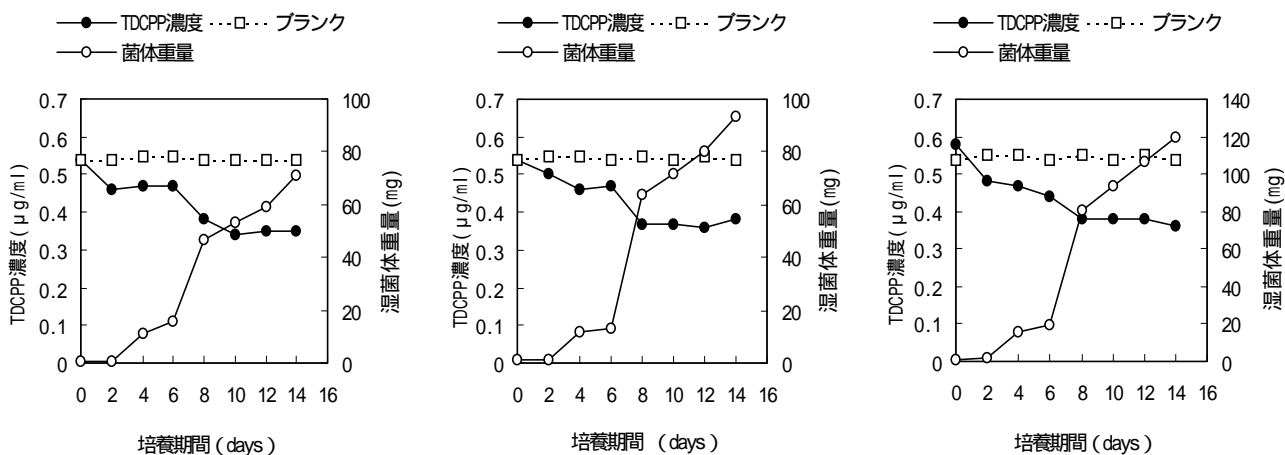


図4 各添加孢子数における TDCPP 減少

左軸は培養液中の TDCPP 濃度()およびブランクの TDCPP 濃度()、右軸は湿菌体重量()、横軸は培養期間を示す。a)は初期孢子数 30 個、b)は初期孢子数 3000 個、c)は初期孢子数 300000 個の結果である。実験は 1 回行い、TDCPP 濃度は同検体 2 本、湿菌体重量は同検体 3 本の平均値をデータとした。湿菌体重量は培養液全量(4.5 ml)分の重量を示す。

3 まとめ

- スクリーニングの結果、No. 9 鳥越廃棄物処分場排水から 2 菌株(菌株 No.9A、9B とした)、No.14 長岡中央浄化センター排出口付近の河川水から 1 菌株(菌株 No.14 とした)、No.17 新潟環境中央研究所排出溝の泥から 1 菌株(菌株 No.17A とした)を単離することができた。
- 4 菌株の形態学的な観察の結果、菌株 No.9A、9B、14 は糸状菌、菌株 No.17A は酵母であることが示唆された。
- TDCPP 濃度は、12 日間で 0 日目と比べて菌株 No.9A は 53.4 %、菌株 No.9B は 59.1 %、菌株 No.14 は 44.3 %、菌株 No.17A は 37.3 %の減少を示した。
- 単離した 4 菌株のうち、最も TDCPP 濃度の減少が大きかった菌株 No.9B について分類同定を行った結果、*Ascomycota*(子のう菌門) *Euascomycetes*(真正子のう菌門) に属するカビである可能性が示唆された。また、*Paecilomyces tenuipes* との間に最も高い 97 %の相同性を示した。
- 培養開始時に添加する孢子数を種々変えて TDCPP の減少を検討した。添加孢子数の違いに関わらず、30 %~40 %の TDCPP 減少が認められたが、菌体濃度の増加に伴う TDCPP 減少の増加が観察されなかったことから、菌体濃度と TDCPP 減少の関係を明確にすることはできなかった。
- 今後、培養中の培養液の性質を明らかにし、培養条件の向上の検討および本菌株が TDCPP に対する分解菌かどうかを究明することが必要であると考えられる。