

難分解性 Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate 分解微生物の単離と特徴解析

環境生物化学研究室 川島 浩司

指導教官 山田 良平、解良 芳夫、高橋 祥司

緒言

Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) は、難燃剤、潤滑油添加剤などの用途において使用されている、代表的な含塩素有機リン酸トリエステル類であり、様々な毒性を有していることから、その使用に伴う環境への流出が懸念されている。しかしながら、TDCPP は物理化学的に非常に安定であり、微生物により分解されるといふ報告も得られていない。

当研究室では、これまでに TDCPP を唯一のリン源とした完全合成培地を用いて TDCPP 分解能を有する微生物のスクリーニングを行い、高い TDCPP 分解能を有する集積培養菌群 No. 45D が得られている。また、集積培養菌群 No. 45D の諸性質の解析も行われ、200 μM の無機リン酸の添加は、TDCPP の分解にほとんど影響を与えないが、脱塩素化を促進するということが明らかとなった。この結果から、TDCPP 分解とその中間代謝産物と予想される 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP) 分解は別々の菌により行われていることが考えられた。

そこで本研究では、集積培養菌群 No. 45D の微生物群集構造を、16S rRNA 遺伝子を標的とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) 法により解析することと、集積培養菌群 No. 45D から TDCPP 分解菌を単離し、その特徴を解析することを目的とした。

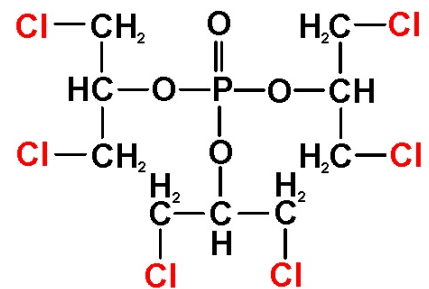


Fig. 1 TDCPP の構造

結果および考察

1 DGGE 法による集積培養菌群 No. 45D の菌叢解析

これまでの研究により、集積培養菌群 No.45D 中には、TDCPP 分解と 1,3-DCP 分解は別々の菌により行われており、また、200 μM 程度の無機リン酸存在下において 1,3-DCP 分解菌が十分に生育してくる可能性が示されている。そこで DGGE 法により集積培養菌群の菌叢解析を行い、分解に関与する菌を推定した。

DGGE の結果、No. 45D には複数種の微生物が存在し、また、無機リン酸の存在により、その微生物群集構造に変化が生じることが明らかとなった (Fig. 2)。それぞれの菌の TDCPP 分解における役割を推定すると、培養開始時に優占種となっているバンド 6 が TDCPP の分解を行い、無機リン酸の存在下で、培養時間の経過に伴い存在比が増加したバンド 1 が 1,3-DCP の分解を行なっている菌であると考えられる。配列解析の結果、バンド 6 は多くの *Sphingomonas* 属の菌と 100% の相同性を示した。*Sphingomonas* 属に属する菌では、難分解性汚染物質を利用する能力がある種が数多く知られている。また、バンド 1 は何種類かの *Acidovorax* 属の菌と 100% の相同性を示した。*Acidovorax* 属では、Chlorobenzene 分解菌などが報告されている。

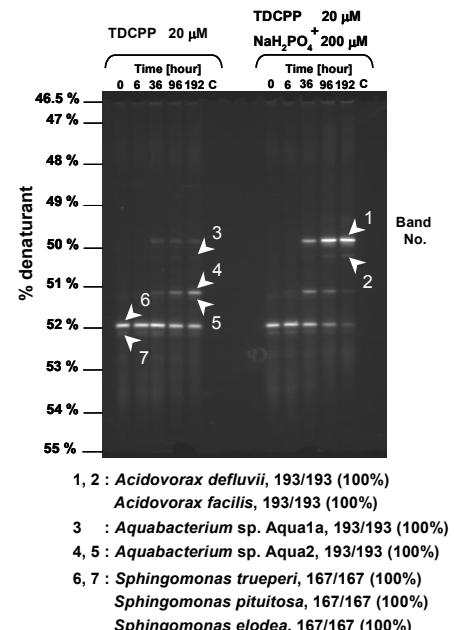


Fig. 2 DGGE 法による No. 45D の菌叢解析

16S rRNA 遺伝子の V3 領域を PCR により増幅し、その PCR 産物 1 μg を、8%ポリアクリルアミドゲル (変性剤濃度勾配 45-55%) を用いて、60 V で 16 時間、60°C で泳動した。

2 限界希釈法による TDCPP 分解微生物の単離

集積培養菌群 No.45D 中には、TDCPP 分解菌と 1,3-DCP 分解菌が、それぞれ別々に存在することが示唆されたので、TDCPP を唯一のリン源として利用できる微生物を限界希釈法により単離した。単離操作の結果、顕微鏡観察による細胞形態およびプレート上で形成するコロニーの形は単一となり、純粋菌株が得られたと考えられた。この菌を TDK1 株と名付け、TDK1 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定したところ、*Sphingomonas trueperi* と 99.4% の相同性を示した。また、Fig. 3 に示した系統樹上でも TDK1 株は *Sphingomonas trueperi* とクラスターを形成した。この結果より、TDK1 株は *Sphingomonas* 属に属することが示された。また DGGE (Fig. 2) のバンド 6 の配列と 100% 一致した。

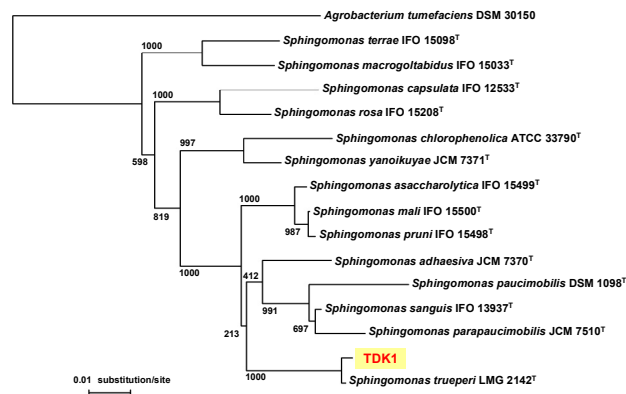


Fig. 3 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

Agrobacterium tumefaciens をアウトグループとして、近隣結合法により作成した。数値はブートストラップ法による系統学的信頼度を示す。

3 TDK1 株による TDCPP の分解

TDK1 株による TDCPP の分解能の測定を行なった (Fig. 4)。また、これまで測定されていなかったが、代謝産物として推定されていた 1,3-DCP も GC-MS により測定した。

TDK1 株は初期濃度 20 μM の TDCPP を 3 時間で速やかに分解した。また、TDCPP の消失に伴い、1,3-DCP の遊離がみられ、6 時間でほぼ化学量論的な 1,3-DCP が遊離した。このことから、TDCPP の分解により、1,3-DCP が遊離することが明らかとなった。

さらに培養を続けたところ、1,3-DCP が減少し、ほぼ同量の塩化物イオンの遊離が見られたが、その量はコントロールと同程度であった。このことから、TDK1 株に 1,3-DCP 分解能力はないことが示された。

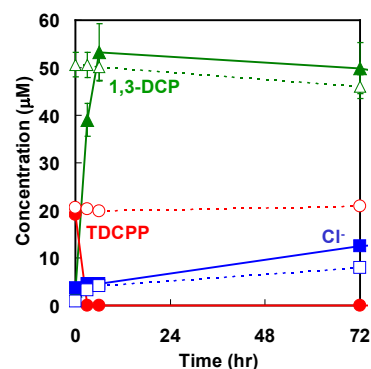


Fig. 4 TDK1 株による TDCPP 分解

○、△、□ はコントロールを示しており、TDCPP 20 μM 、1,3-DCP 60 μM を含み、滅菌した菌を添加した。

4 TDK1 株の各種有機リン酸トリエステル類に対するリン源としての資化性

TDK1 株の分解特性をさらに特徴付けるために、TDCPP 以外の有機リン酸トリエステル類に対する資化性を、それらを唯一のリン源とした場合の生育により調べた (Fig. 5)。

TDK1 株は、TDCPP 以外のハロアルキル系トリエステルである TCEP、TBPP、アリール系トリエステルである TCP、TPP を利用することができた。しかしながら、TCEP を用いた場合、他の基質を用いた場合より生育に遅れがみられた。また、アルキル系トリエステル類を用いた場合、生育はまったく見られなかった。

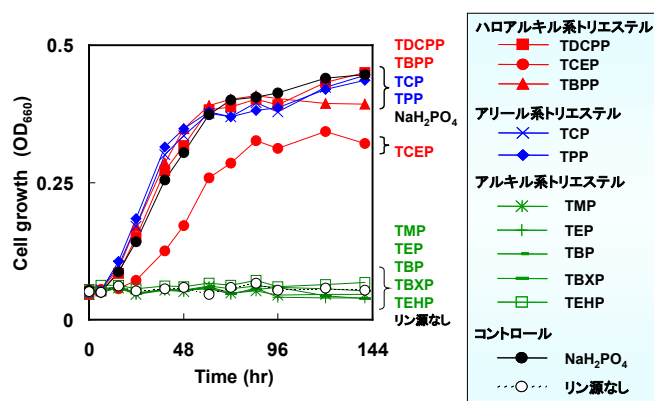


Fig. 5 TDK1 株の様々な有機リン酸トリエステル類に対するリン源としての資化性

各種有機リン酸トリエステルを唯一のリン源として用いた。また、濃度は 5 μM とした。