

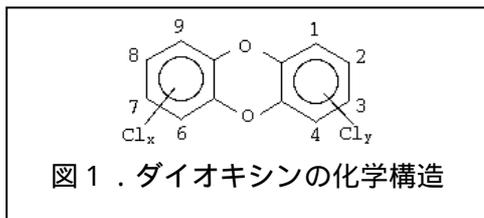
2. ハロゲン化芳香族化合物分解細菌の探索と分子生物学的研究 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸分解菌の探索および分離

機能材料工学専攻

天田 啓

はじめに

ハロゲン化芳香族化合物は、医学、工学そして農学など、様々な科学の発展に多くの貢献をしてきた。しかしながら、最近の研究により、これらハロゲン化芳香族化合物の一部が、生物あるいは環境に対して、様々な影響を及ぼしていることがわかってきた。環境汚染物質として近年、特に注目されているポリ塩化ジオキシンあるいはポリ塩化ジベンゾフラン（通称：ダイオキシン、図1）やポリ塩化ビフェニル（PCB）なども、ハロゲン化芳香族化合物の一種である。



本研究では、これらハロゲン化芳香族化合物のモデル化合物として、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D、図2）を用いている。



2,4-D は人工的に合成された植物ホルモンで、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸とともに、ベトナム戦争中に使用された枯葉剤の主成分である。この化合物もダイオキシンなどと同様なその構造的な特徴から、環境への影響が懸念されていたが、動物に対してはそれほど有害ではないとされている。今年度は、環境中から 2,4-D を分解する土壌細菌を探索し、その分離を試みた。

実験方法

九州北部を中心に関東以西の温泉、田畑、河川など約 100 ヶ所から土壌を採取し試料とした。それぞれの土壌サンプルに滅菌水を加え激しく攪拌した後の上澄み液を、2,4-D を唯一の炭素源とする液体基本培地に加えた。30℃ で 4 日間振盪培養した後に、培養液の一部を採取し、新しい液体培地に植え継いだ。この植え継ぐ操作を数回行うことで、2,4-D 分解菌を集積した。この植え継ぎの際に 2,4-D 濃度を分光法（極大吸収波長：284 nm）にて測定した。集積培養後、寒天を加えた固体基本培地に培養液の一部を塗布し、コロニーの形成を待った。出現したコロニーを観察し、色や形など性状の異なるコロニーを全て釣菌し、分離を試みた。分離できた細菌を再び液体基本培地に植菌し、2,4-D 濃度の減少を確かめた。分離の操作は固体培地上のコロニーが 1 種類になるまで行い、分離された細菌を -80℃ で保存した。一部の細菌については、光学顕微鏡あるいは、アルミ薄板上で乾燥後、走査型電子顕微鏡（Keyence 社製 VE-7800）による観察を行った。

実験結果と考察

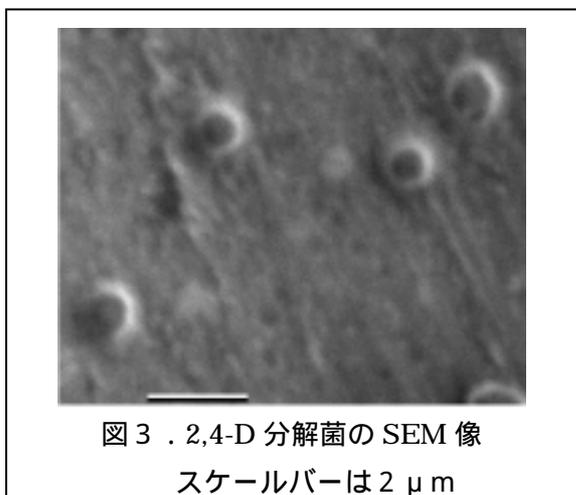
3 回の集積培養後、培養液中の 2,4-D 濃度を測定したところ、100 種類のサンプルのうち 50 種類のサンプルで 2,4-D 濃度の減少が見られた。これらのサンプルの一部を固体培地に塗布したところ、ほとんどの固体培地上で複数種類のコロニーの形成が見られた。コロニーを釣菌し別々の液体培地に植菌し再び培養を行い、2,4-D 濃度を測定した。減少が見られた培養液の一部を固体培地に塗布すると、ほとんどの培地上には、1 種類のコロニーのみの形成が見られた。これらの操作で 2,4-D 分解菌を 27 種類（表 1）分離することができ、すべてを -80℃ で保存した。これらのうち、コロニーの性状から判断すると、何種類かは同じかあるいは非常に近縁の種である可能性がある。

表 1. 分離された 2,4-D 分解菌の採取地と分解率

採取地	分解率(%)	採取地	分解能(%)	採取地	分解能(%)
大分県 由布岳	61.0	奈良県 広陵町	80.5	福岡市	93.5
大分県 由布岳	87.8	奈良県 広陵町	56.1	福岡市	93.9
大分県 水分	82.9	愛知県 岡崎市	75.6	福岡市	84.5
熊本県 大津町	73.2	千葉県 根木名川	90.2	福岡市	85.9
熊本県 大矢野町	80.5	千葉県 成田市	90.2	福岡市	83.0
熊本県 大矢野町	92.7	宗像市	80.5	福岡市	84.9
広島県 粟田	90.3	宗像市	78.1	福岡市	84.7
広島県 粟田	90.2	福岡市	84.9	福岡市	85.1
広島県 帝釈	85.4	福岡市	80.8	北九州市	84.9

現在、分離された 2,4-D 分解菌に対して、グラム染色による分類を行っているところである。今までに調べることができた数種類の分解菌に関しては、グラム陰性であることがわかった。

また、熊本県上天草市大矢野町から得られた 2,4-D 分解菌を走査型電子顕微鏡により観察したところ、球菌であることがわかった(図 3)。



今後は、分離されたすべての分解菌に対して、グラム染色や顕微鏡による観察を行った後、分解菌による糖の資化性や酵素の生産性などの微生物学的な解析を行いたいと考えている。また、分解菌それぞれの増殖曲線あるいは 2,4-D 分解の時間経過など培養工学的な解析も行う予定である。

さらに、分子系統的な解析、つまり 16S rRNA

遺伝子の塩基配列を決定し、データベースを用いて種の同定も行う予定である。また、同定が終わった細菌から 2,4-D 分解初発酵素を含む遺伝子全長を抽出し、塩基配列を決定する。さらに、その塩基配列をもとに、分解酵素タンパク質の発現系を構築し、精製した酵素タンパク質を用いて生化学的性質を検討したいと考えている。

まとめ

約 100 ヶ所から採取した土壌サンプルから、26 種類の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸分解菌を分離することができた。今回調べることができた数種類に関しては、すべてグラム陰性菌であった。