

2B10-4 難分解性 Tris (2-chloroethyl) phosphate の微生物分解

○川崎 愛美, 佐竹 育子, 遠藤 祐介, 高橋 祥司, 解良 芳夫,
山田 良平
(長岡技科大)

[目的] Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) 等の含塩素有機リン酸トリエステルは、可塑剤、難燃化剤などに幅広く使用されている。しかし、その高い化学的安定性かつ難分解性から、環境中への蓄積が考えられ、また近年の研究により発ガン性、変異原性などの毒性が指摘されていることから、人の健康や生態系に与える影響が懸念されている。本研究では、微生物機能を利用したTCEPを分解除去技術の開発を目的とし、野外試料よりTCEP分解微生物を探索・単離を検討した。[方法と結果] 有機リン酸トリエステル類に曝露されている可能性のある場所から採取した野外試料をTCEPが唯一のリン源とした完全合成培地に接種し、TCEP分解微生物を集積培養した。得られた集積培養液はTCEPを分解し、中でも分解の早い2つの集積培養液 (No.45-DE, No.67-E) は、 $20\mu\text{M}$ のTCEPを24時間以内で完全に消失させた。また、 Cl^- の遊離もみられ、その濃度は理論値の約45～66%に達した。これら集積培養液からTCEP分解微生物の単離を検討したところ、No.45-DEから長桿状の菌株2株、No.67-Eから短桿状の菌株3株のTCEP分解菌を得ることができた。単離した菌株の16S rDNAの塩基配列を解析し、DNAデータベースに対して相同性検索を行ったところ、No.45-DEから単離した2つの菌株は*Sphingomonas trueperi* と99.4%の相同性を示し、No.67-Eから単離した3つの菌株は*Sphingomonas* sp. MBIC3990と約98%の相同性を示した。

Microbial degradation of Tris (2-chloroethyl) phosphate, a persistent organophosphorous compound

○Manami KAWASAKI, Ikuko SATAKE, Yusuke ENDO,
Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA, Ryo-hei YAMADA
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words tris(2-chloroethyl)phosphate, *Sphingomonas*, microbial degradation

2B11-1 *Gordonia* 属のアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子の解析

○鈴木 雅智, 羅 景洙, 松宮 芳樹, 久保 幹
(立命館大・理工・化生工)

【背景と目的】我々はこれまでに長鎖環状炭化水素を分解可能な微生物を単離・同定してきた。その中でも*Gordonia*属6株は他の属の株と比較し、長鎖環状炭化水素を効率よく分解した。アルカンの初級酸化酵素であるアルカンヒドロキシラーゼの遺伝子 (*alk*遺伝子) の解析から、*Gordonia*属の*alk* 遺伝子は*Gordonia* sp. TF6 の1種類のみが報告されているが、単離してきた*Gordonia* sp. NDKY76Aは2種類の*alk*遺伝子を有していた。そこで本研究では、*Gordonia*属の*alk*遺伝子に関する知見を得るため、これら*Gordonia*属6株の*alk*遺伝子を解析した。【結果】*Rhodococcus* 属の*alkB*の保存領域に特異的なPCRプライマーで*Gordonia*属6株の*alk*遺伝子を増幅、クローニングし、塩基配列を決定した。その結果、いずれの*Gordonia* 属も *alk* 遺伝子を2種類 (*alkG1*, *alkG2*) 有していた。これら *alk* 遺伝子の塩基配列の全長を決定したところ、*alkG1*は*R. erythropolis* NRRL B16531の*alkB*と、*alkG2*は*Gordonia* sp. TF6の*alkB*とそれぞれ約95%の相同性を示した。よって長鎖環状炭化水素分解菌である*Gordonia*属6株はそれぞれ2種類の*alk* 遺伝子を有していることが明らかとなった。

Analysis of alkane hydroxylase gene in genus *Gordonia*.

○Masatomu SUZUKI, Kyung-Su NA, Yoshiki MATSUMIYA,
Motoki KUBO
(Dept. Biosci. Biotech., Ritsumeikan Univ.)

Key words alkane hydroxylase, *Gordonia*, cyclic alkane, biodegradation

2B10-5 難分解性 Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate の微生物分解

○川島 浩司, 小沼 功, 上戸 潤, 高橋 祥司, 解良 芳夫,
山田 良平
(長岡技科大)

含塩素有機リン酸トリエステルである Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) は、難燃剤等に使用されており、様々な環境中で検出されている。TDCPPの毒性が報告されているが、微生物による分解の報告はなく、当物質による環境汚染が懸念されている。これまでに、TDCPPを唯一のリン源とした集積培養により、TDCPP分解能を有する微生物群集が得られ、代謝産物として Cl^- の生成が確認されている。本報告では、無機リン酸塩存在下における TDCPP 分解挙動と微生物叢の変遷、およびTDCPP分解菌の単離を述べる。集積培養菌群のTDCPP分解に及ぼす無機リン酸塩添加の影響を検討したところ、無機リン酸塩添加により、TDCPP分解は少し抑制されたが、 Cl^- の遊離量は増加した。無機リン酸塩の存在は、TDCPPの代謝産物と推定される 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)の脱塩素化を促進させると考えられた。そこで、1,3-DCPの脱塩素化に及ぼす無機リン酸塩添加の影響を検討したところ、無機リン酸塩添加により Cl^- の遊離量は増加した。また、集積培養菌群をDGGE法により解析したところ、無機リン酸塩の添加により微生物叢に変化がみられ、無機リン酸塩添加による脱塩素化能の向上は微生物叢の変化に起因することが明らかとなった。また、TDCPP分解と1,3-DCPの脱塩素化は別々の微生物により行われていることが示唆された。集積培養菌群からTDCPP分解菌を単離し、16S rDNAの塩基配列を決定したところ、*Sphingomonas trueperi* と最も高い相同性を示した。

Microbial degradation of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate, a persistent organophosphorous compound

○Kouji KAWASHIMA, Isao KONUMA, Jun KAMITO,
Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA, Ryo-hei YAMADA
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words organophosphoric acid triester, microbial degradation

2B11-2 異なる有機水銀分解遺伝子 (*merB*) をクローニングした大腸菌の有機水銀分解特性

○遠藤 銀朗¹, 成田 勝², 松井 一彰¹
(¹東北学院大学工学部, ²東北緑化環境保全 (株))

特定の細菌が持っている有機水銀分解酵素 (MerB) は、有機水銀によって汚染された環境中で細菌が生存するために無くてはならない酵素である。この酵素タンパク質をコードする*merB* 遺伝子は、一般に*mer*オペロンと呼ばれる水銀耐性を付与する遺伝因子に構造遺伝子として含まれており、広スペクトラム水銀耐性細菌に必須の遺伝子とされている。これまで発見されている*merB*遺伝子は複数種あり、同一の*mer*オペロンに数種含まれている場合もある。本研究では、*merB*を保有する代表的な細菌である*Bacillus megaterium* MB1株、*Pseudomonas* sp. K-62株、*Staphylococcus aureus* RN23株がそれぞれ保有している*merB*遺伝子 (合計6種) を大腸菌にクローニングして、それらの*merB*遺伝子産物である有機水銀分解酵素 (MerB) の有機水銀化合物種に対する基質特異性を調べた。

得られた結果より、それぞれの MerB 酵素タンパク質は異なる有機水銀分解能を大腸菌に与えることが知られ、各 MerB タンパク質は有機水銀化合物種に対する基質特異性を有することが知られた。以上のことから、環境を汚染している有機水銀の種類によって、有効に利用しうる*merB*遺伝子を保有する細菌を浄化に適用する必要があることが示唆された。

Characteristics of organomercury decomposition by *E. coli* cloned with organomercury lyase genes from different bacteria

○Ginro ENDO¹, Masaru NARITA², Kazuaki MATSUI¹
(¹Faculty of Eng., Tohoku Gakuin Univ., ²Tohoku Ryokka Kankyohozon Ltd.)

Key words mercury resistant bacteria, organomercury lyase, substrate specificity