

3P-089 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析とビスフェノール A 分解遺伝子組換え体による芳香族化合物分解能の調査

○木場 悟¹, 中川 直也¹, 松村 吉信^{1,2}
(¹関西大・化生工・生命生工, ²関西大学・ORDIST)
ymatsu@kansai-u.ac.jp

Sphingomonas bisphenolicum AO1 株は、bisphenol A (BPA) を含む多くのフェノール系化合物や有機ハロゲン化合物を分解する環境浄化に適した細菌株である。これまでの研究から、本株の BPA 分解能は不安定でその一因として遺伝子構造の不安定さが示唆されている。また、AO1 株の BPA の中間代謝産物分解から BPA 代謝経路も推測され、4-hydroxyacetophenone(4-HAP) が BPA 分解の律速段階であると予想されている。本研究では不安定さの原因特定と BPA 分解酵素遺伝子の探索を目的に次世代シーケンサーによる全ゲノム構造解析を試みた。さらに、BPA 分解能の向上のため *bisdAB* 組換え AO1 株も作成した。AO1 株ゲノムの全塩基配列決定はロシユ 454 ゲノムシーケンサーで行い、約 530 Mb の塩基配列を得た。CLC Genomics Workbench で解析し、総塩基数が約 5 Mb となる 434 個のコンティグを得られ、142,957 個の ORF を確認した。現在、Blast プログラムを用いた同源性検索で ORF のアノテーションを行っている。また、ゲノムやプラスミド配列の精度向上のため、精製プラスミドのみの塩基配列決定も行っている。AO1 株の BPA 分解能を高めるために *bisdAB* 組換えプラスミドを作製し AO1 株に導入した。しかしながら、本組換え体による BPA 分解能の向上は確認できなかった。今後、組換え遺伝子の発現量を確認し、組換え体の改良を行う予定である。

The genomic structure of *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 and bisphenol-A removal by *bisdAB*-recombinant strain AO1.

○Satoru Koba¹, Naoya Nakagawa¹, Yoshinobu Matsumura^{1,2}
(¹Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., ²Kansai Univ., ORDIST)

Key words bisphenol A, Genomic analysis, environmental pollutant, biodegradation

3P-091 *Rhodococcus jostii* RHA1 株の *cis*-1,2-ジクロロエチレン分解能の解析

○荒木 直人, 千野 佳奈子, 笠井 大輔, 政井 英司, 福田 雅夫
(長岡技術大)
masao@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景】塩素化エチレンのうちトリクロロエチレン (TCE) および *cis*-1,2-ジクロロエチレン (cDCE) は土壌・地下水汚染の規制対象となっており、それらの汚染浄化方法として微生物を利用したバイオレメディエーションが期待されている。これまでに我々は、ビフェニル (BPH) 分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA1 に TCE 分解能を見だし、TCE 分解に対する BPH 分解酵素の関与を明らかにした。本研究では、RHA1 株の cDCE の分解能および分解に関与する酵素遺伝子について調べた。

【方法】cDCE の分解を調べるために、W 無機塩培地に懸濁した RHA1 懸濁液 20 ml を 100 ml のバイアルビンに入れ、さらに cDCE を終濃度 76 μM 相当となるように添加した。バイアルをテフロンコートゴム栓およびアルミキャップで密栓した後、30°C、200 rpm で振盪した。cDCE の分解は、バイアルの気相部分 400 μl を採取して flame ionization detector-gas chromatography (GC-FID) で残存 cDCE を定量した。

【結果と考察】コハク酸で培養した RHA1 を用いて cDCE の分解を観察され、さらにエチルベンゼン、TCE または cDCE 存在下で培養した RHA1 株では cDCE 分解が高まった。また、RHA1 の BPH ジオキシゲナーゼ BphA および EtbA 二重変異株では、cDCE 分解能が低下したが一部残存し、cDCE の分解には BPH ジオキシゲナーゼ以外の別の酵素の関与が予想された。

Degradation of *cis*-1,2-dichloroethylene by *Rhodococcus jostii* RHA1

○Naoto Araki, Kanako Chino, Daisuke Kasai, Eiji Masai, Masao Fukuda
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Rhodococcus*, chloroethylene, bioremediation

3P-090 オミックス解析に基づく塩素化エチレン類のバイオレメディエーションによる環境影響評価

○木村 信忠¹, 辻田 知佳¹, 山副 敦司², 関口 勇地³, 野田 尚宏³, 高畑 陽⁴, 野尻 秀昭⁵, 福田 雅夫⁶
(¹産総研・生物プロセス, ²NITE, ³産総研・バイオメディカル, ⁴大成建設, ⁵東大・生セ, ⁶長岡技大・生物)
n-kimura@aist.go.jp

【目的】本研究では、塩素化エチレン類で汚染された地下水のバイオスティミュレーションによる環境修復の過程で活性化する細菌や遺伝子群を特定し、バイオスティミュレーションによる環境への影響について評価する手法を提供することを目的とする。

【方法】汚染サイトに栄養塩や有機物等の浄化材を注入する前から注入後に至る 6 ヶ月間、経時的に採取した地下水から mRNA の抽出し、浄化現場で高発現している機能遺伝子を検出することを目的に、浄化現場のサンプルから抽出した RNA を対象にしたメタトランスクリプトーム解析を実施した。

【結果と考察】浄化材を注入する前から注入後に至る 6 ヶ月間において、1 ヶ月毎に採取したサンプルから mRNA を抽出し、次世代シーケンサー (HiSeq2000) による塩基配列の解析を行った。次に塩基配列データを対象にした機能カテゴリーデータベースである COG (Clusters of Orthologous Groups) や KEGG データベースに対する同源性検索を実施し、発現している遺伝子の分類と経時変化について解析した。さらに、DNA レベルで解析した微生物相に関するメタゲノム解析データと比較し、浄化による微生物生態系へ環境影響について考察した。

Assessment of a biostimulation site on remediation of Tetrachloroethylene by a metatranscriptomic approach

○Nobutada Kimura¹, Chika Tsujita¹, Atsushi Yamazoe², Yuji Sekiguchi³, Naohiro Noda³, Yo Takahata⁴, Hideaki Nojiri⁵, Masao Fukuda⁶
(¹BRI, AIST, ²NITE, ³Biomed. Res. Inst., AIST, ⁴Taisei Co., ⁵Univ. of Tokyo, ⁶Nagaoka Univ. of Tech.)

Key words Tetrachloroethylene, bioremediation, Metatranscriptomics

3P-092 ヒ素超蓄積植物モエジマシダの根圏微生物の単離および特徴づけ

○簡 梅芳¹, 羅 佩昕², 牧田 涼太³, 宮内 啓介⁴, 遠藤 銀朗⁴, 井上 千弘¹
(¹東北大院・環境, ²台湾国立中興大院・植物病理, ³東北大・工, ⁴東北学院大・工・環境建設)
meifang@mail.kankyoh.tohoku.ac.jp

環境中のヒ素汚染を有効に除去する技術の一つとして、ヒ素超蓄積植物であるモエジマシダを用いた生物学的環境浄化技術の適用が考えられる。我々のこれまでの研究により、モエジマシダによるヒ素吸収に先立つヒ素形態の変化には、根圏中の微生物が大きく寄与していることが示唆された。本研究では、モエジマシダの根圏に棲息する微生物に着目し、モエジマシダのより高効率なヒ素吸収に寄与する微生物の獲得を目的として行った。実験手法として、モエジマシダの根圏試料を用いて、複数の単離条件を検討し、根圏微生物の単離を行った。単離した微生物について、16S rRNA 遺伝子による微生物の同定および亜硫酸酸化・還元酵素遺伝子の検出を行ったうえ、ヒ酸・亜硫酸に対する耐性能、ヒ素酸化・還元活性の定性および定量試験、またモエジマシダの根への再定着能について評価した。根圏試料から単離した 100 株以上の微生物のうち、亜硫酸酸化活性を示した菌株が確認された。さらに、液体培地に添加した亜硫酸の 9 割以上を 48 時間以内にヒ酸に酸化した菌株と、モエジマシダの根表面および根内部への定着が認められた菌株があったことから、このような強い亜硫酸能または根への定着能を示す微生物を添加したモエジマシダの栽培実験を行い、より効率的にヒ素を吸収・除去するモエジマシダ・微生物の共栽培条件を検討したい。

Isolation and characterization of microbes in the rhizosphere of an arsenic hyper-accumulator, *Pteris vittata*

○Mei-Fang Chien¹, Pei-Hsin Lo², Ryota Makita³, Keisuke Miyauchi⁴, Ginro Endo⁴, Chihiro Inoue¹
(¹Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Plant Pathology, NCHU, Taiwan, ³Dept. Eng., Tohoku Univ., ⁴Dept. Civil Environ. Eng., Fac. Eng., Tohoku Gakuin Univ.)

Key words arsenic, *Pteris vittata*, rhizosphere bacteria