

## ダイオキシン類化合物を添加したマイクロコズムにおける微生物群集構造と分解遺伝子の多様性の解析

きむらのふただ、かまがたよういち

○ 木村信忠、鎌形洋一

産業技術総合研究所・生物遺伝子資源研究部門

【目的】 ダイオキシンは化学物質の合成過程や廃棄物の燃焼過程において非意図的に生成し、焼却灰（フライアッシュ）や廃棄物処分場の浸出水などを介して拡散する地球規模での環境汚染が大きな社会問題となっている。環境中、特に土壌や河川の底泥などにおいては広範囲かつ低濃度に存在しており、それら进行处理するためには物理・化学的な方法では非効率的である。そこで微生物によるダイオキシン分解の研究が行われ、ダイオキシンを分解する細菌が自然界から分離されている。<sup>1)</sup> 本研究では土壌中におけるダイオキシンの生物学的分解機構について検討することを目的として、ダイオキシン類化合物を添加したマイクロコズムの微生物群集構造と分解遺伝子の多様性について解析を行った。

【方法】 つくば市の森林より表層から約5~10 cm の深さの土壌を採取し、2 mm メッシュのふるいにかけてから実験材料として利用した。300ml 容三角フラスコに森林土壌と M9 培地を混合したスラリー土壌を調製した。これに最終濃度 0.1mM ダイオキシン(DD) または 0.2mM ダイベンゾフラン (DF) を添加した土壌、および無添加土壌の3種類を用意し、25 度で数ヶ月間振とう培養した。培養中にダイオキシンまたはダイベンゾフランを追加するとともに、一定期間ごとに土壌を採取し、ダイオキシン量、全菌数を測定した。土壌中の微生物群集の解析は細菌に特異的な PCR プライマーにより増幅した 16S rRNA 遺伝子のクローン解析と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法により行った。土壌中の芳香族化合物分解遺伝子の解析は基質特異性の決定に関与する芳香族化合物の初発酸化酵素  $\alpha$  サブユニットを特異的に増幅するプライマーによる nested PCR により増幅した DNA 断片を導入したライブラリーを構築し、塩基配列によるデータベース検索と系統樹の作成を行った。

【結果と考察】 16S rRNA 遺伝子のクローン解析の結果から、DD および DF 添加土壌の微生物群集構造に特徴は見られなかった。また既知の芳香族化合物分解菌の存在は確認されなかった。しかしながら分解遺伝子を増幅する PCR 解析により、すべての土壌において分解遺伝子に特異的な配列を含む DNA 断片の増幅が確認された。分解遺伝子の塩基配列から系統樹を作成したところ、すべての土壌には既知の分解遺伝子を含まないクラスターが存在した。そのうち無添加土壌の分解遺伝子ホモログは主に1つのクラスターに属したが、DD および DF 添加土壌の分解遺伝子ホモログは複数のクラスターに分散した。また DF 添加土壌には *Rhodococcus erythropolis* M5 ピフェニルジオキシゲナーゼと同じクラスターに属する分解遺伝子ホモログが存在した。一方、DD 添加土壌には既知の分解遺伝子を含まない特徴的なクラスターが存在した。このことから、化合物を添加した土壌中には多様でユニークな分解遺伝子が優占しているものと考察した。

<sup>1)</sup> Kimura N. et al J. Biosci. Bioengi. (2001) 92, 138 - 143