

2Jp03 *Sphingomonas* sp. TDK1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate 分解酵素の諸特性解析

○鈴木 雄斗, 山田 裕里恵, 森 淳一, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
(長岡技科大)

[目的] Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) などの含塩素有機リン酸トリエステルは可塑剤や難燃材として大量に用いられているが、これらは蓄積性もあり、種々の毒性を有する。近年、これら含塩素有機リン酸トリエステルの廃棄物処分場からの地下水などへの流入が問題視されているが、含塩素有機リン酸トリエステルの微生物分解に関する報告はない。これまで我々は、野外試料から TDCPP 分解能を有する *Sphingomonas* sp. TDK1 株を単離し、当菌株の TDCPP 分解挙動や無細胞抽出液における諸特性の解析を行った。今回は、TDK1 株より TDCPP 分解酵素を均一に精製し、その酵素学的諸特性の解析を行ったので報告する。[方法と結果] TDCPP を唯一のリソ源とした最少培地で培養した *Sphingomonas* sp. TDK1 株から各種カラムクロマトグラフィーを用いて TDCPP 分解酵素を均一にまで精製した。TDCPP を基質とした場合の本酵素の K_m は $81.0 \mu\text{M}$ 、 V_{max} は $5.16 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 K_{cat} は 5.13 s^{-1} であり、至適 pH は 8.0、至適温度は 35°C であった。本酵素活性は 2 価金属イオン存在下で増加したが、金属キレート剤の添加による影響は認められなかった。ICP-MS を用いて酵素中の金属イオンを解析したところ、酵素 1 分子あたり 1 つの Zn を有していることが明らかとなった。本酵素はハロアルキル系有機リン酸トリエステルやアリール系有機リン酸トリエステルを基質とするが、アルキル系有機リン酸トリエステルや有機リン系農薬は基質としなかった。

Characterization of degradative enzyme of tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate from *Sphingomonas* sp. strain TDK1

○Yuto SUZUKI, Yurie YAMADA, Jun-ichi MORI, Katsumasa ABE, Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words organophosphate, tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate, phosphotriesterase, *Sphingomonas*

2Jp05 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株による環境汚染物質浄化能の解析

○前川 睦乃, 土田 昇平, 松村 吉信
(関西大・工・生物工)

[目的] *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株は、環境ホルモンの一つであるビスフェノール A (BPA) を効率的に分解できる。これまでに、BPA 分解活性とその代謝経路を解析し、cytochrome P450 (P450_{bisd}) モノオキシゲナーゼ (P450_{bisd}, Fd_{bisd}, Red_{bisd}) が BPA 代謝の初期反応である BPA の水酸化を触媒していることを明らかにした。細菌型の P450 モノオキシゲナーゼには *Streptomyces griseus* の P450 のような極めて広い基質特異性をもつ種類も存在している。そこで本研究では、AO1 株がもつ環境汚染物質分解能の詳細な調査を目的とした。

[方法および結果] 環境汚染原因化合物を添加した L 培地に AO1 株を植菌・培養し、その化合物の経時変化を HPLC で追跡した。多くの汚染物質でその分解と分解産物が確認され、培養経過に伴って両者の減少も観察された。分解速度は化合物によって大きく異なっていたが、ビスフェノール類化合物や、ビフェニル類化合物、ナフタレン類化合物など、BPA 以外の化合物でも分解が明らかとなった。また、分解が確認された化合物について、HPLC で観察された分解産物を LC-MS で同定した。1,1-bis(4-hydroxyphenyl)ethane の分解産物にも OH 基の付加が確認され、P450_{bisd} の関与が示唆された。

Degradation of environmental pollutants by *Sphingomonas bisphenolicum* AO1.

○Chikano MAEKAWA, Shohei TSUCHIDA, Yoshinobu MATSUMURA
(Dept. Biotech., Fac. Eng., Kansai Univ.)

Key words bisphenol A, *Sphingomonas*, environmental pollutant, cytochrome P450

2Jp04 *Sphingobium* sp. TCM1 株 tris(2-chloroethyl)phosphate 分解酵素の機能解析

○吉田 知史, 高橋 祐樹, 土居 由佳, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
(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類は可塑剤や難燃化剤として広く利用されてきた。その一方で、これらの物質は難分解性であり、神経毒性や発癌性などが報告されていることから、ヒトや生態系に与える影響が懸念されている。これまで我々は、TCEP を唯一のリソ源とした集積培養により、TCEP に対し高い分解活性を有する *Sphingobium* sp. TCM1 株を単離し、TCM1 株および無細胞抽出液の TCEP 分解特性について解析してきた。今回は、TCM1 株より TCEP 分解酵素を精製し、基質特異性など本酵素の諸特性について解析した結果を報告する。[方法と結果] TCEP を唯一のリソ源とした培地で培養した *Sphingobium* sp. TCM1 株から各種カラムクロマトグラフィーを用いて TCEP 分解酵素を均一にまで精製した。ゲル濾過クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE 解析から本酵素は分子質量 59kDa のモノマー酵素であることが明らかとなった。また、本酵素の至適 pH は 8.5 であり、至適温度は 25°C であった。本酵素活性は 2 価金属イオンの添加で上昇し、金属キレート剤である EDTA や EGTA の添加で著しく減少した。本酵素中に含まれている金属を ICP-MS で直接解析したところ、本酵素は Zn を含む酵素であることが明らかとなった。基質特異性の検討を行った結果、本酵素はアルキル系有機リン酸トリエステル類を基質とせず、ハロアルキル系有機リン酸トリエステル、アリール系有機リン酸トリエステル、paraoxon methyl, paraoxon ethyl, DDVP を基質とすることが明らかとなった。

Enzymatic characterization of tris(2-chloroethyl) phosphate-degrading enzyme from *Sphingobium* sp. strain TCM1

○Satoshi YOSHIDA, Yuki TAKAHASHI, DOI Yuka, ABE Katsumasa, TAKAHASHI Shouji, KERA Yoshio
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words organophosphate, tris(2-chloroethyl) phosphate, *Sphingobium*, phosphotriesterase

2Jp06 石油分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A 株を用いたバイオレメディエーションにおける環境回復評価

○山崎 佑貴, 久保田 謙三, 松宮 芳樹, 久保 幹
(立命館大・生命・生工)

[背景・目的] 石油汚染土壌のバイオレメディエーションでは、石油分解菌数を高いレベルで維持して効率良く油分分解を行うだけでなく、周辺の非汚染環境と同程度まで環境を回復させることが重要である。本研究では、石油分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A を用いたバイオレメディエーションでの環境回復評価を目指し、浄化中及び浄化後の NDKY76A 株の挙動と、土壌細菌数及び微生物フロアの変化を解析した。

[方法・結果] 模擬汚染土壌 (ヘキサデカン: 2,000 mg/kg) に NDKY76A を約 1×10^8 cells/g-soil 投与し、バイオレメディエーションを行った。alk 遺伝子プライマーを用いた real-time PCR により、NDKY76A 株の菌数を 30 日間解析したところ、模擬汚染土壌において NDKY76A 株は 10 日後維持されていたが、非汚染土壌では約 3 日で検出限界 (1×10^6 cells/g-soil) 以下まで減少した。これらの結果から、石油汚染の浄化が進むにつれて NDKY76A 株の菌数は低下すると考えられた。

一方、バイオレメディエーションによる環境回復を評価するために、eDNA 解析法及び PCR-DGGE 法により土壌細菌数と微生物フロアを解析した。模擬汚染土壌に NDKY76A 株と栄養塩を投与することで土壌細菌数は経時的に増加し、非汚染土壌と同程度となった。それぞれの土壌の微生物フロアをクラスター解析した結果、いずれも類似性が 80% 以上であったことから、NDKY76A 株の投与は土壌の微生物フロアに影響しないことが示唆された。以上の結果から、NDKY76A 株によるバイオレメディエーションでは、汚染の浄化と共に、環境回復が可能であると考えられた。

Assessment of environmental condition in bioremediation by oil-degrading bacterium, *Gordonia* sp. NDKY76A

○Yuki YAMAZAKI, Kenzo KUBOTA, Yoshiki MATSUMIYA, Motoki KUBO
(Dept. Biotechnol., Ritsumeikan Univ.)

Key words bioremediation, soil, hydrocarbon, *Gordonia*