

Title	フェノール分解菌を用いたトリクロロエチレン分解に関する研究
Author(s)	武尾, 正弘
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3129328">https://doi.org/10.11501/3129328</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

フェノール分解菌を用いたトリクロロ  
エチレン分解に関する研究

1996年

武尾正弘

## 目 次

緒 論 .....	1
第1節 トリクロロエチレン (TCE) による地下水汚染の現状 .....	1
第2節 TCEによる地下水汚染の対策 .....	2
第3節 <i>in situ</i> バイオレメディエーションとTCEの生分解 .....	3
第4節 本研究の目的と概要 .....	5
第1章 土着性フェノール分解菌の計数、分離及びその特徴 .....	8
第1節 緒言 .....	8
第2節 実験材料及び方法 .....	8
第1項 実験材料 .....	8
第2項 実験方法 .....	9
第3節 実験結果並びに考察 .....	10
第1項 フェノール分解菌の計数法に関する検討 .....	10
第2項 各種土壌サンプル中のフェノール分解菌の計数 .....	13
第3項 フェノール分解菌の分離と同定 .....	14
第4節 要約 .....	15
第2章 各種フェノール分解菌によるTCE分解 .....	16
第1節 緒言 .....	16
第2節 実験材料及び方法 .....	16
第1項 実験材料 .....	16
第2項 実験方法 .....	16
第3節 実験結果並びに考察 .....	18
第1項 各種フェノール分解菌によるTCE分解 .....	18
第2項 TCE分解活性とフェノール分解活性の関係 .....	20
第3項 増殖相によるTCE分解活性 .....	22
第4節 要約 .....	23
第3章 <i>Pseudomonas putida</i> BH株の芳香族化合物分解系とTCE分解特性 .....	24
第1節 緒言 .....	24

第2節	実験材料及び方法	24
第1項	実験材料	24
第2項	実験方法	25
第3節	実験結果並びに考察	26
第1項	<i>P. putida</i> BH株の芳香族化合物資化性	26
第2項	<i>P. putida</i> BH株の芳香族化合物分解経路	27
第3項	<i>P. putida</i> BH株によるTCE分解	29
第4節	要約	32
第4章	<i>Pseudomonas putida</i> BH株のフェノール分解遺伝子群の解析	34
第1節	緒言	34
第2節	実験材料及び方法	34
第1項	実験材料	34
第2項	実験方法	35
第3節	実験結果並びに考察	40
第1項	フェノール分解遺伝子のコスミドクローニング	40
第2項	フェノール分解遺伝子の発現	43
第3項	フェノールヒドロキシラーゼ遺伝子 ( <i>pheA</i> ) の解析	45
第4項	カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子 ( <i>pheB</i> ) の解析	53
第5項	フェノール分解制御遺伝子 ( <i>pheR</i> ) の解析	53
第4節	要約	59
第5章	フェノール分解遺伝子を導入した組換え体のTCE分解特性	62
第1節	緒言	62
第2節	実験材料及び方法	63
第1項	実験材料	63
第2項	実験方法	64
第3節	実験結果並びに考察	64
第1項	組換え <i>Escherichia coli</i> によるTCE分解	64
第2項	組換え <i>Pseudomonas putida</i> によるTCE分解	65
第3項	高発現ベクターを有する組換え体によるTCE分解	67
第4項	TCE分解代謝物の分析	68
第4節	要約	69

総括並びに結論 .....	71
謝 辞 .....	76
文 献 .....	77

## 緒 論

### 第1節 トリクロロエチレン（TCE）による地下水汚染の現状

トリクロロエチレン（TCE）は不燃性で脱脂能力が高いことから、これまで金属、機械工業を中心に脱脂剤や溶剤として広く使用されており、最近では、電子産業での基板洗浄においても多量に使用されるようになった<sup>1)</sup>。このような使用に伴い、現在、国内だけで年間4万トンが本物質を使用する事業所から排出されていると推定されている<sup>2)</sup>。

1981年に米国カリフォルニア州サンタクララバレー、いわゆるシリコンバレーにおいて、半導体製造関連企業の保有するタンクから多量の廃溶剤が漏出し、周辺地域の地下水を高濃度に汚染していることが明らかとなった<sup>3)</sup>。この事件を契機として、TCEを初めとする低沸点有機塩素化合物による地下水汚染の問題が社会的に注目されるようになった。我が国でも、米国の汚染事例を受けて、環境庁が昭和57年（1982年）に全国主要15都市の地下水汚染について本格的に調査を行ったところ、TCEを含む低沸点有機塩素化合物による地下水汚染が各地の井戸で高頻度で検出され、特にTCE及びテトラクロロエチレン（PCE）については、後に設定された水質環境基準値あるいは要監視項目指針値（1992年）に対する超過率が3%を超える状況であった（表1）<sup>4)</sup>。この内容は新聞紙上にも発表され、各地の自治体でも急遽、土壌・地下水汚染の調査が行われたが、兵庫県太子町で6,600mg/kgのTCE汚染土壌が発見される等、高濃度の汚染地域の存在も明らかとなった<sup>5)</sup>。厚生省は、このような汚染状況を鑑み、1983年8月に都道府県知事に対して、地下水を水源とする水道に対し、TCE、PCE等の水質試験の徹底と、汚染水源の取水停止及び水源の転換

を指示し、更に、1984年2月には環水第15号において、これらの暫定水質基準を示した。その後、引き続き各地方自治体で地下水汚染の実

表1 1982年度環境庁調査における有機塩素化合物の検出率(%)と超過率(%)

化学物質	浅井戸 (1083本)		深井戸 (277本)		合計 (1360本)	
	検出率	超過率	検出率	超過率	検出率	超過率
塩化メチル	0.2	-	0.0	-	0.1	-
クロロホルム	0.5	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0
ジクロロメタン	22.5	0.0	23.5	0.0	22.4	0.0
四塩化炭素	7.8	0.4	17.0	0.0	9.6	0.3
1,1-ジクロロエタン	1.8	-	3.2	-	2.0	-
1,2-ジクロロエタン	1.3	0.5	0.7	0.4	1.2	0.5
1,1,1-トリクロロエタン	13.1	0.1	15.9	0.0	13.7	0.1
1,1-ジクロロエチレン	0.9	0.0	1.1	0.0	1.0	0.0
cis-1,2-ジクロロエチレン	8.1	1.9	11.2	1.4	8.8	1.8
trans-1,2-ジクロロエチレン	1.4	0.0	1.8	0.0	1.5	0.0
トリクロロエチレン	26.7	2.4	32.5	5.1	27.9	3.0
テトラクロロエチレン	26.7	3.8	30.0	4.3	27.3	3.7

超過率：1992年に改訂された水質環境基準値あるいは要監視項目指針値に対する超過率

態調査がなされたが、約26,000本の調査井戸のうち、2.7%の井戸で、水道水の暫定基準値0.03mg/lを超えるTCEが検出されており、TCEの広範囲な汚染の継続が確認された。このような背景から、低沸点有機塩素化合物の多くは1992年に水道水質基準項目（TCE：0.03mg/l，PCE：0.01mg/l，1,1,1-トリクロロエタン：0.3mg/l）に、1993年に環境基準項目（TCE：0.03mg/l，PCE：0.01mg/l，1,1,1-トリクロロエタン：0.1mg/l）に指定され、更に1993,1994年には新たに大気環境指針暫定値の設置及び土壌環境基準への追加等、厳しい規制と監視の対象となっている。

また、TCEは昭和49年（1974年）に制定された「化学物質の審査および製造等の規則に関する法律」、いわゆる化審法の改正（1989年）に伴い、継続的に摂取された場合には、人の健康を損なう恐れがある化学物質として、第二種特定化学物質にも指定されている。

本物質は、マウス、ラットあるいはモルモットで、経口投与により肝機能障害や肝臓肥大を示す慢性毒性が指摘され、発癌性の疑いも持たれている<sup>67)</sup>。更に、環境中でTCEが分解を受けた際に生じるジクロロエタン、ジクロロエチレンや塩化ビニルは、強い急性毒性を持ち、ジクロロエタンと塩化ビニルについては発癌性が証明されている<sup>68)</sup>。

一方、我が国においては、地下水の利用量は、都市用水、農業用水等の1/6を占めており、都市用水に限ってみれば、約1/3を占めると推定されている<sup>69)</sup>。このような状況から、広範囲に拡がったTCE等による地下水汚染は、水道水源を通して我々の健康を直ちに脅かす重大な問題であり、その早急な対策が切望されている。

## 第2節 TCEによる地下水汚染の対策

TCE等によって汚染された地下水の処理法として、揚水曝気法や真空抽出法等の物理的処理法が実用化されている<sup>70)</sup>。揚水曝気法や真空抽出法は、曝気や真空で地下水からTCE等を気相へ移行させる除去法であり、局所的な高濃度の汚染にその能力を発揮するが、広い範囲に拡散した低濃度汚染に対しては極めて処理効率が悪く、多数の処理施設の設置も必要とされる。また、気相部へ移行させたTCE等をそのまま大気中に拡散させることは、単に汚染を異なる媒体へ移行させるにすぎないため、活性炭処理法や溶媒回収法等で排ガス中のTCEを再回収する必要がある。最終的には、これらの媒体も廃棄物として処理せねばならず、コスト的に大きな問題を有している<sup>71)</sup>。

一方、生物を利用する方法（バイオレメディエーション法）として、地下水を揚水後、

TCE分解微生物を含むバイオリアクターで処理する方法と、汚染サイトに栄養塩類、活性化剤、あるいは高いTCE分解能を有する微生物を投入して直接汚染地を修復する方法があり、前者をon site バイオレメディエーション、後者をin situ (原位置) バイオレメディエーションとして区別している<sup>9)</sup>。特に、後者の方法は、低濃度で広範囲に広がる地下水汚染には有効であり、浄化に特別な施設も必要としないことから比較的成本が安い技術として注目されている<sup>9),10)</sup>。

1980年代になって、米国では土壤汚染の浄化を推進するために、スーパーファンド法が施行され、種々の汚染除去法が検討されてきたが、採用された新技術のうち、スーパーファンドサイト (同法で浄化の義務づけられたサイト) の約9%でバイオレメディエーションが採用され、現在も汚染サイトでその適用が進んでいる<sup>11)</sup>。米環境保護局 (US.EPA) では、バイオレメディエーションを今後の土壤・地下水汚染浄化の中心的技術と位置づけている。我が国においても、1994~5年にかけて、環境庁の依託事業として千葉市でTCE汚染地下水のバイオレメディエーションが実験的に実施されている<sup>11),12)</sup>。

### 第3節 in situ バイオレメディエーションとTCEの生分解

バイオレメディエーション法のうち、特に原位置での処理法を、in situ バイオレメディエーション法と呼んでおり、これは大きく二つの処理方式に分けることができる (図1)。即ち、栄養塩や活性化剤等を汚染サイトに添加することにより土着性の微生物を増殖・活性化させるバイオスティミュレーション法と高いTCE分解能を有する微生物を汚染サイトに補って処理を行うバイオオーギュメンテーション法である<sup>9)</sup>。これまでの適用例の80%程度が前者であり、14%は後者で、6%は両者の併用であった<sup>11)</sup>。先に述べた環境庁の事例も前者に属する。処理方式の選択に際しては、対象汚染物質の物性や分解性、地質あるいは水文

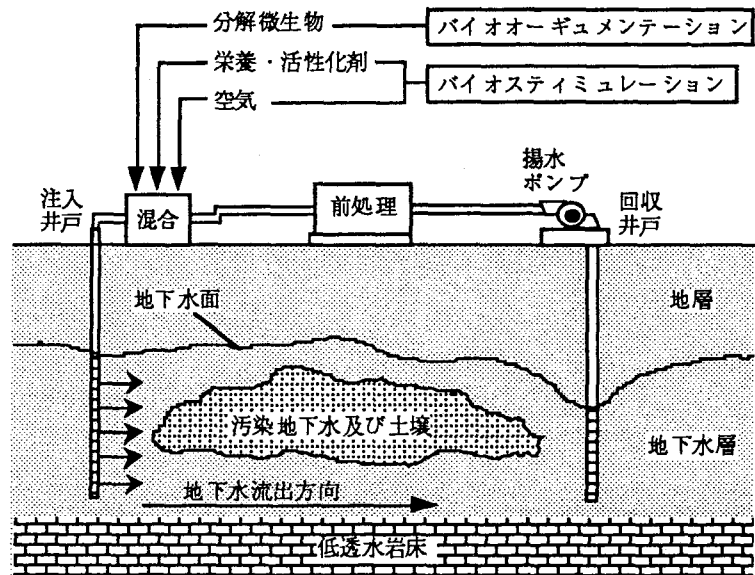


図1 in situ バイオレメディエーションの概念図



地質的条件等を考慮せねばならないことに加え、事前に汚染サイトの土着性分解菌の存在量や分解活性を正確に把握することが特に重要な要件である。例えば、土着性分解菌が多く存在し、それらが高いTCE分解活性を持つことが明らかとなれば、土着性分解菌を活性化するバイオスティミュレーションを選択すればよいが、その逆の場合は、高いTCE分解活性を持つ分解菌を補うバイオオーギュメンテーションを採用する必要がある。いずれの方法を採用した場合でも、汚染物質除去の可否は分解菌の能力に大部分依存することは間違いなく、効率よい除去を達成するためには微生物レベルで汚染物質の分解を理解することが重要である。

これまでTCEの分解菌として、メタン資化性菌<sup>13-15</sup>、アンモニア酸化菌<sup>16,17</sup>、プロパン酸化菌<sup>18-20</sup>、イソプレン酸化菌<sup>21</sup>、フェノールやトルエン等の芳香族化合物分解菌<sup>22-26</sup>等の好気性細菌が知られている。一方、嫌気性細菌にもTCEを脱塩素化するものが多く存在するが、増殖速度が遅く、脱塩素によって毒性の高い塩化ビニルを生成する等の理由から、バイオレメディエーションに関しては、PCEのように初期の分解に脱塩素が必須な場合を除いて、好気性細菌を利用することが現実的と考えられている<sup>27</sup>。これらの好気性

細菌の中でもメタン資化性菌が最もよく研究されており、そのTCE分解経路も明らかにされている(図2)<sup>13</sup>。TCEは、まず、メタンモノオキシゲナーゼによりTCEエポキシドに変換され、その後、ジクロロ酢酸、グリオキシル酸、一酸化炭素や蟻酸を生成し、大部分は他の従属栄養細菌により二酸化炭素へ無機化される。この経路上のメタンモノオキシゲナーゼの役割をトルエンジオキシゲナーゼやフェノールヒドロキシラーゼのような各種細菌のオ

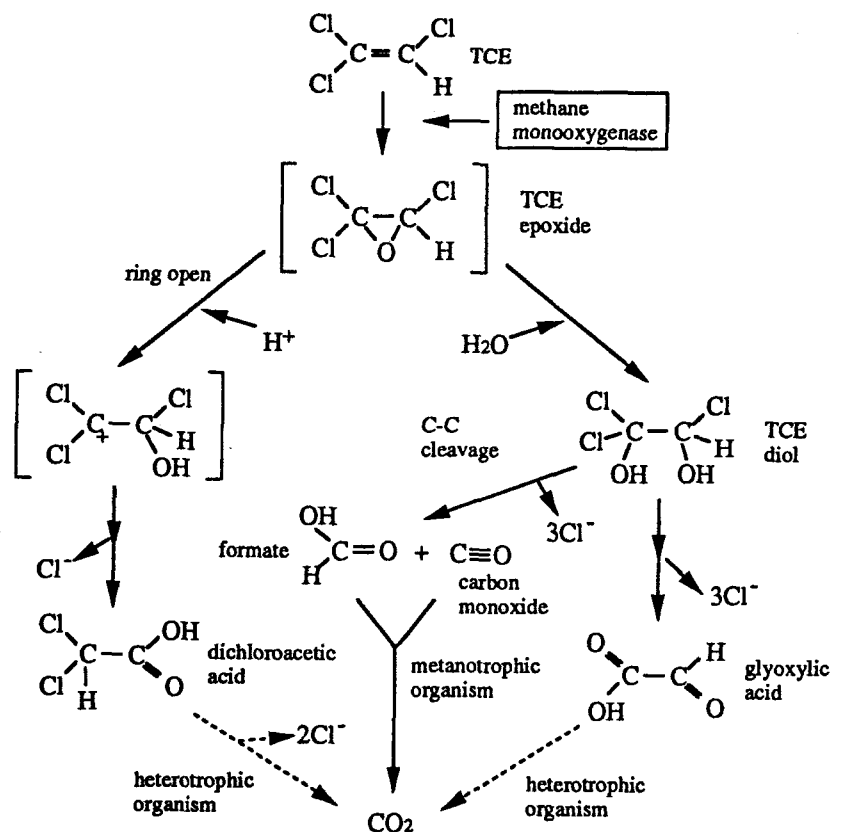


図2 メタン資化性菌によるTCE分解

キシゲナーゼ類が代替し、TCEを分解すると考えられている。

このような分解菌を利用して、土壌カラム、土壌マイクロコズム、リアクターを用いたTCE除去に関する研究<sup>28~33)</sup>とともに、サイトでのTCE除去実験<sup>34~36)</sup>が既に実施されている。Nelsonらは、カリフォルニア州の食品工場内の汚染サイトで、フェノール分解菌 *Pseudomonas cepacia* G4を用いて、TCE除去のパイロットテストを行い、約一週間で地下水中のTCE濃度を2.5ppmから0.1ppm以下まで低下させることに成功した<sup>34)</sup>。また、サウスカロライナ州では、米国エネルギー省によって、汚染サイトへメタンガスを注入してメタン資化性菌を活性化し、大規模なバイオレメディエーションの実証試験を行い、効果を挙げた<sup>35)</sup>。これらの事例では、投入微生物や土着性微生物のTCE分解能を誘導するためにフェノールやメタン等、本来の誘導基質が必要であった。このようにTCEのバイオレメディエーションにおける第一の問題点は、それ自身が汚染物質でもある化学物質の使用を余儀なくされる点にある。また、そのような誘導基質が存在すればTCE分解が拮抗的に阻害され、一方、誘導基質がTCEより先に分解された場合、誘導状態が不十分となりTCE分解活性が減少するといった矛盾を有している。これらに加え、TCEの代謝産物は、TCEよりも毒性が高く、微生物の安定維持とTCE分解を妨げる要因にもなっている。

TCEのバイオレメディエーションにおけるこのような問題点は、野生型のTCE分解菌をバイオレメディエーションに用いる限り、回避できない問題であるが、微生物菌株の育種によって対応が可能である。例えば、育種により、構成的にTCE分解活性を発現する菌株が得られれば、誘導基質の問題は一挙に解決できるであろう。特に、近年の遺伝子操作技術の発展により、TCE分解機構が遺伝子レベルで解析されつつあり、育種に必要な遺伝子レベルの情報も蓄積されてきた。従って、今後は、有用なTCE分解菌を得るための遺伝子レベルでの育種技術が、バイオレメディエーション成功の鍵になると予想される。

#### 第4節 本研究の目的と概要

TCE分解に使用する細菌として、現在、メタン資化性菌とフェノール分解菌が有力候補として精力的に研究されている。しかし、いずれの菌にも長短があり、いましばらくは二者の実用化への研究が進められると考えられる。

フェノール分解菌は、これまで多数の研究者によって自然界から分離されてきたことか

ら、土壌中にも比較的普遍的に存在し、バイオレメディエーションへ活用しやすいと考えられる。また、メタン資化性菌に比べ、TCE分解比活性こそ劣るが、増殖速度が速いため、容易に菌株の増殖や調製が可能である。Hopkinsらは、マイクロコズムにおけるTCE分解試験において、フェノールがメタンやアンモニアに比べ高いTCE除去活性を誘導することを明らかにしており、誘導基質としてフェノールの潜在的有用性を指摘している<sup>34)</sup>。更に、ガス状のメタンや水溶性に乏しいトルエンに比較して、フェノールのハンドリングは容易である。このような理由から、本研究では、フェノール分解菌に注目し、これを利用した効果的なバイオレメディエーションシステムを構築するための基礎研究として、フェノール分解菌及びフェノール分解遺伝子を用いたTCE分解について種々実験的検討を行った。

これまでに述べたTCEのバイオレメディエーションにおける背景と問題点を考慮し、まず、第1章では、バイオレメディエーションを行うにあたり重要な基礎情報となる土壌中の土着性フェノール分解菌の存在量や種類を把握するために、プレート培養法によるフェノール分解菌の計数法を確立し、それを用いて、各地より採取した土壌中のフェノール分解菌を計数し、好気性従属栄養細菌に対するフェノール分解菌の存在量を明らかとした。更に、供試土壌からフェノール分解菌の分離とその特徴付けを行った。

続いて、第2章では、土着性のフェノール分解菌によるバイオスティミュレーションの可能性を探るため、第1章で土壌から分離した6株を含め、14株のフェノール分解菌についてそのTCE分解活性を調べた。これと同時に、各菌株のフェノール分解活性を測定し、両者の関係についても論じた。

第3章では、バイオオーギュメンテーションに活用し得る有力候補株として、第2章で試験したフェノール分解菌のうち、特にTCE分解活性及びフェノール分解活性の高かった*Pseudomonas putida* BH株のTCE分解特性を明らかにするために、本菌株の芳香族化合物代謝経路の特徴付けとTCE分解特性を検討した。

更に、第4章では、*P. putida* BH株のTCE分解機構を遺伝子レベルで明らかにするために、本菌株からフェノール分解遺伝子群をクローニングし、塩基配列の解析を通じて、TCE分解を触媒するフェノールヒドロキシラーゼをコードした遺伝子の構造と発現機構を解明した。

第5章では、遺伝子組換えTCE分解菌のバイオレメディエーションへの活用を前提に、第4章で得られたフェノール分解遺伝子群を有する組換え*Escherichia coli*及び*Pseudomonas putida*のTCE分解特性について検討を行い、組換えTCE分解菌の育種の

方向性を論じた。

最後に、総括並びに結論では、本研究で得られたフェノール分解菌及びフェノール分解遺伝子を用いたTCE分解に関する知見をまとめ、本研究の実用化への展望と将来性について言及した。

## 第1章 土着性フェノール分解菌の計数、分離及びその特徴

### 第1節 緒言

バイオレメディエーションは、土着性微生物を利用して浄化するバイオスティミュレーション法及び分解微生物を導入するバイオオーギュメンテーション法に大別される。これらの方法でTCE汚染を除去するには、まず、汚染サイトに存在する土着性TCE分解菌の存在量とその能力を正確に把握し、両法の選択を適切に行うことが重要である。前者が採用された場合、これらの情報はスティミュレーションの条件最適化に必要不可欠であり、また、後者が採用された場合でも、外部からの分解菌のオーギュメンテーション効果を適切に評価するために、事前にこれらの情報を把握しておくことが必要である。

土着性微生物を活用したTCE除去の研究として、Fanら<sup>1)</sup>は、米国の3カ所の土壌について、トルエンを用いてトルエン分解菌を増殖させ、土着性トルエン分解菌によるTCE分解を、また、Waltonら<sup>2)</sup>は根圏と非根圏の土壌微生物によるTCE分解を調べているが、分解菌の存在量や種類等、きめ細かな観点から土着性分解菌については評価を行っていない。一方、McClellanら<sup>3)</sup>は、TCE汚染井戸の土着性微生物を活用したTCE除去試験を行い、微生物数の推移を観察したが、計数した微生物の特徴には言及していない。また、矢木らも<sup>4,5)</sup>、千葉市内の汚染サイトで、メタンガスを吹き込んで土着性メタン資化性菌を増殖・活性化し、TCE汚染地下水の浄化に成功したが、スティミュレーションによりメタン資化性菌数が地下水中で $10^5 \sim 10^6/\text{ml}$ へ上昇したことを報告したにとどまっている。このように、既にTCEのバイオレメディエーションが試験的に実施され、一定の成果を挙げているが、土着性分解菌に関する情報はほとんど明らかになっていない。

本研究では、緒論でも述べたとおり、種々の長所からフェノール分解菌をTCEの分解・除去に利用することとしており、上記観点から、ここでは、まず、TCE分解に関与し得る各地の土着性フェノール分解菌の存在量を把握するために、土壌からの正確なフェノール分解菌の計数法の確立とそれを利用した土壌中のフェノール分解菌の計数について検討を行った。また、計数されたフェノール分解菌を純化し、菌株の同定とその基本的性質も調べた。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 第1項 実験材料

##### (1) 供試土壌

細菌の計数方法に関する検討には、大阪府吹田市内の大阪大学工学部環境工学科の建物南側から採取した土壌を微生物源として用いた。また、表1-1に示す8ヶ所の土壌サンプルを用い、好気性従属栄養細菌数（以下、全菌数と称す）及びフェノール分解菌数の計数を行った。

## (2) 培地

全菌数の計数には表1-2に示すCGY培地<sup>6)</sup>を、フェノール分解菌の計数には表1-3に示すフェノール無機塩培地<sup>7)</sup>（以下、フェノール培地と略す）を用いた。また、菌株の培養と維持には、表1-4に示すL培地<sup>8)</sup>を使用した。平板培養には寒天を1.7%(w/v)で各培地へ添加した。

表1-1 供試した土壌サンプル一覧

サンプル名	採取場所	土壌の種類
吹田 1	大阪府吹田市	森林土壌
吹田 2	大阪府吹田市	森林土壌
豊能	大阪府豊能町	森林土壌
田無 1	東京都田無市	森林土壌
田無 2	東京都田無市	森林土壌
西宮 1	兵庫県西宮市	森林土壌
西宮 2	兵庫県西宮市	畑土
高松	香川県高松市	畑土

表1-2 CGY培地の組成 (g/l)

Casitone	5.0
Glycerol	5.0
Yeast extract	1.0
pH 7.2	

表1-4 L培地の組成 (g/l)

Peptone	10.0
Yeast extract	5.0
NaCl	10.0
pH 7.2	

表1-3 フェノール無機塩培地の組成 (g/l)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
FeCl <sub>3</sub>	0.01
CaCl <sub>2</sub>	0.05
NaCl	0.05
Phenol	variable
pH 7.2	

## 第2項 実験方法

### (1) フェノール分解菌の計数法に関する検討

土壌サンプルの処理は土壌微生物学実験法<sup>9)</sup>を参考にして行った。即ち、地表面下約20~25cmの所から採取した土壌サンプルを速やかに研究室に持ち帰り実験に供した。サンプルを一様に混合し、2mmのふるいにかけて均一化した後、土壌粒子に付着している微生物を剥離するために、その50g（湿重量）を5mg/lトリポリリン酸溶液450mlに懸濁し、氷浴中でホモジナイザー（日本精機製作所製、AceAM-10型ホモジナイザー）により処理（10,000rpm）した。得られた懸濁液を10<sup>1</sup>希釈液として、その1mlを新しいトリポリリン酸溶液9mlに加えて順次希釈液を得た。適当な倍率の希釈液を、平板培地上に塗沫して28℃で

培養し、コロニー数を計数した。コロニー数のデータは微生物学実験法<sup>10)</sup>に準じて統計処理し、計数結果は土壌の乾燥重量1gあたりで表した。

## (2) フェノール分解菌の分離と同定

フェノール分解菌の計数で用いたプレート上からコロニーを釣菌し、フェノール培地での増殖とCGY寒天培地への塗抹を繰り返すことによりフェノール分解菌の単離を行った。得られた分解菌については、その形態的及び生理的性質を、長谷川の成書<sup>11)</sup>に従って検討し、更に簡易細菌同定キットAPI20NE（日本ビオメリユウバイテック）を用いて同定試験を行った。

## 第3節 実験結果並びに考察

### 第1項 フェノール分解菌の計数法に関する検討

#### (1) ホモジナイザーによる処理時間及び培養日数に関する検討

土壌粒子から細菌を効果的に剥離するために、ホモジナイザーによる処理時間について検討を行った。ホモジナイザーによる処理時間を0～60分と変化させた場合のCGY寒天培地に出現した全菌数の計数結果を図1-1に示す。この結果は、培養を12日まで継続した時のコロニー計数值から算出したものである。この結果から、処理時間が10～30分で最大かつ一定の菌数の計数が可能であることがわかった。従って、以降の実験ではホモジナイザーでの処理時間を20分とし、その懸濁液を平板培養に供することとした。

次に、適切な培養日数を決定するために、ホモジナイザー処理時間20分の条件でコロニー出現数の経日変化を調べた。図1-2に示すようにコロニーの大部分は4日目までに出現し、その後7日目以降、コロニーの増加は見られなくなった。そこで、培養7日目の計数をもって全菌数の計数值とした。

#### (2) フェノール培地の基質濃度、培養日数及びレプリカ法の有効性に関する検討

フェノールは毒性が強いため、高濃度の培地を使うと増殖が阻害される恐れがあり、あまり低濃度では増殖が遅くなる

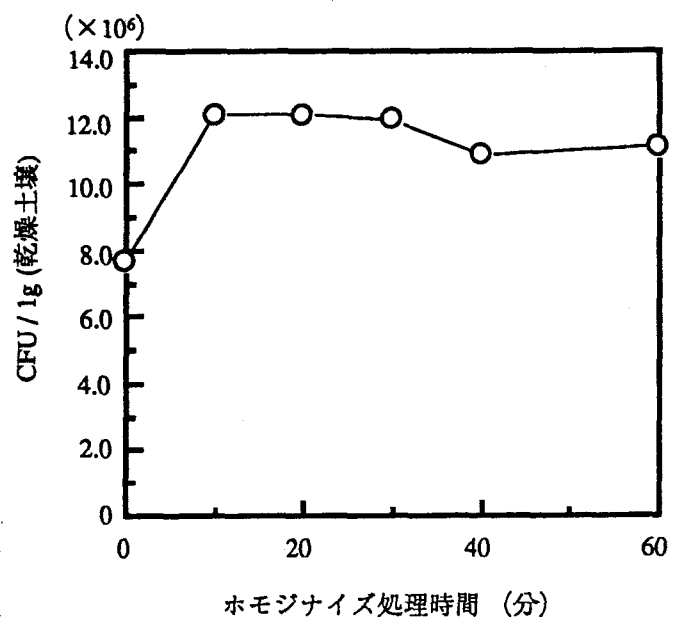


図1-1 ホモジナイズ処理時間が全菌数計数に及ぼす影響

等、増殖に最適なフェノール濃度の存在が予想される。そこで、フェノール分解菌の計数に適切な培地フェノール濃度及び培養日数を決定するために、125, 250, 500, 1000mg/lの各濃度でフェノールを含むフェノール寒天培地を用いてフェノール分解菌の計数を行った。図1-3にその結果を示す。但し、フェノール濃度1000mg/lの寒天培地上では、統計処理可能な充分数のコロニーが形成されなかったため、ここに結果は記載していない。

培養の経過に伴って大きなコロニーのま

わりにフェノールの代謝産物を利用して増殖したと思われる多数のサテライトコロニーが出現した。そこで、出現菌株の一部を、再度、フェノール寒天培地へレプリカし、そこで増殖したものを真のフェノール分解菌としてその比率を求めたところ、図1-4に示す結果が得られた。これより、培養2週間で、真のフェノール分解菌数がサテライトコロニーの出現により全体の25~40%まで低下することがわかった。また、培養日数が短い場合でもサテライトコロニーの存在は無視できず、レプリカを行わなければ実際のフェノール分解菌を計数することは難しいと判断した。図1-4の比率に従って図1-3のコロニー計数値を修正し、真のフェノール分解菌数を算出したものが図1-5である。レプリカにより修正を加えた場合のフェノール分解菌の計数は、7日目以降の増加がかなり少なくなったため、レプリカ法にて7日目に計数を行えばフェノール分解菌数がほぼ正確に計数できると考えられる。

また、250, 500mg/lのフェノール寒天培地に出現した菌数の増加曲線はお互いによく一致しており、125mg/lのものとはかなり異なることから、土壤中にはフェノール濃度が125~250mg/lのある一定濃度で、資化性の限界濃度の異なる2群のフェノール分

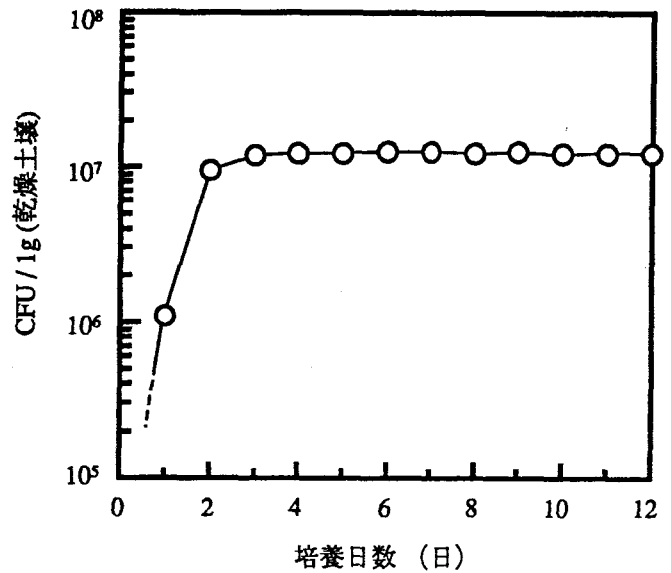


図1-2 培養日数が全菌数計数に及ぼす影響

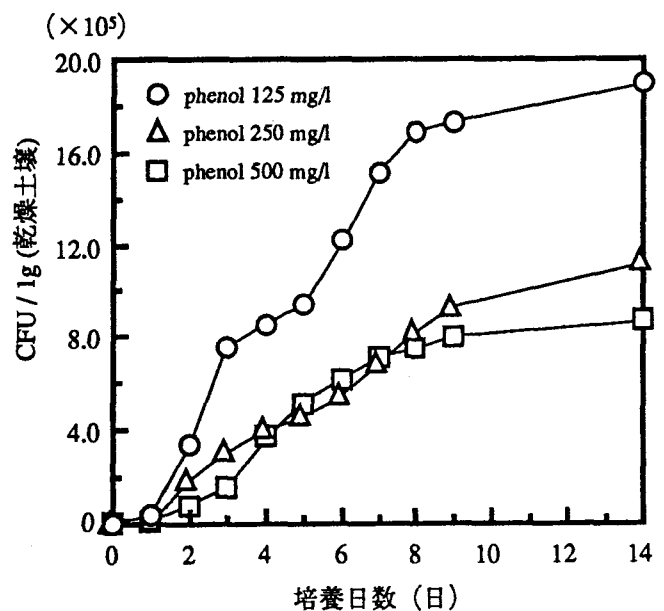


図1-3 各種濃度のフェノール培地に出現したコロニー数の経日変化



解菌の存在が示唆された。そこで、これ以降は、低濃度分解菌用及び高濃度分解菌用培地として、それぞれ125mg/l及び500mg/lのフェノール寒天培地を使用することとした。

### (3) 栄養要求性のあるフェノール分解菌の計数に関する検討

栄養要求性を持つフェノール分解菌の存在を考慮して、フェノール培地に酵母エキスを100mg/lになるよう添加した場合と添加しない場合について、フェノール分解菌の出現菌数を比較した。フェノール寒天培地上で酵母エキスの添加によって計数されるコロニー数はほぼ倍増したが、表1-5に示すとおりレプリカによって真の分解能を持つことが確認されたフェノール分解菌数はほとんど変わらなかった。ここで、酵母エキスの添加により少しフェノール分解菌の増殖が抑制されたように見えるが、これは酵母エキスがサテライトコロニーの増殖を促し、サテライトコロニーが多数出現したために、レプリカ操作に影響を与えた結果と考えられる。

一般に、酵母エキスを添加することにより微量の必須栄養素を要求するフェノール分解菌も増殖が可能となり、分解菌数は増加すると考えられるが、この結果は、栄養要求性のある分解菌の存在があまり大き

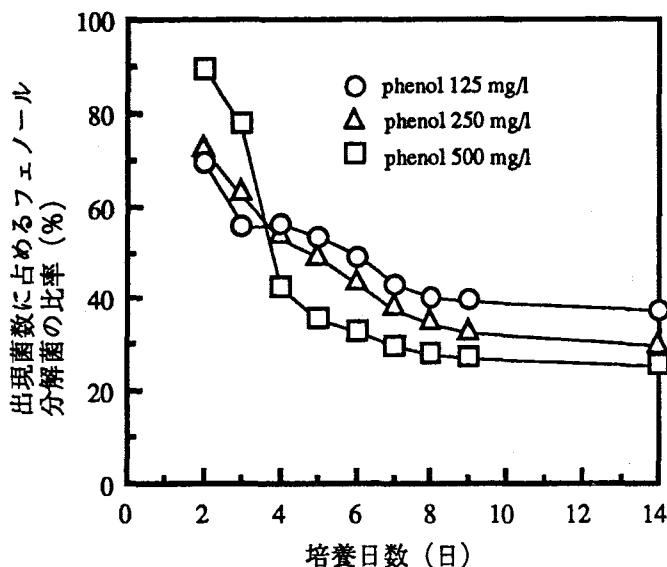


図1-4 出現菌数に占める真のフェノール分解菌の比率の経日変化

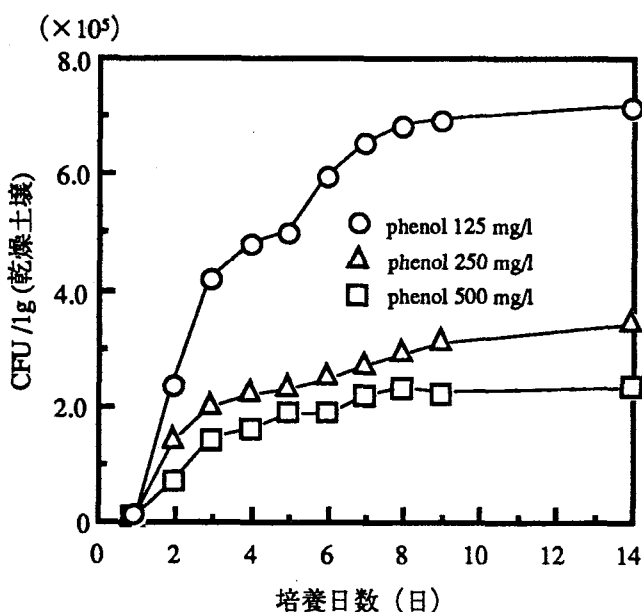


図1-5 各種濃度のフェノール培地に出現したフェノール分解菌の修正計数值

表1-5 フェノール分解菌計数に及ぼす酵母エキス添加の影響

培地		CFU/g(乾燥土壤)	酵母エキス添加なしに対する比率
フェノール濃度	酵母エキスの添加		
125mg/l	-	$7.8 \times 10^5$	(100%)
	+	$7.2 \times 10^5$	93%
500mg/l	-	$3.5 \times 10^5$	(100%)
	+	$3.0 \times 10^5$	84%

な比率を占めていないか、あるいは酵母エキスが目的とする栄養要求性を持つ分解菌のコロニー形成に利用されなかったことを示唆している。従って、以降の実験では酵母エキスの添加を行わず計数を行うこととした。

#### (4) フェノール分解菌計数に及ぼす抗生物質添加の影響

カビコロニーの形成によりフェノール分解菌の計数が著しく妨害される場合を考慮し、カビの増殖を抑制するアクチジオンを100mg/lとなるように添加した場合と添加しない場合についてCGY寒天培地及びフェノール寒天培地で菌

表1-6 抗生物質アクチジオンの添加が計数に及ぼす影響

培地	アクチジオンの添加	CFU/lg (乾燥土壌)	アクチジオン 添加なしの計数值 に対する比率
CGY培地	—	$9.4 \times 10^6$	(100%)
	+	$7.8 \times 10^6$	83%
フェノール培地 (125mg/l)	—	$1.5 \times 10^6$	(100%)
	+	$1.5 \times 10^6$	101%
フェノール培地 (500mg/l)	—	$1.2 \times 10^6$	(100%)
	+	$1.4 \times 10^6$	110%

数の計数を行った。表1-6に示す結果から、抗生物質添加によって全菌数はやや減少するものの、フェノール分解菌の計数はほとんど影響を受けないことがわかった。従って、一般的にアクチジオンの細菌への影響は小さく、アクチジオンの添加によりカビの影響を小さくし、しかもフェノール分解菌を正しく計数することができると考えられる。

#### 第2項 各種土壌サンプル中のフェノール分解菌の計数

前項の検討により、フェノールを125mg/l（低濃度分解菌用）及び500mg/l（高濃度分解菌用）の濃度で含む2種類のフェノール寒天培地を用い、7日間、28℃で培養し、レプリカ法によってフェノールの分解能を確認後、得られた比率によって計数結果を修正することにより、真のフェノール分解菌数を算出することとした。この計数法に従い、表1-1に示す各地から採取した土壌サンプル中のフェノール分解菌数を評価した。なお、本試験ではカビコロニーの出現がほとんど認められなかったため、抗生物質アクチジオンは使用しなかった。

各土壌中の全菌数及びフェノール分解菌数の計数結果を表1-7に示す。いずれの土壌サンプルにおいても、フェノール分解菌の計数は全菌数に対してかなり高い割合を占めることがわかった。低濃度分解菌の占める割合は、低いものでも6%、高い場合には20%を占めており、一方、高濃度分解菌についても4%~13%存在することが示された。また、供試したいずれの土壌にも $10^6$ /lg(乾燥土壌)程度のフェノール分解菌が存在することがわかった。西村らは、メタンを用いたフィールド試験で、メタンの導入によって、観測井戸中の地下水に $10^3$ ~ $10^6$ /mlのメタン資化性菌が増殖し、TCEを良好に分解したことを報告し

ている<sup>9)</sup>。メタン資化性菌は、TCE分解の比活性が高いため、フェノール分解菌と直接比較はできないが、本試験で得られた土壌中のフェノール分解菌の存在量は、ステイミュレーションにおける初期存在量としてかなり効果が期待できる量と考えられる。また、

これらの菌がすべてTCE分解能を持つとすれば、バイオステイミュレーションによる浄化の可能性が高いと予測できる。

### 第3項 フェノール分解菌の分離と同定

フェノール分解菌の計数時に出現したコロニーを、フェノール培地での培養とCGY寒天培地への塗抹を繰り返すことで、コロニー形態の異なる多数のフェノール分解菌を単離した。このことは、土壌環境中においては、1種あるいは2種類の強力なフェノール分解菌が優占的に存在するのではなく、多種多様な分解菌が混在していることを示唆している。従って、バイオレメディエーションにフェノール分解菌を活用する場合に、現場に存在する多様な分解菌について、まず、その諸性質を明らかにしておくことが重要と考えられる。そこで、得られた分離株の中で、コロニー形態の異なる6株をA-4, A-5, A-7, B-6, M-1, Y-3株と命名し、それらの形態的及び生理的性質を調べた。表1-8に、分離菌株の生理的及び形態的性質を示す。分離菌株はいずれもグラム陰性菌でオキシダーゼ陽性であったが、運動性やカタラーゼ等の基本的性質が異なる3グループ以上のものが含まれていた。簡易細菌同定キットAPI20NEによる同定試験の結果、A-5株が*Pseudomonas fluorescens* (確

表1-7 各土壌中のフェノール分解菌の計数結果(1g[乾燥土壌])

土壌サンプル	全菌数	低濃度分解菌*	高濃度分解菌**
吹田1	9.4×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup> (16)	1.2×10 <sup>6</sup> (13)
吹田2	3.0×10 <sup>7</sup>	2.4×10 <sup>6</sup> (8)	1.3×10 <sup>6</sup> (4)
豊能	1.9×10 <sup>7</sup>	3.1×10 <sup>6</sup> (16)	1.9×10 <sup>6</sup> (10)
田無1	1.9×10 <sup>7</sup>	3.6×10 <sup>6</sup> (19)	1.4×10 <sup>6</sup> (7)
田無2	2.4×10 <sup>7</sup>	2.9×10 <sup>6</sup> (12)	1.8×10 <sup>6</sup> (8)
西宮1	9.2×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>6</sup> (20)	1.1×10 <sup>6</sup> (12)
西宮2	3.1×10 <sup>7</sup>	3.2×10 <sup>6</sup> (10)	1.9×10 <sup>6</sup> (6)
高松	1.7×10 <sup>7</sup>	1.1×10 <sup>6</sup> (6)	9.4×10 <sup>5</sup> (5)

括弧内は、全菌数に対する比率 (%)

\* 125mg/lのフェノール培地に出現した菌数

\*\* 500mg/lのフェノール培地に出現した菌数

表1-8 分離菌株の生理的及び形態的性質

菌株	グラム染色	形態	運動性	カタラーゼ活性	オキシダーゼ活性	O-Fテスト	APIテストによる同定
A-4	—	φ 1.2~1.4 μ	—	+	+	*	同定できず
A-5	—	φ 0.9~1.2 μ	+	—	+	O	<i>P. fluorescens</i>
A-7	—	φ 1.0~1.2 μ	—	+	+	*	同定できず
B-6	—	φ 0.9~1.1 μ	—	+	+	*	同定できず
M-1	—	0.9~1.3/2.3~2.8 μ	+	+	+	O	<i>P. putida</i>
Y-3	—	0.8~1.1/2.8~3.2 μ	+	+	+	O	<i>P. putida</i>

\* : グルコースを利用しない、あるいは不定

率81.6%)、M-1, Y-3株が*Pseudomonas putida* (99.7%)と同定されたが、他の菌株は、既存の種に帰属することができなかった。

#### 第4節 要約

土壤中でTCE分解に関与し得るフェノール分解菌の存在量を明らかにするために、種々の検討を行い、次の結果を得た。

- (1) 土壤サンプル中の好氣的従属栄養細菌（以下、全菌数と称す）及びフェノール分解菌数を正確に計数するための方法を確立した。即ち、土壤サンプルに適当な前処理を行った後、5mg/lのトリポリリン酸カリウム緩衝液中に懸濁（50g湿重量/450ml）し、ホモジナイザー処理（10,000rpm, 20min）したものを希釈し、全菌数の計数用にCGY寒天培地へ、また、低濃度フェノール分解菌及び高濃度フェノール分解菌の計数用に125mg/l及び500mg/lのフェノール無機塩寒天培地へ塗抹し、28℃、7日間培養して出現した菌数を計数する。更に、フェノール分解菌の計数では、サテライトコロニー出現による影響を考慮し、出現菌株の一部をフェノール無機塩寒天培地へレプリカし、真のフェノール分解菌の比率を求めて、先に求めた計数値を補正する。
- (2) (1)の方法に従って、各地の8カ所より採取した土壤サンプル中のフェノール分解菌を計数したところ、いずれのサンプル中にも、 $10^6$ /1g(乾燥土壤)程度のフェノール分解菌の存在が明らかとなった。また、全菌数に対して、低濃度フェノール分解菌が6~20%、高濃度フェノール分解菌が4~13%とかなり高い比率で存在することも明らかとなった。
- (3) 供試土壤からフェノール分解菌の単離を試みたところ、コロニー形態の異なる多数の分解菌が得られた。これらのうち6株の生理的及び形態的性質を調べ、基本的性質の異なる3タイプ以上の分解菌の存在を認めた。更に、API20NEによる簡易同定試験により、1株を*Pseudomonas fluorescens*、2株を*Pseudomonas putida*と同定した。

## 第2章 各種フェノール分解菌によるTCE分解

### 第1節 緒言

前章で、一般の土壤環境中に多くのフェノール分解菌が存在することを明らかにした。フェノール分解菌がTCEを分解することは、これまでの研究により明らかにされてきたが、土壤中に存在するすべてのフェノール分解菌がこの能力を持つか否かは不明である。例えば、メタン資化性菌の場合、可溶性メタンモノオキシゲナーゼを有する菌株のみがTCE分解を触媒するため、TCE分解能を持たないメタン資化性菌の存在も明らかとなっている。

土壤中に存在する大部分のフェノール分解菌が高いTCE分解能を持つとすれば、土着性分解菌の活性を誘導するバイオスティミュレーションによりTCEのバイオレメディエーションが可能になるが、一方、フェノール分解菌のごく一部のみがTCEを分解できるのであれば、TCE分解能の高い菌を補うバイオオーギュメンテーションを行わねばならない。即ち、土壤中に存在するフェノール分解菌のTCE分解能によってレメディエーションシステムを使い分ける必要がある。

そこで、本章では、土壤等から分離された各種フェノール分解菌のTCE分解能を明らかにする目的で、前章の分離株を含め、14株のフェノール分解菌を用いてそれらのTCE分解能を評価し、更にフェノール分解能との関係を論じた。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 第1項 実験材料

##### (1) 供試菌株

表2-1に示す14株のフェノール分解菌を実験に使用した。表2-1の上から8株は、大阪大学工学部環境工学科水質管理工学研究室及び姫路工業大学工学部応用化学科環境化学研究室内の保存菌株であり、下から6株は本研究で新たに分離した菌株である。PpG1064は分与株である<sup>2)</sup>が、BH株及びAH株は大阪府の下水処理施設の活性汚泥から<sup>3)</sup>、また、残りは和歌山県の下水処理施設の活性汚泥から分離した株であり<sup>4)</sup>、いずれもフェノール資化能を有する。先に分離した6株の結果とともに、保存菌株の生理的及び形態的性質を一括して表2-2に示した。これらの菌株は、フェノール寒天培地(表1-3)で継代し、必要に応じてフェノール培地あるいはL培地(表1-4)で増殖させ、実験に供した。

#### 第2項 実験方法

表 2-1 供試した各種フェノール分解菌

菌株	分離源	分離に使用した基質	文献
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> AH	活性汚泥	フェノール	橋本ら <sup>2)</sup>
<i>Pseudomonas putida</i> BH	活性汚泥	フェノール	橋本ら <sup>2)</sup>
<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064	不明	ナフタレン	Dunn <i>et al.</i> <sup>3)</sup>
<i>Acinetobacter</i> sp. YAD	活性汚泥	アニリン	藤井ら <sup>4)</sup>
<i>Acinetobacter</i> sp. YAF	活性汚泥	アニリン	藤井ら <sup>4)</sup>
<i>Alcaligenes</i> sp. YAJ	活性汚泥	アニリン	藤井ら <sup>4)</sup>
<i>Rhodococcus</i> sp. PN1	活性汚泥	p-ニトロフェノール	未発表
Strain WP1	活性汚泥	フェノール	未発表
Strain A-4	森林土壌	フェノール	本研究
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A-5	森林土壌	フェノール	本研究
Strain A-7	森林土壌	フェノール	本研究
Strain B-6	畑土	フェノール	本研究
<i>Pseudomonas putida</i> M-1	畑土	フェノール	本研究
<i>Pseudomonas putida</i> Y-3	畑土	フェノール	本研究

表 2-2 各種フェノール分解菌の生理的及び形態的性質

菌株	グラム染色	形態	運動性	カタラーゼ活性	オキシダーゼ活性	O-Fテスト
AH	—	0.7~0.9/2.2~3.0 $\mu$	—	+	—	O
BH	—	0.9~1.0/2.4~3.0 $\mu$	+	+	+	O
PpG1064	—	0.8~0.9/2.4~3.2 $\mu$	+	+	+	O
YAD	—	0.9~1.1/1.4~2.2 $\mu$	—	+	—	O
YAF	—	0.9~1.1/1.5~2.4 $\mu$	—	+	—	O
YAJ	—	1.1~1.2/2.2~2.5 $\mu$	—	+	+	O
PN1	+	0.8~1.1/4.0~11 $\mu$	—	+	—	*
WP1	+	$\phi$ 0.7~1.3 $\mu$	—	+	—	O
A-4	—	$\phi$ 1.2~1.4 $\mu$	—	+	+	*
A-5	—	$\phi$ 0.9~1.2 $\mu$	+	—	+	O
A-7	—	$\phi$ 1.0~1.2 $\mu$	—	+	+	*
B-6	—	$\phi$ 0.9~1.1 $\mu$	—	+	+	*
M-1	—	0.9~1.3/2.3~2.8 $\mu$	+	+	+	O
Y-3	—	0.8~1.1/2.8~3.2 $\mu$	+	+	+	O

\*：不定もしくはグルコースを利用せず

### (1) T C E 分解試験

5mlのL培地に菌株を一白金耳量植菌し、30℃、一晚往復振盪培養を行った。この前培養液を、フェノール (500mg/l) 培地に1%植菌して30℃、160rpmで回転振盪培養を行い、菌体濁度がOD<sub>600</sub>=0.6~0.7となった対数増殖中期から後期の菌体を遠心分離 (10,000×g, 10min, 4℃) により集菌し、50mM磷酸カリウム緩衝液 (pH7.5) で洗浄後、同緩衝液にOD<sub>600</sub>=2.0となるように懸濁した。120ml容のバイアル瓶に20mlの細胞懸濁液を入れ、終濃度1mg/lとなるようにT C Eを加えてテフロンライナー付きゴム栓及びアルミキャップに

表2-3 ガスクロマトグラフ条件

装置	島津GC-14A
カラム	ガラスカラム ( $\phi$ 3mm $\times$ 3.1m)
充填剤	silicon DC-550 (液相濃度20%) 60/80 mesh
カラム温度	100℃
インジェクター温度	200℃
検出器温度	250℃
検出器	ECD
キャリアーガス	N <sub>2</sub> (99.999%)
流量	50ml/min

表2-4 高速液体クロマトグラフ条件

ポンプ	CCPE(東ソー製)
コントローラー	PX-8010(東ソー製)
カラム	TSK gel ODS-80TM ( $\phi$ 4.6mm $\times$ 150mm) (東ソー製)
溶出液	H <sub>2</sub> O : Acetonitrile = 1:1
流速	1ml/min
検出器	紫外可視検出器 UV-8000
検出波長	270nm

より密閉して、25℃にて振盪しながらTCEの分解試験を行った。TCEは200mg/lとなるようにメタノールに溶かし、これをバイアル瓶に添加した。また、TCEの分析はヘッドスペース法を用い、表2-3の条件でECDを装備したガスクロマトグラフにより行った。但し、ここで、TCE濃度はTCEがすべて液相中に存在するとして表した。

### (2) フェノール分解試験

TCE分解試験と同様に調製した前培養菌体を、フェノール (400mg/l) 培地にOD<sub>600</sub>=0.5となるように懸濁し、分解試験に供した。30℃、160rpmで回転振盪培養を行い、経時的に培養液を1ml採取し、即座に反応を停止するため60%硝酸を1滴加えた。遠心分離 (25,000 $\times$ g, 10min, 室温) により得た上清のフェノール濃度を表2-4の条件で高速液体クロマトグラフにより測定した。

### (3) 菌体蛋白質の測定

フェノール分解試験のはじめに細胞懸濁液を1ml採取し、遠心分離 (25,000 $\times$ g, 10min, 室温) により集菌後、50mM燐酸カリウム緩衝液 (pH7.5) により洗浄して、終濃度2% (w/v)のSDS溶液に懸濁した。この細胞懸濁液を超音波処理 (POWER:H, LEVEL:5, 東湘電機株式会社製、超音波細胞破碎装置Biorupter) した後、湯浴にて保温 (100℃, 2min) して溶菌処理し、遠心分離 (25,000 $\times$ g, 10min, 室温) により夾雑物を除いた後、上清の蛋白質濃度をピシンコニン酸法<sup>9)</sup>により定量した。蛋白の標準試料には、牛血清アルブミンを用いた。

## 第3節 実験結果並びに考察

### 第1項 各種フェノール分解菌によるTCE分解

前培養において十分にフェノールで誘導した菌体を用い、TCE分解試験を行った結果、供試フェノール分解菌のTCE分解挙動が、3タイプに分類できることがわかった。

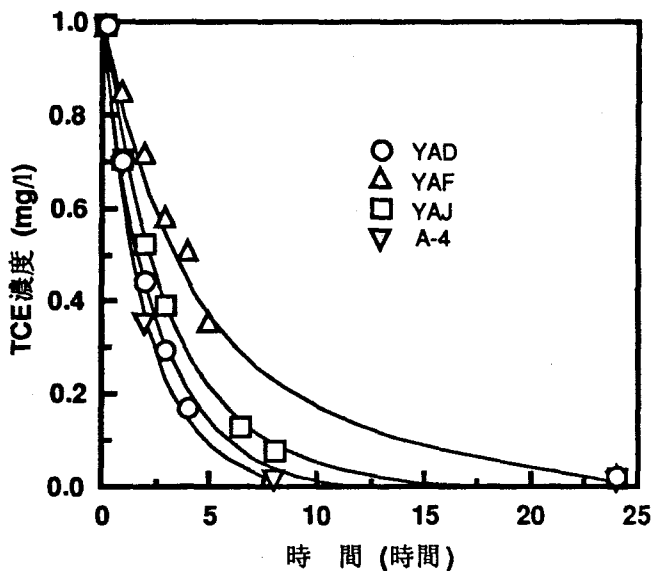


図2-1 タイプ1の菌株によるTCE分解 (I)

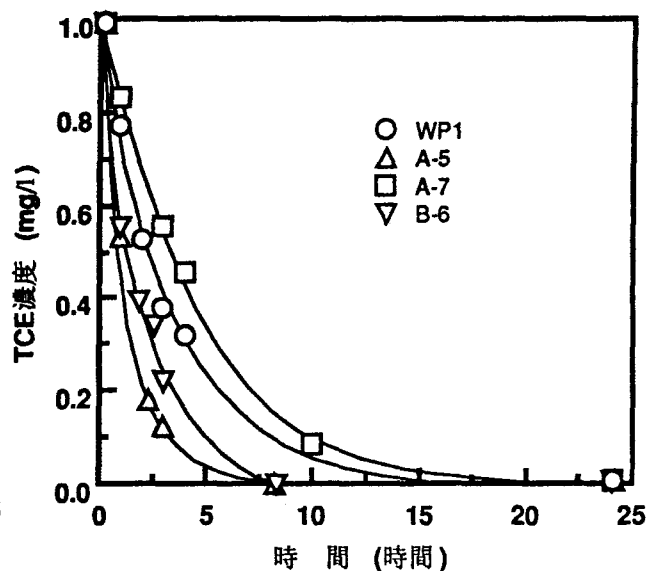


図2-2 タイプ1の菌株によるTCE分解 (II)

タイプ1はTCE濃度が低下してもTCE分解活性が持続し、完全なTCEの除去が行われたもの、タイプ2はTCE分解活性を持つものの、分解活性が長く持続せず、途中で分解が停止したもの、タイプ3は全くTCE分解活性の見られなかったものである。

タイプ1の菌株によるTCE分解は、図2-1及び図2-2に示すとおり、すべての菌株で試験開始から急激にTCEの分解が進み、24時間後にはほぼ完全に1mg/lのTCEが消失した。このグループには8株が含まれており、試験株の過半数にあたる菌株が低濃度のTCEを完全に除去できる能力を有することがわかった。一方、タイプ2の菌株による分解試験では、図2-3に示すとおり分解の初期速度が菌株によってかなり異なっており、また、最終的なTCEの除去率についても55%~90%と差が認められた。このグループの菌株については、十分に試験時間を延長しても完全なTCE分解に達しなかった。タイプ3には、*p*-ニトロフェノール分解菌PN1株が含まれ、フェノール分解能を有するものの、図2-4に示すとおり、唯一TCEを分解できなかった。

タイプ2の菌株がTCEを完全に分解できない、あるいはタイプ3の菌株がTCEを全く分解できない理由として、(1) TCE自身あるいはTCEエポキシド等

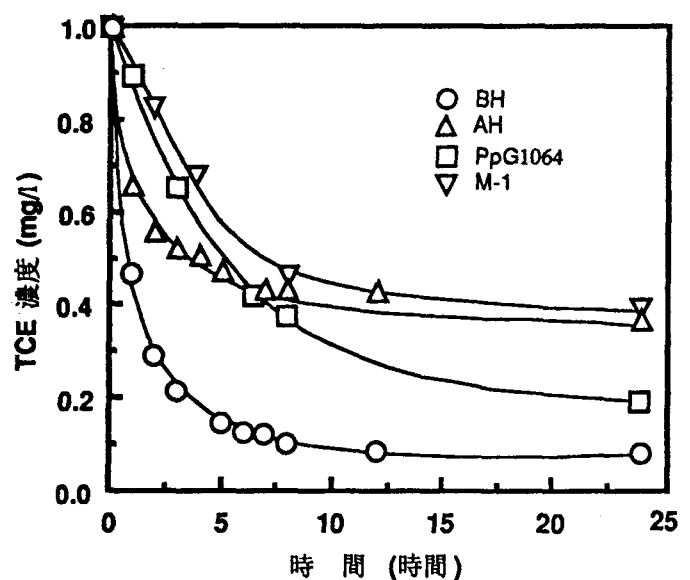


図2-3 タイプ2の菌株によるTCE分解



のTCE代謝物の毒性が強く、菌株が感受性であったこと、(2)フェノール分解酵素の安定性が悪く、短期間で失活したこと、(3)酵素のTCEに対する親和性が低かったこと、(4)酵素の誘導条件が厳密で、本実験の条件ではその能力が維持されなかったこと、(5)膜構造に依存した基質の透過性の問題で、菌体に低濃度のTCEが取り込まれなかったこと、等が挙げられる。

Wackettら<sup>9)</sup>やFoxら<sup>7)</sup>は、TCEの代謝物が細胞構成成分に結合し、毒性を示すこ

とを指摘している。また、メタンモノオキシゲナーゼでは、TCEの200ターンオーバーで酵素自身が失活することが報告されている<sup>9)</sup>。ここでは、例えば、タイプ2に属するAH株は、タイプ1に属する多くの菌株と同等の初期TCE分解速度を持つにもかかわらず、最終的に完全なTCEの除去には至らなかったことから、菌自体かフェノール分解酵素の失活がまず疑われる。既知のTCE分解酵素では、完全にTCE代謝物に抵抗性を持つものは知られていないが、トルエン分解菌の場合、トルエンモノオキシゲナーゼの方がトルエンジオキシゲナーゼよりも抵抗性を持つことが述べられており<sup>9)</sup>、酵素によって抵抗性がかなり異なるようである。

現在のところ、これらの挙動の違いの原因を確定できないが、酵素の安定性はもちろんのこと、酵素の親和性、誘導条件の特異性等、酵素自身及びその発現の問題ではないかと考えており、その解明にはさらなる検討が必要である。

## 第2項 TCE分解活性とフェノール分解活性の関係

次に、これらの菌株においてフェノール分解とTCE分解の関係を明らかにするために、各菌株のフェノール分解活性とTCE分解活性の関係を求めたところ、図2-5のようになった。両分解活性は、分解試験における各基質の初期減少速度を菌体蛋白量で除して求めたものである。この結果より、TCE分解活性を持たなかったPN1株を除き、両基質の分解活性の間にはある程度正の相関関係があることがわかった。この結果は、高いフェノール分解活性を示す土壌については、バイオスティミュレーションにより効果的なTCE除去が期待できることを示唆している。しかしその反面、フェノール分解活性がほぼ同

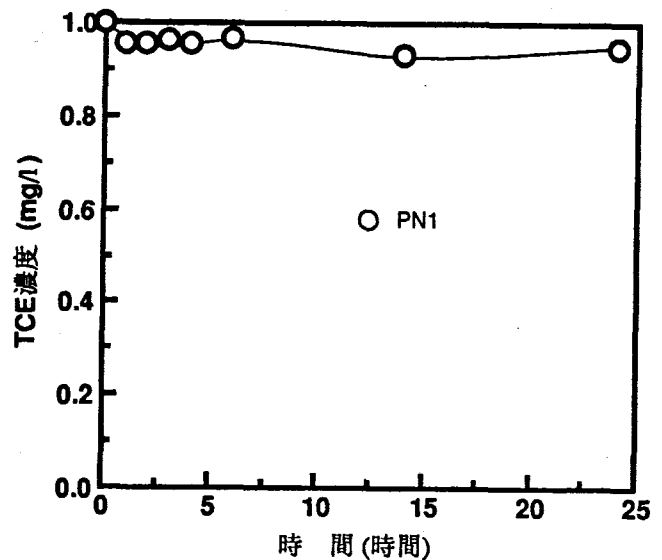


図2-4 タイプ3の菌株によるTCE分解

じ株においても、TCE分解活性にばらつきが見られたことから（例えば、*A. calcoaceticus*AH株とA-5株ではフェノール分解活性がほぼ等しいにもかかわらず、TCE分解活性は2割以上の差が認められる）、一部の菌株では、フェノール分解活性とTCE分解活性がかなり異なることも明らかとなった。

TCE分解の第一ステップであるTCEエポキシドの形成（緒論図2）を触媒するフェノール分解酵素（フェノールヒドロキシラーゼ）に

ついては、これまで少なくともアミノ酸配列の相同性が少ない3タイプのものが報告されていることから<sup>9-12</sup>、基質特異性の異なるフェノール分解菌が多数存在することは当然のことと考えられる。供試菌株のうち最もTCE分解活性及びフェノール分解活性の高かったBH株について、後述するようにフェノール分解遺伝子のクローニングに成功し、マルチコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼを持つことを明らかにしている（第4章）<sup>13</sup>。しかも、同タイプのフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子が世界各地で分離されていることから<sup>14</sup>、高いTCE分解活性を有するフェノール分解菌がいたるところに分布している可能性が高い。従って、多くの汚染サイトでフェノールによるバイオスティミュレーションの可能性が高いことが推察される。

次に、TCE分解と芳香族化合物分解の関係が密接なため、供試菌株についてフェノールと類似の芳香族化合物の資化性を調べた（表2-5）。資化性試験は、1mMの基質を含む無機塩寒天培地上での増殖を、基質を含まない培地上での増殖と比較して行った。この資化性試験の結果では、高いTCE分解能を有する菌株（BH株、YAD株等）は、比較的クレゾールを資化する傾向が認められた。一方、前述したマルチコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼを有する細菌は、フェノールと同等にクレゾールを良好に分解できること<sup>15</sup>、更に、TCE分解活性を持つ芳香族化合物分解菌としてトルエン分解菌<sup>16</sup>やイソプロピルベンゼン分解菌<sup>17</sup>が知られていることから、クレゾール、トルエン、イソプロピルベンゼンのようにベンゼン環にアルキル基を有する芳香族化合物に対して特異性を持つオキシゲナーゼほど、TCEに対する特異性が高いことが推測されるが、この問題は今後の

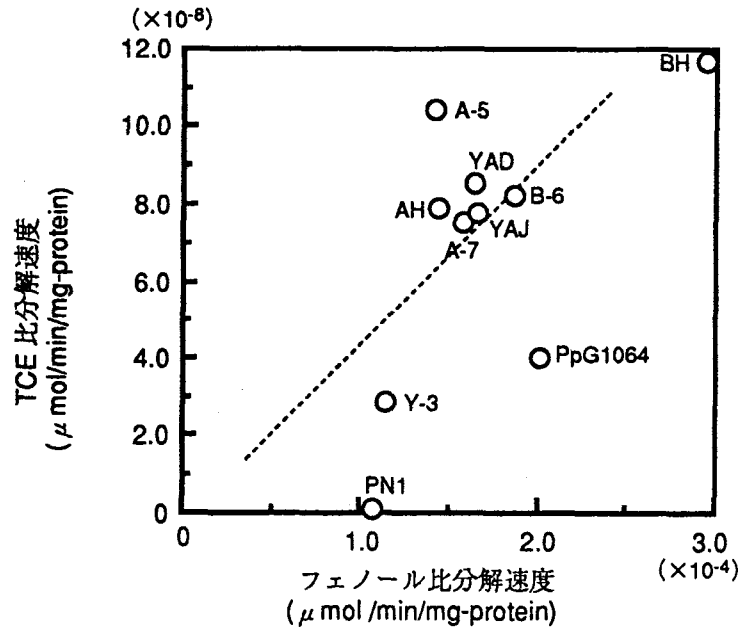


図2-5 フェノール比分解速度とTCE比分解速度の関係  
各菌株はフェノールで誘導を行った。

表 2-5 各種フェノール分解菌の芳香族化合物資化性

菌株	アニリン	安息香酸	o-クレゾール	m-クレゾール	p-クレゾール	サリチル酸	p-ニトロフェノール	p-ヒドロキシ安息香酸
AH	-	+	-	-	-	+	-	+
BH	+	+	+	+	+	-	-	+
PpG1064	-	+	-	-	-	+	-	-
YAD	+	+	+	+	+	+	-	+
YAF	+	+	-	-	-	+	-	+
YAJ	+	+	-	-	-	+	-	+
PN1	-	+	-	-	-	-	+	+
WP1	-	+	-	-	-	-	-	+
A-4	-	+	-	-	+	+	-	+
A-5	-	+	-	-	+	+	-	+
A-7	-	+	-	-	+	+	-	+
B-6	-	+	-	-	+	+	-	+
M-1	-	+	-	-	-	-	-	+
Y-3	-	+	-	-	-	-	-	+

検討課題である。

### 第3項 増殖相によるTCE分解活性

タイプ2に属する菌株のうちTCEの最終除去率の高かった*P. putida* BH株と、最終除去率のあまり高くなかった*A. calcoaceticus* AH株及びタイプ1に属する*Acinetobacter* sp. YAD株を代表株として、増殖相とTCE分解活性の関係について調べた。図2-6は、フェノール培地にて、OD<sub>600</sub>が約0.5になった時点（対数増殖中期）、約0.7になった時点（対数増殖後期）、そして増殖が停止したと思われる時点（定常期）の菌体を用いて、各々のTCE分解の初期速度を比較したものである。この結果より、基質であるフェノールが培地中からなくなる定常期においても分解活性が高く保たれている株と分解活性が速やかになくなる株が存在することが明らかとなった。AH株のように基質濃度が減少した場合に分解活性が速やかに低下する株では、そのTCE分解活性を利用するための制御条件の設定が容易でないと考えられる。BH株でも、基質の減少に伴ってTCE分解活性が低下する傾向が認められたが、AH株に比べるとその低下は少なく、BH株のTCE

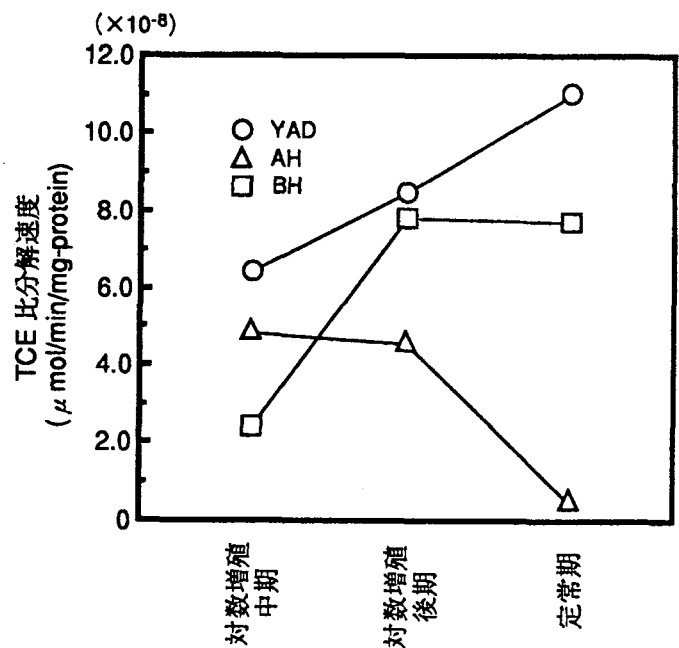


図 2-6 増殖相がTCE分解に及ぼす影響

分解能力を持続させることはAH株に比べ比較的容易といえる。一方、YAD株では、基質を消費してからもTCE分解活性が低下せず、むしろ増大する傾向にあった。これは、分解酵素の誘導が長期間継続しているためか、もしくは生産された分解酵素の蛋白としての安定性が他の菌株のものに比べて高いためと考えられる。

YAD株のように分解活性が長期間に維持される菌株は、TCEのバイオレメディエーションへの活用に特に有効と考えられる。TCE分解活性の弱いあるいは活性が持続しにくい菌株が優占するサイトでは、BH株やYAD株のような菌株のバイオオーギュメンテーションによる浄化が期待される。それ故、優れた特徴を有する菌株の分離と育種が次の課題と言えよう。

#### 第4節 要約

土壤中のフェノール分解菌のTCE分解能を評価するために、第1章で分離したフェノール分解菌を含む14株のフェノール分解菌のTCE分解能及びフェノール分解能について検討を行い、次のような結果を得た。

- (1) 供試フェノール分解菌のTCE分解挙動は、検討した範囲内ではあるが、3つのタイプに分類できた。即ち、TCEを完全に除去したグループ（タイプ1）、TCE分解活性が持続せず、TCEが完全除去されなかったグループ（タイプ2）、TCEを全く分解できないグループ（タイプ3）である。供試菌株のうち、タイプ3の1株を除き、全てTCE分解活性を持っており、過半数を占める8株はTCEを完全に除去したタイプ1に属する菌株であった。
- (2) 供試菌株についてTCE分解活性とフェノール分解活性の関係を検討したところ、両者の関係には、ある程度の正の相関関係が認められた。
- (3) フェノール分解菌の増殖相がTCE分解に及ぼす影響を調べたところ、定常期に至り、基質の消失とともに、極端にTCE分解活性を失う菌株、全く活性が減少しない菌株、あるいは、その中間的な菌株が存在することが明らかとなった。

### 第3章 *Pseudomonas putida* BH株の芳香族化合物分解系とTCE分解特性

#### 第1節 緒言

*Pseudomonas putida* BH株は、橋本らにより大阪の下水処理施設の活性汚泥を微生物源として、集積培養により得られたフェノール分解菌の一株であり<sup>1)</sup>、前章で、供試フェノール分解菌の中でも高いTCE分解能及びフェノール分解能を有することを明らかにした。高いTCE分解活性を示す菌株は、バイオオーギュメンテーションの有力候補株であり、バイオオーギュメンテーションへの適用に先だって、その諸性質とTCE分解特性を明らかにしておく必要がある。

一方、共代謝によるTCE分解は、これまで知られているだけで、フェノール<sup>2~4)</sup>、トルエン<sup>5,6)</sup>、イソプロピルベンゼン<sup>7)</sup>、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸<sup>8)</sup>等、多数の芳香族化合物について報告されており、*P. putida* BH株のTCE分解能力がフェノール以外の芳香族化合物分解系と関係している可能性も残されている。本菌株については、これまでの研究により、ベンゼン環のメタ開裂経路を経由するフェノール分解経路とオルソ開裂経路を経由する安息香酸分解経路の存在が示唆されているが、他の芳香族化合物に対する資化性や代謝経路が明らかとなっていない。

そこで、本章では、まず、本菌株のTCE分解能と深く関係する各種芳香族化合物の資化性と代謝経路を調べ、更に、明らかにされた代謝経路とTCE分解の関係を含め、本菌株のTCE分解特性について検討を行った。

#### 第2節 実験材料及び方法

##### 第1項 実験材料

###### (1) 菌株

フェノール分解菌*Pseudomonas putida* BH株を用いた。

###### (2) 培地

*P. putida* BH株の資化性試験には、表3-1に示す無機塩培地に単一炭素源として各芳香族化合物を5mMあるいは1mMで添加して使用した。また、菌株の継代と培養にはL培地（表1-4）を使用した。

###### (3) 基質

表3-1 無機塩培地の組成 (g/l)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.02
CaCl <sub>2</sub>	0.1
NaCl	0.1

pH 7.2

芳香族化合物資化性試験の基質として、*o*-クレゾール、*m*-クレゾール、*p*-クレゾール、*m*-アミノ安息香酸、*p*-アミノ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*m*-トルイル酸、*p*-ニトロフェノール、*p*-キシレン、ペンタクロロフェノール、3,4-ジメチルフェノール、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、1-ナフチル酢酸、フェノキシ酢酸、 $\beta$ -ナフトール、ベンゼン、トルエン、プロトカテキン酸、フタル酸、1,3,5-ベンゼントリオールを用いた。

## 第2項 実験方法

### (1) 芳香族化合物資化性試験

5mlのL培地に菌体を一白金耳量植菌し、30℃で回転振盪培養（160rpm, 24h）を行い、菌体を遠心分離（10,000×*g*, 4℃, 10 min）にて回収した。さらに、菌体を50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）で洗浄後、再び回収し、適量のリン酸カリウム緩衝液に懸濁したものを資化性試験に用いた。資化性試験は、各基質を単一炭素源として含む100mlの無機塩培地に細胞懸濁液を1ml植菌し、30℃、160rpmの回転振盪培養にて行った。資化性の判定は、無機塩培地での約100時間までの増殖の有無（OD<sub>600</sub>）で判断した。また、液体培養による試験とは別に、無機塩寒天培地による培養でも試験を行った。

### (2) 酵素活性の測定

芳香族化合物の代謝経路を推定するために、Nakazawaらの方法<sup>9)</sup>に準じて、ベンゼン環開裂酵素であるカテコール1,2-ジオキシゲナーゼ（C12O）及びカテコール2,3-ジオキシゲナーゼ（C23O）の活性の測定を行った。まず、前培養として、L培地に一白金耳量の菌体を接種し、30℃、160rpmで24時間、回転振盪培養を行った。続いて、5mMの基質を含むL培地にこの前培養液を1ml植菌し、同様に培養した。遠心分離（10,000×*g*, 4℃, 10 min）により菌体を回収し、15mlのリン酸カリウム緩衝液に懸濁し、0℃で45秒間の超音波破碎（日本精機製作所製GT2000、振動指示値約20 $\mu$ A）の後、遠心分離（25,000×*g*, 4℃, 20 min）を行い、その上清を粗酵素液とした。

○ C12O活性：粗酵素液4mlに、過酸化水素を終濃度40mMになるよう加え、室温で30分間保持し、C23O活性を不活化した。続いて、400units/mlのカタラーゼ溶液を終濃度40units/mlになるよう加え、室温で10分間保持し、過酸化水素を除去した。紫外吸光測定において妨害物質の影響を抑えるために、この粗酵素液をリン酸カリウム緩衝液で5倍に希釈した後、その2.8mlに5mMカテコール溶液を0.2mlを加え、*cis,cis*-ムコン酸の生成量を波長260nmの吸光度で経時的に測定し、比活性を次式(1)より求めた。

$$\text{比活性 (units/mg-protein)} = \frac{c \times 3 \times 1000}{16.0} \times \frac{1}{d \times 0.448} \dots \text{式(1)}$$

ここで、 $c$ ：吸光度の1分あたりの増加量，16.0：*cis,cis*-ムコン酸1mMの吸光度（光路長1cm），3：反応系容量（ml），0.448：系内の粗酵素液量（ml）， $d$ ：粗酵素液蛋白量（mg/l）を示す。

○ C23O活性：粗酵素液4.5mlにアセトン0.5mlを加え酵素を安定化させ、この粗酵素液2mlに、リン酸カリウム緩衝液0.8mlと5mMカテコール溶液0.2mlを加え、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの生成量を波長375nmの吸光度で経時的に測定し、比活性を次式(2)により求めた。

$$\text{比活性 (units/mg-protein)} = \frac{c \times 3 \times 1000}{44.1} \times \frac{1}{d \times 1.8} \quad \dots \text{式(2)}$$

ここで、 $c$ ：吸光度の1分あたりの増加量，44.1：2-ヒドロキシ酸セミアルデヒド1mMの吸光度（光路長1cm），3：反応系容量（ml），1.8：系内の粗酵素液量（ml）， $d$ ：粗酵素液蛋白量（mg/l）を示す。

なお、蛋白質の定量は、牛血清アルブミンを標準試料とするビウレット法<sup>10</sup>で行った。

### (3) T C E分解試験

L培地を用いて対数増殖期まで30℃、160rpmで回転振盪培養した菌体を、さらに、誘導基質を5mMで含むL培地に植菌した。12時間、同様に回転振盪培養を行い、遠心分離（10,000×*g*，4℃，10min）にて菌体を回収し、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）で洗浄後、再び菌体を回収し、OD<sub>600</sub>=2.5となるように懸濁してT C E分解試験に供した。この懸濁液20mlを120ml容バイアル瓶に入れ、同緩衝液とT C E溶液を加えて25mlとし、シリコンライナー付きゴム栓及びアルミキャップで密閉した。分解試験は、バイアル瓶を25℃の水浴中で回転振盪（100rpm）し、経時的に気相を100μl採取して、ガスクロマトグラフ分析に供した。なお、T C E溶液は、10,000mg/lのN,N-ジメチルホルムアミド溶液をリン酸カリウム緩衝液で100mg/lになるように希釈して、適量をバイアル瓶へ注入した。T C Eのガスクロマトグラフ分析は、第2章第2節に準じて行った。

## 第3節 実験結果並びに考察

### 第1項 *P. putida* BH株の芳香族化合物資化性

本試験では、まず、各芳香族化合物の基質濃度を5mMとして実験を行い、増殖の見られないものに関しては、その濃度阻害を考慮して基質濃度を1mMに調整して再試験を行った。表3-2に示す結果から、本菌株は、フェノール、安息香酸、*o*-、*m*-、*p*-クレゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*m*-トルイル酸、3,4-ジメチルフェノール、プロトカテキン酸の9

種類の基質を資化することが確認された。さらに、寒天培地による増殖を適宜観察したところ、ほぼこの結果を裏付ける結果が得られた（表3-2に併記）。

*Pseudomonas*属細菌は、一般に図3-1に示す経路で多種の芳香族化合物を資化することが知られている<sup>11)</sup>。それらの代謝経路では、側鎖が短縮され、多環から単環へと分解が進み、カテコールやプロトカテキン酸等の中間代謝物に一旦、集約された後、下流物質へと代謝されて行く<sup>11)</sup>。本菌株は、*p*-ヒドロキシ安息香酸及びプロトカテキン酸を資化できたことから、既知のオルソ及びメタのカテコール開裂経路に加え、図3-1に示すプロトカテキン酸経路を持つ可能性が示唆された。

## 第2項 *P. putida* BH株の芳香族化合物代謝経路

*P. putida* BH株が資化できる各芳香族化合物がどのような経路によって代謝されるかを明らかにするために、まず、カテコールの開裂酵素であるC120及びC230の活性測定を行った。両酵素はともに、基質あるいはその代謝物によって誘導される酵素であるため、その活性測定には誘導条件の検討が必要である。そこで、両酵素の誘導基質として、安息香酸とフェノールを用いて、酵素活性の発現に必要な培養時間を調べた。表3-3にその結果を示す。いずれの酵素活性も培養12時間を経過すれば、ほぼ完全に誘導され、それらの完全な誘導レベルは $10^2$ units/mg-proteinと判断した。これにより新たに基質と確認された7種類の芳香族化合物について、C120及びC230活性測定のために適

表3-2 *P. putida* BH株の芳香族化合物の資化性

基質	1mM	5mM	寒天培地
<i>o</i> -クレゾール		+	+
<i>p</i> -クレゾール	+	-	+
<i>m</i> -クレゾール		+	+
<i>m</i> -アミノ安息香酸	N.T.	-	-
<i>p</i> -アミノ安息香酸	-	-	-
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸		+	+
<i>m</i> -トルイル酸		+	+
<i>p</i> -ニトロフェノール		-	-
<i>p</i> -キシレン*	N.T.	-	-
ペンタクロロフェノール	-	-	-
3,4-ジメチルフェノール		+	+
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	-	-	-
1-ナフチル酢酸	-	-	-
フェノキシ酢酸	-	-	-
$\beta$ -ナフトール	N.T.	-	-
ベンゼン*	N.T.	-	-
トルエン*	N.T.	-	-
プロトカテキン酸		+	+
フタル酸	N.T.	-	-
1,3,5-ベンゼントリオール	N.T.	-	-

+ : 増殖, - : 増殖せず, N.T. : テストせず,  
\* : 寒天培地において基質を蒸気供給した。

表3-3 *P. putida* BH株のC120及びC230活性の経時変化\*

時間 (h)	安息香酸誘導		フェノール誘導	
	C120	C230	C120	C230
6**	$7.6 \times 10^{-3}$	0	$3.6 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-2}$
12	$2.0 \times 10^{-2}$	$2.3 \times 10^{-5}$	$4.6 \times 10^{-4}$	$3.8 \times 10^{-2}$
18	$1.7 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-5}$	$1.9 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-2}$
24	$3.1 \times 10^{-2}$	$4.3 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-2}$

\* : 比活性 (units/mg-protein)

\*\* : 培養液30ml (他は15ml) から粗酵素液を調製した。



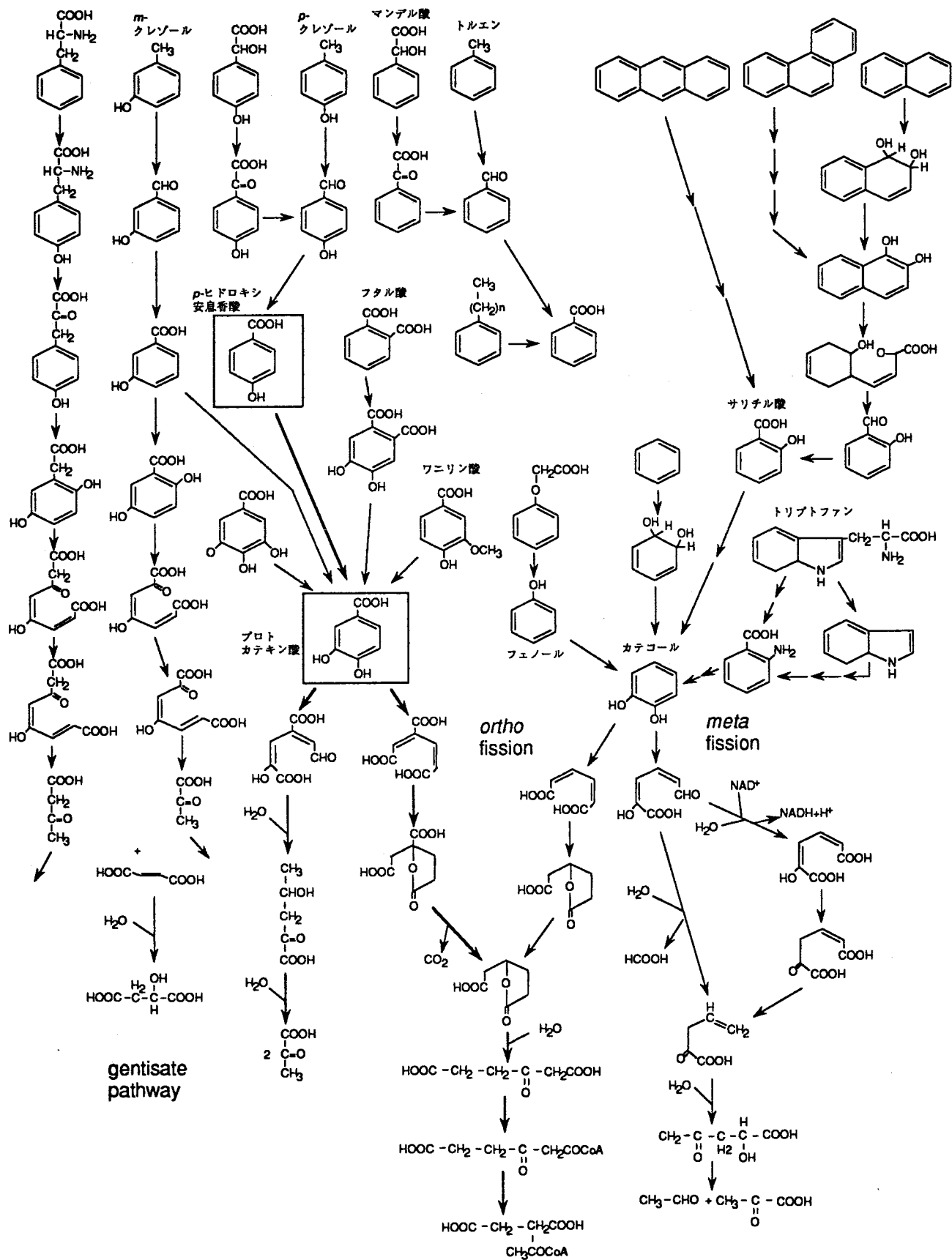


図3-1 *Pseudomonas*属細菌の芳香族化合物の代表的な代謝経路

当な前培養時間を15時間と設定した。この条件により測定した各芳香族化合物分解時の両比活性を表3-4にまとめた。o-, m-, p-クレゾール及び3,4-ジメチルフェノールは、フェノールと同等の高いC23O活性を示したことから、主としてメタ開裂経路により代謝されることがわかった。また、試験した基質のなかで、安息香酸と同等にC12O活性を示すものが認め

表3-4 *P. putida* BH株の各種芳香族化合物代謝時におけるC12O及びC23O活性と代謝経路の推定

基質	比活性 (units/mg-protein)		代謝経路
	C12O	C23O	
o-クレゾール*	$7.5 \times 10^{-4}$	$4.8 \times 10^{-2}$	m
p-クレゾール*	0	$5.1 \times 10^{-2}$	m
m-クレゾール*	$7.1 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^{-2}$	m
p-ヒドロキシ安息香酸	$1.1 \times 10^{-3}$	$4.4 \times 10^{-4}$	N.D.
m-トルイル酸	0	0	N.D.
3,4-ジメチルフェノール*	$4.5 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-2}$	m
プロトカテキン酸	$2.6 \times 10^{-3}$	0	N.D.
フェノール*	$3.1 \times 10^{-4}$	$4.6 \times 10^{-2}$	m
安息香酸	$4.3 \times 10^{-2}$	$6.1 \times 10^{-5}$	o

m: カテコールメタ開裂経路, o: カテコールオルソ開裂経路, N.D.: 不定, \*: 培養液30ml (他は15ml) から粗酵素液を調製した。

られなかったことから、これらの基質はオルソ開裂経路をほとんど経由しないと考えられる。

前述したとおりp-ヒドロキシ安息香酸及びプロトカテキン酸では、資化されるにもかかわらず、C12O及びC23O活性とも比活性が酵素誘導レベルに達しなかったことは、先述したプロトカテキン酸経路の存在を支持する結果と考えられる。ここで、これらの基質の分解において、培地にメタ開裂経路特有の黄蛍光色の呈色が認められなかったことから、これらの基質はプロトカテキン酸のオルソ開裂経路で分解されていると推定した。

一方、m-トルイル酸では、両酵素活性が検出できず、代謝経路が推定できなかったため、本菌株はさらに別の代謝経路を有する可能性もある。

### 第3項 *P. putida* BH株によるTCE分解

#### (1) *P. putida* BH株の芳香族化合物代謝経路とTCE分解の関係

これまでの検討により、本菌株の芳香族化合物の代謝経路には、少なくともカテコールのメタ開裂経路、オルソ開裂経路とプロトカテキン酸のオルソ開裂経路が存在すると推定した。そこで、これらの経路の酵素活性を誘導する基質の代表として、それぞれフェノール、安息香酸及びp-ヒドロキシ安息香酸を用いて、本菌株のTCE分解活性との関係を検討することとした。これらの基質で誘導を行った菌体を用いて、初期TCE濃度を20mg/lとしてTCE分解試験を行った。対照として、リン酸カリウム緩衝液にTCEを加えたブランク試験及び誘導を行わない菌体を使用したコントロール試験も同時に行った。分解試験の結果を図3-2に示す。

この結果、フェノールで誘導を行った菌体だけがTCE分解を触媒したことから、安息

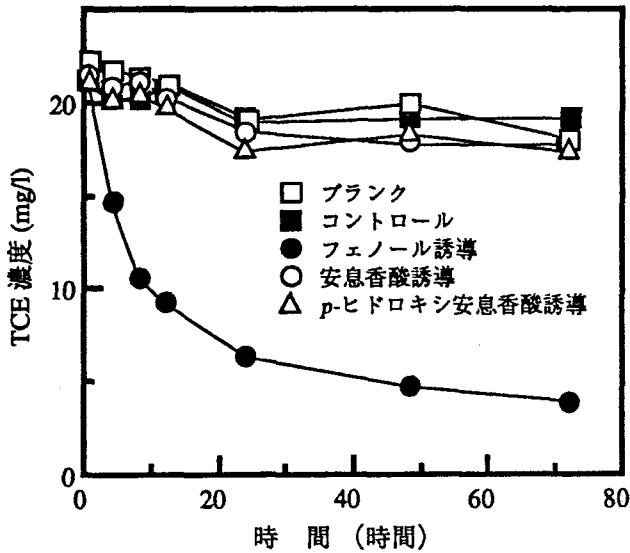


図3-2 3つの芳香族化合物代謝経路誘導条件下での*P. putida* BH株によるTCE分解

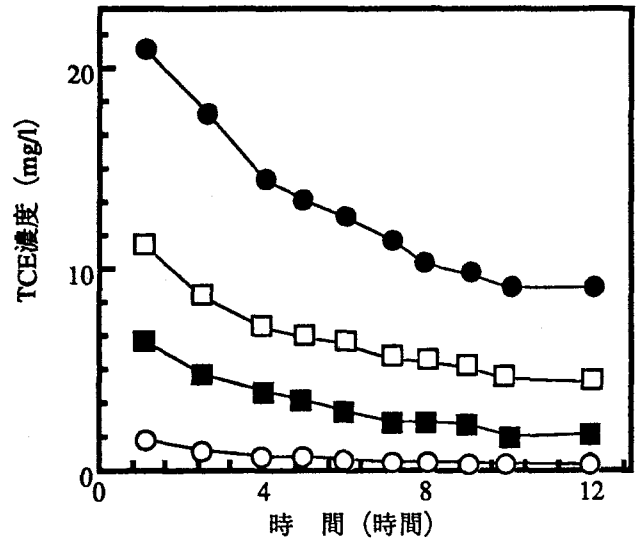


図3-3 *P. putida* BH株のTCE分解に及ぼす初期TCE濃度の影響

香酸を誘導基質とするカテコールのオルソ開裂経路あるいは*p*-ヒドロキシ安息香酸を誘導基質とするプロトカテキン酸のオルソ開裂経路は、本菌株のTCE分解に関与しないことが明らかとなった。

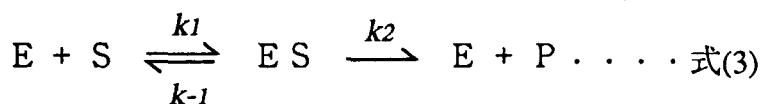
(2) *P. putida* BH株のTCE分解に及ぼす初期TCE濃度の影響

フェノールで誘導を行った菌体を用い、種々の初期TCE濃度(1, 5, 10, 20mg/l)でTCE分解試験を行った。その結果を図3-3に示す。この結果では、時間が経過するに従い反応速度が低下しているため、菌体の不活化や酵素活性の失活が疑われる。また、TCEの残存率を、試験開始1時間後の測定値に対する相対値で定義すると、48時間後では初期濃度20mg/lに設定したもので22.4%、10mg/lで10.6%、5mg/lで4.7%、1mg/lで5.1%となり、初期濃度が高いほど残存濃度も高くなる傾向が認められた。図3-3において、TCE分解が直線的であった1時間から2.5時間までのデータよりTCE分解速度を求めて表3-5に示した。但し、mg-SSは菌体乾燥重量を示す。

表3-5 TCE分解速度

初期TCE濃度 (mg/l)	TCE分解速度 (mg-TCE/h/mg-SS)
1	$5.2 \times 10^{-4}$
5	$1.5 \times 10^{-3}$
10	$2.2 \times 10^{-3}$
20	$2.8 \times 10^{-3}$

酵素反応を(3)式に示す酵素基質複合体を形成する単純なモデルと考えれば、その反応速度*v*は、次のMichaelis-Mentenの式(4)で表せる。



ここで、E：酵素，S：基質，ES：酵素-基質複合体，P：生成物

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \dots \dots \text{式(4)} \quad \left( K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right)$$

ここで、 $K_m$ ：Michaelis定数、 $V_{\max}$ ：最大反応速度を示す。

この式の逆数を取り、式(5)に示すLineweaver-Burkの逆数プロットを行えば、 $1/[S]$ と $1/v$ の一次式の切片と傾きから $V_{\max}$ と $K_m$ を求めることができる。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \dots \dots \text{式(5)}$$

懸濁細胞を酵素にみため、表3-5に示したTCE分解速度と試験開始1時間後のTCE濃度を用いて $1/[S]$ と $1/v$ の関係を求めると図3-4のように高い相関（最小二乗回帰による相関係数  $r = 0.9995$ ）を持つ直線関係が得られた。これにより、*P. putida* BHによるTCEの分解は、酵素反応を単純な酵素基質複合体を経由する反応モデルとしたMichaelis-Menten式によく一致することがわかった。この解析の結果、 $V_{\max}'$ を  $4.0 \times 10^3 \text{ mg-TCE/h/mg-SS}$  ( $0.5 \text{ nmol/min/mg-SS}$ )、 $K_m'$ を  $10.3 \text{ mg/l}$  ( $78 \mu\text{M}$ ) と算出した。

実験条件が多様なため、単純に比較することは難しいが、多くのTCE分解菌の分解速度は、 $0.5 \sim 2.0 \text{ nmol/min/mg-protein}$ 程度と言われており<sup>12)</sup>、本菌株の最大分解速度は、本試験結果が $\text{mg-SS}$ あたりで評価されていることを考慮すれば、この範囲と同程度と見積もられる。芳香族化合物分解菌では、例外的に*P. cepacia* G4株が $8.0 \text{ nmol/min/mg-protein}$ でTCEを分解できると報告されている<sup>13)</sup>。また、メタン資化性菌*M. trichosporium* OB3b株のTCE分解速度は、 $456 \sim 600 \text{ nmol/min/mg-protein}$ と報告されており<sup>14)</sup>、他の分解菌を圧倒している。しかしながら、TCEのバイオレメディエーションの応用的見地にたてば、菌株の培養の容易さ、増殖速度の速さ、酵素の安定性、TCE分解に対する遺伝制御の問題、さらには適用されるサイトでの生態学的安定性等、多くの要因のバランスが重要であり、単に分解速度の比較で、菌株の優劣をつけることはできない。

メタン資化性菌の場合、(1)フェノール分解菌やトルエン分解菌に比べて増殖速度が遅いこと、(2)メタンによる拮抗阻害が著しいこと、(3)可溶性のメタンモノオキシゲナーゼを有する菌株のみがTCE分解を触

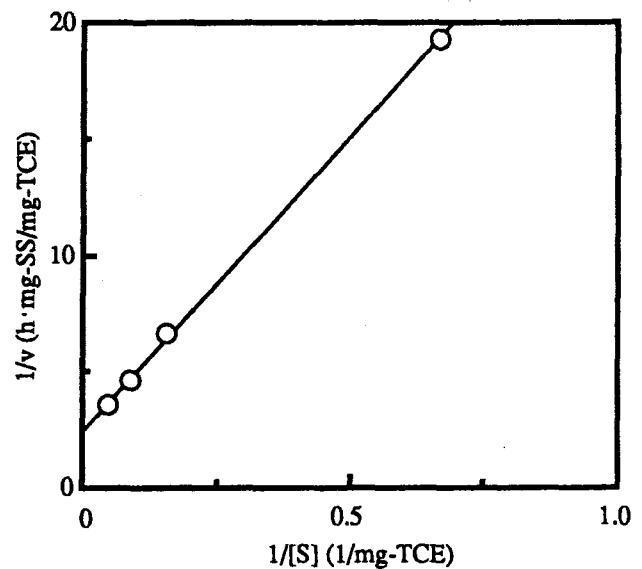


図3-4 Lineweaver-Burkの逆数プロット

媒すること、(4)低濃度の銅イオンの存在で酵素活性が阻害されること等、いくつかの問題を抱えている。特に(1)の問題は重大であり、HopkinsらやFanらが土壌マイクロコズムにおいて行ったTCE分解試験で、メタンがトルエンやフェノールほど顕著なTCE分解活性を誘導しなかったこと<sup>15,16)</sup>の第一の原因と考えられる。

BH株については、TCE分解速度がこれまで報告された分解菌に比べ、顕著に速いとは言えないため、本菌株のフェノール分解酵素系について酵素・遺伝子レベルで検討し、更に遺伝子組換え技術等でTCE分解活性を増強することも重要な課題と考えられる。

#### 第4節 要約

供試フェノール分解菌のうち最も高いTCE分解活性を示した*P. putida* BH株のTCE分解特性を明らかにするために、種々の検討を行い、次の結果を得た。

- (1) TCE分解が各種芳香族化合物分解との共代謝で起こるため、本菌株の芳香族化合物の資化性について調べたところ、本菌株は、試験した20種類の芳香族化合物のうち、フェノール、安息香酸、*o*-, *m*-, *p*-クレゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*m*-トルイル酸、3,4-ジメチルフェノール、プロトカテキン酸の9種類の基質を資化することができた。
- (2) (1)で明らかとなった基質の代謝経路を明らかにするために、ベンゼン環開裂酵素活性の測定を行ったところ、フェノール、*o*-, *m*-, *p*-クレゾール及び3,4-ジメチルフェノールは、カテコールのメタ開裂経路で、安息香酸はカテコールのオルソ開裂経路で、また、プロトカテキン酸及び*p*-ヒドロキシ安息香酸はプロトカテキン酸のオルソ開裂経路で代謝されると推定され、少なくとも本菌株には3つの代謝経路の存在が示唆された。
- (3) (2)で推定した3つの芳香族化合物代謝経路とTCE分解との関係を調べるために、3つの経路の代表基質としてそれぞれフェノール、安息香酸及び*p*-ヒドロキシ安息香酸により酵素系を誘導した菌体を用いてTCE分解試験を行ったところ、カテコールのメタ開裂を経由するフェノール分解経路のみがTCE分解を触媒し、本菌株のフェノール分解経路がTCE分解と密接に関係していることを示唆した。
- (4) 本菌株のフェノール分解経路の酵素群によるTCE分解挙動を明らかにするために、フェノール誘導条件下で初期TCE濃度を変化させて本菌株によるTCE分解試験を行ったところ、そのTCE分解は、Michaelis-Menten式によく一致することが

明らかとなり、 $V_{max}'=4.0 \times 10^3$  mg-TCE/h/mg-SS、 $K_m'=10.3$  mg/lを得た。

## 第4章 *Pseudomonas putida* BH株のフェノール分解遺伝子群のクローニングとその解析

### 第1節 緒言

1970年代に開発された遺伝子操作技術は、組換え技術の安全性の問題から一時期停滞期を迎えたが、1980年代になって、生物の遺伝子解析や新規生物の育種に大きな威力を発揮した。とりわけ、比較的遺伝子発現システムの単純な細菌や酵母では、早くから宿主ベクター系が構築され、その遺伝子解析や育種に大きな成果を挙げてきた。

このような背景から、TCE分解に関係する各種オキシゲナーゼ遺伝子も、TCE分解との関わりが明らかになる以前から、本来の遺伝子機能を明らかにする目的でクローン化され、その解析が進められてきた。メタン資化性菌の場合、メタンモノオキシゲナーゼの蛋白の純化と分析及びその遺伝子の塩基配列解析が詳細に行われ、その姿がかなり明確に特徴付けられてきた。本酵素がTCE分解を触媒することが明らかになった後も、可溶性のメタンモノオキシゲナーゼのみがTCE分解を触媒すること等、遺伝子組換え技術を含む分子生物学的手法により新たな知見が得られている<sup>1-5)</sup>。また、トルエン分解菌*P. putida* F1株及び*P. mendocina* KR1株では、それぞれトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子<sup>6-8)</sup>とトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子<sup>9,10)</sup>が解析され、それらの遺伝子産物がTCE分解を触媒することが示されている<sup>11,12)</sup>。

一方、フェノール分解菌については、いくつかの菌株で遺伝子解析がなされてきたが、フェノール分解遺伝子とTCE分解との関係が明らかとなっておらず、また、TCE分解菌の標準株として認知されている*P. cepacia* G4株については、未だその遺伝子のクローン化がなされていない。唯一、中村らは*Pseudomonas* sp. KN1株からフェノール分解遺伝子のクローニングを行い、組換え菌によるTCE分解を確認している<sup>13)</sup>が、現在までフェノール分解遺伝子自体の特徴付けが全くなされていない状況にある。

そこで、本章では、*P. putida* BH株のTCE分解機構を遺伝子レベルで解明するために、本菌株からTCE分解を触媒するフェノール分解遺伝子のクローニングとその解析を行った。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 第1項 実験材料

##### (1) 供試菌株

本実験で使用した菌株とプラスミドを表4-1に示す。また、クローニングベクター

pVK100の構造を図4-1に示す。本ベクターは、広範囲のグラム陰性菌を宿主とするIncP-1プラスミドRP4由来の複製起点、Tn903由来のカナマイシン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子を持つコスミドベクターであり<sup>18)</sup>、ヘルパープラスミドpRK2013の存在下で他の宿主へ接合伝達することが可能である<sup>19)</sup>。

## (2) 培地

ここでは、主にL培地(表1-4)及び無機塩培地(表3-1)を使用した。栄養要求性を持つ菌株の増殖のために、無機塩培地にはプロリン、ロイシン、チアミンを20mg/lの濃度で添加した。また、形質転換には、表4-2に示すSOC培地を使用した。組換え体の選択には、抗生物質アンピシリン、テトラサイクリン及びカナマイシンをそれぞれ50, 25, 25  $\mu$ g/mlの濃度で培地に添加し、また、*lac*プロモーターの誘導剤としてイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトシド (IPTG) 及び組換え体選択の発色剤として5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド (X-gal) をそれぞれ8mg/l及び40mg/lの濃度で使用した。塩基配列解析用の一本鎖DNAの調製には、表4-3に示す2 $\times$ TY培地を、SDS-PAGEによる蛋白分析のための培養には表4-4に示すTB培地を使用した。

## 第2項 実験方法

表4-1 供試菌株とプラスミド

Strain and plasmid	Properties	Reference or source
<b>Strain</b>		
<i>E. coli</i> HB101	<i>pro, leu, thi, hsdR</i> , Sm	(14)
<i>E. coli</i> JM103	<i>thi, hsdR</i> , Sm	(15)
<i>E. coli</i> JM109	<i>thi, hsdR</i>	Takara Shuzo
<i>P. putida</i> BH	Phe, Ben	(16)
<i>P. putida</i> KT2440	Ben, <i>hsdR</i>	(17)
<b>Plasmid &amp; phage</b>		
pVK100	Tc, Km, RK2-based vector	(18)
pS10-45	19.6-kb <i>Sal</i> I fragment from BH chromosome in pVK100, Km, PH	This study
pS04-92	22.5-kb <i>Sal</i> I fragment from BH chromosome in pVK100, Km, PH, C23O	This study
pUC19	Ap, multicopy type cloning vector	Takara Shuzo
pUC18	Ap, multicopy type cloning vector	Takara Shuzo
pBluescript SK+	Ap, vector for sequencing	STRATAGENE
pBluescript SK-	Ap, vector for sequencing	STRATAGENE
pRK2013	Km, RK2-based helper plasmid	(19)
pKT230	Km, Sm, RSF1010-based vector	(17)
M13K07 phage	Km, helper phage for preparation of single-strand DNA	Takara Shuzo

*pro* : proline requirement, *leu* : leucine requirement, *thi* : thiamine requirement, *hsdR* : host specific restriction minus, Phe : phenol assimilating ability, Ben : benzoate assimilating ability, Sm : streptomycin resistance, Tc : tetracycline resistance, Km : kanamycin resistance, Ap : ampicillin resistance, PH : phenol hydroxylase activity, C23O : catechol 2,3-dioxygenase activity

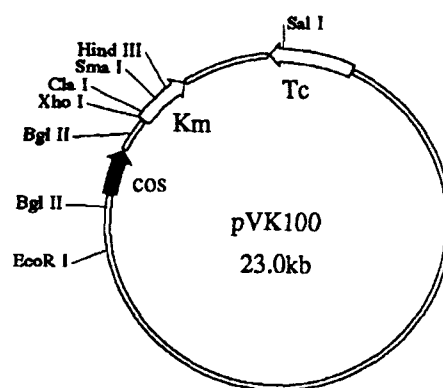


図4-1 コスミドベクターpVK100の構造

Km : kanamycine resistant gene, Tc : tetracycline resistant gene, cos :  $\lambda$  phage cohesive end site



表4-2 SOC培地の組成 (g/l)

Tryptone	20.0
Yeast extract	5.0
NaCl	0.5
KCl	0.19
MgCl <sub>2</sub>	0.9
glucose	3.6

pH 7.0

## (1) 制限酵素処理

各種制限酵素は、宝酒造あるいは東洋紡から購入し、使用説明書に従い添付緩衝液を使用してDNAサンプルの消化に使用した。

## (2) DNAの抽出

*Pseudomonas putida* BH株からの染色体DNAの抽出は、斉藤らの凍結融解とフェノール抽出を組み合わせた方法<sup>20)</sup>により行った。また、ベクター及び組換えプラスミドの調製は、Birboimらのアルカリ法<sup>21)</sup>で行った。抽出したプラスミドは、必要に応じて塩化セシウム-臭化エチジウム等密度勾配超遠心分離 (100,000rpm, 20°C, 16h) にて純化を行った<sup>22)</sup>。DNAのサイズ分析は、水平サブマリン型電気泳動装置 (ミューピッドII、コスモバイオ製) を使用したアガロースゲル電気泳動により行った。泳動後のゲルを、臭化エチジウム溶液 (0.5 μg/ml) で染色後、紫外線照射装置下で可視化し、標準分子量マーカーとして泳動した既知分子サイズのλ DNA *Hind*III消化物 (100ng/μl) と比較して、その相対移動距離からサイズを求めた。また、ゲルの作製及び泳動には表4-5に示すTAE緩衝液を用いた。

## (3) アガロースゲルからのDNAの回収

アガロースゲルからのDNA断片の回収には、UNIDIRECTIONAL ELECTROELUTOR (IBI製) を用いた電気泳動溶出法、DNA回収遠心フィルター SUPREC-01 (宝酒造製) あるいは Gene Clean Kit (BIO101製) を採用し、添付の説明書に従ってDNAの回収を行った。

## (4) DNA断片の末端平滑化

5'あるいは3'突出末端を有するDNA断片の末端平滑化には、宝酒造製のDNA Blunting Kit を用い、添付の取り扱い説明書に準じて使用した。

## (5) DNA濃度の測定

表4-3 2×TY培地の組成 (g/l)

Tryptone	16.0
Yeast extract	10.0
NaCl	5.0

pH 7.2

表4-4 TB培地の組成 (g/l)

Tryptone	12.0
Yeast extract	24.0
Glycerol	4.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.5

pH 7.2

表4-5 TAE緩衝液の組成 (mM)

Tris-HCl (pH8.0)	40
EDTA·2Na	1
Acetic acid	20

DNA溶液の濃度は、0.35ml容石英セルを用い、波長260nmの吸光度測定により求めた。なお、 $OD_{260}=1$ となる時の2本鎖DNA濃度を $50\mu\text{g/ml}$ 、1本鎖DNA濃度を $40\mu\text{g/ml}$ としてDNA濃度を算出した。また、簡便法として、既知濃度の $\lambda$ DNAとともにDNAサンプルを電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色後、紫外線照射により得られるサンプルの輝度を $\lambda$ DNAの輝度と比較することによって、DNA濃度を推定した。

#### (6) アルカリ性フォスファターゼ処理

ベクターの再環状化を防ぐため、Bacterial alkaline phosphatase（東洋紡製）あるいはCalf intestinal alkaline phosphatase（宝酒造製）を用い、使用説明書の条件に従い、ベクターDNAの5'末端からリン酸基を除去した。

#### (6) ライゲーション

コスミドクローニングのためのライゲーションでは、コンカテマー形成を促進するため、ベクターと挿入断片の末端濃度比を4:1とし、反応液中のDNA濃度を $200\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上にして、宝酒造製ligation kitのB液を加え、 $26^\circ\text{C}$ で10分間反応を行った。また、サブクローニングのためのライゲーションでは、ベクター（ $0.03\text{ pmol}$ ）及びインサートDNA（ $0.1\sim 0.3\text{ pmol}$ ）を含むDNA溶液 $20\mu\text{l}$ に宝酒造製ligation kitのA液 $100\mu\text{l}$ とB液 $20\mu\text{l}$ を加え、 $16^\circ\text{C}$ で30分間保持してDNAの結合反応を行った。

#### (7) 形質転換

$-80^\circ\text{C}$ で保存していた*E. coli* JM系のコンピテントセル $100\mu\text{l}$ を氷中で溶解し、DNA溶液（ $<20\mu\text{l}$ ）を添加した。 $0^\circ\text{C}$ で30分間保持後、ヒートショック（ $42^\circ\text{C}$ で60秒保持）を与え、再び氷冷した。次に、その菌液を試験管に分注した1mlのSOC培地に添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間振盪培養を行った。その培養液 $0.1\text{ml}$ を、アンピシリン、IPTG、X-galを添加したL寒天培地に塗抹し、 $37^\circ\text{C}$ で24時間培養した。外来遺伝子が挿入されずに再環状化したベクターが*E. coli*に入った場合、IPTGとX-galを含む培地上で青色コロニーを形成する。一方、ベクターに挿入断片を有する組換え体は、白色コロニーとして容易に検出できる。コンピテントセルは、 $\text{CaCl}_2$ 法<sup>29)</sup>で調製したものか、あるいは*E. coli* JM109, COMPETENT high（東洋紡製）を購入使用した。

#### (8) 形質導入

組換えDNAの大腸菌への導入は、宿主として*E. coli* HB101を用い、 $\lambda$ DNA IN VITRO PACKAGING KIT（Amersham International製）を用い、使用説明書に従って行った。

#### (9) 接合による遺伝子導入

接合に使用する遺伝子供与株、受容株、ヘルパーをL培地で一晚適温（*E. coli*:  $37^\circ\text{C}$ , *P.*

*putida*: 30℃) で培養し、各培養液のOD<sub>600</sub>が等しくなるように希釈し、それぞれ1:1:1の比率で希釈液を混合した。これをアスピレーターによる吸引濾過でフィルター（ミリポアフィルター：孔径0.45 μm）に通して菌体を捕集し、このフィルターをL寒天培地上で、30℃で6時間培養した。培養後、滅菌水で適宜洗浄希釈して選択培地に塗抹した。

#### (10) 塩基配列の解析

塩基配列の解析は、Sangerらのdideoxy法<sup>24)</sup>により行った。まず、解析に必要なDNA断片を塩基配列決定用ベクターpBluescript II SK+あるいはSK-へ導入し、必要に応じて宝酒造製kilo-sequence用 deletion kitを用いて、挿入断片を種々サイズヘデリーションしたプラスミドを構築し、これを用いて添付プロトコルに準じて一本鎖DNAを調製した。シーケンス反応は、市販各種蛍光（FITC）プライマー及び東洋紡製日立オートシーケンサー用 sequence kitを用いて行った。更に、反応液を日立オートシーケンサーSQ-3000にかけて電気泳動により配列の解析を行った。

#### (11) SDS-PAGE分析

アンピシリンを150mg/lとなるように添加したTB培地10mlに組換え大腸菌を植種し、37℃、150 oscillations/minで往復振盪培養を行った。1時間後、ベクターの*lac*プロモーターを活性化するため、200mg/ml IPTGを12.5 μl添加し（終濃度約1mM）、再び、同条件で12時間培養を行った。培養液1.5mlを遠心分離（10,000rpm, 4℃, 5min）し、表4-6に示すサンプルバッファーで完全に懸濁後、再び、遠心分離を行った。上清を宝酒造製遠心フィルターSUPREC-01（孔径0.22 μm）で濾過し、濾液を沸騰水中で約5分間加熱後、その5 μlをSDS-PAGE分析の試料として泳動に供した。

SDS-PAGEには、90mm×80mm×1mmのゲルを使用した。120mm×102mmの1組のガラスプレートに、表4-7に示す組成の分離ゲル溶液を約8ml流し込み、その上に少量の蒸留水を重層し、25℃で重合を行った。約1時間後、上層の蒸留水を除去し、分離ゲル上部に表4-8に組成を示す濃縮ゲル

溶液をプレート上端まで重層し、サンプルコーム（12検体用）を上部に差し込み、25℃で

表4-6 サンプルバッファーの組成 (ml)

0.5M Tris-HCl (pH6.8)	1.25
Glycerol	1.00
10% Sodium dodecylsulfate	2.00
2-Mercaptethanol	0.50
0.1% Bromophenol blue	0.25
Distilled water	5.00

表4-7 分離ゲル（15%）の組成 (ml)

30% Acrylamide*	10.0
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	5.0
10% Sodium dodecylsulfate	0.2
10% Ammonium persulfate	0.2
TEMED**	0.008
Distilled water	4.6

\* 29g acrylamide+ 1g N, N' methylene bisacrylamide /100ml distilled water  
 \*\* N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

表4-8 濃縮ゲル（3%）の組成 (ml)

30% Acrylamide*	1.0
1.0M Tris-HCl (pH6.8)	0.75
10% Sodium dodecylsulfate	0.06
10% Ammonium persulfate	0.06
TEMED**	0.006
Distilled water	4.1

\* 29g acrylamide+ 1g N, N' methylene bisacrylamide /100ml distilled water  
 \*\* N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

表4-9 Tris-glycine緩衝液の組成 (g/l)

Tris*	3.0
Glycine	18.8
Sodium dodecylsulfate	1.0

\* tris (hydroxymethyl) aminomethane

表4-10 染色液の組成 (ml)

Methanol	50
Acetic acid	50
Coomassie brilliant blue R-250	0.5(g)
Distilled water	400

再び保持した。濃縮ゲルが完全に重合後、サンプルコームを静かに抜き取り泳動に使用した。泳動は、アトー製AE-6440により、濃縮ゲル中を18mAで染色液の先端が分離ゲル境界に達するまで泳動

し、続いて分離ゲル中を26mAで泳動を行った。泳動用緩衝液の組成を表4-9に示す。泳動後のゲルは、表4-10に示す染色液でゆるやかに振盪して1時間染色後、表4-11に示す脱色液でゆるやかな振盪と脱色液の交換を適宜繰り返して脱色を行った。

表4-11 脱色液の組成 (ml)

Methanol	150
Acetic acid	70
Distilled water	780

### (12) フェノール分解試験

被検菌株をL培地（必要に応じてカナマイシンを添加）に一白金耳量植菌し、L字管で一晩適温（*E. coli*: 37°C, *P. putida*: 30°C）で往復振盪培養を行った。この培養液1mlを100mlのL培地（必要に応じてカナマイシンを添加）またはフェノール（400mg/l）を含む同培地に植菌し、300ml容三角フラスコでOD<sub>600</sub>=2~3になるまで回転振盪培養（160rpm, 30°C）を行い、それぞれ非誘導菌体、誘導菌体とした。この菌体をフェノール（400mg/l）を含む無機塩培地へOD<sub>600</sub>=1になるよう懸濁し、回転振盪培養（160rpm, 30°C）にて分解試験を行った。経時的に培養液を採取し、直ちに60%硝酸を1滴加えて反応を停止させ、遠心分離（15,000 rpm, 10min）にて菌体を除去した後、培地中のフェノール及びカテコール濃度を第二章第二節の条件で高速液体クロマトグラフにて測定した。

### (13) フェノールヒドロキシラーゼ(PH)活性の測定

PH活性は、Fujitaらの方法<sup>29)</sup>に準じ、菌体の乾燥重量1mg、1時間当たりにフェノールから生産されるカテコール量（nmol/hr/mg cell）で評価した。即ち、L培地で一夜適温（*E. coli*: 37°C, *P. putida*: 30°C）で培養した菌体を集菌し、無機塩培地（表3-1）で洗浄後、フェノール（2.5mM）を含む100mlの無機塩培地にOD<sub>600</sub>=2.0となるように菌体を懸濁した。懸濁液を30°C、160rpmで振盪培養し、菌体とフェノールを反応させた。1時間後、培養液を遠心分離し、上清1.5mlを採取し、等量のカテコール2,3-オキシゲナーゼ（C230）粗酵素液を加え、フェノールより生成したカテコールを更に2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド（2-HMS）に変換した。この2-HMS濃度を本物質の吸収極大波長375nmの吸光度によって測定し、これをカテコール濃度に換算した。

なお、DNAの操作法は、基本的にSambrookらの成書<sup>20)</sup>に準じ、コスミドクローニングは矢野らの研究報告<sup>20)</sup>を参考に行った。

### 第3節 実験結果並びに考察

#### 第1項 フェノール分解遺伝子のコスミドクローニング

コスミドクローニングに用いる適切なサイズのBH株の染色体DNA断片を得るために、コスミドベクターpVK100中に唯一のクローニングサイトを持つ数種の制限酵素で染色体DNAを消化したところ、図4-2の泳動写真に示すとおり制限酵素SaIIがBH株の染色体DNAを良好に消化できることがわかった。そこで、まず、この酵素を用い、ファージ粒子に取り込み可能なDNAサイズである15kb~30kbのDNA断片が多量に生成するように消化条件を決定した。その結果、20 $\mu$ lの反応液中で、DNA濃度90ng/ $\mu$ l、酵素量0.2~0.7unitとし、37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた時、目的サイズのDNA断片が多く得られることがわかった。この条件を基本に、得られるDNA断片に多様性を持たせるため、酵素量や消化DNA量を種々変えた条件も加えて、BH染色体DNAを消化し、電気泳動後、15kb~30kbの画分を含むゲル部分を無菌カッター刃で切り出し、電気泳動溶出法によってDNA断片を回収した。その結果、図4-3に示すとおり目的サイズのDNAサンプルが得られ、その収量は最終的に1.78 $\mu$ gとなった(回収率2.2%)。

このDNAサンプルとあらかじめSaIIで消化したpVK100をライゲーションし、その500ngを用いて形質導入を行ったところ、約20,000株のコロニーがカナマイシンを含む選択培地上に出現した。組換え株を任意に選択してプラスミドの

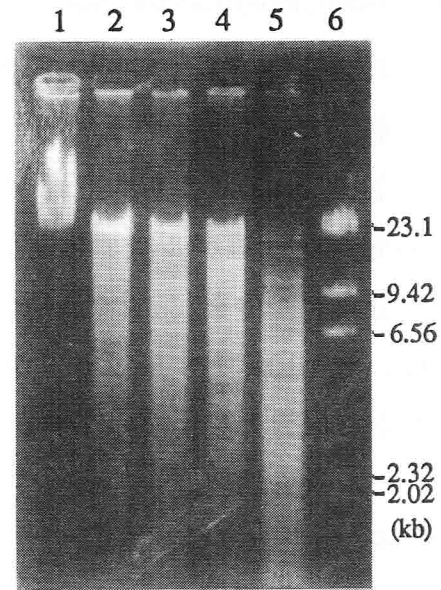


図4-2 各種制限酵素による*P. putida* BH株染色体DNAの消化

*P. putida* BH株染色体DNAの1:未消化物, 2: *Hind*III消化物, 3: *Eco*RI消化物, 4: *Xho*I消化物, 5: *Sa*II消化物, 6:  $\lambda$ DNA *Hind*III消化物

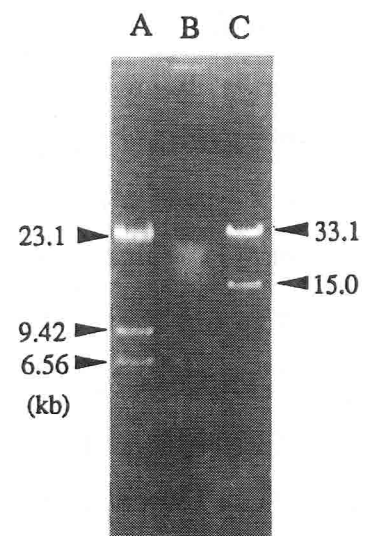


図4-3 回収したDNA断片の電気泳動写真

A:  $\lambda$ DNA *Hind*III 消化物  
B: 回収DNA断片  
C:  $\lambda$ DNA *Xho*I 消化物

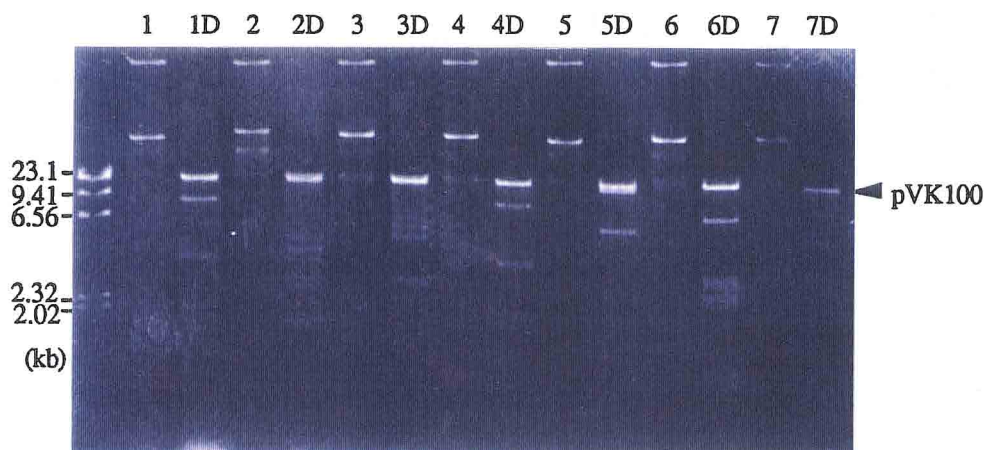


図4-4 組換え体から抽出したプラスミドとそのSaII消化物

1~7は未消化サンプルで、Dは各サンプルのSaII消化物を示している。

抽出を行い、制限酵素分析したところ、図4-4に示すとおり、分析した株のほとんどに挿入断片が認められた。挿入断片のサイズを平均20kb、挿入率を低く見積もって80%、*Pseudomonas*属細菌の染色体サイズを4000kbと仮定すれば、目的の遺伝子がこのライブラリーに含まれる確率はほぼ100% (>99.9%)と推定される<sup>27,28)</sup>。

次に、この20,000株のうち任意に2,300株をフェノール (400mg/l) を含むL寒天培地にレプリカし、培養したところ、このうちの7株のコロニーが培地上で褐色または黄蛍光色を呈した (図4-5)。この呈色は、これまでトルエン等の芳香族化合物分解遺伝子のクローニングの際にも報告されており<sup>29,30)</sup>、ベンゼン環のメタ開裂経路の中間代謝物の生成によるものと推定される。即ち、フェノールは、クローニングされた遺伝子にコードされたフ

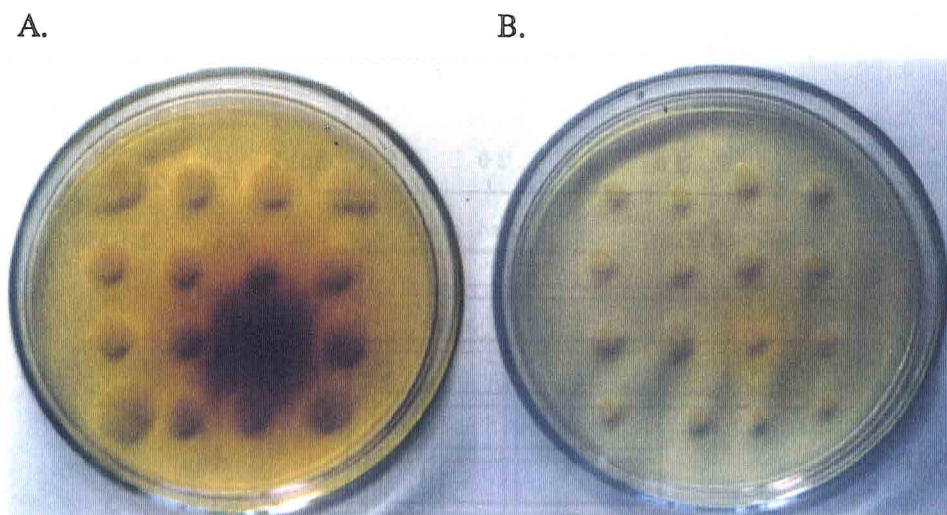


図4-5 フェノールを含むL寒天培地上で呈色する組換え体

A. カテコールの蓄積が推定される組換え体

B. 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの蓄積が推定される組換え体

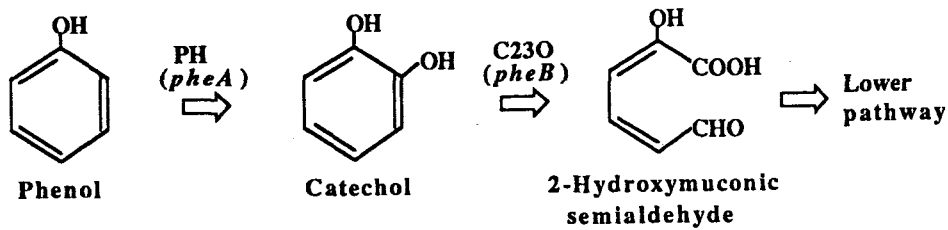


図4-6 推定される *Pseudomonas putida* BH株のフェノール分解経路

PH: フェノールヒドロキシラーゼ, C23O: カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ  
括弧内は、対応する遺伝子を示している。

フェノールヒドロキシラーゼ (PH) によりカテコールへ酸化され、これが更にカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ (C23O) の作用で2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドに変換されたと考えられる (図4-6)。褐色は、生じたカテコールの空気酸化による呈色で、一方、黄蛍光色は2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの生成が原因と考えられる。ここで、PHをコードした遺伝子を *pheA*、C23O をコードした遺伝子を *pheB* と命名した。

これらの組換え株のカテコール生成を確認するために、フェノールを含むL培地で培養した培養液1mlにフロログルシノール溶液2mlを添加して、反応させたところ、いずれも緑色に呈色しカテコールを検知することができた。

これら7株の組換え体からプラスミドを抽出し、制限酵素で分析して *Sa*Iの制限酵素地図を作製したところ、図4-7に示すとおり5種の異なる挿入断片を確認できた (pS04-92と pS18-93及びpS23-97と pS03-43は同一の挿入断片を持っていた)。これらの組換えコスミドを有するクローンのうち、pS04-92 (pS18-93) を有する組換え体のみが、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドを生成しなかった。この結果は、pS04-92に完全な *pheB* 遺伝子が含まれないことを示唆している。このような観察から、*pheA* 及び *pheB* を含むフェノール分解遺伝子群が図中の挿入断片の右寄りに存在すると予想し、図中の右側に最も大きな領域

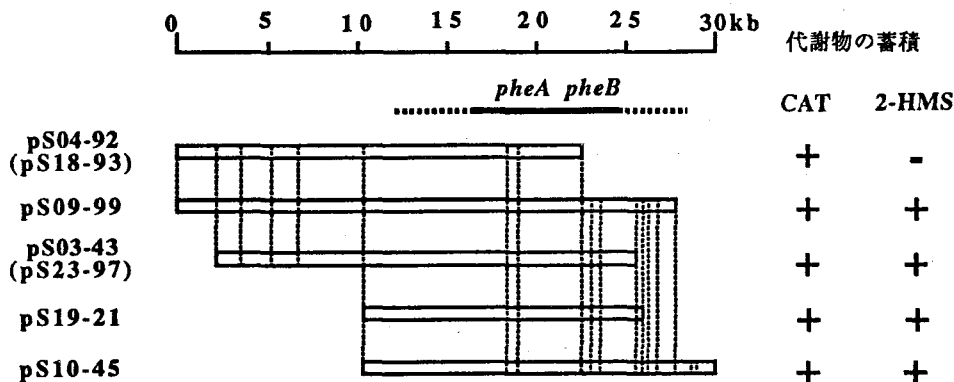


図4-7 組換えコスミドの *Sa*I制限酵素地図と推定される *pheA* 及び *pheB* 遺伝子位置

CAT: カテコール, 2-HMS: 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド, +: 蓄積あり, -: 蓄積なし

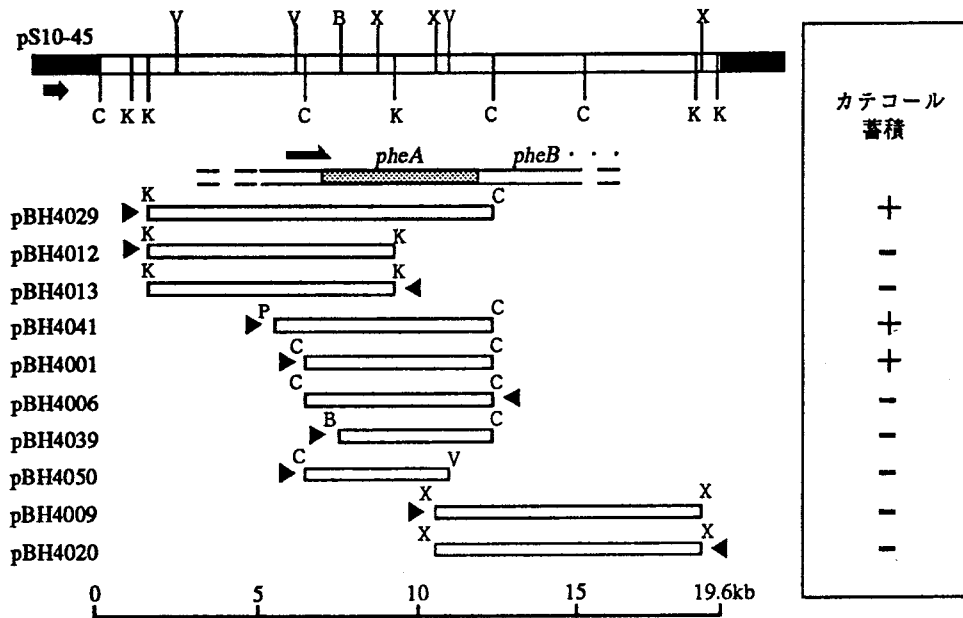


図4-8 pS10-45の制限酵素地図とフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子の推定位置

矢頭は、ベクターpUC19あるいはpUC18上の*lac*プロモーターの方向を示している。+：蓄積あり，-：蓄積なし，B：BamHI，C：SacI，K：KpnI，P：PstI，V：EcoRV，X：XhoI

域を持つpS10-45をさらなる分析に使用することとした。

サブクローニングと各種制限酵素による消化を繰り返してpS10-45の挿入断片分析を行った結果、図4-8に示す19.6kbの挿入断片の制限酵素地図を完成した。このサブクローニングの過程で構築した種々の組換えプラスミドを有する組換え体を、フェノールを含むL寒天培地上で増殖させ、その呈色を観察したところ、pBH4001、pBH4029、pBH4041を保持する大腸菌がカテコールを蓄積した。一方、pBH4039及びpBH4050を有する大腸菌はカテコールを蓄積しなかったことから、*pheA*遺伝子はpBH4001の6.1kbの挿入断片の広い領域に渡ってコードされていることが推察された。また、同一断片をベクター配列に対し逆方向に持つpBH4006を有する大腸菌が、顕著なカテコール蓄積を示さなかったことから、pBH4001上の*pheA*遺伝子の発現はベクターの*lac*プロモーターによるものと考えられる。

## 第2項 フェノール分解遺伝子の発現

クローニングされたフェノール分解遺伝子の発現を調べるために、接合法によって、*Pseudomonas putida* KT2440へpS04-92及びpS10-45の導入を試みた。受容菌として使用したKT2440株は、安息香酸をベンゼン環のオルソ開裂経路で資化することができるため、この経路にフェノールをカテコールへ酸化する遺伝子、即ち*pheA*遺伝子を導入すれば、組換え株はフェノールを完全に資化できるようになると予想される(図4-9)。接合によるpS04-92及びpS10-45の導入により、カナマイシンを含むフェノール寒天培地にそれぞれ $2.0 \times 10^3$ 、 $1.3 \times 10^3$ /受容菌の頻度でコロニーが出現した。接合株から抽出したプラスミド



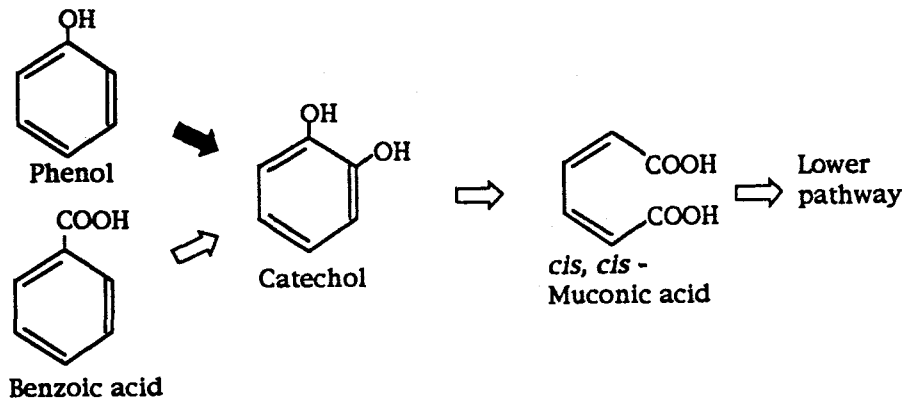


図4-9 遺伝子組換えによる *Pseudomonas putida* 2440株のフェノールの代謝

⇨ *P. putida* KT2440株の安息香酸代謝経路,  
 ➡ 導入する *pheA*遺伝子にコードされたフェノール代謝経路

を、制限酵素で分析した結果、その制限酵素消化プロファイルからpS04-92及びpS10-45が接合株に導入されていることが確認された。

次に、得られた接合株のうち *P. putida* KT2440 (pS10-45) を用いて親株 *P. putida* BH株とともにフェノール分解試験を行った。実験結果を図4-10に示す。フェノールで前培養し、十分に酵素系を誘導した菌株を用いて行った場合には、若干の分解速度に差は認められるが、接合株のKT2440 (pS10-45) は、親株のBH株と比べ遜色なく3時間程度で400mg/lのフェノールを分解した。また、この際、全くラグタイムが認められなかった。

一方、非誘導菌体を用いた場合、接合株も親株同様1~2時間のラグタイムの後、5時間程度でフェノールを完全に分解した。これらの結果は、pS10-45上に少なくともPH遺伝子が存在することを示唆し、親株以外の細菌中でも良好に発現することが明らかとなった。加えて、接合株においても、酵素誘導の制御が認められたことから、この組換えコスミド上にPHの発現を制御する機構が存在し、機能することが確認された。

しかしながら、同条件でpS10-45及びpS04-92を有する *E. coli* HB101を用いて分解試験を行ったが、有意なフェノールの減少は認められなかった。前節でのクローニングにおいて、これらコスミドを持つ *E. coli* がフェノールを含むL寒天培地上で、褐

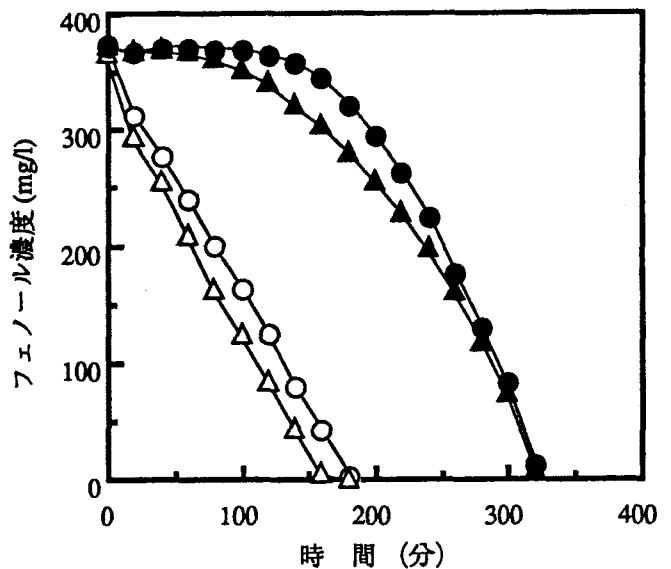


図4-10 接合株によるフェノールの分解

○ : *Pseudomonas putida* BH (フェノール誘導)  
 △ : *Pseudomonas putida* KT2440 (pS10-45) (フェノール誘導)  
 ● : *Pseudomonas putida* BH (非誘導)  
 ▲ : *Pseudomonas putida* KT2440 (pS10-45) (非誘導)

色あるいは黄蛍光色に呈色し、大腸菌での本遺伝子発現の指標となったが、おそらくその発現レベルは低く、フェノールの代謝物の生成量は極めて微量であったが、顕著な呈色のために発現が検知されたものと思われる。

### 第3項 フェノールヒドロキシラーゼ遺伝子 (*pheA*) の解析

#### (1) *pheA*遺伝子の塩基配列の解析

フェノール分解経路のキー酵素であり、TCE分解を触媒すると予想されるPHをコードした*pheA*遺伝子の詳細を明らかにするため、本遺伝子の塩基配列を解析することとした。まず、完全な*pheA*遺伝子を有するpBH4001及びpBH4006、更に、サブクローニングと必要に応じてデリベーションにより作製した種々のプラスミドを使用して、Dideoxy法<sup>30)</sup>により6.1kb *SacI*断片の全塩基配列を決定した (図4-11)。

決定された配列を解析したところ、その配列中には、*pheA1* (nt 746~1021)、*pheA2* (nt 1077~2069)、*pheA3* (nt 2076~2345)、*pheA4* (nt 2360~3910)、*pheA5* (nt 3981~4337) 及び*pheA6* (nt 4351~5409) の6つのオープンリーディングフレーム (ORF) が認められた。各ORFの直前には、nt 742~746、nt 1057~1064、nt 2065~2068、nt 2347~2352、nt 3964~3972及びnt 4339~4343にかけて、*E. coli*及び*P. aeruginosa*の16S rRNAの3'末端と相補性をもつリボゾーム結合部位 (RBS)<sup>31)</sup>が認められ、また、最初のORFの上流には、nt 701~714にかけて、 $\sigma^{54}$ タイプのRNAポリメラーゼが結合するプロモーター配列 (-24/-12プロモーター)<sup>32)</sup>が認められた。これらのORFは、それぞれ10.6kDa、38.3kDa、10.5kDa、60.5kDa、13.2kDa及び38.5kDaの蛋白質をコードすると計算された。以上の結果から、*P. putida* BH株由来の*pheA*遺伝子は、6つの蛋白成分からなるマルチコンポーネントの酵素をコードすると推定した。

次に、決定された*pheA*遺伝子の塩基配列を、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)等のデータベースに登録されているDNA配列に対してホモロジー検索を行ったところ、*Pseudomonas* sp.CF600株由来のマルチコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子*dmp*遺伝子<sup>33)</sup>と非常に高いホモロジーがあることがわかった。また、*pheA*遺伝子の配列をDDBJに登録後、再度ホモロジー検索を行ったところ、新たに本遺伝子とホモロジーをもつ、*P. putida*の*phh*遺伝子、*phl*遺伝子、*Acinetobacter calcoaceticus*のフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子 (名称が付けられていないため、ここでは*acp*遺伝子とする) が登録されていることがわかった (表4-12)<sup>34)</sup>。本遺伝子と*dmp*遺伝子、*phh*遺伝子及び*phl*遺伝子の各遺伝子間には高いホモロジーが認められ、特にCF600株由来の*dmp*遺伝子との間に至っては、決定した6112bpにおいてわずか1bpしか相違がみられず (図4-11, nt 5026, *phe*: A, *dmp*: G)、100%

GAGCTCGGTGGGGCGGACCTTGACCAGACCCCTTGAGTGAATGCATCTGCGGCCAGCGAGGAACATGCCGACTTCGCTGG 80  
 SacI /

CATTCGGTCTCAGCTTCCTGGCCAGTTCGGCATCCTTCAGGCCGACTGGTAACCATGGCGCAGGAACAAGCCCTTGGCG 160

CGTTCGATGCCAGGGTATTGACCATTTCCCGGCGAAAGCTGGCCATCGCTGAAAACATGCAGCAACAGCATGCGCTGTTC 240

GCCAAGCCAGATCTTGCCTTCCATGCTCTGGAAGTGGATCAGGTTGGTCAGGTCCTTGAATCGGAGTGTGGATTTACG 320

GCTTGTACTTGATCGGCATGTAAGCGAGGCCCTATTTATTTTTAGATGGGGAAAATCAGGGTCGCCGCTATAGCGCAAG 400

GCAGCGGGCATTCCAGATGGGGTCATGGGAAAATCGGCAGTTTTTTTACCTGCGCCAGCTCCCCATAGCCAGCCTCAG 480

TATCTGGCAAAGTCAACCAATGATCAATCGACGGCAGTGATTTAGTATTAGAGATCAGCGTTCAGCTGCGCCATAAG 560

CATTGCTCAAGCGGCCTTGGGCAATTGATCAAATGCTTAAAAAGTCTGCGCAAGCGGGCTTAATTCGCTCGCTCCGA 640  
 TCATTCTAAAAATTAGAAACACATTGAAAAACAATACCTTGAAGTCTGTTTTCAGACCTTGGCACAGCCGTTGCTTGATG 720

TCCTGCGCAAGCCGCAACCTGGAGATGACCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCTCACTCGTTACATCC 800  
 pheA1--> M T V T N T P T P T F D Q L T R Y I

GTGTGCGCAGCGAACCAGAAGCCAAGTTCGTGAGTTCGATTTCCGCATTGGTCATCCGGAGCTGTTGCTGAGTTGGTG 880  
 R V R S E P E A K F V E F D F A I G H P E L F V E L V

CTGCCGCAAGACGCCCTTCGTGAAGTTTTGCCAGCACACCAGCGTGGTGGCAATGGACGAAGCGATGGCCAAGCGGTGGA 960  
 L P Q D A F V K F C Q H N R V V A M D E A M A K A V D

CGACGACATGGTCAAGTGGCGCTTCGGCGATGTCGGTCGCCGCTTGCCGAAAGACCCGGGCTGAGAACCCTGCCGACAGG 1040  
 D D M V K W R F G D V G R R L P K D P G

CAGATGGGCATCCAACAACAAGAGGGTACGGTTGATATGAGCGTAGAGATAAAGACCAATACGGTGGATCCGATCCGCCA 1120  
 pheA2--> M S V E I K T N T V D P I R Q

GACCTACGGCAACCTGCAACGGCGCTTCGGCGACAAGCCGGCTAGCCGTTATCAGGAAGCCAGCTACGACATCGAAGCGG 1200  
 T Y G N L Q R R F G D K P A S R Y Q E A S Y D I E A

TCACCAACTTTCATCTCGCCCGCTGTGGGACCCGCAGCAGAGCTGCACGATCCGACCCGCAGGGCATCCGCATGACC 1280  
 V T N F H Y R P L W D P Q H E L H D P T R T A I R M T

GATTGGCACAAGGTCACCGACCCCGCCAATTCTACTACGGCGCTATGTGCAGACCCGCGCGGATGCAGGAAGCCAC 1360  
 D W H K V T D P R Q F Y Y G A Y V Q T R A R M Q E A T

CGAACACGCCTATGGCTTCTGCGAAAAGCGTGAGCTGCTGAGCCGCTGCGCCGAGTTGCAGGCCAAGCTGCTGCGCT 1440  
 E H A Y G F C E K R E L L S R L P A E L Q A K L L R

GCCTGGTGGCGCTGCGGCATGCCGAGCTGGGCGCCAACATGAATAACAGCAGCATCGCCGGCGACAGCATCGCCGCCACC 1520  
 C L V P L R H A E L G A N M N N S S I A G D S I A A T

GTGACCCAGATGCACATCTACCAGGCGATGGACCGCTGGGCATGGGCCAGTACCTCTCGGCATCGGCCTGCTGCTCGA 1600  
 V T Q M H I Y Q A M D R L G M G Q Y L S R I G L L L D

TGGCGGCACCGCGAGGCGTTGGATCAAGCCAAGGCCTATTGGCTCGACGACCCGATCTGGCAGGCGCTGCTGCTGCTACG 1680  
 G G T G E A L D Q A K A Y W L D D P I W Q G L R R Y

TCGAAGACAGCTTCGTGATCCGCGACTGGTTCGAGTTGGGCTGGCGCAGAACCTGGTCTGACGGCTTGTGTCAGCCG 1760  
 V E D S F V I R D W F E L G L A Q N L V L D G L L Q P

CTGATGTACCAGCGCTTCGACCAATGGCTCACAGAGAACGGTGGCAGCGATGTGGCCATGCTCACCGAGTTCATGCGCGA 1840  
 L M Y Q R F D Q W L T E N G G S D V A M L T E F M R D

CTGGTACGGCGAAAGCACGCGCTGGGTCGACGCCATGTTCAAGACCGTCTTGCCGAAAATGACGCTAACCGTGAGCAGG 1920  
 W Y G E S T R W V D A M F K T V L A E N D A N R E Q

TGCAGGCCCTGGCTGGAGGCTGCGGAGCCGCTGCCTACGAGGCATGTTGCCCTGGCCGAGGAAGCCACCGGTATCGCC 2000  
 V Q A W L E V W E P R A Y E A L L P L A E E A T G I A

GCGCTGGATGAAGTCCGACGCGCTTCGCTACTCGCTGCAGAAAATCGGCCTGAAAAGCCGCGAGGAATAAAGCATGTC 2080  
 A L D E V R S A F A T R L Q K I G L K S R E E M S  
 pheA3-->

図4-11 *Pseudomonas putida* BH株のフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子の塩基配列

下線は推定のリボソーム結合部位を示し、二重下線は推定の-12/-24プロモーター配列を示す。  
 矢印は、inverted repeatを示す。

ATCACTCGTCTACATCGCCTTCCAGGATAACGACAACGCGCGTTACGTGGTGAAGCGATCATCCAGGACAACCCACG 2160  
 S L V Y I A F Q D N D N A R Y V V E A I I Q D N P H  
 CCGTCGTCCAGCACCACCCGGCGATGATCCGTATCGAGGCCGAGAAGCGCCTGGAGATCCGCAGGAAACCGTGAAGAG 2240  
 A V V Q H H P A M I R I E A E K R L E I R R E T V E E  
 AACCTCGGCCGCGCCTGGGACGTCCAGGAAATGCTGGTGGACGTAATCACCATCGGCGGCAACGTCGACGAGGACGATGA 2320  
 N L G R A W D V Q E M L V D V I T I G G N V D E D D D  
 CCGCTTCGTCTCGAGTGAAGAAGTAGGAGACAAGCTCATGGCTACCCACAACAAGAAACGCTCAACCTGAAAGACAA 2400  
 R F V L E W K N pheA4--> M A T H N K K R L N L K D K  
 ATACCGCTACCTGACCCGCGATCTGGCCTGGGAAACGACCTACCAGAAGAAGAAGACGTGTCCCGCTGGAGCACTTCG 2480  
 Y R Y L T R D L A W E T T Y Q K K E D V F P L E H F  
 AGGGCATCAAGATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGACCATGGACACCTACTGGAATACCAGGCG 2560  
 E G I K I T D W D K W E D P F R L T M D T Y W K Y Q A  
 GAGAAAGAGAAGAAGCTCTACGCGATCTTCGACGCTTTGCCAGAACAATGGTCATCAGAACATTTCCGATGCGCGCTA 2640  
 E K E K K L Y A I F D A F A Q N N G H Q N I S D A R Y  
 CGTCAACGCCCTGAAGCTGTTCTCACCGCGTTTACCAGCTGGAATACCAGGCCTTCCAGGGCTTCTCGCGGGTGGCC 2720  
 V N A L K L F L T A V S P L E Y Q A F Q G F S R V G  
 GGCAGTTCAGTGGCGCGGTGCGCGGTGCGCTGTGAGATGCAGGCGATCGACGAGCTGCGCCATGTGCAGACGCAAGTC 2800  
 R Q F S G A G A R V A C Q M Q A I D E L R H V Q T Q V  
 CACGCCATGAGCCATTACAACAAGCACTTCGATGGTTTGCATGACTTCGCCCACATGTACGACCGGGTCTGGTACCTCTC 2880  
 H A M S H Y N K H F D G L H D F A H M Y D R V W Y L S  
 GGTACCCAAGTCTATATGACGATGCGCGGACCGCGGTCCGTTTCGAGTTCCTCACCGCGTCTCGTTCTCTTCGAGT 2960  
 V P K S Y M D D A R T A G P F E F L T A V S F S F E  
 ACGTGCTGACCAACCTGTTGTTTCGTACCCTTCATGTCCGGTGGCCCTACAACGGCGATATGGCCACGGTACCTTCGGT 3040  
 Y V L T N L L F V P F M S G A A Y N G D M A T V T F G  
 TTCTCCGCGCAGTCCGACGAGGCGCGGCACATGACCCTGGGTCTGGAAGTATCAAGTTCATGCTCGAACAGCATGAAGA 3120  
 F S A Q S D E A R H M T L G L E V I K F M L E Q H E D  
 CAACGTGCCATCATCCAGCGTGGATCGATAAGTGGTCTGGCGCGTTACCGCTGCTGACCCTGATCGGCATGATGA 3200  
 N V P I I Q R W I D K W F W R G Y R L L T L I G M M  
 TGGACTACATGCTGCCGAACAAAGTATGTCCTGGTCTGAGGCTGGGGGTCTACTTCGAGCAGGCCGGTGGCGCGCTG 3280  
 M D Y M L P N K V M S W S E A W G V Y F E Q A G G A L  
 TTCAAGGATCTGGAGCGCTATGGCATCCGGCCGCGAAATACGTCGAGCAGACCACCATCGGCAAGGAGCACATCACCCA 3360  
 F K D L E R Y G I R P P K Y V E Q T T I G K E H I T H  
 CCAGGTGTGGGGGCTTATATCAATACAGCAAGGCCACCAGCTTCCATACCTGGATACCCGGCGACGAGGAAGTGAAGT 3440  
 Q V W G A L Y Q Y S K A T S F H T W I P G D E E L N  
 GGCTGTCCGAGAAATACCCGGACACCTTCGACAAATACTACCGCCCGCGCTTCGAGTTCTGGCGTGAGCAGCAGGCCAAG 3520  
 W L S E K Y P D T F D K Y Y R P R F E F W R E Q Q A K  
 GGTGAGCGCTTCTACAACGACACCCTGCCGACCTCTGCCAGGTGTGCCAGTTACCGGTGATTTTACCAGCCGGACGA 3600  
 G E R F Y N D T L P H L C Q V C Q L P V I F T E P D D  
 TCCGACCAAGCTCAGCTGCGCAGCCTGGTGCAGGAGGGGAGCGCTATCAATTCGCTCGGATGGCTGCTGCGACATCT 3680  
 P T K L S L R S L V H E G E R Y Q F C S D G C C D I  
 TCAAGAACGAGCCGGTGAAGTACATCCAGGCCTGGCTGCCGGTGCACCAGATCTACCAGGGCAACTGCGAAGGCGGGGAT 3760  
 F K N E P V K Y I Q A W L P V H Q I Y Q G N C E G G D  
 GTCGAAACGGTGGTGCAGAAGTACTACCACATCAAAAGCGCGTGGACAATTTGGAGTACCTGGGCTCGCCCGAGCACCA 3840  
 V E T V V Q K Y Y H I K S G V D N L E Y L G S P E H Q  
 GCGCTGGCTGGCCCTGAAAGGTTCAGACCCACCAACTGCCGCCCGCGGACAAGAGCCTGGGCGCCGCTGAGGCAGCG 3920  
 R W L A L K G Q T P P T A A P A D K S L G A A  
 CCAGCCGCTCAGGGTGAAGCACCGCCCTGAGCCATTCCAAGAACAAGAGGTTTCGATCATGACTGCAACTCAATCGG 4000  
pheA5--> M T V N S I G  
 CGAATACACCGCCACGCCACGGATGTGCAGGCCAACTTCAACGGCATGCAACTGCTCTACTCTACTGGGAAGAGCACC 4080  
 E Y T A T P R D V Q A N F N G M Q L L Y L Y W E E H  
 TGATGTACTGCTCCGCGCTCGGTTCTTGGTAGCCCCGGCATGCCCTTTGCCGAGTTCCTCGAGCAGGTGCTCAAGCCC 4160  
 L M Y C S A L A F L V A P G M P F A E F L E Q V L K P  
 GCGATCCACGCCATCCGGACAGCGCAAGATCGATTTAGCCAGGCGCTCTGGCAGCTGAACGACCAGCCGTTACCCCC 4240  
 A I H A H P D S A K I D F S Q A L W Q L N D Q P F T P

図4-11 -続き-

GGACTACGCCCGCCAGCCTGGAAGCCAACGGCATCGACCACAAAAGCATGCTGCGTCTGAACACCCCGGGCCTGAACGGCA 4320  
D Y A A S L E A N G I D H K S M L R L N T P G L N G  
TCCAGGGTTTCGTGCAGCTGAGAGGTGTGCATGAGTTACAACGTACCATTGAACCGACCGGCGAAGTGATCGAAGTGGA 4400  
I Q G S C S pheA6--> M S Y N V T I E P T G E V I E V E  
GGACGGCCAGACCATCCTCCAGGCCGCTCTGCGCCAGGGCGTCTGGCTGCCGTTCCGCTGCGGCCACGGCACCTGCGCCA 4480  
D G Q T I L Q A A L R Q G V W L P F A [C] G H [G] T [C] A  
Conserved amino acids in ferredoxin  
CCTGCAAGGTGCAGGTGGTGCAGGGCGAAGTGGATATCGGCGAAGCCTCGCCGTTCCGCTGATGGACATCGAGCGCGAC 4560  
T [C] K V Q V V E [G] E V D I G E A S P F A L M D I E R D  
GAGCGCAAGGTGCTGGCCTGCTGCGCCATTCCGCTGTCCGACCTGGTGATCGAAGCCGACGTCGATGCCACCCGGACTT 4640  
E R K V L A [C] C A I P L S D L V I E A D V D A D P D F  
CCTCGGCCATCCGGTGGAGGATTACCGGGGGTGGTTCAGCGCCTGGTTGACCTGTGCGCGACCATCAAGGGCCTGCACA 4720  
L G H P V E D Y R G V V S A L V D L S P T I K G L H  
TCAAGTGGATCGGCCATGCCGTTCCAGGCCGGCAGTACGTCAACCTGGCATTGCCGGGCATCGACGGCACCCCGCGCC 4800  
I K L D R P M P [F Q A G Q Y V N L A L P G I D G T R A]  
FAD-binding site  
TTCTCGCTGGCCAACCCCGCGAGCCGAACGACGAAGTTCGAGTTGCACGTGCGCCTGGTCCGAGGGCGGTGCGGCCACCGG 4880  
[F S L A N] P P S R N D E V E L H V R L V E G G A A T G  
CTTTATCCACAAGCAACTGAAAGTCGCGCAGCGGTGGAGCTGTCCGGCCTTATGGGCAGTTCTTCGTGCGCGATTCCG 4960  
F I H K Q L K V G D A V E L S G P Y G Q F F V R D S  
AGGCCGGCGACCTGATCTTCATCGCCGGCGGCTCGGGCTTATCGAGCCCGCAGTCGATGATCCTCAATCTGCTGAACGC 5040  
Q A G D L I [F I A G G S G L S S P Q S M I L N L L E R]  
NAD-binding site  
GGCGATACGGCGGATCACCTGTTCAGGGCGCGCAACCCGCGGAGCTGTACAACCTGCGAACTGTTTCGAGGAAC 5120  
[G D T R R I T L F Q G A R N R A E L] Y N C E L F E E L  
GGCCGCGGCCACCCCAACTTACGTTACGTGCCGGCACTCAACCAGGCCAACGACGATCCCGAATGGCAGGGTTTCAAGG 5200  
A A R H P N F S Y V P A L N Q A N D D P E W Q G F K  
GCTTCGTCCACGACGCCGCAAGGCGCATTTCGACGGCCGCTTCGGCGGGCAGAAAGCCTACCTGTGCGGCCACCCGCCG 5280  
G F V H D A A K A H F D G R F G G Q K A Y L C G P P P  
ATGATCGACGCGCCATCACCACTGATGCAAGGTGCTGTTGTCGAGCGGACATCTTTATGGAGCGCTTCTACACCGC 5360  
M I D A A I T T L M Q G R L F E R D I F M E R F Y T A  
CGCCGATGGGGCCGGCAGAGCAGCCGTTCCGCGCCTGTTCAAGCGCATCTGAGGTGAACCATGAACCGTGCCGGTTATGA 5440  
A D G A G E S S R S A L F K R I  
GATTCGCGAAACGGTCAGCGGCCAGACGTTCCGTTGCCGCGCCGACAGTCCGGTGTCTCAGTGGATGGAGCAACAGGGCA 5520  
AGCGCTGCGTGCCAGTCGGTTGCCGCGGGCGGCTGCGGCTGTGCAAGGTGCGGCTGCTGAGCGGCACCTACCAGTGC 5600  
CACAAGATGAGTTGCAACCATGTGCCGCCGAGGCGGCCAAGCAGGGCCTGGCCCTGGCCTGCCAACTGTTTCCCAGAC 5680  
TGACCTGAACATCGAATGCCTGCGCCGCAAGGCCCGGGCGACCACAACAAGAACCAGCAAGAGGTGTCGTCATGAA 5760  
AAAAGGCGTAATGCGCCCCGGTTCAGTCCAGCTTCGCGTACTGAACCTGGAGAGCGCCCTGGCCCACTACCAGGACCTGC 5840  
TCGGTCTGATCGAAATGGACCGGACGAGCAAGGGCGGCTTACCTGAAGGCTGGACCGAGGTCGACAAATCTCCGTG 5920  
GTGCTGCGGAGGCCGATCAACCGGCATGGATTCATGGGCTTCAAGGTGATCGACGAGGACTGCCTGAACCGCCTGAC 6000  
CCAGGATCTGCTCAATTATGGCTGCCGATCGAAACCATCCCCCGGTTGAACCTCAAGGTTGCGGTCGGCGGGTGCCTT 6080  
TCCAGACGCCGTCGGGACACTTTTTTCGAGCTC 6112  
SacI /

図4-11 -続き-

表4-12 マルチコンポーネントフェノールヒドロキシラーゼ間の  
アミノ酸配列の相同性

遺伝子	ヌクレオチド 数	アミノ酸 数	推定分子量 (KDa)	PheA1~PheA6 各コンポーネント に対する相同性 (%)
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 <sup>a</sup>				
<i>dmpK</i>	276 (746-1021)	92	10.6	100.0
<i>dmpL</i>	993 (1077-2069)	331	38.3	100.0
<i>dmpM</i>	270 (2076-2345)	90	10.5	100.0
<i>dmpN</i>	1551 (2360-3910)	517	60.5	100.0
<i>dmpO</i>	357 (3981-4337)	119	13.2	100.0
<i>dmpP</i>	1059 (4351-5409)	353	38.5	99.7
<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> P35X <sup>b</sup>				
<i>phhK</i>	276 (655-930)	92	10.6	96.7
<i>phhL</i>	993 (986-1978)	331	38.2	99.7
<i>phhM</i>	270 (1985-2254)	90	10.5	97.8
<i>phhN</i>	1548 (2269-3816)	516	60.3	96.5
<i>phhO</i>	357 (3887-4243)	119	13.2	98.3
<i>phhP</i>	1059 (4257-5315)	353	38.6	88.7
<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> strain H <sup>c</sup>				
<i>phlK</i>	276 (244-519)	92	10.6	95.7
<i>phlL</i>	1026 (542-1567)	342	39.3	99.4
<i>phlM</i>	273 (1574-1846)	91	10.7	96.7
<i>phlN</i>	1548 (1861-3408)	516	60.4	96.1
<i>phlO</i>	357 (3479-3835)	119	13.2	98.3
<i>phlP</i>	1059 (3849-4907)	353	38.5	88.7
<i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i> NCIB8250 <sup>d</sup>				
ORF1	288 (139-4260)	96	11.3	96.7
ORF2	999 (448-1446)	333	38.4	99.7
ORF3	267 (1462-1728)	89	10.1	97.8
ORF4	1533 (1789-3321)	511	60.3	96.5
ORF5	360 (3418-3777)	120	13.8	98.3
ORF6	1050 (3792-4841)	350	39.0	88.7

Accession number : a ; M60276, b; X79063, c ; X80765, d ; Z36909

近いホモロジーがあった。BH株は大阪の排水処理施設から得た活性汚泥を馴養して分離した株であり<sup>10)</sup>、また、CF600株はイギリスのコークス炉廃液処理プラントの活性汚泥から分離された株である<sup>35)</sup>。両者が地理的に離れた地点から分離された株であることから、両遺伝子が近代になって発生したものであればその相同性は驚異的と考えられる。更に、*phh*遺伝子はシンガポールで、*phl*遺伝子及び*acp*遺伝子はドイツで分離された遺伝子であり、本遺伝子が大きな変異を受けずに世界中に広範囲に渡って分布していることが明らかとなった。

これに対して、現在までに、*Pseudomonas* sp. EST1001<sup>36)</sup>、*P. pickettii* PKO1<sup>37)</sup>、*Trichosporon cutaneum*<sup>38)</sup>由来のシングルコンポーネントのPH遺伝子が報告されているが、これらと*pheA*遺伝子の塩基配列には、顕著なホモロジーは認められなかった。

更に、*pheA1*~*pheA6*にコードされると推定される各蛋白のアミノ酸配列を基に、ホモロジー検索を行ったところ、*P. mendocina* KR1のトルエン 4-モノオキシゲナーゼ<sup>9,10</sup>、*P. pickettii* PKO1のトルエン 3-モノオキシゲナーゼ<sup>39</sup>及び*Methylococcus capsulatus* (Bath)<sup>40~42</sup>あるいは*Methylosinus trichosporium* OB3b<sup>1~3</sup>のメタンモノオキシゲナーゼ等のマルチコンポーネントモノオキシゲナーゼ類との相同性が示唆された。検索結果から、これらのオキシゲナーゼ類との各蛋白成分間の機能上の関係を図4-12にまとめた。一般に、マルチコンポーネントのオキシゲナーゼ類による芳香族化合物の酸化では、図4-13に示すように、NADHやNADPH等の電子供与体から、オキシドリダクターゼ及びフェレドキシンを経てオキシゲナーゼ成分へ電子が伝達され、この成分が基質を酸化することが明らかとなっている<sup>43</sup>。

分離した*pheA*遺伝子にコードされたPheA2及びPheA4は、トルエン4-モノオキシゲナーゼ及びメタンモノオキシゲナーゼのオキシゲナーゼ成分であるTmoE、TmoA及びMmoY、MmoXと明確なホモロジーが認められた。それ故、PheA2及びPheA4は、PHのオキシゲナーゼ成分と考えられる。また、PheA6は、トルエン4-モノオキシゲナーゼ及びメタンモノオキシゲナーゼのオキシドリダクターゼ成分であるTmoF及びMmoCと高いホモロジーがあり、この他にもキシレン<sup>44</sup>、安息香酸<sup>45</sup>のオキシゲナーゼの同一成分と高いホモロジーを有することがわかった。これらの配列には、N末端領域にクロロプラスタ

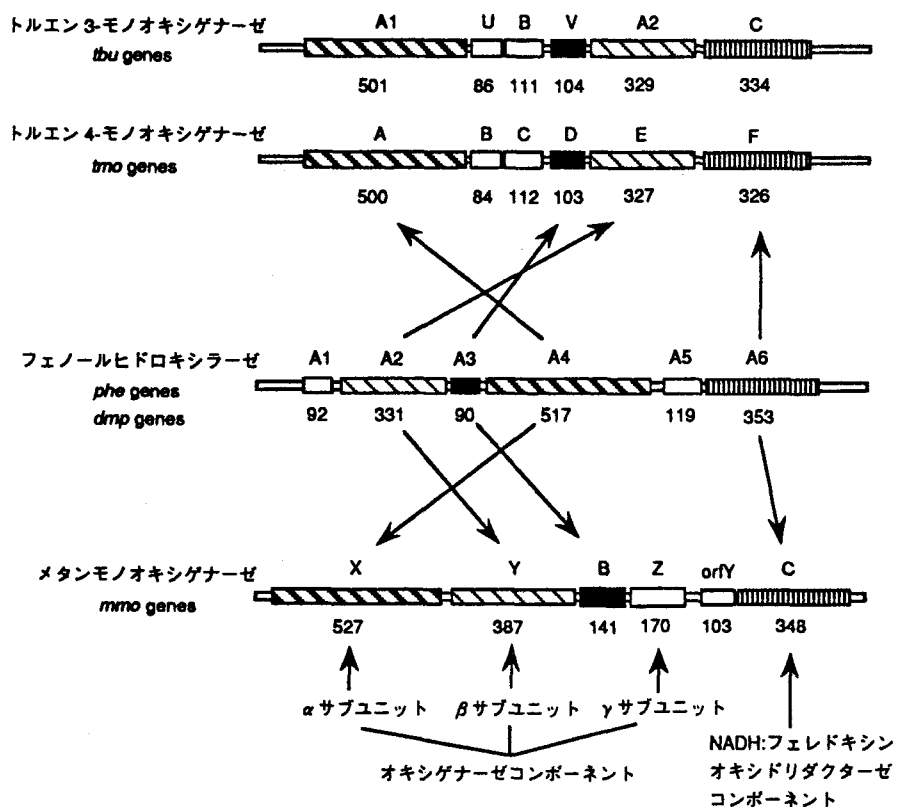


図4-12 フェノールヒドロキシラーゼとマルチコンポーネントオキシゲナーゼ類との機能上の関係

数字は、推定アミノ酸残基数

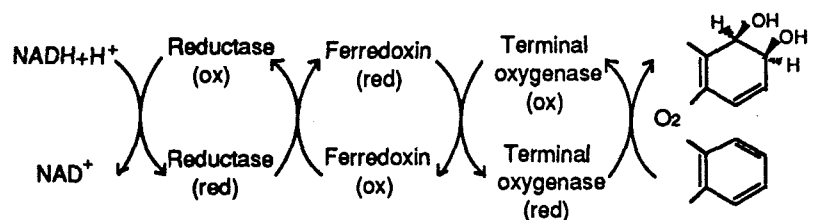


図4-13 マルチコンポーネント芳香族化合物オキシゲナーゼシステムの機構

RED:還元型, OX:酸化型

イブのフェレドキシン<sup>46,47)</sup>特有の4つのシステイン残基が保存され、C末端領域においてオキシドリダクターゼ特有の保存配列が認められた<sup>48)</sup>。また、FAD及びNAD結合部位とみられる領域も認められたことから<sup>41)</sup>、PheA6はフェノールヒドロキシラーゼにおけるオキシドリダクターゼ成分と考えられる。一方、PheA3とTmoD及びMmoBの間にも弱いホモロジーが認められたが、その機能の推定までは至っていない。

## (2) *pheA*遺伝子から生産される蛋白の分析

ここで得られた塩基配列より、*pheA*遺伝子が10.6kDa、38.3kDa、10.5kDa、60.5kDa、13.2kDa及び38.5kDaの6つの蛋白成分からなるマルチコンポーネントの酵素をコードしていると推定された。これを確認するために、推定分子サイズと一致する蛋白が組換え*E. coli*中で発現しているかどうかを調べることにした。まず、ここでは、図4-14に示した6.1kb *SacI*断片の制限酵素地図を基に、本酵素の各蛋白成分をコードした領域が、単独かつ完全に含まれる最小の制限酵素消化DNA断片を選択し、そのDNA断片をpUC18及びpUC19へサブクローニングした。その結果、*pheA1*~*pheA6*をそれぞれ単独で持つと考えられる組換えプラスミド、pYPB61、pYX131、pYK81、pYX181、pYBE81及びpYS141を得ることに成功した。これらのプラスミドは、ベクターの*lac*プロモーターの活性化方向と遺伝子の転写方向が一致するように、*lac*プロモーターの下流に各DNA断片が挿入されており、IPTGの添加による*lac*プロモーターの活性化により、各蛋白成分が効率良く発現できるように構築した。

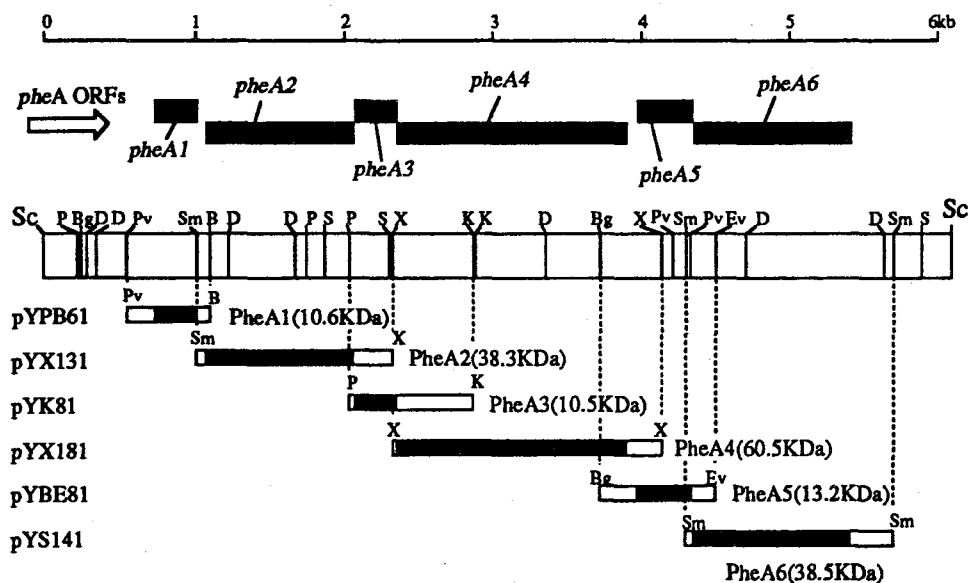


図4-14 *SacI*断片の制限酵素地図と各ORFを保持するプラスミドの挿入断片  
 B: *Bam*HI, Bg: *Bgl*II, D: *Dra*I, Ev: *Eco*RV, K: *Kpn*I, P: *Pst*I, Pv: *Pvu*II, S: *Sal*I, Sc: *Sac*I,  
 Sm: *Sma*I, X: *Xho*I



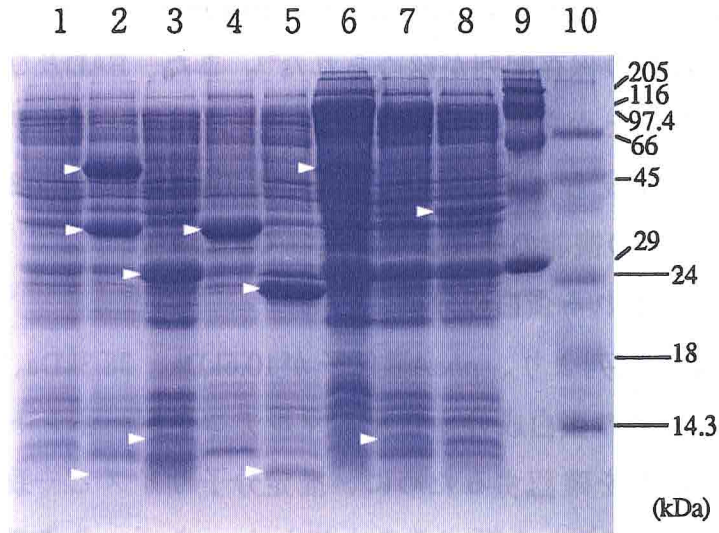


図4-15 組換え体の生産する蛋白のSDS-PAGE分析

1: *E. coli* JM109 (pUC19), 2: (pYS61[*pheA1~A6*]), 3: (pYPB61[*pheA1*]),  
 4: (pYX131[*pheA2*]), 5: (pYK81[*pheA3*]), 6: (pYX181[*pheA4*]), 7: (pYBE81  
 [*pheA5*]), 8: (pYS141[*pheA6*]), 9,10: Molecular size standards  
 矢頭は、コントロール (レーン1) に認められないバンドを示す。

次に、得られた組換えプラスミドを保持する*E. coli*から生産される蛋白を、SDS-PAGEにより解析した。その結果を図4-15に示す。*pheA*全体を含むpBH4001 (Lane2) を保持する*E. coli*のものは、コントロールとして泳動したpUC19 (Lane1) のみを保持する*E. coli*から調製したサンプルの泳動パターンとは、異なる特有のバンドが複数確認できた。これらのバンドはPHの各蛋白成分のものと考えられ、特に40kDa及び60kDa付近に強いバンドが認められた。同分子サイズの蛋白が、pYX131 (Lane4) 及びpYX181 (Lane6) を保持する*E. coli*からも強く発現していることが認められる。この両蛋白は、PHのオキシゲナーゼコンポーネントと推定したPheA2 (38.3kDa) 及びPheA4 (60.5kDa) の推定分子サイズとほぼ一致した。この結果、*pheA*遺伝子全体を含むpBH4001からは、主としてオキシゲナーゼコンポーネントが大量に生産されていることがわかった。pYPB61 (Lane3) 及びpYBE81 (Lane7) を保持する*E. coli*のものは、共に10kDa付近に、また、pYS141 (Lane8) を保持する*E. coli*のものは、40kDa付近にコントロールと異なるバンドを確認した。これらはPheA1 (10.6kDa)、PheA5 (13.2kDa) 及びPheA6 (38.5kDa) の推定分子サイズとほぼ一致した。一方、pYK81 (Lane5) を保持する*E. coli*は、PheA3 (10.5kDa) と考えられるバンド以外に、その2倍程度の分子サイズ (22kDa前後) の強いバンドを検出した。これは、目的の蛋白の二量体が検出されたものと考えられる。このような二量体形成を示す例は、トルエンモノオキシゲナーゼの蛋白分析の際にも認められており<sup>9)</sup>、この場合、二量体が検出された蛋白は、フェレドキシンコンポーネントであった。

本PHの各蛋白成分 (PheA1~PheA6) の推定分子サイズに近い分子サイズの蛋白が、それぞれ個別に異なる組換えプラスミドを保持する *E. coli* より生産されたことから、本酵素がこれまで推察した通りマルチコンポーネントの酵素であることが確定的となった。しかし、実際にSDS-PAGEにより検出された各蛋白成分が、*pheA* 遺伝子からの転写・翻訳物であることを証明するためには、続く課題として、各蛋白成分のN末端アミノ酸配列を決定し、その配列が推定アミノ酸配列と一致することを確認する必要がある。

#### 第4項 カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*pheB*) の解析

*pheB* 遺伝子の塩基配列の解析は、先に我々がクローニングした *pheB* 遺伝子を含む組換えプラスミド pBH500 を基に、これを分与した阪大・西原らのグループによって行われた。その結果、*Pseudomonas* sp. CF600 株のフェノール分解系遺伝子の C23O 遺伝子 (*dmpB*) とその塩基配列が 100% 同じであることが明らかとなっている<sup>49)</sup>。この遺伝子は、分子量 35,000 の蛋白をコードし、トルエン分解系の *xylE* やナフタレン分解系 *nahH* と高い相同性を示した<sup>50)</sup>。

#### 第5項 フェノール分解制御遺伝子 (*pheR*) の解析

##### (1) フェノール分解制御遺伝子 (*pheR*) の位置推定

第2項において、pS10-45 上にフェノール分解遺伝子の制御系が存在することを推定した。そこで、フェノール分解遺伝子の制御機構を明らかにするために、本遺伝子系の制御遺伝子の解析を行うこととした。

まず、pS10-45 の挿入断片上で *pheR* 遺伝子の位置を推定するために、同一菌株中で *pheA* 遺伝子とその上流の任意の DNA 断片を不和合性群の異なるベクターを用いて大腸菌中で相補させて、PH 活性を検出することとした。図 4-16 に示すように *pheA* 遺伝子だけを含む *SacI* 6.1kb 断片をベクター pKT230 にサブクローニングし、pBH4201 を作製し、次に、*pheA* 遺伝子上流の様々な大きさの DNA 断片を pS10-45 及び pS04-92 から pUC19 にサブクローニングして組換えプラスミドを構築した。形質転換によりこの両プラスミドを同一宿主 (*E. coli* JM103 株) 内で共存させ、PH 活性の測定を行った。なお、ここでは、C23O 粗酵素液を用いた PH 活性測定法を採用したため、pS10-45 の代わりに、C23O 遺伝子 (*pheB*) を含まない pS04-92 を活性測定に使用した。フェノールで誘導した pS04-92 を保持する *E. coli* の PH 活性 (30.9 nmol/h/mg of cell) は非誘導時に比べ高い活性を発現し、また、*pheA* が単独で存在する pBH4201 を保持する *E. coli* のもの (1.8 nmol/h/mg of cell) と比較して、17 倍強の高い活性を示した。この結果も、*pheA* 遺伝子上流にフェノール存在下で *pheA* 遺伝子を高レベルに発現させる制御遺伝子の存在を支持している。種々の組み合わせのうち、pBH4201 と pBH4053

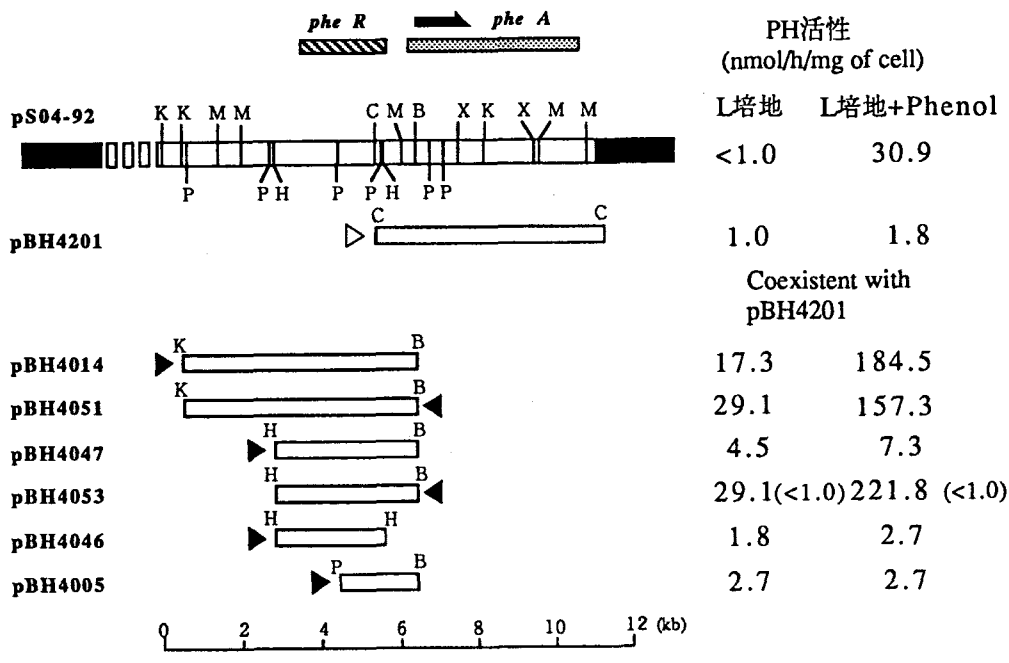


図4-16 プラスミド相補株のPH活性と *pheR* 遺伝子の推定位置

括弧内は、pBH4053単独時の活性を示す。

▷ : pKT230上のカナマイシン耐性遺伝子プロモーターの方向

▶ : pUC18あるいはpUC19上の *lac* プロモーターの方向

B : *Bam*HI, C : *Sac*I, H : *Hind*III, K : *Kpn*I, M : *Sma*I, P : *Pst*I, X : *Xho*I

の共存株がフェノール誘導時で最大の221.8nmol/h/mg of cellを示したことから、pBH4053の挿入DNA断片上に *pheR* が完全な形で存在すると推定した。

## (2) *pheR* 遺伝子の塩基配列決定

*pheR* 遺伝子の塩基配列を決定するために、まず、*pheR* 遺伝子の存在が推定された pBH4053の *Sph*I-*Bam*HI約4.0kb断片を数種の断片に分割し、pBluescriptII SKにサブクローニングを行い、組換えプ

ラスミド pSK110P及び pSK180Pを構築した。構築されたプラスミドの構造を図4-17に示す。更に、これらのプラスミドからデリベーションプラスミドを作製し、得られたプラスミドを使用して、*pheR* 遺伝子の塩基配列の解析を行った。

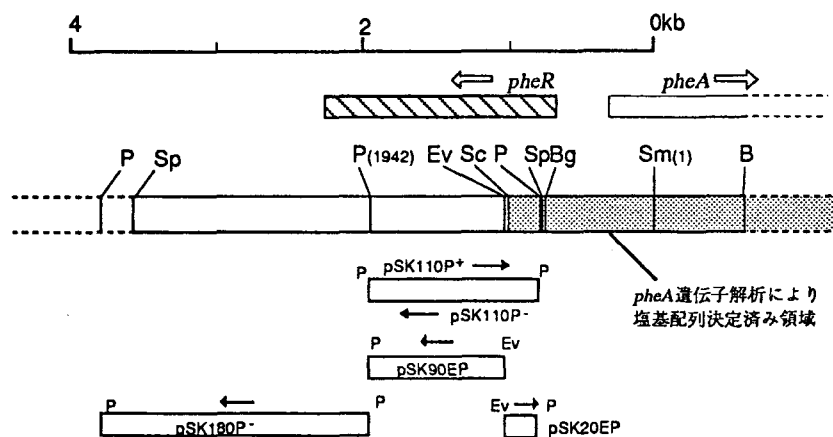


図4-17 *pheR* 遺伝子の推定位置と塩基配列の解析に使用したプラスミド

pSK110P<sup>+</sup>, pSK20EPはpBluescript SK+をpSK110<sup>-</sup>, pSK90EP, pSK180P<sup>-</sup>はpBluescript SK-をクローニングベクターとして使用した。矢印は塩基配列決定方向を、中抜き矢印は遺伝子の転写方向を示す。P: *Pst*I, Sp: *Sph*I, Ev: *Eco*RV, Sc: *Sac*I, Bg: *Bgl*II, Sm: *Sma*I.

図4-18に決定された配列を示す。この配列を解析したところ、*pheA*遺伝子の転写方向とは逆向きに、ヌクレオチド(nt) 682~2370にかけて1689bpのオープンリーディングフレーム (ORF) が認められた。このORFから推定される蛋白は、563アミノ酸からなる63.3kDaの分子サイズを持つと計算された。このORFの直前には、nt667~671に*P. aeruginosa*の16S rRNAの3'末端と相補性を持つリボソーム結合部位 (RBS) が認められた。また、nt600~670にかけて複数の*E. coli*特有のプロモーター配列 (-35/-10プロモーター)<sup>50</sup>が、nt 611~618には、*P. putida*のプロモーター配列も認められた。更に、nt 364~376及びnt 421~464には、しばしば制御タンパクの結合部位に認められる反復配列構造も認められた。以上の結果より、*pheR*遺伝子はPH遺伝子 (*pheA*) の上流に逆向きに存在する遺伝子であると推定した。

この遺伝子は、ホモロジー検索の結果、先にShinglerらが明らかにしたジメチルフェノール分解系の制御遺伝子*dmpR*<sup>52</sup>と高い相同性を有することがわかった。本*pheR*遺伝子の配列と*Pseudomonas* sp. CF600の*dmpR*の塩基配列を比較したところ、両遺伝子間の配列は、ORF外でわずかに違いがみられたものの (図4-18, nt 2391~2407範囲内) ORF内では100%一致することがわかった。先に我々が決定した*pheA*遺伝子においても、同機能のCF600株の*dmpKLMNOP*遺伝子と100%近い相同性を示したことを考え合わせると、両菌株の保有するフェノール分解遺伝子群は、全般に渡って本質的に同一のものであると考えられる。また、*pheR*遺伝子の塩基配列より推定される蛋白のアミノ酸配列を基に、ホモロジー検索を行ったところ、本蛋白が*P. putida* mt-2株のトルエン分解プラスミドTOL (pWWO)にコードされた制御タンパクXylR<sup>53</sup>と67%のホモロジーを持つことがわかった。両蛋白の推定アミノ酸配列のアライメントを図4-19に示す。中澤らによれば、XylRは、アミノ末端側からカルボキシ末端側へ向かってA、B、C、Dと命名した4つの領域(domain)から成り立っていると考えられている<sup>52,53</sup>。Domain Aは、最も相同性が低い場所であり、フェノールやトルエン等の基質の認識と非常に関係の深い領域とされている。次にくるDomain Bは、特に明記される機能を持ってはいないが、親水性アミノ酸が豊富な特徴を持ち、Domain AとDomain Cをつなぐ重要な領域である<sup>26</sup>。Domain Cは、 $\sigma^{54}$ 因子を持ったRNAポリメラーゼと直接相互作用する領域であり、ATP結合部位を含み、ATPの加水分解反応によって得られるエネルギーをRNAポリメラーゼに伝達し、転写を活性化すると考えられている。最もカルボキシ末端側のDomain Dは、helix-turn-helixのDNA結合モチーフが存在し、制御対象遺伝子のオペレーター領域に結合すると推測されている。この情報を基にフェノール分解遺伝子の制御系のモデルを推定し、図4-20に示した。

また、このXylRは、NtrCファミリーと呼ばれる正の制御蛋白<sup>54</sup>の一員であり、

CCCGGGTCTTTCGGCAAGCGGCGACCGACATCGCCGAAGCGCCACTTGACCATGTCGTCGTCACCAGCCTTGCCATCGC 80  
 SmaI/  
 TTCGTCCATTGCCACCACGCGGTTGTGCTGGCAAAACTTACGAAGGCGTCTTTCGGCAGCACCAACTCGACGAACAGCT 160  
 CCGGATGACCAATGGCGAAATCGAACTCGACGAACCTGGCTTCTGGTTGCTGCGCACACGGATGTAACGAGTGAGCTGA 240  
 TCGAAAGTCGGTGTGGGGTATTGGTCACGGTCATCTCCAGGTTGGCGGCTTGGCAGGACATCAAGCAACGGCTGTGCC 320  
 <-- pheA -----> <----->  
 AAGGTCTGAAAACAGACTTCAAGGTATTGTTTTCAATGTGTTTCTAATTTTTAGAAATGATCGGAGCGAGCGAAATTAAG 400  
 ----- -> <- - -----  
 CCGCGCTTGGCAGACTTTTTAAGCATTGATCAATTGCCAAGGCCGCTTGAGCAAATGCTTATGGCGCAGCTGAACGC 480  
 TGATCTTAATACTAAAATCACTGCCGTCGATTGATCATTGGTTGACTTTTGCCAGATACTGAGGCTGGCTATGGGGAG 560  
 CTGGCGCAGGTGAAAAAAGTCCGATTTTCCCATGACCCCATCTGGAATCGCCGCTGCCTTGGCTATAGCGGCGACC 640  
 -35 -10 -35 -10  
 CTGATTTTCCCATCTAAAATAAATAGGGGCTCGCTTACATGCCGATCAAGTACAAGCCTGAAATCCAGCACTCCGAT 720  
 pheR --> M P I K Y K P E I Q H S D  
 TTCAAGGACCTGACCAACCTGATCCACTTCCAGAGCATGGAAGGCAAGATCTGGCTTGGCGAACAGCGCATGCTGTTGCT 800  
 F K D L T N L I H F Q S M E G K I W L G E Q R M L L L  
 GCAGTTTTCAGCGATGGCCAGCTTTTCGCCGGGAAATGGTCAATACCTGGGCATCGAACGCGCCAAGGGCTTGTCTCTGC 880  
 Q F S A M A S F R R E M V N T L G I E R A K G L F L  
 GCCATGGTTACCAGTCCGGCCTGAAGGATGCCGAACCTGGCCAGGAAGCTGAGACCGAATGCCAGCGAAGTCCGGCATGTC 960  
 R H G Y Q S G L K D A E L A R K L R P N A S E V G M F  
 CTCGCTGGGCGCAGATGCATTCACTCAAGGGTCTGGTCAAGGTCGCCCCACCGAGCTCGATATCGACAAGGAATACGG 1040  
 L A G P Q M H S L K G L V K V R P T E L D I D K E Y G  
 GCGCTTCTATGCCGAGATGGAGTGGATCGACTCCTTCGAGGTGAAATCTGCCAGACCGACCTGGGCGAGATGCAAGACC 1120  
 R F Y A E M E W I D S F E V E I C Q T D L G Q M Q D  
 CGGTGTGCTGGACTCTGCTCGGCTACGCTGCGCTATTCTCGGCTTCATGGGCGGAAATCATCTTCAAGGAAGTC 1200  
 P V C W T L L G Y A C A Y S S A F M G R E I I F K E V  
 AGCTGCCGCGGCTGCGGCGGCGACAAGTGCCGGGTCATTGGCAAGCCGGCCGAAGAGTGGGACGACGTTGCCAGCTTCAA 1280  
 S C R G C G G D K C R V I G K P A E E W D D V A S F K  
 ACAGTATTTCAAGAACGACCCCATCATCGAGGAACCTTACGAGTTGCAATCGCAACTGTTGTCGCTGCGTACCAACCTCG 1360  
 Q Y F K N D P I I E E L Y E L Q S Q L L S L R T N L  
 ACAAACAGGAAGGCCAGTACTACGGCATCGGTGAGACCCCGGCTACCAGACCGTGGCAATATGATGGACAAGGCCGCA 1440  
 D K Q E G Q Y Y G I G Q T P A Y Q T V R N M M D K A A  
 CAGGGCAAAGTCTCGGTGCTGCTGCTTGGCGAGACCGGGGTCGGCAAGGAGGTCATCGCGCGTAGCGTGCACCTGCGCAG 1520  
 Q G K V S V L L L G E T G V G K E V I A R S V H L R S  
 CAAACGCGCCGCGAGCCCTTTGTCGCGGTGAACTGTGCGGCGATCCCGCCGACCTGATCGAGTCCGAATGTTCCGGCG 1600  
 K R A A E P F V A V N C A A I P P D L I E S E L F G  
 TGGAAAAAGGCGCCTTACCAGCGCCACCCAGTCACGCATGGGCGGCTTCGAGCGGGCCGACAAGGGCACCATCTTCCTT 1680  
 V E K G A F T G A T Q S R M G R F E R A D K G T I F L

図4-18 フェノール分解制御遺伝子 *pheR* の塩基配列

*E. coli*プロモーターのコンセンサス配列を上線で、*P. putida*特有のプロモーター配列を二重下線で、推定のリボゾーム結合部位を下線で、また、*inverted repeat*を破線矢印でそれぞれ示した。#は、*Pseudoimonas* sp. CF600の *dmpR* 遺伝子との相違点を示す。

GACGAGGTGATCGAACTCAGCCCGCGCTCAGGCCAGTCTGCTGCGCGTGCTGCAAGAAGGCGAGCTGGAGCGAGTTGG D E V I E L S P R A Q A S L L R V L Q E G E L E R V G	1760
CGACAACCGCACGCGCAAGATCGACGTAAGGGTTATCGCCGCCACCCACGAGGACCTGGCCGAAGCGGTCAAGGCCGGGC D N R T R K I D V R V I A A T H E D L A E A V K A G	1840
GTTTTGCGCGCGACCTGTACTACCGACTGAACGTTTTCCCGGTGGCGATCCCGCGTTGCGCGAACGCCGCGAGGACATT R F R A D L Y Y R L N V F P V A I P A L R E R R E D I	1920
CCACTGCTGGTTGAGCACTTCCCTGCAGCGCTTCCACCAGGAGTACGGCAAGAGAACCCTCGGCCTTTCAGACAAAGCCCT P L L V E H F L Q R F H Q E Y G K R T L G L S D K A L	2000
GGAGGCCCTGCCTGCATTACAGTTGGCCGGCAATATCCGTGAGCTGGAGAACGTATCGAGCGCGGCATCATCCTCACC E A C L H Y S W P G N I R E L E N V I E R G I I L T	2080
ATCCGAACGAAAGCATCAGCGTGCAGGCGCTGTTCCCTACGGGCGCCGGAAGAGCCGACGCCAGCGAGCGGGTGTGCG D P N E S I S V Q A L F L R A P E E P Q T A S E R V S	2160
TTGGACGGCGTGCTGATTCAGCCAGGCAATGGCCAGGGCAGTTGGATCAGCCAGTTGTTGAGCAGCGGCCTGAGCCTCGA L D G V L I Q P G N G Q G S W I S Q L L S S G L S L D	2240
CGAGATCGAGGAAAGCCTGATGCGCGAAGCCATGCAACAGGCCAACCAAAACGTCTCCGGTGCCGCGCGCTTGCTCGGCC E I E E S L M R E A M Q Q A N Q N V S G A A R L L G	2320
TAAGCCGACCGGCACTGGCCTATCGGCTGAAGAAAATCGGCATCGAAGGCTAGGATCTGTTGTCGTTTCATACGCGGCCG L S R P A L A Y R L K K I G I E G	2400
#####	
####	
CGCCGGAGCCTGTTTTTTTCGCGAGGCTAGGCACGAGCCGTGAAGTCTGGTGGCCAAACGAGCGCGGAGTAACGCGACTC	2480
GCGAAAAACAGGCCCGGCCCTGCGGGTTGCGCGGAAATGCCGCCAACTGTCGTTGTAGGACTTGGCAAGGGAACAACCA	2560
TTACCTGCGTCTACGCCTAACCTGGCGACATTTTCGCTGCAACGCGGCTCGCGTTGAAACGGCAACAGACCC	2634

図4-18 -続き-



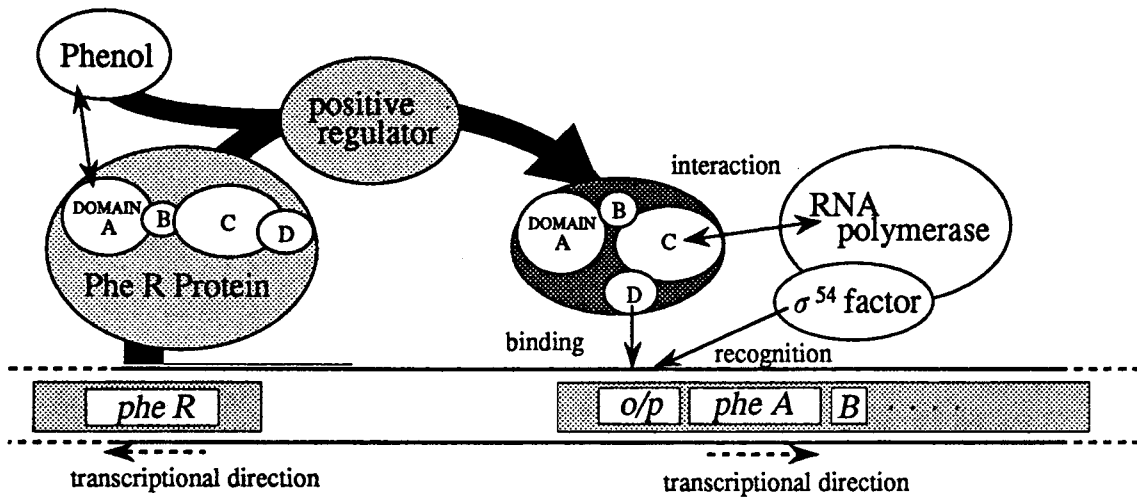


図4-20 *Pseudomonas putida* BH株のフェノール分解遺伝子系の制御モデル  
O/Pは、フェノールヒドロキシラーゼ遺伝子以下の転写単位のプロモーター/オペレーター領域を示す。

Shinglerらは、*dmpR*から発現される制御蛋白DmpRのDomainAの削除や一部改変により、ジメチルフェノールを認識することなくDomainCにATPase活性を認めている<sup>59)</sup>。この結果は、DomainAを遺伝子工学的手法で加工することで基質が存在することなく*pheA*遺伝子を活性化できることを意味しており、構成的高活性なTCE分解菌の育種に大いに役立つ情報となっている。

#### 第4節 要約

フェノール分解菌*P. putida* BH株のTCE分解を触媒すると推定されるフェノール分解遺伝子群のクローニングとその解析を行い、次のような結果を得た。

- (1) *P. putida* BH株の染色体から、広宿主域コスミドpVK100を用いたコスミドクローニング法でフェノール分解遺伝子群のクローニングを試みたところ、フェノールを含む寒天培地上で、褐色あるいは黄蛍光色を呈する組換え大腸菌が得られた。制限酵素分析により、5種類の外来断片を有する組換え体を得られたことがわかり、サブクローニングと発現実験により、フェノールヒドロキシラーゼ遺伝子 (*pheA*) 及びカテコール2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*pheB*) の位置を推定した。
- (2) 得られた組換えコスミドのうち、22.5kbの挿入断片上に*pheA*遺伝子のみを含むpS04-92及び19.6kbの断片上に*pheA*遺伝子に加え*pheB*以下の下流遺伝子も含むpS10-45を接合法により*P. putida* KT2440へ導入したところ、フェノール寒天培地で増殖で



きる接合株が、それぞれ $2.0 \times 10^5$ ,  $1.3 \times 10^3$ /受容菌の頻度で得られた。このうち、*P. putida* KT2440 (pS10-45) を用い、フェノール誘導・非誘導の条件でフェノール分解試験を行ったところ、接合株はBH株とほぼ同等にフェノールを分解できることがわかった。また、その際、接合株においても酵素誘導を生じたことから、pS10-45の挿入断片上にフェノール分解遺伝子系の制御遺伝子が存在し、KT2440株中で機能することが明らかとなった。

- (3) (1) で推定した*pheA*遺伝子を完全に含む領域 (6.1kb *SacI*断片) の塩基配列を解析したところ、解析した6112bpの配列中に6つのオープンリーディングフレーム (ORF: *pheA1*~*pheA6*) を認めた。最初のORFの上流には、-24/-12プロモーターが存在し、また、各ORF直前に*E. coli*及び*P. aeruginosa*のリボゾーム結合部位 (RBS) も見出された。各ORFは、その推定アミノ酸配列からそれぞれ10.6kDa、38.3kDa、10.5kDa、60.5kDa、13.2kDa及び38.5kDaの蛋白 (PheA1~PheA6) をコードすると計算された。一方、塩基配列のホモロジー検索の結果から、本遺伝子はマルチコンポーネントのフェノールヒドロキラーゼ遺伝子 (*dmp*, *phh*, *phl*, *acp*遺伝子系) と高いホモロジーを有することが分かった。また、アミノ酸配列のホモロジー検索の結果より、いくつかのマルチコンポーネントオキシゲナーゼ類 (T3MO, T4MO, MMO酵素系) の各コンポーネントとホモロジーが認められ、これらの酵素系のコンポーネントの機能からPheA2及びPheA4がフェノールヒドロキシラーゼのオキシゲナーゼコンポーネント、PheA6をオキシドリダクターゼコンポーネントと推定した。これらの各蛋白の発現は、組換え大腸菌による蛋白のSDS-PAGE分析により確認した。
- (4) フェノール分解制御遺伝子 (*pheR*) の存在が推定される *pheA*遺伝子上流領域と完全な *pheA*遺伝子を含む6.1kb *SacI*断片を同一大腸菌株内で相補させ、フェノールヒドロキシラーゼ活性を指標に *pheR*遺伝子の位置を推定し、更にその領域の塩基配列の解析を行ったところ、*pheA*遺伝子上流領域に *pheA*遺伝子と逆方向に1689bpからなるORFの存在を認めた。推定アミノ酸配列から、このORFにコードされると推定される蛋白は、563アミノ酸からなる63.3kDaの分子サイズを持つと計算された。このORFの上流には、複数の*E. coli*プロモーター (-35/-10) 及び*P. putida*のプロモーターが認められ、更に、制御蛋白が結合すると推測される大きな反復配列も認められた。一方、塩基配列のホモロジー検索より、ジメチルフェノール分解系の制御遺伝子 *dmpR* とほぼ同一の遺伝子であることが明らかとなった。また、アミノ酸配列で高いホモロジーを有するトルエン分解系の制御蛋白 XylR の機能から推定し

て、PheRは-24/-12プロモーターを活性化する正の制御蛋白NtrCのグループに属する制御蛋白と考えられる。従って、本フェノール分解系はPheRによって正の制御を受けていると結論された。

## 第5章 フェノール分解遺伝子を導入した組換え体によるTCE分解

### 第1節 緒言

TCEのバイオレメディエーションの問題点として、(1)有害誘導基質の環境への施用、(2)誘導基質によるTCE分解の拮抗阻害、(3)TCE分解代謝物の毒性、が指摘できる。これらの問題は、土着性の野生株のTCE分解能をバイオレメディエーションに活用する限り回避できない問題である。但し、(3)については、比較的TCE及びその代謝物に抵抗性を持つTCE分解菌も報告されており、このような菌株がTCE汚染サイトで生態学的安定性を獲得できれば、大いに活用可能と考えられる。一方、(1)、(2)の問題に対しては微生物菌株の育種で対応することができる。即ち、誘導基質が必要ない、TCE分解酵素系を構成的に発現する菌株が育種できれば、(1)(2)の問題を一挙に解決することができる。

微生物の育種法として、従来より薬剤や紫外線による突然変異法が利用され、特に物質生産の分野で効果をあげてきた。突然変異による育種では、簡単な処理で目的の菌株を作製できるが、栄養要求性変異等、むしろ生態学的安定性を失う変異も頻繁に発生するため、環境施用を前提としたバイオレメディエーションには必ずしも有利な方法とは言えない。また、これまで解析されたTCE分解酵素系がマルチコンポーネント構成で、しかもその制御系がやや複雑なため、ランダムで単純な変異では遺伝子の高発現化が期待できない。Shieldsらは、Tn5による変異処理で*P. cepacia* G4株の構成的TCE分解変異株を分離しており、トルエン等による誘導の必要ない菌株を育種したが、野生株のG4株より高いTCE分解活性は得られていない<sup>2)</sup>。

もう一つの育種法として、遺伝子組換え技術を利用した方法が挙げられる。遺伝子組換え技術では、一旦、クローニングによりTCE分解酵素の遺伝子を取得すれば、計画的に遺伝子の高活性化と構成的発現を同時に達成することが可能であり、更に、汚染サイトで生態学的に安定で、かつTCEやその代謝物に対して抵抗性のある宿主を選べば、理想的なTCE分解菌が構築できる。既に、トルエン分解菌*P. putida* F1株及び*P. mendocina* KR1株から、それぞれトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子とトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子が大腸菌へクローニングされ、組換え大腸菌においてTCE分解が確認されており、そのTCE分解活性の発現にはもはやトルエンを必要としなかった<sup>3,4)</sup>。一方、メタン資化性菌の場合、TCE分解比活性が他の分解菌より高いにもかかわらず、増殖速度が遅いことが

短所とされてきたが、この点を克服するために、TCE分解を触媒する可溶性メタンモノオキシゲナーゼの遺伝子を増殖速度の速い*Pseudomonas*属細菌へ導入し、宿主を替える試みもなされている<sup>9)</sup>。

現段階では、後者の育種菌は、遺伝子組換え体の環境放出にかかわる厳しい規制から、容易に利用することはできないが、優れた育種菌が構築されれば、将来的に組換え菌が利用される可能性も高いと考えられる。

そこで、本章では、優れたTCE分解菌育種のための基礎的知見を得るため、クローニングで得られたフェノール分解遺伝子を含む組換え体を用いて、そのTCE分解特性を検討することとした。

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 実験材料

#### (1) 菌株とプラスミド

組換えプラスミドpS10-45及びpS04-92は、前章で広宿主域コスミドベクターpVK100を用いたフェノール分解遺伝子群のクローニングにより得られた組換えコスミドである。pS10-45はPH及びC230をはじめとするフェノール分解酵素群の大部分をコードしており、一方、pS04-92は*pheB*遺伝子以下の分解遺伝子は存在していない(図

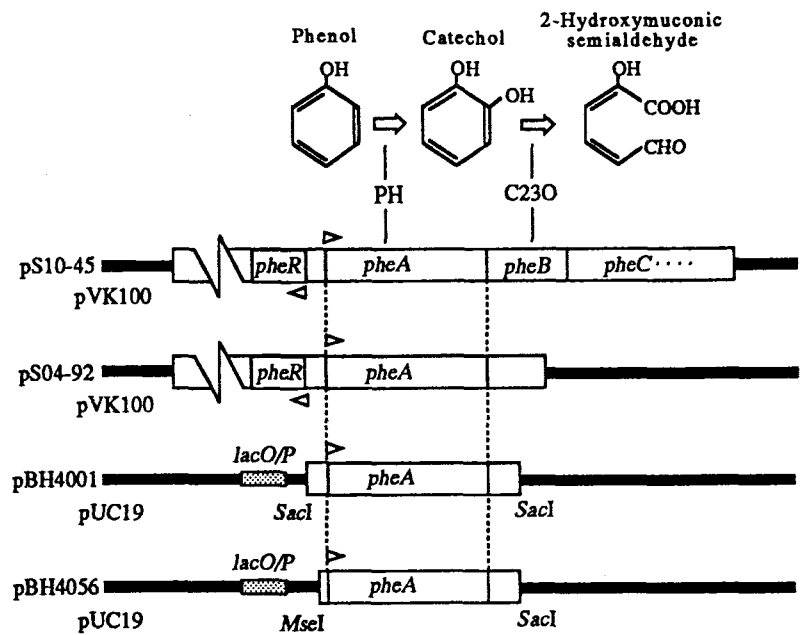


図5-1 供試プラスミドの構造

太線はベクターを、ボックスはBH染色体を、矢頭は転写方向をそれぞれ示している。PH: フェノールヒドロキシラーゼ, C230: カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ, *lacO/P*: ラクトースオペロンオペレータープロモーター領域

5-1)。両プラスミドには、*pheR*遺伝子のさらに上流に未同定の大きな領域が存在する。また、PHを高発現させるため、ここでは完全な*pheA*遺伝子をコードした6.1kb *SacI*断片及び5.5kb *MseI-SacI*断片をそれぞれpUC19に挿入して構築したpBH4001及びpBH4056も実験に使用した(図5-1)。両プラスミド上で、*pheA*の転写方向は*lac*プロモーターの活性化方向と一致しており、このプロモーターからの高発現が期待できる。なお、pS10-45及びpS04-92の宿主には、*E. coli* HB101及び*P. putida* KT2440を、また、pBH4001及びpBH4056

の宿主には*E. coli* JM103を使用した（表4-1）。

## (2) 培地と培養条件

菌株の培養にはL培地（表1-4）を用いた。組換えプラスミド上のフェノール分解遺伝子の発現のための誘導物質として、*E. coli* HB101(pS10-45)、*E. coli* HB101(pS04-92)、*P. putida* KT2440(pS10-45)及び*P. putida* KT2440(pS04-92)に対してはフェノールを、*E. coli* JM103(pBH4001)及び*E. coli* JM103(pBH4056)に対してはIPTGを、それぞれ5mM及び1mMの濃度で培地に添加した。なお、IPTGの添加は、集菌1時間前に行った。また、必要に応じてpS10-45及びpS04-92を保持する菌株の培養にはカナマイシンを25mg/lで、また、pBH4001及びpBH4056を保持する菌株にはアンピシリンを50mg/lで添加した。*P. putida*は30℃で、*E. coli*は37℃で培養した。

## 第2項 実験方法

### (1) T C E分解試験

第3章 第2節 に準じて行った。

### (2) T C E代謝物の分析

第3章 第2節 に準じ、初期 T C E 濃度を10, 20, 50mg/lとなるよう T C E を加えて分解試験を行い、2日後に懸濁液を遠心分離（15,000×g, 10min, 4℃）し、その上清をイオンクロマトグラフ分析に供した。イオンクロマトグラフの条件を表5-1に示した。

表5-1 イオンクロマトグラフ条件

液クロシステム	DX-300 (Dionex, Calif., USA)
カラム	Ion Pac AS4A-SC (AG-4A-SC, ASRS-I付)
ワークステーション	AI-450 (Dionex)
オートサンプラー	DAS-80 (Dionex)
溶出液	1.8mM炭酸ナトリウム 1.7mM重炭酸ナトリウム
流速	1ml/min
検出器	電気伝導度検出器 CDM-3 (Dionex)

## 第3節 実験結果並びに考察

### 第1項 遺伝子組換え*Escherichia coli*によるT C E分解

*E. coli* HB101(pS10-45)及び*E. coli* HB101(pS04-92)を用いたT C E分解試験では、ベクターのみを持つ*E. coli* HB101 (pVK100) をコントロールとして用い、また、分解試験の初期T C E濃度を20mg/lとした。なお、リン酸カリウム緩衝液にT C Eを加えたブランク試験及びフェノール誘導を行わない各菌株を用いた分解試験も同時に行った。その12時間までの結果を図5-2に、また、72時間までの結果を図5-3に示した。これらの結果から明らかのように、フェノール誘導を行った*E. coli* HB101(pS10-45)及び*E. coli* HB101(pS04-92)のみがT C Eを分解し、フェノール誘導を行わなかったこれら2種類の菌株はT C Eを分解

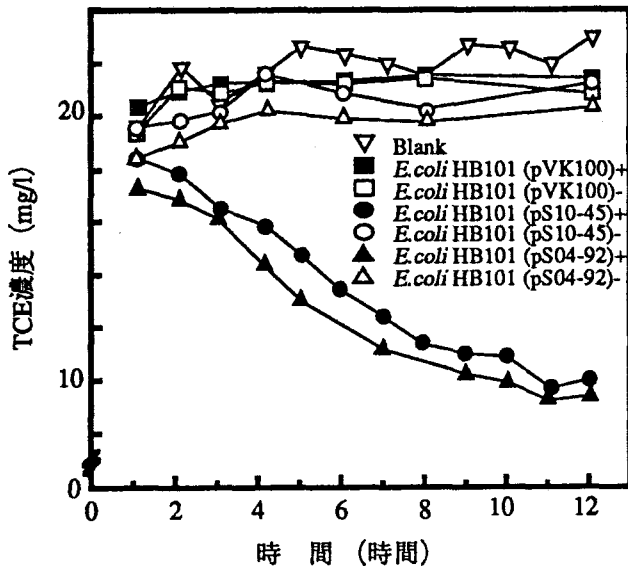


図5-2 組換えE.coliによるTCEの分解(I)

+: フェノール誘導, -: 非誘導

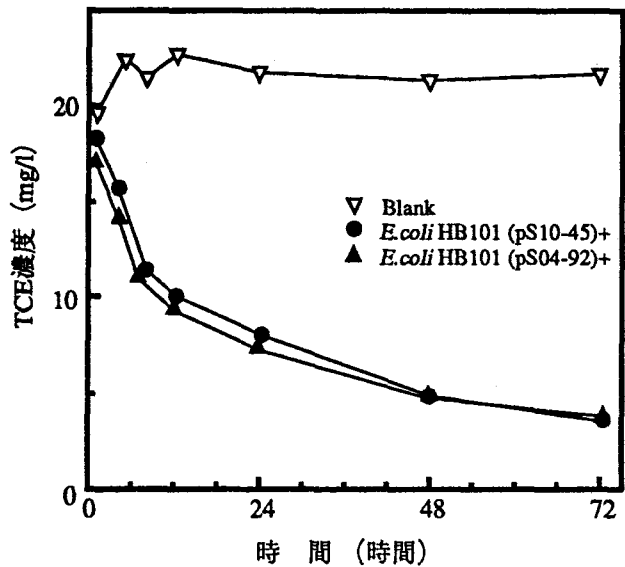


図5-3 組換えE.coliによるTCEの分解(II)

+: フェノール誘導

しなかった。この結果は、フェノール分解遺伝子系の誘導機構が、大腸菌においても機能していることを示唆している。さらに、pS10-45とpS04-92の両方で分解が認められたことは、*pheB*以下の遺伝子の存在に関係なくTCEが分解されることを意味しており、TCE分解が*pheA*遺伝子産物であるPHにより触媒されたことを示唆している。

### 第2項 遺伝子組換えPseudomonas putidaによるTCE分解

バイオレメディエーションへの適用を考慮し、土壌細菌の代表的存在であるPseudomonas属細菌を宿主とする組換え株

によるTCE分解を調べることにした。

*P. putida* KT2440(pS10-45)と *P. putida*

KT2440(pS04-92)を用いたTCE分解試験

には、ベクターのみを持つ *P. putida*

KT2440 (pVK100) をコントロールとして

用い、また、分解試験の初期TCE濃度

を20mg/lとした。なお、ブランク試験及び

非誘導菌株を用いた分解試験も行った。

その12時間までの結果を図5-4に、また、

72時間までの結果を図5-5に示した。これ

らの結果から、*P. putida* KT2440を宿主と

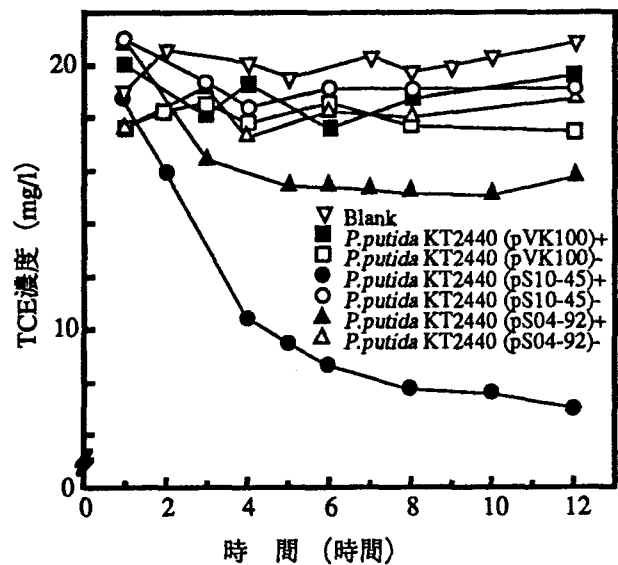


図5-4 組換えP.putida KT2440によるTCEの分解(I)

+: フェノール誘導, -: 非誘導

した場合でも、フェノール誘導を行った *P. putida* KT2440(pS10-45)と *P. putida* KT2440(pS04-92)においてTCE分解が認められた。しかしながら、*P. putida* KT2440(pS04-92)では、試験開始5時間でTCE分解が停止したのに対し、*P. putida* KT2440(pS10-45)はそれ以後でも分解が継続した。両者のTCE分解速度を求めたところ、表5-2に示すとおりその分解速度に顕著な差は認められなかった。そこで、この現象を考察するために、本実験と同様の条件で前培養した菌株を、フェノール及びカナマイシンをそれぞれ5mM及び25mg/lで含む無機塩培地に植菌し、フェノールでの増殖を観察したところ、図5-6に示すとおり、両者の増殖のラグタイムに若干の違いを認めた (KT2440[pS04-92]: 6時間, KT2440[pS10-45]: 4時間)。pS04-92とpS10-45には *pheB* 遺伝子下流領域の

有無と *pheR* 遺伝子上流の未知領域に違いが存在するが、先に行った大腸菌の分解試験ではほとんど両者の発現に違いが認められなかった。KT2440株の染色体遺伝子上には、大腸菌にはない多数の芳香族化合物代謝系の遺伝子が存在することから、両者の遺伝子の違いとKT2440株の染色体遺伝子の相互作用により誘導状態の差が表れた可能性が高い。それ故、両者のTCE分解挙動の差も同様の理由によるものと推察される。

次に、組換え *E. coli* 及び組換え *P. putida* のTCE分解挙動を比較した。一般に、*Pseudomonas* 属細菌の遺伝子を発現させるには、腸内細菌である *E. coli* より *Pseudomonas* 属細菌の方が適していると言われている<sup>7,8)</sup>。表5-2から、親株 *P. putida* BH株と比べて、TCE分解速度は *E. coli* HB101を宿主とした場合は57~59%、*P. putida* KT2440を宿主とした場合は122~137%となり、その差はさほど顕著ではなかったが *Pseudomonas* 属宿主の方が高

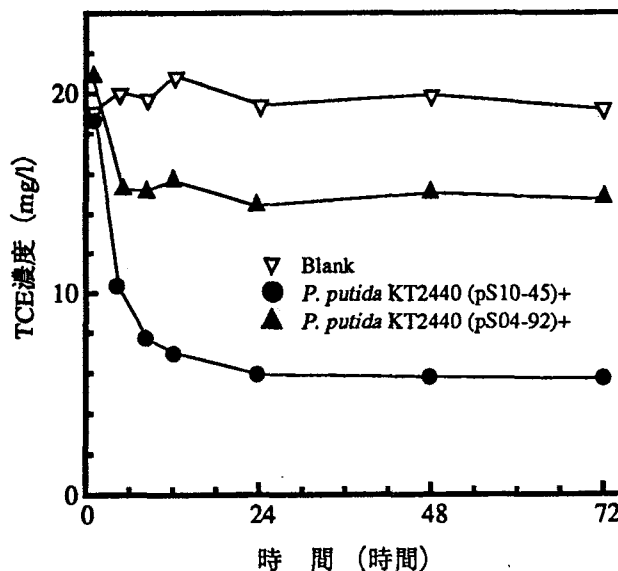


図5-5 組換え *P. putida* KT2440によるTCEの分解(II)  
+: フェノール誘導

表5-2 遺伝子組換え体のTCE分解速度\*

Strain	Specific TCE degradation rate (mg-TCE/h/mg-SS)
<i>E. coli</i> HB101 (pS10-45)	$1.7 \times 10^{-3}$
<i>E. coli</i> HB101 (pS04-92)	$1.6 \times 10^{-3}$
<i>P. putida</i> KT2440 (pS10-45)	$3.4 \times 10^{-3}$
<i>P. putida</i> KT2440 (pS04-92)	$3.8 \times 10^{-3}$
<i>E. coli</i> JM103 (pBH4001)(IPTG+)	$5.6 \times 10^{-4}$
<i>P. putida</i> BH	$2.8 \times 10^{-3}$

\* 分解試験は、TCE初期濃度20mg/lで行った。  
IPTG+: IPTG誘導

い分解速度を示した。しかしながら、*P. putida* KT2440(pS10-45)及び *P. putida* KT2440(pS04-92)は試験開始後24時間までに分解が止まり(図5-5)、一方、*E. coli* HB101(pS04-92)及び *E. coli* HB101(pS10-45)は72時間経過しても分解が継続した(図5-3)ことから、意外にも *E. coli* HB101を宿主とした方がTCEの分解が長時間継続することが明らかとなった。これらの結果は、宿主の選択が育種に重大な影響を与えることを示唆している。

### 第3項 高発現ベクターを有する組換え体によるTCE分解

TCE分解活性の高い組換え体を構築するために、大腸菌の高発現ベクターに*pheA*遺伝子を導入したpBH4001を有する組換え体のTCE分解について検討を行った。*E. coli* JM103(pBH4001)を用いた分解試験では、対照のためにリン酸カリウム緩衝液にTCEを加えたブランク試験を行い、また、プラスミド非保持株*E. coli* JM103も試験に供した。なお、初期TCE濃度は20mg/lとし、プラスミド非保持株*E. coli* JM103の培養には抗生物質による選択圧を加えなかった。その試験結果を図5-7に示した。

図5-7に示すとおり、IPTG誘導を行った場合を含めて *E. coli* JM103(pBH4001)によるTCE分解は、先に試験した *E. coli* HB101(pS10-45)及び *E. coli* HB101(pS04-92)に比べてかなり低く、試験開始後48時間後の分解は15~24%にとどまった。また、TCE分解速度も表5-2に示したように親株 *P. putida* BHの18~20%と低かった。

pS10-45及び pS04-92を構築したベクター-pVK100は細胞中で低コピー数であるのに対し、pBH4001を構築したpUC19は

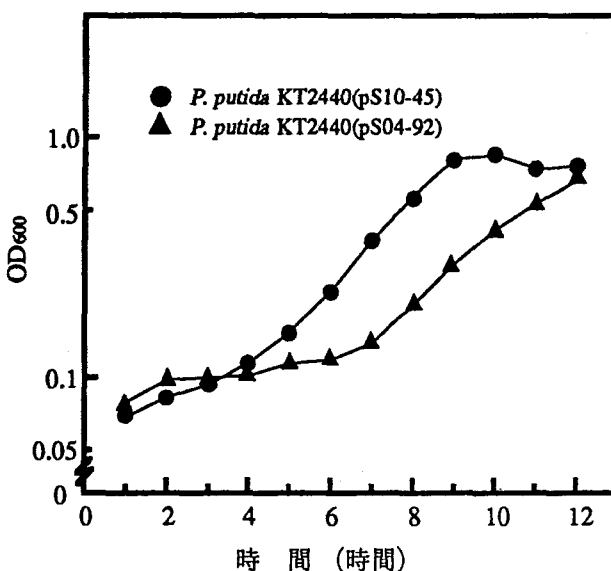


図5-6 組換え *P. putida* KT2440のフェノール培地での増殖曲線

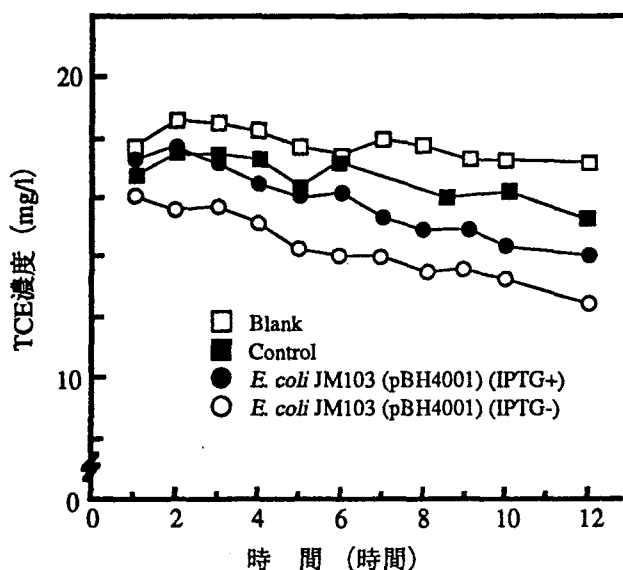


図5-7 組換え *E. coli* によるTCEの分解(III)  
IPTG+: IPTG誘導, IPTG-: 非誘導



コピー数が多いため、クローニングされた遺伝子の発現は一般に良好と考えられる。また、pBH4001は、高発現ベクターpUC19のlacプロモーターの下流にp*heA*遺伝子を挿入したもので、IPTGの存在下で、*pheA*遺伝子は高いレベルで発現すると期待された。しかしながら、本試験の結果はそれに矛盾したものであった。この原因として、第四章の解析より、pBH4001の持つ*SacI*断片上には、*pheA*遺伝子直前に制御蛋白PheRが結合し得る反復配列が存在し、これが高次構造をとってlacプロモーターからの転写に影響を与えたことが考えられる。そこで、*pheA*遺伝子直前のDNA領域をできるだけ削り、*pheA*遺伝子をlacプロモーターに接続したpBH4056 (図5-1) を用いて、TCE分解試験を行った。その結果、図5-8に示すとおりIPTGで誘導した条件で、*E. coli* JM103 (pBH4056)は親株*P. putida* BH株とはほぼ同等のTCE分解活性を示した。*E. coli* JM103 (pBH4056)のTCE分解は、もはやフェノールの誘導を必要としなかった。現状では、IPTGは高価な誘導物質であるため、バイオレメディエーションへの使用は難しいが、同様の方法で、比較的安価で環境に無害な誘導物質で制御できるプロモーターの下流にPH遺伝子を導入することにより、有害な誘導基質を必要としないTCE分解菌の育種が可能と考えられる。また、将来的には、遺伝子工学的に構成的発現を実現できる強いプロモーターを構築できれば、誘導物質なしで構成的にTCEを分解する理想的なTCE分解菌も育種できるであろう。

#### 第4項 TCE分解代謝物の分析

*P. putida* BH株のTCE分解経路を探るため、*P. putida* BH及び*E. coli* HB101 (pS10-45)の細胞懸濁液を用いてTCE分解試験を行い、懸濁液中の代謝物の分析をイオンクロマトグラフィーにより行った。図5-9に示すとおり、好気性細菌によるTCE分解では、中間代謝物として、TCEエポキシド、TCEジオール、ジクロロ酢酸、グリオキシル酸、蟻酸、一酸化炭素が生成すると考えられている。これらのうち、可溶性の有機酸であるジクロロ酢酸、グリオキシル酸、蟻酸は、本クロマト分析で検出可能と思われたが、初期TCE濃度

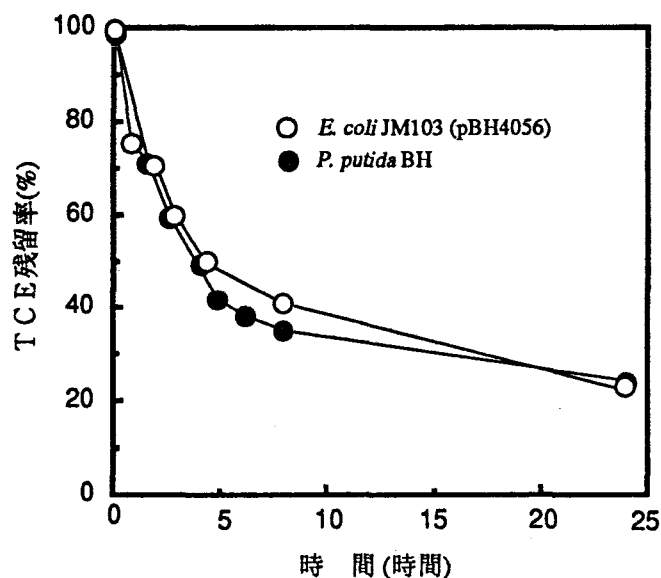


図5-8 組換え*E. coli*によるTCEの分解(IV)  
初期TCE濃度：約1mg/l

10~50mg/lの範囲では代謝物を検出することができなかつた。しかしながら、表5-3に示すとおり *P. putida* BH及び *E. coli* HB101 (pS10-45)ともに、その懸濁液中にTCE 1モルに対して2.6~3.9モルの比ではほぼ化学量論量の遊離塩素イオンを検出した。この結果は、これら両菌株によりTCEが完全に脱塩素されたことを示唆している。また、蟻酸やグリオキシル酸が検出されなかつたことから、完全無機化に至った可能性も高いと考えられる。

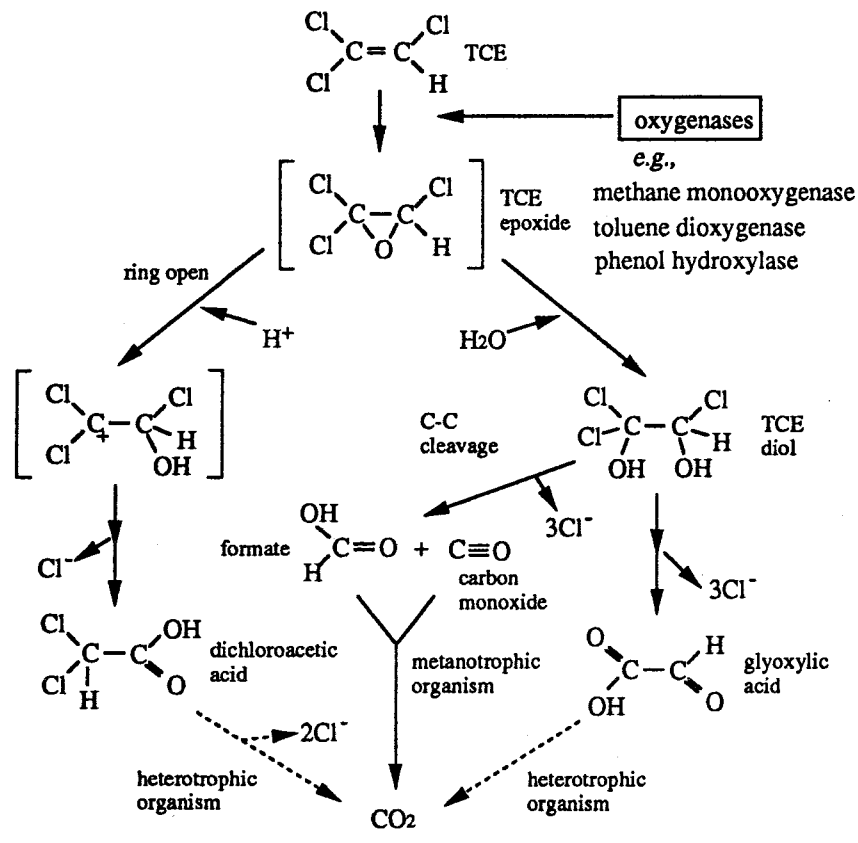


図5-9 好気性細菌によるTCE分解経路

表5-3 TCE分解に伴う塩素イオンの生成

菌株	初期TCE濃度(mg/l)	除去TCE (nmol) (a)	生成塩素イオン (nmol) (b)	(b)/(a)
<i>P. putida</i> BH	10	1186	3380	2.9
	20	2053	5408	2.6
	50	2190	7493	3.4
<i>E. coli</i> HB101 (pS10-45)	10	1521	6008	3.9
	20	3027	8845	2.9
	50	4471	15831	3.5

第4節 要約

*P. putida* BH株のフェノール分解遺伝子を含む組換えプラスミド (pS10-45, pS04-92, pBH4001, pBH4056) を、*E. coli* HB101, *P. putida* KT2440, *E. coli* JM103の各種宿主に導入して得た遺伝子組換え体のTCE分解挙動を調べ、次の結果を得た。但し、pS10-45は

*pheR*, *pheA*及び*pheB*以下の下流遺伝子を含み、一方、pS04-92は*pheR*, *pheA*のみを含む組換えコスミドである。また、pBH4001及び pBH4056は、高発現ベクターpUC19の*lac*プロモーター支配下に*pheA*遺伝子のみが活性化されるように挿入して構築した組換えプラスミドである。

- (1) *E. coli* HB101を宿主とした場合、フェノール誘導条件下で*E. coli* HB101(pS10-45)及び*E. coli* HB101(pS10-45)がT C Eを分解した。その際の分解速度は親株*P. putida* BH株の57~59%であったが、その分解は親株より持続することがわかった。下流遺伝子の有無にかかわらず、*pheA*遺伝子が存在すればT C Eが分解されたことから、*pheA*遺伝子産物であるPHがT C E分解を触媒したことが示唆された。
- (2) *P. putida* KT2440を宿主とした場合でも、フェノール誘導条件下で*P. putida* KT2440 (pS10-45)及び*P. putida* KT2440(pS04-92)がT C Eを分解した。但し、*P. putida* KT2440(pS04-92)は、試験開始5時間程度で急速にT C E分解が停止した。両組換え株のT C E分解速度は、BH株の122~137%と親株より優れた分解速度を示した。
- (3) T C E分解活性の向上を期待し、大腸菌の高発現宿主ベクター系 (pUC19-*E. coli* JM103) を利用して*E. coli* JM103 (pBH4001)及び*E. coli* JM103 (pBH4056)によるT C E分解試験を行ったところ、IPTG誘導条件下で*E. coli* JM103 (pBH4056)が、親株BH株と同等の高いT C E分解活性を示した。この育種により、親株と同程度のT C E分解能力を持ち、しかもフェノール誘導の必要ない組換え体の構築に成功した。
- (4) *P. putida* BH株のT C E分解経路を探るため、*P. putida* BH及び*E. coli* HB101 (pS10-45)の細胞懸濁液を用いてT C E分解試験を行い、懸濁液中の代謝物の分析を試みたが、代謝物を検知することができなかった。しかしながら、懸濁液中にはほぼ化学量論量の塩素イオンの生成を認めたため、両菌株によりT C Eが完全に脱塩素されたことが明らかとなった。

## 総括並びに結論

地下水汚染の代表的存在であるトリクロロエチレン（TCE）は、水道水源を通して我々の健康を脅かす恐れのある環境汚染物質であり、その除去法の早急な開発が切望されている。本物質による地下水汚染は、低濃度で広範囲に拡散するため、既存の物理的処理法ではコスト的に対処しにくく、バイオレメディエーションに大きな期待が寄せられている。

本研究では、フェノール分解菌を活用した効果的なバイオレメディエーションシステムを構築するための基礎研究として、フェノール分解菌あるいはフェノール分解遺伝子を利用したTCE分解について種々実験的検討を行い、以下の知見を得た。

第一章では、一般土壤中でTCE分解に関与し得るフェノール分解菌の存在量を明らかにする目的で、まず、土壤サンプル中のフェノール分解菌数をフェノール無機塩寒天培地への塗抹とレプリカにより正確に計数する方法を確立した。この方法を用いて、各地の8カ所より採取した土壤サンプル中のフェノール分解菌を計数したところ、いずれのサンプル中にも、 $10^6/1g$ (乾燥土壤)程度のフェノール分解菌が存在することを明らかとした。また、別にCGY寒天培地にて計数した好気性従属栄養細菌数に対して、低濃度フェノール分解菌(>125mg/l)が6~20%、高濃度フェノール分解菌(>500mg/l)が4~13%とかなり高い比率で存在することも明らかとした。更に、計数に使用した寒天培地から形態的及び生理的性質の異なる複数の分解菌の単離に成功し、その基本的性質を調べた。

第二章では、土壤中のフェノール分解菌のTCE分解能を評価するために、第1章での分離株を含む14株のフェノール分解菌のTCE分解能について検討を行った。その結果、供試フェノール分解菌のTCE分解挙動は、3つのタイプに分類することができた。即ち、TCEを完全に除去したグループ（タイプ1）、TCE分解活性が持続せず、TCEが完全除去されなかったグループ（タイプ2）、TCEを全く分解できないグループ（タイプ3）である。供試菌株のうち、タイプ3の1株を除き、全てTCE分解活性を持っており、過半数を占める8株は完全にTCEを除去したタイプ1に属する菌株であった。この結果は、フェノールによるバイオスティミュレーションの可能性を強く示唆している。次に、供試菌株のTCE分解活性とフェノール分解活性の関係を検討したところ、両者の関係には、ある程度の正の相関関係が認められたため、強いフェノール分解活性を有するサイトでは、TCEのバイオスティミュレーションによる除去が期待できると推察され

た。また、フェノール分解菌の増殖相がTCE分解に及ぼす影響を調べたところ、基質の消失とともに、極端にTCE分解活性を失う菌株、全く活性が減少しない菌株、あるいは、その中間的な菌株が存在することがわかった。活性の減少しないタイプの菌株は、バイオスティミュレーションに特に有用であり、また、強いTCE分解活性を持たないタイプのフェノール分解菌が優占するサイトにおいて、このタイプの菌株を補うことで、オーギュメンテーション効果も期待できると考えられる。

第三章では、供試菌株のうち最もTCE分解活性の高かった*P. putida* BH株について、そのTCE分解特性を詳細に検討した。まず、TCE分解が各種芳香族化合物分解との共代謝で起こるため、本菌株の芳香族化合物の資化性と代謝経路について調べたところ、本菌株は、20種類の供試芳香族化合物のうち、フェノール及び安息香酸の他に、*o*-, *m*-, *p*-クレゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*m*-トルイル酸、3,4-ジメチルフェノール、プロトカテキン酸の7種類の基質を資化することがわかった。更に、ベンゼン環開裂酵素活性の測定より、少なくとも本菌株にはカテコールのメタ開裂経路、オルソ開裂経路及びプロトカテキン酸のオルソ開裂経路が存在することを推定した。各経路の代表基質としてそれぞれフェノール、安息香酸及び*p*-ヒドロキシ安息香酸で酵素系を誘導し、TCE分解試験を行ったところ、カテコールのメタ開裂を経由するフェノール分解経路のみがTCE分解を触媒することを示した。

次に、フェノール誘導条件下で初期TCE濃度を変化させてBH株の懸濁細胞によるTCE分解試験を行ったところ、その分解はMichaelis-Menten式によく合致し、 $V_{max}'=4.0 \times 10^3 \text{ mg-TCE/h/mg-SS}$ 、 $K_m'=10.3 \text{ mg/l}$ を得た。得られた最大TCE分解速度は、既知の多くのTCE分解菌のものと同程度と見積もられた。

第四章では、*Pseudomonas putida* BH株のTCE分解に関与するフェノール分解遺伝子群のクローニングとその解析を行い、遺伝子レベルで本分解系の解明を試みた。まず、広宿主域コスミドpVK100を用いたコスミドクローニング法で、*P. putida* BH株の染色体からフェノール分解遺伝子群のクローニングを試み、フェノール分解遺伝子群を含む挿入断片を持つ5種類の組換え大腸菌が得られた。更に、サブクローニングと発現実験により、これらの断片上でフェノールヒドロキシラーゼ遺伝子 (*pheA*) 及びカテコール2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*pheB*) の位置を推定した。得られた組換えコスミドのうち、*pheA*遺伝子を含むpS04-92及び*pheA*遺伝子に加え*pheB*以下の下流遺伝子も含むpS10-45を用い、接合法により*P. putida* KT2440へ導入した。得られた接合株のうち、*P. putida* KT2440 (pS10-45)

を用い、フェノール誘導・非誘導細胞によるフェノール分解試験を行ったところ、接合株はBH株とほぼ同等にフェノールを分解できることがわかった。また、その際、接合株にも酵素誘導の制御が認められたため、pS10-45の挿入断片上にフェノール分解遺伝子群の制御遺伝子が存在し、KT2440株中で機能することが明らかとなった。

次に、*pheA*遺伝子を完全に含む領域（6.1kb *SacI*断片）の塩基配列の解析を行ったところ、決定した6112bpの配列中に6つのオープンリーディングフレーム（ORF: *pheA1*～*pheA6*）を認めた。各ORFから推定されるコンポーネント（PheA1～PheA6）の分子サイズは、その推定アミノ酸配列からそれぞれ10.6kDa、38.3kDa、10.5kDa、60.5kDa、13.2kDa及び38.5kDaと計算された。塩基配列のホモロジー検索の結果から、本遺伝子はマルチコンポーネントのフェノールヒドロキラーゼ遺伝子と高いホモロジーを有することが分かり、また、アミノ酸配列のホモロジー検索の結果より、いくつかのマルチコンポーネントオキシゲナーゼ類の各コンポーネントとホモロジーも認めた。これらの酵素系のコンポーネントの機能からPheA2及びPheA4がフェノールヒドロキシラーゼのオキシゲナーゼコンポーネント、PheA6をオキシドリダクターゼコンポーネントと推定した。

一方、制御遺伝子（*pheR*）を含むと推定される領域の塩基配列の解析を行ったところ、*pheA*遺伝子の上流領域に*pheA*遺伝子と逆方向に1689bpからなるORFの存在を認めた。推定アミノ酸配列から、このORFにコードされると推定される蛋白は563アミノ酸からなり、63.3kDaの分子サイズを持つと計算された。塩基配列のホモロジー検索より、本遺伝子がジメチルフェノール分解系の制御遺伝子*dmpR*とほぼ同一の遺伝子であることが明らかとなり、また、アミノ酸配列で高いホモロジーを有するトルエン分解系の制御蛋白XylRの機能から推定して、PheRは-24/-12プロモーターを活性化する正の制御蛋白NtrCのグループに属する制御蛋白であることが示唆された。従って、本フェノール分解系はPheRによって正の制御を受けていると結論された。

第五章では、優れたTCE分解菌育種のための基礎的知見を得るため、第四章で得た遺伝子組換え体*E. coli* HB101(pS10-45)、*E. coli* HB101(pS04-92)、*P. putida* KT2440(pS10-45)、*P. putida* KT2440(pS04-92)、*E. coli* JM103(pBH4001)及び*E. coli* JM103(pBH4056)のTCE分解挙動を調べた。まず、*E. coli* HB101を宿主とした場合、フェノール誘導条件下で*E. coli* HB101(pS10-45)及び*E. coli* HB101(pS04-92)がTCEを分解した。その際の分解速度は親株*P. putida* BH株の57～59%であったが、その分解は親株より持続することがわかった。下流遺伝子の有無にかかわらず、*pheA*遺伝子が存在すればTCEが分解されたことから、フェノールヒドロキシラーゼがTCE分解を触媒することが明らかになった。また、*P.*

*putida* KT2440を宿主とした場合でも、フェノール誘導条件下で*P. putida* KT2440(pS10-45)及び*P. putida* KT2440(pS04-92)がTCEを分解した。但し、*P. putida* KT2440(pS04-92)は、試験開始5時間程度で急速にTCE分解が停止した。両組換え株のTCE分解速度は、BH株の122~137%と親株より優れた分解速度を示した。大腸菌の組換え体での結果も考慮すれば、遺伝子発現にふさわしい宿主を選択すれば、高いTCE分解活性を有し、しかも活性の長期間持続する組換え体が得られると考えられる。

更に、TCE分解活性の向上を期待し、大腸菌の高発現宿主ベクター系 (pUC19-*E. coli* JM103) を利用して*pheA*遺伝子の高発現化を試みた。*E. coli* JM103(pBH4001)はIPTG誘導条件下でさえ顕著なTCE分解活性を示さなかったが、*pheA*遺伝子上流のPheR推定結合領域を削除したpBH4056を有する*E. coli* JM103は、IPTG誘導条件下で親株BH株とほぼ同等のTCE分解活性を示した。この育種により、フェノール誘導の必要ない組換え体の構築に成功した。

## 展望

本研究第一章第二章では、ごく一般的な土壌にはフェノール分解菌が比較的多数存在し、それらの大部分がTCE分解能を有することが明らかとなった。この結果から、多くのサイトでフェノールを用いたバイオスティミュレーションによるTCE除去が実施しやすい状況にあると言える。その際、土壌のフェノール分解活性を測定することで、ある程度のTCE分解活性を推定することも可能と考えられる。しかし、フェノール分解菌のTCE分解活性も多様であり、その増殖相によっても活性が変化する事実も存在する。仮に、TCE分解活性が低いあるいは分解活性を持たないフェノール分解菌が優占するサイトでは、本研究で得られた*P. putida* BH株や*Acinetobacter* sp.YAD株のように高いTCE分解活性を有する菌株のオーギュメンテーションも必要と考えられる。それ故、効果的なオーギュメンテーションを行うためには、高いTCE分解活性を有する菌株の分離と育種が重要と考えられる。

本研究で用いたフェノール分解菌のうち最も高いTCE分解活性を示したBH株は、そのような育種のための候補株であり、そのTCE分解機構を明らかにすることは計画的な育種を行う上で極めて重要である。第四章、第五章の結果により、本菌株のTCE分解がマルチコンポーネントのフェノールヒドロキシラーゼによって触媒されることが明らかとなった。この酵素は、世界的に普遍的に分布する酵素と推定され、多くのサイトでのフェノールによるスティミュレーションの可能性を支持している。また、分解遺伝子の解析を

通じて、育種に有用な情報が得られた。

組換え体を用いた分解試験では、土壌細菌の代表的存在の*P. putida*で親株より高い活性が得られたが、意外にも組換え大腸菌でも同様の活性が得られ、しかもその活性は長時間維持された。また、TCE分解活性の向上を期待し、大腸菌の高発現系と遺伝子組換え技術を導入することにより、親株BH株と同等のTCE分解活性を示し、しかもフェノール誘導の必要ない組換え体を得られた。この結果は、さらに遺伝子や宿主をうまく選択すれば、高活性でかつ活性が持続し、誘導基質の必要がない理想的な組換え体構築の可能性を示唆するものである。将来、このような研究結果が蓄積され、優秀な組換え体が構築されたならば、現状における組換え体使用の規制も緩和され、組換え体が活躍する日も訪れるであろう。



## 謝 辞

本研究に対し、終始御懇篤なる御指導を賜った大阪大学工学部 藤田正憲教授、並びに本論文の御校閲を賜った大阪大学大学院工学研究科 菅 健一教授、塩谷捨明教授、室岡義勝教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に対し貴重な御助言と暖かな御支援を賜った姫路工業大学工学部 前田嘉道教授に厚く感謝いたします。

さらに、研究にあたって有益な御助言と御鞭撻を下された熊本大学工学部 古川憲治教授、静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 岩堀恵祐助教授、大阪大学工学部 池 道彦博士に深謝いたします。

併せて、実験に協力して頂いた大阪大学工学部環境工学科水質管理工学研究室及び姫路工業大学工学部応用化学科環境化学研究室の皆様感謝いたします。

## 参考文献

### 緒論

- (1) 武富 眞, 櫃本礼二: 北九州市における有機塩素化合物汚染防止対策のための調査指導, 用水と廃水, 30, 791-798 (1988)
- (2) 読売新聞, 6月28日朝刊
- (3) 上坂政章: シリコンバレーにおける地下水汚染対策, 公害と対策, 22, 337-343 (1986)
- (4) 早川哲夫: 地下水汚染対策の現状と今後の動向, 用水と廃水, 30, 721-731 (1988)
- (5) 日本水環境学会関西支部編: 地下水・土壌汚染の現状と対策, 環境技術研究協会, pp.1-9 (1995)
- (6) 中室克彦, 佐谷戸安好: 地下水汚染物質の生体への影響, 地下水技術, 37, 41-51 (1995)
- (7) 中室克彦: 環境試料水中におけるトリクロロエチレン等の分析方法とその生体影響, 公害と対策, 22, 628-636 (1986)
- (8) 西村 実, 田坂広志: バイオテクノロジーを用いた環境修復技術, 公害と対策, 27, 628-636 (1991)
- (9) 矢木修身, 丸山裕夫: 新しい環境浄化技術ーバイオレメディエーションー, 造水技術, 21, 28-34 (1995)
- (10) 松川圭輔: 土壌浄化技術について, 千代田技報, 14, 82-86 (1993)
- (11) 西村 実: バイオレメディエーションー微生物による環境汚染浄化ー, 土と微生物, 46, 19-26 (1995)
- (12) 矢木修身: バイオレメディエーション技術の適用による土壌、地下水の浄化, 平成8年度日本生物工学会シンポジウム講演要旨集, 大阪大学, 70-73 (1996)
- (13) Little, C. D., Palumbo, A. V., Herbes, S. E., Lindstrom, M. E., Tyndall, R. L., and Gilmer, P. J.: Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium, Appl. Environ. Microbiol., 54, 951-956 (1988)
- (14) Tsien, H. -C., Brusseau, G. A., Hanson, R. S., and Wackett, L. P.: Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b, Appl. Environ. Microbiol., 55, 3155-3161 (1989)
- (15) Uchiyama, H., Nakajima, T., Yagi, O., and Tabuchi, T.: Aerobic degradation of trichloroethylene by a new type II methane-utilizing bacterium, strain M., Agric. Biol. Chem.,

53, 2903-2907 (1989)

- (16) Arciero, D., Vannelli, T., Logan, M., and Hooper, A. B.: Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 640-643 (1989)
- (17) Vannelli, T., Logan, M., Arciero, D. M., and Hooper, A. B.: Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1169-1171 (1990)
- (18) Fliermans, C. B., Phelps, T. J., Ringelberg, D., Mikell, A. T., and White, D. C.: Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1709-1714 (1988)
- (19) Vanderberg, L. A., Burbach, B. L., and Perry, J. J.: Biodegradation of trichloroethylene by *Mycobacterium vaccae*, *Can. J. Microbiol.*, 41, 298-301 (1995)
- (20) Reij, M. W., Kieboom, J., DE Bond, J. A. M., and Hartmans, S.: Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propane, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2936-2942 (1995)
- (21) Ewers, J., Freier-Schroder, D., Knackmuss, H., -J.: Selection of trichloroethene(TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE, *Arch. Microbiol.*, 154, 410-413 (1990)
- (22) Nelson, M. J. K., Montgomery, S. O., Mahaffey, W. R., and Pritchard, P. H.: Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradation pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 949-954 (1987)
- (23) Nelson, M. J. K., Montgomery, S. O., and Pritchard, P. H.: Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 604-606 (1987)
- (24) McClay, K., Streger, S. H., and Steffan, R. J.: Induction of toluene oxidation activity in *Pseudomonas mendocina* KR1 and *Pseudomonas* sp. ENVPC5 by chlorinated solvents and alkanes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3479-3481 (1995)
- (25) Dabrock, B., Riedel, J., Bertram, J., and Gottschalk, G.: Isopropylbenzene(cumene)-a new substrate for the isolation of trichloroethylene-degrading bacteria, *Arch. Microbiol.*, 158, 9-13 (1992)
- (26) Harker, A. R. and Kim, Y.: Trichloroethylene degradation by two independent aromatic degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1179-1181 (1990)

- (27) Ensley, B. D.: Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism, *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 283-299 (1991)
- (28) Wilson, J. T., and Wilson B. H.: Biotransformation of trichloroethylene in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 242-243 (1985)
- (29) Krumme, M. L., Timmis, K. N., and Dwyer, D. F.: Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant G4 5223 PR1 in aquifer microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2746-2749 (1993)
- (30) Folsom, B. R. and Chapman, P. J.: Performance characterization of a model bioreactor for biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1602-1608 (1993)
- (31) Speitel Jr, G. E. and Segar Jr, R. L.: Cometabolism in biofilm reactors, *Wat. Sci. Tech.*, 31, 215-225 (1995)
- (32) Hecht, V., Brebbermann, D., Bremer, P., and Deckwer, W. -D.: Cometabolic degradation of trichloroethylene in a bubble column bioscrubber, *Biotech. Bioeng.*, 47, 461-469 (1995)
- (33) Uchiyama, H., Ogura, K., Nishibayashi, M., Kokufuta, E., and Yagi, O.: Trichloroethylene degradation by cells of a methane-utilizing bacteria, *Methylocystis* sp. M, immobilized in calcium alginate, *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 608-613 (1995)
- (34) Nelson, M. J., Kinsella, J. V., Montaya, T.: *In situ* biodegradation of TCE contaminated groundwater, *Environmental progress.*, 9, 190-196 (1990)
- (35) Hopkins, G. D., Semprini, L., and McCarty, P. L.: Microcosm and *in situ* field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2277-2285 (1993)
- (36) McCarty, P. L. and Semprini, L.: Ground-water treatment for chlorinated solvents, in *Handbook of bioremediation*, LEWIS PUBLISHERS, pp87-116 (1994)

## 第1章

- (1) Fan, S. and Scow, K. M.: Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1911-1918 (1993)
- (2) Walton, B. T., and Anderson, T. A.: Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1012-1016 (1990)
- (3) McClellan, K. L., Buras, N., and Bales, R. C.: Biodegradation of trichloroethylene by bacteria

indigenous to a contaminated site, J. Environ. Sci. Health, A24, 561-570 (1989)

- (4) 緒論 (12)の文献
- (5) 緒論 (11)の文献
- (6) Pike, E.B., Carrington, E.G. and Ashburner, P.A.: An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge, J. Appl. Bacteriol., 35, 309-321 (1972)
- (7) 橋本 奨, 藤田正憲: 活性汚泥より分離した3種のフェノール分解菌の同定とその性質について, 下水道協会誌, 24, 27-33 (1987)
- (8) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.: Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989)
- (9) 土壤微生物研究会編: 土壤微生物学実験法, 養賢堂 (1975)
- (10) 微生物研究法懇談会編: 微生物学実験法, 講談社 (1975)
- (11) 長谷川武治編: 微生物の分類と同定 (下), 学会出版センター (1985)

## 第2章

- (1) DiSpirito, A. A., Gullledge, J., Shiemke, A. K., Murrell, J. C., Lidstrom, M. E., and Krema, C. L.: Trichloroethylene oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase in type I, type II and type X methanotrophs, Biodegradation, 2, 151-164 (1992)
- (2) 第1章 (7)の文献
- (3) Dunn, N. W. and Gunsalus, I. C.: Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*, J. Bacteriol., 114, 974-979 (1973)
- (4) 藤井俊樹, 武尾正弘, 高田英資, 前田嘉道: 化学排水馴養活性汚泥細菌におけるアニリン分解プラスミドの分布, 環境技術, 25, 25-28 (1996)
- (5) 日本生化学会編: 新生化学実験講座 1 タンパク質I分離・精製・性質, 東京化学同人 (1990)
- (6) Wackett, L. P. and Householder, S. R.: Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase, Appl. Environ. Microbiol., 55, 2723-2725 (1989)
- (7) Fox, B. G., Borneman, J. G., Wackett, L. P. and Lipscomb, J. D.: Haloalkane oxidation by soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: mechanistic and environmental implications, Biochemistry, 29, 6419-6427 (1990)
- (8) 緒論(27)の文献
- (9) Nurk, A., Kasak, L. and Kivisaar, M.: Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and

*Pseudomonas putida*, Gene, 102, 13-18 (1991)

- (10) Kukor, J. J. and Olsen, R. H.: Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol/cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and functional analysis of the encoded enzyme, J. Bacteriol., 174, 6518-6526 (1992)
- (11) Nordlund, I., Powlowski, J., and Shingler, V.: Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600, J. Bacteriol., 172, 6826-6833 (1990)
- (12) Kalin, M., Neujahr, H. Y., Weissmahr, R. N., Sejlitz, T., Johl, R., Fiechter, A., and Reiser, J.: Phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*: gene cloning, sequence analysis, and functional expression in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 174, 7112-7120 (1992)
- (13) Takeo, M., Maeda, Y., Okada, H., Miyama, K., Mori, K., Ike, M. and Fujita, M.: Molecular cloning and sequencing of the phenol hydroxylase gene from *Pseudomonas putida* BH, J. Ferment. Bioeng., 79, 485-488 (1995)
- (14) DNA databank accession number: M60276, X79063, X80765, Z36909, D28864
- (15) 緒論 (20)の文献
- (16) 緒論 (23)の文献
- (17) 緒論 (25)の文献

### 第三章

- (1) 第1章 (7)の文献
- (2) 緒論 (20)の文献
- (3) Fujita, M., Ike, M., Hioki, J., Kataoka, K. and Takeo, M.: Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes, J. Ferment. Bioeng., 79, 100-106 (1995)
- (4) 中村寛治, 宮地有正: Phenol hydroxylase遺伝子を導入した組換え微生物によるトリクロロエチレンの分解, 環境工学研究論文集, 29, 17-27 (1992)
- (5) 緒論 (22)の文献
- (6) 緒論 (23)の文献
- (7) 緒論 (25)の文献
- (8) 緒論 (26)の文献
- (9) Nakazawa, T. and Yokota T.: Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways, J. Bacteriol., 115, 262-267 (1973)

- (10) 菅原 潔, 福島正美: 生化学実験法7, 蛋白質の定量法, 第3版, 学会出版センター (1990)
- (11) 矢野圭司: 細胞質因子の応用: *Pseudomonas*属細菌を中心として, 醗酵工学, 56, 57-73 (1978)
- (12) 第2章 (7)の文献
- (13) Folsom, B. R., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H.: Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates, Appl. Environ. Microbiol., 56, 1279-1285 (1990)
- (14) Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., van der Waarde, J. J., and Janssen, D. B.: Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene, Appl. Environ. Microbiol., 57, 7-14 (1991)
- (15) 緒論 (33)の文献
- (16) 第一章 (1)の文献

#### 第四章

- (1) Fox, B. G., Froland, W. A., Dege, J. E., and Lipscomb, J. D.: Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b, J. Biol. Chem., 264, 10023-10033 (1989)
- (2) Crady, D. L. N., Laidler, V., Salmond, G. P. C., and Murrell, J. C.: Molecular analysis of the methane monooxygenase (MMO) gene cluster of *Methylosinus trichosporium* OB3b, Mol. Microbiol., 5, 335-342 (1991)
- (3) Crady, D. L. N., Laidler, V., Salmond, G. P. C., and Murrell, J. C.: The methane monooxygenase gene cluster of *Methylosinus trichosporium*: cloning and sequencing of the mmoC gene, Arch. Microbiol., 156, 477-483 (1991)
- (4) Burrows, K. J., Cornish, A., Scott, D., and Higgins, I. G.: Substrate specificities of the soluble and particulate methane monooxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b, J. Gen. Microbiol., 130, 3327-3333 (1984)
- (5) 緒論 (13)の文献
- (6) Finette, B. A. and Gibson, D. T.: Initial studies on the regulation of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1, Biocatalysis, 2, 29-37 (1988)
- (7) Zylstra, G. J., McCombie, W. R., Gibson, D. T., and Finette, B. A.: Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon, Appl. Environ. Microbiol., 54, 1498-1503 (1988)

- (8) Zylstra, G. J. and Gibson, D. T.: Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1, *J. Biol. Chem.*, 264, 14940-14946 (1989)
- (9) Yen, K.-M., Karl, M. R., Blatt, L. M., Simon, M. J., Winter, R. B., Fausset, P. R., Lu, H. S., Harcourt, A. A., and Chen, K. K.: Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase, *J. Bacteriol.*, 173, 5315-5327 (1991)
- (10) Yen, K.-M., and Karl, M. R.: Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase, *J. Bacteriol.*, 174, 7253-7261 (1992)
- (11) Zylstra, G. J., Wackett, L. P., and Gibson, D. T.: Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3162-3166 (1989)
- (12) Winter, R. B., Yen, K. -M., and Ensley, B. D.: Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*, *Bio/technology*, 7, 282-285 (1989)
- (13) 第3章 (4)の文献
- (14) Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D.: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 41, 459-472 (1969)
- (15) Messing, J., Crea, R., and Seeburg, P. H.: A system for shot gun DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, 9, 309-321 (1981)
- (16) 第1章 (7)の文献
- (17) Bagdasarian, M., Luze, R., Ruckert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., and Timmis, K. N.: Specific-purpose plasmid cloning vectors II. broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*, *Gene*, 16, 237-247 (1981)
- (18) Knauf, V. C. and Nester, E. W.: Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of a *Agrobacterium* Ti plasmid, *Plasmid*, 8, 45-54 (1982)
- (19) Figurski, D. H. and Helinski, D. R.: Replication of an origin-containing derivatives of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1648-1652 (1979)
- (20) Saito, H. and Miura, K.: Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment, *Biochim. Biophys. Acta*, 72, 619-629 (1963)



- (21) Birnboim, H. C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523 (1979)
- (22) Darzins, A., and Chakrabarty, A. M.: Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 159, 9-18 (1984)
- (23) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.: *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989)
- (24) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467 (1977)
- (25) Fujita, M., Kamiya, T., Ike, M., Kawagoshi, Y., and Shinohara, N.: Catechol 2,3-dioxygenase production by genetically engineered *Escherichia coli* and its application to catechol determination, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 407-414 (1991)
- (26) 矢野圭司：広宿主域バクターを用いた有用酵素生産法の開発，昭和61年度科学研究費補助金研究成果報告書 (1986)
- (27) Clark, L., and Carbon, J.: Selection of specific clones from colony banks by suppression or complementation tests, *Methods Enzymol.*, 68, 369-408 (1979)
- (28) Holloway, B. W., and Morgan, A. F.: Genome organization in *Pseudomonas*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 40, 79-105 (1986)
- (29) Inouye, S., Nakazawa, A., and Nakazawa, T.: Molecular cloning of TOL genes *xyiB* and *xyiE* in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 145, (1981)
- (30) Lehrbach, P. R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, H.-J., and Timmis, K. N.: Enzyme recruitment in vitro: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13, *J. Bacteriol.*, 158, 1025-1032 (1984)
- (31) Shine, J., and Dalgarno, L.: Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes, *Nature*, 254, 34-38 (1975)
- (32) Thony, B., and Hennecke, H.: The -24/-12 promoter comes of age, *FEMS Microbiol. Rev.*, 63, 341-358 (1989)
- (33) 第2章 (10)の文献
- (34) 第2章 (12)の文献
- (35) Shingler, V., Franklin, F. C. H., Tsuda, M., Holroyd, D., and Bagdasarian, M.: Molecular analysis of a plasmid encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600, *J. Gen.*

Microbiol., 135, 1083-1092 (1989)

- (36) Nurk, A., Kasak, L. and Kivisaar, M.: Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and 8
- (37) 第2章 (9)の文献
- (38) 第2章 (11)の文献
- (39) Byrne, A. M., Kukor, J. J., and Olsen, R. H.: Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene 3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, *Gene*, 154, 65-70 (1995)
- (40) Stainthorpe, A. C., Murrell, J. C., Salmond, G. P. C., Dalton, H., and Lees V.: Molecular analysis of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Arch. Microbiol.*, 152, 154-159 (1989)
- (41) Stainthorpe, A. C., Lees V., Salmond, G. P. C., Dalton, H., and Murrell, J. C.: The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Gene*, 91, 27-34 (1990)
- (42) West, C. A., Salmond, G. P. C., Dalton, H., and Murrell, J. C.: Functional expression in *Escherichia coli* of protein B and C from soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1301-1307 (1992)
- (43) 浄原法蔵, 滝沢昇: 芳香族炭化水素ジオキシゲナーゼの遺伝子, *バイオサイエンスとインダストリー*, 49, 617-621 (1991)
- (44) Suzuki, M., Hayakawa, T., Shaw, J. P., Rekik, M., and Harayama, S.: Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system, *J. Bacteriol.*, 173, 1690-1695 (1991)
- (45) Neidle, E. L., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., Rekik, M., and Harayama, S.: Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenase, *J. Bacteriol.*, 173, 5385-5395 (1991)
- (46) Harayama, S., Polissi, A., and Rekik, M.: Divergent evolution of chloroplast-type ferredoxins, *FEBS Lett.*, 285, 85-88 (1991)
- (47) 佐伯和彦: 光合成細菌の多様なフェレドキシン, *化学と生物*, 31, 750-754 (1993)
- (48) Powlowski, J. and Shingler, V.: In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600, *J. Bacteriol.*, 172, 6834-6840 (1990)
- (49) Nishihara, T., Yamada, T., Takano, K., Osada, S., Nishikawa, J., and Imagawa, M.:

- Characterization of *pheB* gene encoding catechol 2,3-dioxygenase, *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 181-183 (1994)
- (50) Bartilson, M. and Shingler, V.: Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600, *Gene*, 85, 233-238 (1989)
- (51) Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene*, 33, 103-119 (1985)
- (52) Shingler, V., Bartilson, M., and Moore, T.: Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators, *J. Bacteriol.*, 175, 1596-1604 (1993)
- (53) Inouye, S., Nakazawa, A., and Nakazawa, T.: Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida*, *Gene*, 66, 301-306 (1988)
- (54) Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J., and Kustu, S.: Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers, *Science*, 243, 629-635 (1989)
- (55) Shingler, V., and Pavel, H.: Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds, *Mol. Microbiol.*, 17, 505-513 (1995)

## 第五章

- (1) 緒論 (21)の文献
- (2) Shields, M. S. and Reagin, M. J.: Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3977-3983 (1992)
- (3) 第4章 (11)の文献
- (4) 第4章 (12)の文献
- (5) Jahng, D. and Wood, T. K.: Trichloroethylene and chlorofolm degradation by a recombinant *Pseudomonad* expressing soluble methane monooxygenase from *Methlosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2473-2482 (1994)
- (6) 緒論(27)の文献
- (7) 中澤晶子：炭化水素資化系，蛋白質核酸酵素，26, 408-412 (1981)
- (8) 中澤晶子：微生物学基礎講座8，遺伝子工学，四章シュードモナス，共立出版，pp106-133 (1987)

## 雑誌掲載論文等

### 論文

- (1) Fujita, M., Hashimoto, M., Takeo, M., and Hagino, K.  
Plasmid-coded degradation of salicylate using the catechol cleavage pathway of the host  
J. Ferment. Bioeng., 67, 286-290 (1989)
- (2) 藤田正憲, 橋本 奨, 武尾正弘, 萩野貴世子  
排水処理のための遺伝子操作と育種*Pseudomonas*属細菌の基質分解特性に関する研究  
下水道協会誌, 26, 16-24 (1989)
- (3) 池 道彦, 日置 潤一, 片岡 孝治, 武尾 正弘 (1995)  
フェノール分解遺伝子によるトリクロロエチレンの分解  
環境技術, 24, 240-243 (1994)
- (4) Fujita, M., Ike, M., Hioki, J., Kataoka, K., and Takeo, M.  
Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes, J. Ferment. Bioeng., 79, 100-106 (1995)
- (5) Takeo, M., Maeda, Y., Okada, H., Miyama, K., Mori, K., Ike, M. and Fujita, M.  
Molecular cloning and sequencing of the phenol hydroxylase gene from *Pseudomonas putida* BH  
J. Ferment. Bioeng., 79, 485-488 (1995)
- (6) 池 道彦, 片岡孝治, 武尾正弘, 藤田正憲  
土壌中のフェノール分解菌の存在量とそのトリクロロエチレン分解能  
水環境学会誌, 19 (1996) (印刷中)
- (7) 片岡 孝治, 池 道彦, 藤田 正憲, 武尾 正弘  
フェノール分解菌によるトリクロロエチレンの分解  
第3回生物利用新技術研究シンポジウム論文集, pp11-14 (1995)

### 著書・解説等

- (1) 武尾正弘, 前田嘉道, 池 道彦, 藤田正憲  
環境浄化のための遺伝子組換え系とその利用  
水, 34, 65-74 (1992)
- (2) 池 道彦, 藤田 正憲, 武尾 正弘  
地下水・土壌汚染の現状と対策～自然環境の復元をめざして～ (社団法人日本水環境

学会関西支部編) , 4.有機塩素化合物の浄化対策, 4-1.微生物処理, 5)フェノール分解菌による分解, 環境技術研究協会, 168-174 (1995)

#### 国際会議発表等

(1) Fujita, M., Ike, M., Kataoka, K., and Takeo, M.(1995)

Comparative studies on trichloroethylene(TCE) degradation by phenol degrading bacteria

Japan-Germany Work Shop on Bioremediation, Tokyo, 1995.12.4-12.5., Program and Abstracts