

VII-27

内分泌攪乱物質スチレン分解微生物の単離と
16SrRNA 塩基配列に基づく分類

○東北学院大学 学生員 鈴木 祐介、前澤工業（株） 正会員 及川 栄作
東北学院大学 正会員 石橋 良信

1. はじめに

発泡ポリスチレン（発泡スチロール）はスチレンモノマーの重縮合を繰り返すことによって形成されるので、衝撃緩衝性に優れ、任意の形に加工することが容易で、安価であることから、家電製品の梱包剤としてその成形体が大量に使用されている。

発泡スチロールの処理法は従来焼却や埋め立てによって来たが、最近は回収およびリサイクル利用が進んで来ている。しかしながら、焼却による処理は、焼却炉の寿命を縮めたり、悪臭や二酸化炭素を発生すると共に、ダイオキシン発生の懸念がある。埋め立てによる処理は発泡スチロールを分解する微生物は知られていないことから、土中に留まると考えられるが、なんらかの原因で溶け出て地下水等に混入した場合、スチレンモノマーおよびポリスチレンが内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンの一つとしてリストアップされていることからその管理や汚染状況把握が課題になっている。

スチレンのエストロゲン作用の最初の報告は 1993 年の Colborn ら¹⁾によるが、1998 年の厚生省のまとめによる「内分泌かく乱物質の健康影響に関する検討会中間報告書」の中でスチレンはエストロゲン受容体等に対する結合能は認められないとしながら、トリブチルスズのように酵素阻害やダイオキシンのように他の受容体に結合してその作用を示すタイプである場合もあるため、内分泌攪乱作用自体は否定できないとしている²⁾。

本研究はこのような発泡スチロールやスチレンの処理に遺伝子工学を摘要してゼロエミッション処理することを最終的な研究目標としている。その具体的な方法は二つのプロセスから成っており、一つは発泡スチロール融解剤であるリモネンを生産および分泌する生物を作製し、発泡スチロールを微生物を用いて融解させることである。もう一つは発泡スチロール融解物のスチレンやポリスチレンを資化する細菌を単離し、この細菌を利用してコンポスト処理を行うことである。そこで、本研究は二つ目のプロセスのコンポスト処理に役立てるためにスチレンを資化する微生物を環境中から単離し、単離した微生物の 16S リボソーム RNA 塩基配列を決定して分類を試みた。

2. 研究方法

スチレン資化菌の単離は Kevin らの方法³⁾に従った。この方法はスチレン分解における初期段階で働くスチレンモノオキシダーゼがインドール（無色）をインディールブルー（青色）に酸化させる反応も触媒することを原理としたもので、スチレン資化菌はインドールを塗抹した寒天培地上に青色のコロニーとして容易に識別できる。

スチレン資化菌の単離に用いた土壌試料は仙台市内の国道 4 号線の路肩または山形市大字八森より採取した。20 g の土は生理食塩水で懸濁し、遠心した。遠心後の上清をスチレンを炭素原とする最小培地に植え、30℃で一週間振とう培養した。濁りが確認された培養液をインドールの塗抹したプレートに塗抹し、

室温で暗所に 7 日から 10 日間静置培養した。青くなったコロニーを 50 ml の 1xLB 培地に植え継ぎ一晚培養した。菌体は遠心分離して集めた。トータル DNA は菌体にリゾチーム処理、SDS-proteinase K 処理、フェノール:クロロホルム処理、エタノール沈澱処理を行って調製した。DNA は 20～100 μl の TE 溶液に溶解した。PCR は次の条件で行った。94℃ 1 分, 60℃ 45 秒, 72℃ 45 秒を 25 サイクル、72℃ 10 分を 1 サイクル。PCR プライマーは全微生物の 16S リボソーム RNA に対応する 520F プライマーおよび 1400R プライマーを用いた。PCR 産物は pGEM-Tvector (プロメガ) に挿入し、大腸菌に導入してクローン化した。塩基配列は 310 Genetic Analyzer(パーキンエルマー) を用いて決定し、データベースとの相同性解析は遺伝情報解析ソフトウェア Genetyx MAC ver.8 を用いて行った。

3. 研究結果

- 1) スチレン資化菌を単離する際の指標として用いられている、インドール（無色）をインディーゴブルー（青色）に酸化させる反応を示す細菌を十数株単離することができた。
- 2) 単離した細菌のうち、6 株の 16S リボソーム RNA 塩基配列に基づく分類を試みたところ、表-1 に示す微生物と高い相同性が示された。

表-1 16S リボソーム RNA に基づく分類結果

菌 株 名	分 類 結 果	相同性	単離場所
SD-1、SD-4、SD-9	<i>Aureobacterium testaceum</i>	94.7%	仙台市 国道 4 号線
	<i>Microbacterium arborescens</i>	94.7%	
	<i>imperial</i>	94.7%	
	<i>laevaniformans</i>	94.7%	
SD-2	<i>Arthrobacter</i> sp.	94.7%	
SD-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	98.9%	
STR-Y-O	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	山形市
	<i>cereus</i>	99%	大字八森

(SD-1、SD-4、SD-9 は同種であると考えられる)

4. おわりに

その後、*Pseudomonase* sp.と分類された SD-10 株および *Bacillus thuringiensis* と分類された STR-Y-O 株のスチレン分解能をガスクロマトグラフ分析計を用いて調べる実験を試みている。講演会ではこの結果についても発表する考えである。

参考文献

1) Colborn, T., *et al.* (1993) EHP, 101(5), 378-84
2) http://www.mhw.go.jp/search/docj/shingi/s9811/s1119-2_13.html#2-2 (1998)
3) Kevin E. O., *et al.*, (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63 pp. 4287-4291