

B-10 *Pseudonocardia*属細菌及び*Rhodococcus*属細菌の 1,4-ジオキサン分解ポテンシャルの評価

○井上 大介^{1,2*}・角田 翼¹・澤田 和子²・森田 雅恵²
池 道彦³・清 和成^{1,2}

¹北里大学大学院医療系研究科環境医科学群（〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1）

²北里大学医療衛生学部健康科学科（〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1）

³大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1）

* E-mail: d.inoue@kitasato-u.ac.jp

1. はじめに

1,4-ジオキサンは、環状エーテル構造を有する合成有機化合物であり、主に有機合成の反応溶剤として汎用されている。また、エチレンオキシド反応や界面活性剤の製造工程において副生成することが知られている。1,4-ジオキサンは、水と任意に混和する上、揮発性、固体への吸着性、光分解性、加水分解性、生分解性がいずれも低い。また、水中での残留性が極めて高い。また、急性及び慢性毒性に加え、発がん性の疑いもあることから、水環境の1,4-ジオキサン汚染による健康影響の可能性が懸念され、近年、水道水質基準、水質環境基準、及び排水基準が設定された。しかし、河川水や地下水において環境基準を超過する1,4-ジオキサン汚染は既に顕在化しており^{1,2}、浄化技術の開発が求められている。

現状では、紫外線やオゾン、過酸化水素による酸化を併用した促進酸化法が1,4-ジオキサン汚染水の処理に唯一有効であるが、大量のエネルギー投入とコストを要する上、共存物質による無効消費のために1,4-ジオキサン処理効率が低下する可能性がある^{3,4}など、課題も多く残されている。他方、1,4-ジオキサンは古くから生物難分解性（化学物質審査規制法に基づく好気的生分解試験における14日間のBOD減少率0%）と考えられてきたが、近年、1,4-ジオキサンを資化する、あるいはテトラヒドロフラン（THF）などを一次基質とする共代謝によって分解する複数の細菌が報告され^{5,12}、微生物分解が可能であることが明らかになってきた。微生物の酵素反応は化学的処理に比べて基質特異性に優れることから、分解菌を用いた浄化法は多様な共存物質を含む環境水に対しても安定した浄化効果が期待できる。

これまでに分離された1,4-ジオキサン分解菌の多くは放線菌に属し、特に*Pseudonocardia*属と*Rhodococcus*属に分類されるものが比較的多い。そこで本研究では、両属の1,4-ジオキサン分解ポテンシャルについて理解を深め、汚染浄化に役立つ知見を得るため、両属から選定した複数の代表菌株の1,4-ジオキサン資化能及びTHFを一次基質とする共代謝能を調査するとともに、分解関与遺伝子の解析を行った。

2. 実験方法

(1) 供試菌株

*Pseudonocardia*属、*Rhodococcus*属の各属内における系統分類学的位置関係を考慮して、*Pseudonocardia*属から13種、*Rhodococcus*属から12種を選定し、各々の種の基準株を（独）理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM）より購入し、本研究の供試菌株として用いた（表1）。

(2) 分解試験

各供試菌株は、MGY培地（malt extract 10g/L, glucose 4g/L, yeast extract 4g/L, pH 7.3）を用いて培養した後、遠心分離（8,500×g, 4℃, 5分）によって菌体を回収し、滅菌生理食塩水で2回洗浄して、各分解試験に用いた。分解試験では、炭素源を下記の濃度で加えた20mlの無機塩培地（pH 7.0）⁹を含む50ml容バイアル瓶に、各菌株をOD₆₀₀が1.0になるように接種した。炭素源として、資化試験では20mg/Lあるいは100mg/Lの1,4-ジオキサンを単独で添加し、共代謝試験では20mg/Lの1,4-ジオキサンとともに

表1 供試菌株の1,4-ジオキサン資化能及びTHFを一次基質とした共代謝能

属	供試菌株	資化能 ^a	共代謝能 ^b	
			THF	1,4-ジオキサン
<i>Pseudonocardia</i>	<i>P. acaciae</i> JCM 16707 ^T	-	++	++
	<i>P. ammonioxydans</i> JCM 12462 ^T	-	-	-
	<i>P. asaccharolytica</i> JCM 10410 ^T	-	+ (19%)	+ (55%)
	<i>P. autotrophica</i> JCM 4348 ^T	-	+ (25%)	-
	<i>P. carboxydvorans</i> JCM 14827 ^T	-	+ (55%)	-
	<i>P. chloroethenivorans</i> JCM 12679 ^T	-	-	-
	<i>P. dioxanivorans</i> JCM 13855 ^T	+	++++	++++
	<i>P. halophobica</i> JCM 9421 ^T	-	++	-
	<i>P. hydrocarbonoxydans</i> JCM 3392 ^T	-	+ (50%)	-
	<i>P. petroleophila</i> JCM 3378 ^T	-	+ (23%)	-
	<i>P. sulfidoxydans</i> JCM 10411 ^T	-	+ (8%)	-
	<i>P. thermophila</i> JCM 3095 ^T	-	+ (33%)	-
	<i>P. yunnanensis</i> JCM 9330 ^T	-	+ (59%)	-
<i>Rhodococcus</i>	<i>R. aetherivorans</i> JCM 14343 ^T	+	++++	++++
	<i>R. chlorophenolicus</i> JCM 7439 ^T	-	-	-
	<i>R. corallinus</i> JCM 3199 ^T	-	-	-
	<i>R. corynebacterioides</i> JCM 3376 ^T	-	-	-
	<i>R. equi</i> JCM 1311 ^T	-	-	-
	<i>R. erythropolis</i> JCM 3201 ^T	-	-	-
	<i>R. gordoniae</i> JCM 12658 ^T	-	-	-
	<i>R. opacus</i> JCM 9703 ^T	-	-	-
	<i>R. pyridinivorans</i> JCM 10940 ^T	-	-	-
	<i>R. rhodochrous</i> JCM 3202 ^T	-	-	-
	<i>R. ruber</i> JCM 3205 ^T	-	-	-
	<i>R. zopfii</i> JCM 9919 ^T	-	-	-

^a -, 14日以内に分解されず; +, 14日以内に分解。

^b -, 14日以内に分解されず; +, 分解されたが14日後に一部残存(14日後の残存率); ++, 14日以内に残存率0%; +++, 7日以内に残存率0%; +++++, 3日以内に残存率0%。

50mg/LのTHF(一次基質)を添加した。また、供試菌株を接種しないコントロール系も作成した。分解試験は、28℃, 120rpm(回転振盪培養)の条件下において、14日間実施した。試験期間中は、培養液の一部を経時的に採取し、遠心分離(20,000×g, 4℃, 5分)後の上清を孔径0.45μmのセルロースアセテートフィルターでろ過し、GC-FID(GC-2014; 島津製作所)を用いて1,4-ジオキサン及びTHFの残存濃度を測定した。

(3) 分解関与遺伝子の解析

1,4-ジオキサンやTHFの好気分解に関与することが知られている可溶性二鉄モノオキシゲナーゼ(SDIMO)遺伝子の解析を行った。既往研究で設計されたプライマーセット[NVC57, NVC66]^[3]を用いたPCRを行い、SDIMO遺伝子の存在を確認した。また、検出されたPCR産物をシーケンス解析に供し、BLAST検索によって類似の配列を調査した。

3. 実験結果

(1) 1,4-ジオキサン資化能

1,4-ジオキサン資化試験の結果を表1に整理している。

25種の供試菌株の内、*P. dioxanivorans* JCM 13855^T及び*R. aetherivorans* JCM 14343^Tにおいてのみ、1,4-ジオキサンの分解が観察された(図1(A))。このため、1,4-ジオキサン資化能は、*Pseudonocardia*属、*Rhodococcus*属に共通の特性ではなく、限られた種または株に特異的な特性であることが示唆された。*P. dioxanivorans* JCM 13855^Tは元々1,4-ジオキサン資化菌として分離された菌株であり⁹⁾、妥当な結果である。他方、*R. aetherivorans* JCM 14343^Tはメチルルエブチルエーテルを分解することが知られているが¹⁴⁾、1,4-ジオキサン分解能は本研究で初めて確認された。

(2) 1,4-ジオキサン共代謝能

共代謝分解試験の結果、1,4-ジオキサン資化能を有する2種に加えて、*P. acaciae* JCM 16707^T、*P. asaccharolytica* JCM 10410^Tにおいて、THF分解に続いて1,4-ジオキサンの分解が観察されたことから(図1(B)、表1)、これら2種が1,4-ジオキサンを共代謝分解することが明らかになった。また、*Pseudonocardia*属の8種では、1,4-ジオキサンの分解は観察されなかったが、THF分解が観察された。このため、*Pseudonocardia*属の多くの種がTHF分解能を保有しており、その一部は1,4-ジオキサンの共代謝分解も可能であることが示唆された。一方、*Rhodococcus*属では、THF分解能や1,4-ジオキサン分解能は多くの種が共通し

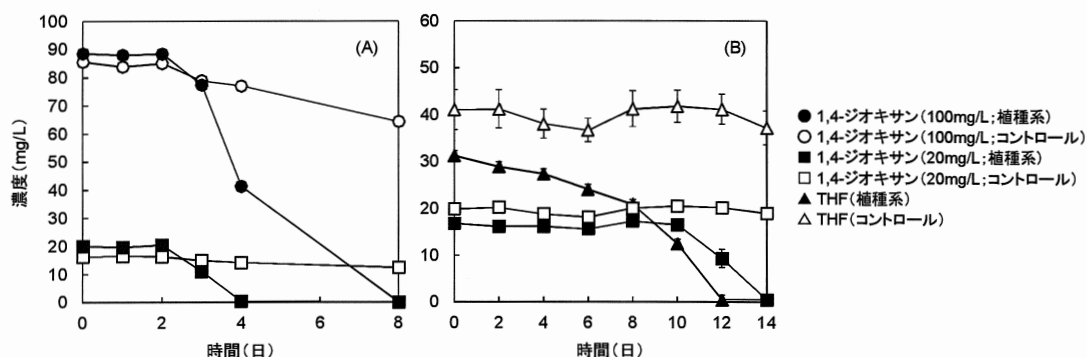


図1 *P. dioxanivorans* JCM 13858^Tによる1,4-ジオキサン資化(A), 及び *P. acaciae* JCM 16707^TによるTHFを一次基質とした1,4-ジオキサン共代謝(B)

て保有する特性ではなく、一部の種あるいは株に特異的な特性であることが示唆された。

(3) SDIMO遺伝子の解析結果

1,4-ジオキサンの資化能、共代謝能を有する4種と、1,4-ジオキサン分解能は確認されなかったがTHFを分解した8種を対象として、THFや1,4-ジオキサンの初発酸化に関与するSDIMO遺伝子の解析を行った。全ての種においてPCR産物が得られたことから、シーケンス解析を行った結果、*P. dioxanivorans* JCM 13855^TのSDIMO遺伝子は、既に解読されている同株の該当配列に一致した。これ以外の11種の内、*P. carboxydvorans* JCM 14827^T、*P. halophobica* JCM 9421^T、*R. aetherivorans* JCM 14343^Tを除く8種のSDIMO遺伝子は、*Pseudonocardia* sp. TY-7のプロパンモノオキシゲナーゼ遺伝子（相同性：91-95%）及び*P. dioxanivorans* JCM 13855^Tが保有するメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子（相同性：90-96%）と高い相同性を示したが、共代謝能が確認された*P. acaciae* JCM 16707^Tでは他の種に比べて既知種のSDIMO遺伝子との相同性が低かった。また、*R. aetherivorans* JCM 14343^TのSDIMO遺伝子は、*Rhodococcus* sp. RR1及び*Rhodococcus* sp. SMV105のプロパンモノオキシゲナーゼ遺伝子と99%の相同性を示した。このことから、これらの種が保有するSDIMO遺伝子は主にプロパン／メタンモノオキシゲナーゼ遺伝子であり、属ごとに保存されていることが示唆された。一方、*P. carboxydvorans* JCM 14827^T及び*P. halophobica* JCM 9421^TのSDIMO遺伝子は、他とは大きく異なり、相同性の高い既知遺伝子を明らかにすることはできなかった。

4. まとめ

本研究では、*Pseudonocardia*属及び*Rhodococcus*属の1,4-

ジオキサン分解ポテンシャルについて検討した。その結果、*Rhodococcus*属においては、一部の種のみが1,4-ジオキサン資化能を保有しており、大部分の種は1,4-ジオキサン分解能をもたないことが明らかになった。また、*Pseudonocardia*属においても、限られた種のみが1,4-ジオキサン資化能を保有したが、多くの種がTHF分解能を有しており、さらに、それらの一部は1,4-ジオキサンを共代謝分解することが明らかになった。今後は、本研究で確認された1,4-ジオキサン分解能の相違（資化／共代謝／THFのみ分解）の原因について詳細に調査することが必要である。

謝辞：本研究は、環境省環境研究総合推進費（5B-1201）による助成を受けて実施した。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 環境省 (2012) 平成23年度公共用水域水質測定結果
- 2) 環境省 (2012) 平成23年度地下水測定結果
- 3) Adams et al. (1994) *Environ. Sci. Technol.* 28, 1812-1818.
- 4) Kosaka et al. (2000) *Water Sci. Technol.* 42, 353-361.
- 5) Bernhardt and Diekmann (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 120-123.
- 6) Parales et al. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4527-4530.
- 7) Mahendra and Alvarez-Cohen (2006) *Environ. Sci. Technol.* 40, 5435-5442.
- 8) Vainberg et al. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5218-5224.
- 9) Kim et al. (2009) *Biodegradation* 20, 511-519.
- 10) Sei et al. (2011) *J. Water Environ. Technol.* 11, 11-19.
- 11) Sun et al. (2011) *Biodegradation* 22, 651-659.
- 12) Sei et al. (2013) *Biodegradation* 24, 665-674.
- 13) Coleman et al. (2006) *Environ. Microbiol.* 8, 1228-1239.
- 14) Goodfellow et al. (2004) *System. Appl. Microbiol.* 27, 61-65.