

2 種類の微生物による 4-クロロビフェニルの全分解

飛田修作 久田美子 堤 充紀

Total Degradation of 4-Chlorobiphenyl by Two Bacterial Strains

Shusaku TOBITA, Yoshiko HISADA and Mitsutoshi TSUTSUMI

PCBを分解する微生物の分離についてはこれまでも多数報告されているが、いずれの分離株もPCBをクロロ安息香酸にまで分解するにすぎない。環境中のPCBが微生物分解を受けて塩化物イオンと二酸化炭素と水とに完全分解されるためには、これらのPCB分解菌のほかにもクロロ安息香酸を分解する微生物の関与が不可欠なわけである^{1,2)}。

前報^{3,4)}で報告した最も簡単なPCBの一つである4-クロロビフェニル(4CB)を分解する微生物(4CB分解菌)のスクリーニングの場合も、分離株は4CBを4-クロロ安息香酸(4CBA)にまで分解するにとどまり、4CBAを分解する能力を兼ね備えた4CB分解菌はまだ見いだされていない。

クロロ安息香酸分解菌については、4CBA分解菌の分離例が報告されているが⁵⁻⁷⁾、それらの分離株については4CBAからの塩化物イオンの遊離やいくつかの中間代謝物が生成することは明らかにされているものの、ベンゼン環の開裂のあと有機炭素が二酸化炭素にまで分解されたことを実証した例は見あたらない。また、同じ分離源から4CB分解菌と4CBA分解菌の両者を分離した例もまだ見うけられず、自然界での両者の共存とその果たす役割についても知見に乏しい。そこで今回は前報の4CB分解菌のスクリーニングに次いで、前回と同一の土壌試料を用いて4CBA分解菌を探索し、先の4CB分解菌との組み合わせによる4CBの全分解と中間代謝物について検討したので報告する。

材料および方法

1. 略 称

本報では次の略称を用いる。CBA(クロロ安息香酸)、4CBA(4-クロロ安息香酸)、4CB(4-クロロビ

フェニル)、4HBA(4-ヒドロキシ安息香酸)、PCA(プロトカテック酸、3,4-ジヒドロキシ安息香酸)、DOC(溶存有機炭素)、OD(島津ボッシュロム・スペクトロニック20A、12.7mm試験管セルによる600nmでの吸光度)。

2. 試 薬

4CBは東京化成製一級、4CBAは東京化成製特級、4HBA、PCAは和光純薬製一級試薬を用いた。

3. 微生物と培養条件

実験には4CB分解菌として1171株を、また4CBA分解菌として117c株を用いた。1171株の分離とPCBの分解特性については前報^{3,4)}で報告した。1171株は*Pseudomonas* sp.と推定されるが、まだ確定的ではない。117c株は1171株と同じ分離源の一般家庭の庭土から今回新たに分離したもので、4CBAを唯一の炭素源として増殖する3種の分離株のうちの一つである。4CBA分解菌の集積培養には、前報同様、0.001%のL-アスコルビン酸を含むPAS培地(pH7.0)^{8,9)}を用い、基質の4CBAは粉末のまま500ppm($\mu\text{g}/\text{ml}$)の濃度になるように個々の培養フラスコに加えた。なお、PAS培地は1ℓあたり次の成分を含有する。K₂HPO₄ 4.4g, KH₂PO₄ 1.7g, NH₄Cl 2.1g, MgSO₄ 0.2g, MnSO₄・H₂O 50mg, FeSO₄・7H₂O 10mg, CaCl₂・2H₂O 3mg, L-アスコルビン酸 10mg。4CBA分解菌の分離には、500ppm相当の4CBAを溶かしたPAS培地に1.5%の寒天(ディフコ社製)を加えて調製したPAS寒天培地のほか、普通寒天培地(栄研製)を併用した。休止細胞を得るための分離株の増殖は、通常500ml三角フラスコ中500ppmの4CBAを含むPAS培地100mlを用いて振とう培養で行った。対数増殖期の培養液を遠心分離にかけ

て集菌し、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で2回洗ったのち、休止細胞は遠沈管のままベレット状で-20℃で使用直前まで保存した。培養温度はすべて30℃とし、振とう速度は120rpmとした。培養液の遠心分離はすべて4℃, 12,000rpm, 10分間の条件で行った。休止細胞を使った培養試験には0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を培地として用いた。

4. 117c株の4CBA分解能試験

117c株の休止細胞を200ppm (1.28mM) の4CBAを含むリン酸緩衝液100mlに氷冷しながら懸濁 (OD 0.45) させ、これを50mlずつ300ml三角フラスコ2個に二分し、片方を20時間振とう培養、他方を50時間静置培養した。培養開始時および培養期間中適宜、3ml宛各培養液を分取し、マイレクス (ミリポア社製0.45μm) を用いてろ過したろ液を4CBA、中間代謝物、塩化物イオン、DOCの各濃度を測定するための試料とした。

5. 4CBの全分解試験

100ml三角フラスコ中でリン酸緩衝液25mlに1171株休止細胞 (-20℃保存) を懸濁させ (OD 0.50), これに12.5mgの4CB粉末 (500ppm, 3.19mM相当) を加えて89時間振とう培養した。培養液を遠心分離にかけ、上澄をさらにマイレクスを用いてろ過した。この除菌後のろ液に117c株の休止細胞を加え (OD 1.32), 先と同じ条件で20時間振とう培養した。この間適宜、培養液の一部を分取し、そのマイレクスろ液を4CBAおよび塩化物イオンの各濃度を測定するための試料とした。

6. GC-MSによる中間代謝物の同定

100ml三角フラスコ中200ppm (1.28mM) の4CBAを含むリン酸緩衝液20mlに117c株休止細胞を懸濁させ (OD 0.50), 20時間静置培養後、濃塩酸を加えてpH2とし、遠心分離後の上澄を酢酸エチル10mlで2回抽出した。酢酸エチル層を減圧濃縮し、残渣に窒素ガスを吹きつけて乾固させ、N,O-ビストリメチルシリルアセトアミド0.5mlを加えて70℃で30分反応させて水酸基、カルボキシル基をトリメチルシリル (TMS) 化した後、GC-MS分析のための試料とした。

7. 分析条件

4CBA, 4HBA, PCAのHPLCによる分析条件は次のとおりである。カラム: Shim-pack CLC-ODS(M) 4.6mm (内径) × 25cm, 溶離液: メタノール-水-酢酸 (60:40:1), 検出器: UV (254nm)。塩化物イオン濃度の測定にはイオンクロマトグラフ (島津HIC-6A 電気伝導度検出器付) を用いた。培養液中

のDOC濃度の測定には全有機炭素計 (島津TOC-10B) を用い、試料のマイレクスろ液の全炭素濃度と無機性炭素濃度をそれぞれ測定し、両者の差からDOC濃度を求めた。4HBA, PCAの同定に用いたGC-MS分析はMS部に日本電子製JMS-DX 303を使用した。GCの分析条件は次のとおりである。カラム: SPB-5 (5%フェニルメチルシリコン), 0.2mm (内径) × 12.5m, 膜厚0.25μm (スペルコ社製), カラム温度: 50~140℃ (25℃/min), 140~250℃ (5℃/min) の2段昇温, 注入口温度: 280℃。MSの分析はEI法でイオン化電流300μA, イオン化電圧70V, スキャンレンジ10~500M/Z, スキャン速度1秒の条件で行った。

結 果

1. 117c株の4CBA分解能

図1に示したように、リン酸緩衝液中200ppm (1.28mM) の4CBAは117c株の休止細胞 (OD 0.45) により、18時間の振とう培養で初期濃度の99%以上が減少し、これに対応する理論量の塩化物イオンが遊離された。また、培養液中のDOC濃度は培養開始時の124ppm (μgC/ml) から18時間後の15ppmにまで減少し、この有機炭素の減少分 (109ppm) は4CBAの有機炭素の初期濃度 (107ppm) にはほぼ一致する。18時間後に残存しているDOCの濃度 (15ppm) は、培養開始時に休止細胞に伴ってもたらされた4CBA以外の有機物のDOC濃度 (17ppm) にはほぼ等しい。このように窒素源を含まない培地で基質濃度に相当するDOCが消失したことは、基質の4CBAが菌体の増殖に使われたのではなく、休止細胞のエネルギー源として消費され、二酸化炭素にまで無機化されて培養液の系外に消えたことを示す。以上の

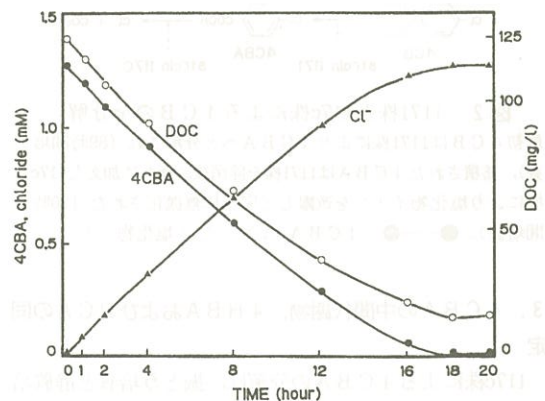


図1 117c株による振とう培養時の4CBA分解過程
4CBA (●—●) はHPLC, 塩化物イオン (▲—▲) はイオンクロマト, 溶存有機炭素 (DOC) (○—○) はTOC計でそれぞれ分析

ように、4 C B Aから塩化物イオンが遊離されたのみならず、減少した4 C B Aの理論量に相当する有機炭素が消失したので、ここに117c株による4 C B Aの全分解が立証された。

2. 1171株と117c株の組み合わせによる4 C Bの全分解

1171株が4 C Bを分解して4 C B Aを蓄積することは前報に示したとおりであるが、その分解液に117c株を加えて4 C B Aの分解を観察したものが図2である。すなわち、4 C Bの初期濃度500ppm (3.19mM) のリン酸緩衝液中で1171株休止細胞 (OD 0.50) により、振とう培養89時間後、4 C Bの89%に相当する4 C B A (2.84 mM) が蓄積された。除菌した培養液の滷液に117c株の休止細胞を加えたところ (OD 1.32)、蓄積されていた4 C B Aは振とう培養20時間後に99%以上消失し、これに対応する理論量の塩化物イオンが遊離された。図1の結果とあわせてみると4 C Bは2種類の微生物、4 C B分解菌1171株と4 C B A分解菌117c株による2段階の培養で全分解されたものと解釈される。

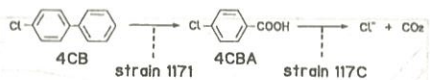
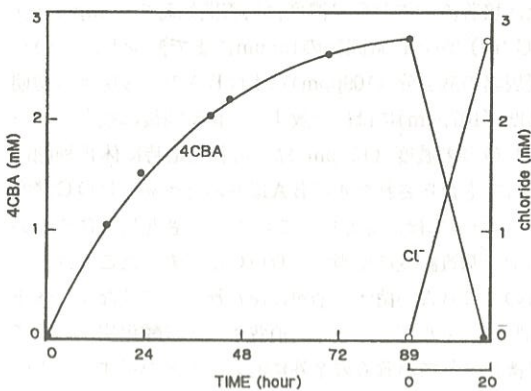


図2 1171株と117c株による4 C Bの全分解

最初4 C Bは1171株により4 C B Aへと分解され (89時間培養)、蓄積された4 C B Aは1171株を除菌後、新たに加えた117c株により塩化物イオンを遊離して完全に無機化された (20時間培養)。●—●: 4 C B A, ○—○: 塩化物イオン

3. 4 C B Aの中間代謝物、4 H B AおよびP C Aの同定

117c株による4 C B Aの分解は、振とう培養と静置培養とで、培養期間中のH P L Cクロマトグラムの経時変化に顕著な相違がみられた。静置培養の場合、H P L Cクロマトグラムに中間代謝物と思われる2つのピークが認められ、これら2つのピークは4 H B AとP C Aの標

品と保持時間が一致し、さらにTMS化処理後のG C - M S分析により、それぞれ確認された。すなわち、200 ppmの4 C B Aを含むリン酸緩衝液に117c株の休止細胞を懸濁 (OD 0.50) させて20時間静置培養した場合、塩酸性 (pH 2) で酢酸エチル抽出したときの酢酸エチル層のH P L Cクロマトグラムは図3に示したとおりである。この時の培養液中の各成分濃度は4 C B Aが41 ppm (分解率79%), 4 H B Aは32ppm, P C Aは9ppmであった。この酢酸エチル抽出物のTMS化後のG C - M Sトータルイオンクロマトグラムを図4に示したが、主要な3つのピーク (No.1~3) は、それぞれ4 C B A, 4 H B A, P C Aの標品のTMS誘導体の保持時間およびマススペクトルに一致した。すなわち、図5、図6に示したとおり、ピークNo.2のマススペクトルは4 H B Aの標品のTMS誘導体のマススペクトル [m/z 282 (M⁺), 267 (M-CH₃), 223, 193 (M-OTMS), 126] に一致し、ピークNo.3のマススペクトルはP C Aの標品のTMS誘導体のマススペクトル [m/z 370 (M⁺), 355 (M-CH₃), 311, 281 (M-OTMS), 193] に一致して、中間代謝物としての4 H B AとP C Aが同定された。図1に示した

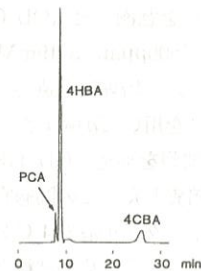


図3 117c株による4 C B A代謝物のH P L Cクロマトグラム

20時間静置培養後の酢酸エチル抽出物について分析したもの (本文参照)

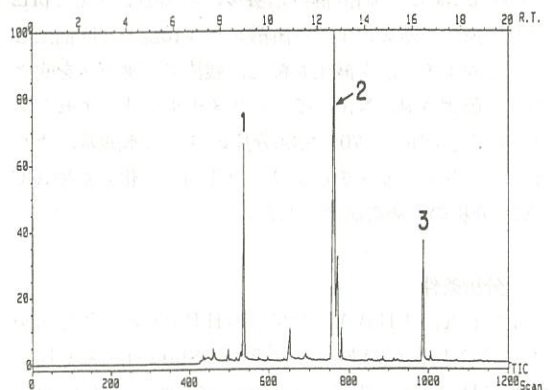


図4 117c株による4 C B A代謝物のG C - M Sトータルイオンクロマトグラム

20時間静置培養後の酢酸エチル抽出物をTMS化処理して分析したもの

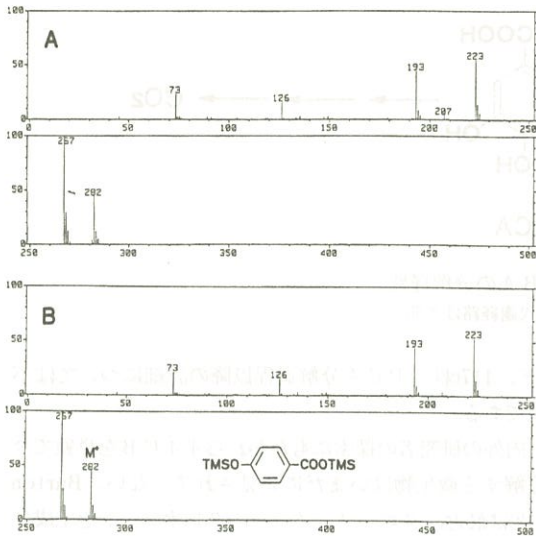


図5 マススペクトルによる4HBAの同定
A: 図4のピークNo.2, B: 4-ヒドロキシ安息香酸標品のTMS誘導体

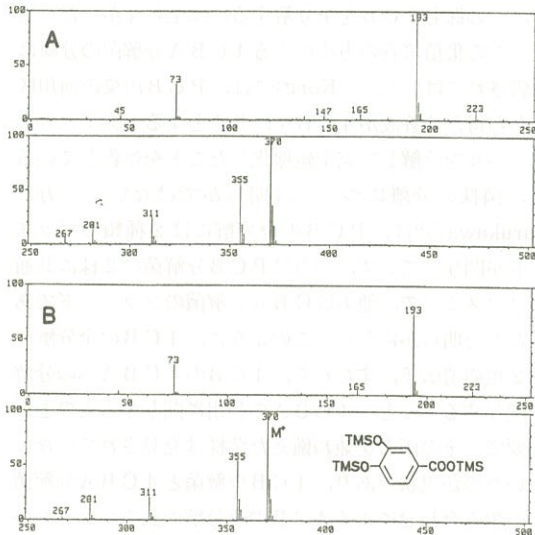


図6 マススペクトルによるPCAの同定
A: 図4のピークNo.3, B: プロトカテック酸標品のTMS誘導体

117c株の振とう培養による4CBA分解過程では、HPLCクロマトグラムに中間代謝物の4HBAとPCAが痕跡程度認められたただけであったが、他の条件は同一のまま振とう培養を静置培養に変えると、4CBAの分解過程が図7のようになる。すなわち、47時間後に4CBAが消失し、これに対応する理論量の塩化物イオンが遊離されたが、4HBAはしばらくは残存し、さらにこれより3時間後の50時間目に完全に消失した。この間、PCAの濃度は4HBAよりもはるかに低く、図7には現れてはこない。また、DOC濃度の減少は最初の12時

間あたりまで振とう培養の場合(図1)のような単純な変化ではない。これはベンゼン環が開裂せずに有機炭素がそのまま残っている中間代謝物4HBAの低濃度の存在と符合している。また、培養液中のDOC濃度は培養開始時の124ppmから4CBAが消失した47時間後の18ppmにまで減少し、この有機炭素の減少分(106ppm)は4CBAの初期濃度(107ppm)に匹敵し、振とう培養の場合と同様、4CBAの無機化による全分解を示している。

以上のように、静置培養により4CBAの中間代謝物として4HBAとPCAの存在が明らかとなり、さらに培養中のこれら中間体の消長から、117c株による4CBAの主要な分解経路は、4CBAが最初に脱塩素化されて4HBAとなり、次いでPCAを経てベンゼン環が開

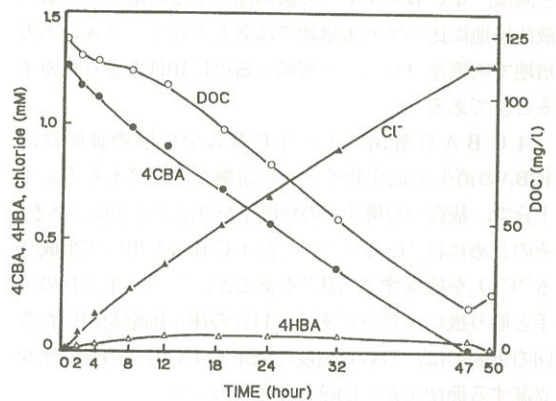


図7 117c株による静置培養時の4CBA分解過程
●—●: 4CBA, △—△: 4HBA, ▲—▲: 塩化物イオン, ○—○: 溶存有機炭素(DOC)

裂してさらに分解されていくものと解釈される(図8)。振とう培養の場合4CBAの中間代謝物の蓄積がほとんど見られなかったが、中間代謝物の生成と分解の速度が異なるだけで分解経路は静置培養の場合と本質的に違いがないと考えられる。図8に示した4CBAの分解経路の中でPCAのベンゼン環の開裂位置とその後の二酸化炭素に至る過程は残された検討課題である。

考 察

4CBA分解菌117c株は前報の4CB分解菌1171株を分離した一般家庭の庭土から今回新たに分離したもので、このように同じ分離源から4CB分解菌と4CBA分解菌の両者を分離した例は、これがはじめてと思われる。このほか、先の4CB分解菌スクリーニング時の土壤試料から4CBAを唯一の炭素源として増殖できる株を多数分離したが(未発表)、なかでも117c株を1171株との組

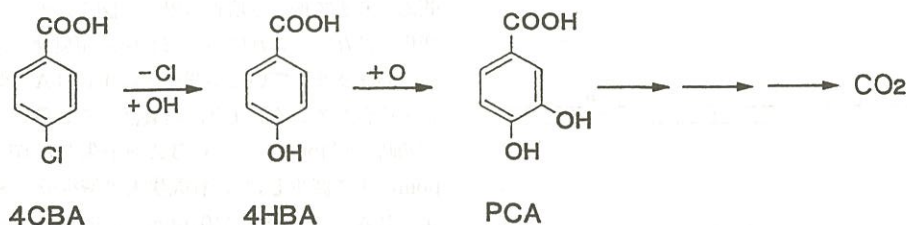


図8 117c株による4CBAの分解経路
PCAから二酸化炭素に至る代謝経路は不明

み合わせて今回の実験に用いた理由は、117c株の4CBA分解能が高く、しかも同じ分離源から分離されている1171株の4CB分解能と分解過程がこれまでに検討済みであったからである。なお、117c株の特徴は他の分離株と同様、4CBAを唯一の炭素源とする培地での増殖が液体培地に比べて寒天培地では著しく遅く、PAS寒天培地で明瞭なコロニーを形成するのに10日あまりを要することである。

4CBA分解菌による4CBA全分解の証明は、4CBAの消失と塩化物イオンの遊離だけではもちろん不十分で、基質の有機炭素の無機化を立証する必要がある。そのためには ^{14}C でラベルした4CBAを用いて生成する $^{14}\text{CO}_2$ を捕捉する方法¹⁰⁾もあるが、ラベル化合物の入手と取り扱いに難点がある。117cの休止細胞を用いた今回の実験では、DOC濃度の測定が4CBAの無機化を立証する簡便でかつ確かな手段となった。

4CBAの微生物分解は大別して2つの経路が知られている。すなわち、ベンゼン環から脱塩素化したのち環開裂するか、それともクロロカテコールを経て環開裂後に脱塩素化するかの2つの経路である。Hartmannら⁵⁾は酵素活性の測定結果を論拠に、分離したWR912株 (*Pseudomonas* sp.) が4CBAをはじめとする3種のCBAをクロロカテコール経路で分解すると報告している。一方、Klagesら⁶⁾は、土壌から分離した4CBA分解菌であるCBS3株 (*Pseudomonas* sp.) が4CBAを基質に増殖する際、4HBAとPCAを蓄積し、PCAはオルト開裂のあと β -ケトアジピン酸経路を経て分解されると報告している。またMarksら⁷⁾も下水処理汚泥から分離した4CBA分解菌のTM-1株 (*Arthrobacter* sp.) が4CBAを4HBA、PCAを経て分解すると報告している。本報での117c株の場合も、中間代謝物として4HBAとPCAが同定されたことにより、4CBAの分解はその脱塩素化にはじまり、そののちベンゼン環が開裂する分解経路の存在が明らかとなった。しかし、微生物によるPCAの環開裂位置と分解産物は2,3-ジオキソゲネース、3,4-ジオキソゲネース、4,5-ジオキソゲネースのいずれが関与するかによって異なり

^{11,12)}、117c株のPCA分解過程以降の詳細については不明である。

内外の研究者の探索にもかかわらず4CBを単独で全分解する微生物はいまだに発見されていない。Bartonら¹³⁾は最近、クロロフェノール、クレオソートを主成分とする木材の防腐剤で汚染された土壌を分離源に4CBAを集積培養の基質として、4CBAおよび4CBを唯一の炭素源、エネルギー源として増殖できる株を分離したが、この株も4CBを全分解するには至らなかった。また、この集積培養の方法による4CBA分解菌の分離は報告されていない。Kongら⁸⁾は、PCB汚染の河川底質から得た培養液が4CBをはじめとするモノクロロビフェニルを分解して完全無機化したことを報告しているが、菌株の分離については明らかではない。一方、Furukawaら⁹⁾は、PCBの全分解には2種類のプラスミドが関与していて、一方はPCB分解菌の2株に共通のプラスミドで、他方はCBA分解菌のプラスミドであることを明らかにした。このように、4CBの全分解には2組の遺伝子、すなわち、4CBの4CBAへの分解に関与するものと、4CBAの利用に関与するものが必要で、その両者を兼ね備えた菌株は発見されていないというのが現状であり、4CB分解菌と4CBA分解菌との組み合わせによる4CBの全分解の試みがいくつか報告されたのもこのためである。

Furukawaら⁹⁾は、*Acinetobacter* (pKF1) と遺伝子操作を施した *Pseudomonas putida* (pAC27) の2株を組み合わせたところ、7日間で4CBの98%以上の塩化物イオンが遊離されて4CBが全分解されたと報告している。この場合の中間代謝物は4-クロロカテコールであった。またSylvestreら¹⁴⁾は、4CB分解菌B-206株と4CBA分解菌CBS3株の混合培養液中では、前者単独の場合に比べて4CBの分解が速く、4CBAその他の代謝物の蓄積が見られないことを報告しているが、CBS3株はLingens⁹⁾から分与を受けたものである。

4CBを4CBAに分解する1171株に4CBAを全分解する117c株を組み合わせれば4CBの全分解は自明のことともいえるが、同じ分離源から分離した2種類の菌

株を用いて4 C Bの完全無機化による全分解を立証したのはこれが最初である。

摘 要

先に4-クロロビフェニル(4 C B)分解菌1171株を分離した同一の土壌から4-クロロ安息香酸(4 C B A)分解菌117c株を分離し、両者の組み合わせによる4 C Bの全分解を検討した。この117c株の休止細胞は4 C B Aから塩化物イオンを遊離させると同時に、減少した4 C B A量に相当する量の溶存有機炭素を減少させることから4 C B Aを全分解することがわかった。まず500ppmの4 C Bは1171株により4 C B Aへと分解され、次いで除菌後の汚液に117c株を加えたところ、蓄積されていた4 C B Aはすみやかに分解され、結局4 C Bは2種類の菌株により2段階の培養で全分解された。4 C B Aの中間代謝物として4-ヒドロキシン安息香酸(4 H B A)とプロトカテク酸(P C A)が同定され、培養中の中間代謝物の消長から、4 C B Aが最初に脱塩素化されて4 H B Aとなり、次いでP C Aを経てベンゼン環が開裂する4 C B Aの主要な分解経路が明らかとなった。しかし、ベンゼン環の開裂位置とその後の無機化に至る分解経路の詳細は残された検討課題である。

終わりに臨み、GC-MS測定の労をとられた日本電子および東レリサーチセンターの関係諸氏に深謝します。なお、本報の概要は日本薬学会第109年会(1989年4月、名古屋市)において発表した¹⁴⁾。

文 献

- 1) Furukawa, K. and Chakrabarty, A.M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 619~626 (1982)
- 2) Sylvestre, M. et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 192~195 (1985)
- 3) 飛田修作, 久田美子, 堤 充紀, 佐藤章夫 : 山梨衛公研年報, 31, 39~43 (1987)
- 4) 飛田修作, 久田美子, 堤 充紀, 佐藤章夫 : 日本化学会第57秋季年会講演予稿集II, p.943 (1988)
- 5) Hartmann, J., Reineke, W. and Knackmuss, H.-J. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 421~428 (1979)
- 6) Klages, U. and Lingens, F. : *Zbt. Bakt. Hyg., I. Apt. Orig. C 1*, 215~223 (1980)
- 7) Marks, T.S., Smith, A.R.W. and Quirk, A.V. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1020~1025 (1984)
- 8) 古川謙介 : 微生物の分離法 (山里一英ら編), pp. 667~675, R & D プランニング (1987)
- 9) Bedard, D.L. et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 761~768 (1986)
- 10) Kong, H.L. and Saylor, G.S. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 666~672 (1983)
- 11) Dennis, D.A., Chapman, P.J. and Dagley, S. : *J. Bacteriol.*, 113, 521~523 (1973)
- 12) Crawford, R.L., Bromley, J.W. and Perkins-Olson, P.E. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 614~618 (1979)
- 13) Barton, M.R. and Crawford, R.L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 594~595 (1988)
- 14) 飛田修作, 久田美子, 堤 充紀 : 日本薬学会第109年会講演要旨集V, p.118 (1989)