



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Clostridium bifermentans

DPH-1株によるテトラクロロエチレンの分解とその機構

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 張, よう喆 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2536

氏 名 (国籍)	張 悛 喆 (大韓民国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第195号
学位授与年月日	平成12年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	<i>Clostridium bifermentans</i> DPH-1株によるテトラクロロエチレンの分解とその機構
審査委員	主査 岐阜大学教授 高見澤 一 裕 副査 信州大学教授 入江 鏡 三 副査 静岡大学教授 田原 康 孝 副査 岐阜大学教授 柘植 治 人 副査 岐阜大学助教授 発 正 浩

論文の内容の要旨

ドライクリーニングや電気機器の洗浄有機溶剤に使用されてきたテトラクロロエチレン (PCE) 及びトリクロロエチレン (TCE) による地下水汚染、土壌汚染が社会問題となっている。PCE 及び TCE は発癌性を有しており、世界的に浄化すべき最優先物質であることが定められている。そのため、各種の浄化方法が研究されているが、研究の歴史が浅く、有効な処理方法が無いことが現実である。

微生物を利用した PCE の浄化方法は、経済性から考えて応用可能な方法であり、過去 10 年間、数多くの研究者らによって、PCE の還元的な脱塩素化について、検討されてきた。しかし、単離菌による PCE の分解は、幾つかの報告があるだけである。さらに、酵素レベルでの PCE 分解に関する報告もわずかである。そのため、本研究では、新たな機能を持った PCE 分解菌の単離と分解酵素による PCE 分解機構の解明を目的とした。

PCE 分解菌の単離を目的として、主として PCE に汚染された地域からサンプルを採取した後、選択圧をかけ、PCE を CO₂ へ転換できる集積培養系を構築した。さらに、この集積培養系から PCE 分解菌の単離を行い、グラム陽性、内生孢子形成の桿菌、DPH-1 株を単離した。この菌株は 16S rRNA 分析及び生理

的な性質から *Clostridium bifermentans* と同定した。*C. bifermentans* DPH-1 株は高濃度の PCE (0.9 mM) を化学量論的に TCE を経てシスー 1,2-ジクロロエチレン (cDCE) へ 56 時間以内に脱塩素した。酵母エキス存在下でエタノールを電子供与体として加えることで分解能を上げることができた。PCE の最大分解速度は 0.43 ($\mu\text{mol/h/mg protein}$) であった。最適分解条件は、pH 7.2-8.0、温度 30-37°C であり、さらに、TCE、DCE 異性体、塩化ビニル、1,2-ジクロロエタン、ジクロロメタン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロプロペン、1,1,2-トリクロロエタン等の各種有機塩素化合物を分解した。

次に、地上処理法でのバイオレメディエーションを想定し、DPH-1 株をセラミックスビーズに固定化した PCE 分解用バイオリクターの開発を行った。固定化菌体の初発菌体量及び初発 PCE 濃度を変化させることにより一次反応式に基づく PCE 分解速度係数 k_b を算出した。その結果、回分培養での PCE 分解速度係数 k_b は 2.1×10^{-2} (/h/mg protein) となった。連続培養での PCE 分解速度係数 k_c は、 2.6×10^{-2} (/h/mg protein) となり、回分培養での PCE 分解速度係数 k_b の 1.24 倍であった。PCE 処理は平均滞留時間 (HRT) が 20 時間以上の条件で行われ、最高 PCE 分解率は 95% であった。

次に、DPH-1 株の PCE デハロゲナーゼの精製と諸性質の検討を行った。DPH-1 株の菌体破碎抽出液を粗酵素として、DEAE-Toyopearl 650、Superdex pg-75、Poros HQ、Superdex HR 200 の各種カラムクロマトグラフィーで精製した。精製酵素の至適 pH は 8.0、至適温度は 35°C で $12 \mu\text{M}$ の PCE を $73 \text{ (nmol/h/mg protein)}$ の速度で分解し、電子供与体なしの条件に比べ電子供与体としてエタノール、メチルピオロゲンを用いた条件で酵素活性が各々 2、3 倍高かった [$5.30, 6.17 \text{ (U/mg protein)}$]。なお、酵素活性は 1 unit (U) = nmoles of product (TCE + cDCE)/ h /ml enzyme として計算した。遮光の条件下で精製酵素にヨウ化物プロピル (0.5 mM) を供し、PCE 分解活性を測定した結果、84% の PCE 分解阻害が確認された。その後、分解阻害が確認された酵素液を光に露出させた条件におくと、元の PCE 分解活性の 85% が回復された。このことから酵素にはコリノイドが存在することが示唆された。PCE デハロゲナーゼの分子量は 70 kDa で二量体であった。N 末端アミノ酸配列は、AEVYNKDKANKLDLYGKVHAQH-YFSNDT であり、これまで報告された PCE デハロゲナーゼのアミノ酸配列とは異なっていた。さらに、本 PCE デハロゲナーゼは TCE、DCE 異性体、1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、1,1,2-トリクロロエタン等の各種有機塩素化合物を分解することが確認できた。活性そのものは弱かったものの、これまでに単一酵素を用いた実験で本 PCE デハロゲナーゼのように多様な有機塩素化合物に対して分解活性を示した例は報告されていない。

以上、新規に単離した *Clostridium bifermentans* DPH-1 株によるテトラクロロエチレンの分解機構の一部を明らかにでき、本菌株を用いた PCE 分解バイオリアクターを試作した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、微生物を用いたテトラクロロエチレン (PCE) 分解に関するもので、1) 新たな PCE 分解菌の単離と同定、2) 同定した *Clostridium bifermentans* DPH-1 株の PCE 分解特性と PCE 分解用バイオリアクターの開発、3) PCE 分解に関与する PCE デハロゲナーゼの精製と性質、からなる。

1) では、PCE 分解菌を単離するために、各種土壌を採取し、PCE 分解菌を集積した。電気製品製造工場周辺から採取した土壌から得られた集積菌群は PCE の飽和濃度である 150 mg/l でも PCE を分解し、さらに、トリクロロエチレン (PCE)、シスジクロロエチレン (cDCE)、塩化ビニル、クロロホルム、1、2-ジクロロエタン、ジクロロメタン、1、1、2-トリクロロエタンを各々、93 %、92 %、39 %、89 %、90 %、77 %、60 % 分解した。PCE の分解産物として微量の塩化ビニルと炭酸ガスが検出された。PCE の分解条件は好気条件よりも嫌気条件の方が優れていた。新たに単離した PCE 分解菌は生理的特徴と 16SrRNA 分析の結果から *Clostridium bifermentans* と同定され、*Clostridium bifermentans* DPH-1 と名付けた。

2) では、*Clostridium bifermentans* DPH-1 株の PCE 分解の特徴を最初に研究した。本菌株は水素を利用しながら PCE を TCE を経て DCE に化学量論的に脱塩素化することをあきらかにした。至適初発温度と pH は各々、30～37℃、7.2～8.0 であった。そして、PCE 比分解速度は、0.43 $\mu\text{mol/h/mgprotein}$ であった。TCE、各種 DCE 異性体、塩化ビニル、ジクロロメタン、1、2-ジクロロエタン、1、1-ジクロロエタン、1、2-ジクロロプロパン、1、3-ジクロロエタン、1、1、2-トリクロロエタン等の多種の脂肪属有機塩素化合物を分解した。

本菌をセラミックスビーズに固定化したバイオリアクターを開発し、回分培養と連続培養で PCE 分解を検討したところ、連続培養の方が回分培養よりも分解速度が 1.2 倍速く、一次反応で解析したところ、分解速度定数は 0.026 $1/\text{h/mgprotein}$ であった。連続培養での PCE 分解は水理的滞留時間 20 時間以上で行われ、最高の PCE 分解率は 95 % であった。

3) では、PCE 分解酵素である PCE デハロゲナーゼを精製し、諸性質を決めた。DEAE-Toyopearl 650, Superdex pg-75, Poros HQ, Superdex HR 200 の順で精製

した。本酵素は分子量 70kDa の二量体であった。至適温度と pH は各々、35℃と 8.0 であった。Km 値と Vmax はそれぞれ、6.05 mM, 73 nmol/h/mgprotein であった。金属イオンや補助因子の影響は受けず、酸素感受性であった。TCE、1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、1,1,2-トリクロロエタンに対しても活性を示した。決定された N 末端アミノ酸配列から新規の PCE デハロゲナーゼであることが示唆された。

以上、本研究は新たな PCE 分解菌を探索して発見し、その分解機構の一端を解明するとともに、本菌を利用した PCE 分解バイオリアクターを開発したものである。PCE による地下水や土壤汚染は世界的な問題であり、その浄化方法の構築が社会的に要求されている。本菌は、PCE ばかりでなく、多種の脂肪属有機塩素化合物を分解する。地下水や土壤汚染は単一の物質による汚染はほとんど無く、通常は複合汚染であり、バイオリメディエーションの応用には多種の化合物を分解する微生物が要求される。本菌はその候補の一つと考えられ、また、PCE 分解機構の一部を明らかにしたことは学問的及び応用上大きいと考えられる。

審査委員会は、本論文について、研究の進め方、論文の構成、内容、図表並びに引用文献などについて慎重に審議すると共に、公表されている論文についても検討した。その結果、審査委員一同は、本論文を岐阜大学大学院連合農学研究科の博士論文として価値あるものと認め、「合格」と判定した。

基礎となる論文

1. Y. C. Chang, M. Hatsu, K. Jung, Y. S. Yoo, and K. Takamizawa: Degradation of a variety of halogenated aliphatic compounds by an anaerobic mixed culture. *J. Ferment. Bioengi.* 86, 410-412, 1998.
2. Y. C. Chang, M. Hatsu, K. Jung, Y. S. Yoo, and K. Takamizawa: Degradation of tetrachloroethylene by heterotrophic enrichment cultures and its isolate. *Int. J. Environ. Conscious Design & Manufact.* 8, 1-7, 1999.