

土壤・地下水汚染対策におけるバイオオーグメンテーションの
実用化に向けた検討

Studies of practical use of bioaugmentation for contaminated soil
and groundwater

東京農工大学大学院
工学府
小松 大祐

目次

第0章 要旨	2
第1章 序章	5
1. 土壌・地下水汚染について	5
2. 土壌・地下水汚染対策技術について	9
3. 原位置浄化について	10
4. バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーション	15
5. 塩素化エチレン類について	19
5. 1 塩素化エチレン類の特徴	19
5. 2 塩素化エチレン類を対象としたバイオレメディエーション	20
6. シアン化合物とは	21
6. 1 シアン化合物の特徴	21
6. 2 シアン化合物のバイオレメディエーションと分解微生物	21
第2章 塩素化エチレン類の VOC 脱塩素化コンソーシアの作成	23
1. はじめに	23
2. 材料と方法	26
2. 1 OKINAWA コンソーシアの取得	26
2. 2 OKINAWA コンソーシアの取得と実証試験	26
3. 結果と考察	33
3. 1 OKINAWA コンソーシアの取得	33
3. 2 OKINAWA コンソーシアを用いた実証試験の結果	34
4. まとめ	43
第3章 より単純化した塩素化エチレン類の脱塩素化コンソーシアの作成	44
1. はじめに	44
2. 材料と方法	45
2. 1 ATV1 コンソーシアの構築	45
2. 2 ATV1 コンソーシアの解析	45
2. 3 ATV1 コンソーシアの脱塩素化性能試験	45
2. 4 実汚染サイトの試料を用いた室内試験	45
3. 結果と考察	47
3. 1 ATV1 コンソーシアの構築	47
3. 2 ATV1 コンソーシアの脱塩素化能力	48
3. 3 ATV1 コンソーシアの構成菌について	48
3. 4 実汚染サイトにおける ATV1 コンソーシアの脱塩素化活性	49
4. まとめ	58
第4章 シアン化合物のバイオレメディエーション	59

1	はじめに	59
1. 1	酸化分解酵素	59
1. 2	酸化分解酵素	60
1. 3	置換・転移分解酵素	60
1. 4	加水分解酵素	60
2.	材料と方法	62
2. 1	実汚染サイトの地下水におけるシアンの分解	62
2. 2	シアン化合物分解菌の単離と系統解析	62
2. 3	シアン分解酵素の解析	63
3.	結果と考察	92
3. 1	実汚染サイトの地下水におけるシアンの分解	92
3. 2	シアン化合物分解菌の単離	92
3. 3	単離したシアン分解菌の系統解析	93
3. 4	単離した細菌のシアン分解能	93
3. 5	単離した細菌のシアン分解酵素	94
4.	まとめ	124
第5章	総合まとめ	125
第6章	引用文献	126
1.	第1章引用文献	126
2.	第2章, 第3章引用文献	130
3.	第4章引用文献	131

第0章 要旨

土壌汚染や地下水汚染の対策方法として、より低コストで環境負荷が低い、微生物を用いた手法にバイオレメディエーションがある。これまでは、土着微生物を活性化させる薬剤のみで細菌そのものを扱う必要がないバイオスティムレーションが実用化されてきたものの、工期の長さや適用性の低さ等の様々な問題から、国内においてはほとんど普及していない。例えば、塩素化エチレン類は、平成29年にその最終分解生成物であるクロロエチレンが土壌汚染対策法の対象物質となったことで、さらにこれまで以上に土着微生物を利用するバイオスティムレーションでは適用が難しくなっている。また、シアン化合物は、生分解可能な物質であるにも関わらず、国内において、これまでバイオレメディエーションが適用されたことがほとんどない。一方、微生物を外部から導入する手法にバイオオーグメンテーションがあるが、対象とする汚染物質により様々な課題がある。例えば塩素化エチレン類を対象としたバイオオーグメンテーションは、導入した微生物の生残性が低く、汚染物質を分解する前に死滅する等の問題点が多数指摘されており、実用化に至っていない。そこで、本研究ではバイオオーグメンテーションの実用化に向けた具体的な手法について検討し、微生物コンソーシアを用いる手法により、導入した微生物が汚染物質の分解まで生残可能な結果を得るとともに、実用化に向けた非常に分解活性が高いコンソーシアを得た。また、シアン化合物は、これまでその分解菌は多く見出されているものの、土壌・地下水において、分解活性が高い単離菌は非常に少なく、実用化された例がない。そこで、本研究においては、非常に分解活性が高いシアン化合物の分解菌を単離し、実用化に向けた詳細なシアン分解メカニズムについて検討を行った。

第2章においては、実汚染サイトから塩素化エチレン類脱塩素化コンソーシアを取得し、安全性を確認後、実汚染サイトへの導入による試験施工を実施した。試験施工前の検討においては、現場適用における安全面への配慮から、それまで実験室内の培養で使用していた水素ガスを使わない手法を検討し、水素ガスを用いることなく、コンソーシアによ

る脱塩素化を確認することができた。試験施工の結果、薬剤のみの投与では、塩素化エチレン類は完全な脱塩素化まで進まなかった一方、コンソーシアを投与した場合においては、塩素化エチレン類の完全な脱塩素化が確認された。また、脱塩素化後においては、塩素化エチレン類の脱塩素化を担う *Dehalococcoides* 属細菌の速やかな減少を確認することができた。よって、投与したコンソーシアは、塩素化エチレン類の脱塩素化までは生残する一方、汚染物質の脱塩素化が終われば、基質を失うことから、速やかに減少していくことが示唆された。以上の結果から、実汚染サイトにおける新規手法として、土着菌を基にした脱塩素化コンソーシアの作成とそのオーグメンテーション手法について確認ができ、その効果も確認することができた。

第3章においては、完全な脱塩素化菌が存在しないサイトにおいて、コンソーシアを適用することを目的とし、非常に脱塩素化活性が高く、より組成が単純化したコンソーシアの作成を行った。*Dehalococcoides* 属細菌は、愛知県内における実汚染サイトから取得したものを用いた。また、それ以外の *Dehalococcoides* 属細菌の生育を補助する細菌は、先行研究によって、維持されていたコンソーシアの共存菌を利用した。単純化したコンソーシアは、4種の細菌から構成されており、塩素化エチレン類の脱塩素化を担う *Dehalococcoides* 属細菌を中心とし、*Petrimonas* 属細菌、*Desulfovibrio* 属細菌、*Clostridium* 属細菌から構成されていた。*Dehalococcoides* 属細菌は単独では非常に生育が遅く、脱塩素化活性も低い一方、コンソーシアにおいては、*Dehalococcoides* 属細菌の成長は早く、脱塩素化活性も非常に高かった。このことから、*Petrimonas* 属細菌、*Desulfovibrio* 属細菌、*Clostridium* 属細菌から水素やビタミン類等を供給され続けることで、単独の場合と比較して、*Dehalococcoides* 属細菌の脱塩素化活性が高い状態になっていると考えられた。その後、本コンソーシアについて、ある実汚染サイトの試料を用いた、室内試験を実施した。なお、試料を採取した実汚染サイトは、薬剤添加のみでは完全な脱塩素化が進まないことがわかっている。室内試験の結果、培養期間中において薬剤のみの添加では完全な脱塩素化は確

認できなかったものの、薬剤とコンソーシアを添加によって完全な脱塩素化が確認された。その結果から、今回使用した実汚染サイトの試料においては、本コンソーシア有用性が確認された。なお、コンソーシアを添加した場合についても、薬剤の種類によっては完全な脱塩素化が確認できなかった。今後は、薬剤の選択についても、サイト毎に確認する必要があると考えられた。今後は、バイオレメディエーション利用指針の適合確認を得た後、現在実施中の実汚染サイトにおける試験施工結果を評価し、実用化することとする。

第4章においては、シアン化合物のバイオレメディエーションについて検討した。シアン化合物は、加水分解経路や酸化分解経路、還元分解経路等様々な分解経路が知られている。また、細菌だけでなく、真菌や植物等様々な生物において、シアン化合物分解酵素は見つかっている。そこで、あるシアン化合物の実汚染サイトの試料に用いて、いくつかの検討を行っていたところ、酵母エキスの添加によって、シアン化合物が分解されることが確認された。当該試料において、シアン化合物の分解を担っている可能性があるシアン分解菌について調べた。その結果、*Pedobacter strain EBE-1* と *Bacillus strain EBE-2* の2種を単離した。16SrRNA 遺伝子の Blast 検索の結果、どちらもニトリラーゼを保有している細菌の近縁種であることがわかった。また、確認した2種のシアン化合物分解菌のうち特に *Bacillus strain EBE-2* は、既存研究と比較して、非常にシアン分解活性が高いことがわかった。そのため、どのようなシアン分解酵素を保有しているのかを確認した。その結果、加水分解酵素であるニトリラーゼを持っていることがわかり、活性測定結果から、シアン化合物からギ酸に分解する分解経路を持つ cyanide hydrolase に分類される酵素であることが示唆された。得られたアミノ酸配列情報から、SWISS モデルを用いた酵素の3次元モデリングまでおこなった。これらの結果から、*Bacillus strain EBE-2* はシアン化合物の分解菌として、今後実汚染サイトへ適用できるよう、さらなる検討を今後進めていく。

第1章 序章

1. 土壌・地下水汚染について

我が国では、様々な公害が高度経済成長期にかけて顕在化した。最初に公害として顕在化したとされるのは、明治時代初期から栃木県と群馬県の渡良瀬川周辺で起きた足尾銅山鉍毒事件である。足尾銅山鉍毒事件においては、様々な公害が起きていたが、その一つに鉍山に由来する重金属類による土壌汚染が挙げられる。重金属類は渡良瀬川から農業用水に流入し、農用地を汚染した。結果、農作物を通してヒトの健康被害にまで発展した。他にもイタイタイ病や水俣病、四日市ぜんそく等様々な公害が顕在化し、経済発展とともに問題となり、公害対策基本法が1967年に制定された。さらに公害対策基本法を発展的に継承し、環境に関する分野についての国の政策の基本的な方向を示す法律として1993年環境基本法が制定された。環境基本法の中においては人の健康や生活環境に係る被害を防ぐ目的で7つの公害（大気汚染、水質汚濁、土壌汚染、騒音、振動、地盤沈下及び悪臭）が定義され、環境の保全について施策の基本となる事項を定めている。

土壌汚染に関する法律として、農用地の土壌汚染防止等に関する法律が、1971年に施行された。本法律の対象は農用地のみであった。また、土壌汚染を未然に防ぐことを目的とし、有害物質を取り扱っている土地に対しては、同1971年に水質汚濁防止法が施行された。上記2つの法律において、土壌汚染も扱っているものの、未然に防ぐことを目的としており、すでに汚染された土地に対しての法律は存在せず、課題となっていた。次第に再開発や様々な契機によって、すでに汚染された土地が明らかになることが多くなってきたことを受け、ようやく他の法律に遅れること約30年、土壌汚染対策法が2003年に施行された。

2020年11月現在、土壌汚染対策法においては、特定有害物質として26物質が対象とされ、指定基準が設けられている（Table 1-1）(1)。同法では指定基準に不適合状態となった土地において土壌汚染により健康被害が生じる恐れがある場合、都道府県知事から土壌汚染対策の指示が出され、適切な措置が求められることとなる。

土壌汚染には、大きく分け、自然由来と人為由来がある。自然由来の土壌汚染は、国内に広く分布している(2)。日本は火山が多く、重金属類が多く含まれる地層が広範囲に確認されている。また、沿岸地域の沖積平野においても、海成堆積層等の粘土層において、ヒ素やフッ素等の重金属類が環境基準値を超えて検出されることも多い。これら自然由来の土壌汚染は、地層ごとに広範囲に一樣に分布をしており、ある程度の汚染範囲の予測が可能である。また、健康被害がでるほどの高濃度の自然由来の土壌汚染は、ヒトが住む地域の中では、一部にしか存在しない。なお、自然由来の汚染はそのすべてがいわゆる重金属類による汚染であり、地下水における移動性が大きくないことから、現在の汚染範囲以上に地下水を介して土壌汚染そのものが拡大していくおそれは低い。

一方、人為由来の土壌汚染は、汚染の原因が事業活動による漏洩等によるため、当事者ですらその状況を知らず、顕在化していない事例も多くある。そのため、何らかの契機によって調査を実施して初めて発覚するケースが多い。特に、廃棄物に関する法律が整備される以前は、事業所の敷地内に有害物質を含む廃棄物を投棄していたことも珍しいことではなく、投棄された廃棄物が汚染の原因になっているケースは散見される。このような人為由来の汚染の場合、物質の種類によっては、地下水を介して汚染が広範囲に拡散することがある。特に揮発性有機化合物に分類される第1種特定有害物質(Table1)は、水に溶解しやすく、地下水を介して広範囲に移流拡散していくことが知られている。土壌汚染対策法においては、地下水下流方向に最大 1.0km 程度の範囲まで到達するとされている(3)。また、第1種特定有害物質の中でも塩素化エチレン類は、その比重の大きさから、下方へも浸透し、拡散していく。したがって、塩素化エチレン類は、当初の漏洩場所を起点とし、水平方向にも垂直方向にも汚染範囲が拡大し、最悪の場合、事業所等の汚染原因者の敷地から外部へと広がっていく。その結果、事業所等の敷地外にある井戸水等の飲用水や河川へ流出し、生物濃縮等によって、ヒトの体内に入るリスクが非常に高くなる。したがって、ヒトの健康被害を防ぐ目的において、土壌・地下水汚染の調査・対策は非常に重要である。現在は、土壌汚染対策法に

よる調査契機以外においても、様々な場面における自主的な土壌調査や対策が多く行われており、汚染の見つかる機会は増えている。なお、土壌汚染は広大な敷地をもつ事業所等以外にも、街中のクリーニング工場やガソリンスタンド、町工場といった身近な業種においても多く確認される。例えば、東京都内において、2020年12月の時点で公表されている土地だけで500件以上が確認されている(4)。したがって、事業活動が存在している限り、どこにでも存在する問題ととらえるのが適当である。

Table1-1 The specific harmful object which was prescribed by the “Dojou osenn taisakuhou” and their Environmental regulation value.

	特定有害物質の種類	<地下水の摂取などによるリスク> 土壌溶出量基準	<直接摂取によるリスク> 土壌含有量基準
第一種特定有害物質 (揮発性有機化合物)	クロロエチレン	検液 1 L につき 0.002mg 以下であること	/
	四塩化炭素	検液 1 L につき 0.002mg 以下であること	
	1,2-ジクロロエタン	検液 1 L につき 0.004mg 以下であること	
	1,1-ジクロロエチレン	検液 1 L につき 0.1mg 以下であること	
	1,2-ジクロロエチレン	検液 1 L につき 0.04mg 以下であること	
	1,3-ジクロロプロペン	検液 1 L につき 0.002mg 以下であること	
	ジクロロメタン	検液 1 L につき 0.02mg 以下であること	
	テトラクロロエチレン	検液 1 L につき 0.01mg 以下であること	
	1,1,1-トリクロロエタン	検液 1 L につき 1 mg 以下であること	
	1,1,2-トリクロロエタン	検液 1 L につき 0.006mg 以下であること	
	トリクロロエチレン	検液 1 L につき 0.03mg 以下であること	
	ベンゼン	検液 1 L につき 0.01mg 以下であること	
	第二種特定有害物質 (重金属等)	カドミウム及びその化合物	
六価クロム化合物		検液 1 L につき六価クロム 0.05mg 以下であること	土壌 1 kg につき六価クロム 250mg 以下であること
シアン化合物		検液中にシアンが検出されないこと	土壌 1 kg につき 遊離シアン 50mg 以下であること
水銀及びその化合物		検液 1 L につき水銀 0.0005mg 以下であり、 かつ、検液中にアルキル水銀が検出されないこと	土壌 1 kg につき水銀 15mg 以下であること
セレン及びその化合物		検液 1 L につきセレン 0.01mg 以下であること	土壌 1 kg につきセレン 150mg 以下であること
鉛及びその化合物		検液 1 L につき鉛 0.01mg 以下であること	土壌 1 kg につき鉛 150mg 以下であること
砒素及びその化合物		検液 1 L につき砒素 0.01mg 以下であること	土壌 1 kg につき砒素 150mg 以下であること
ふっ素及びその化合物		検液 1 L につきふっ素 0.8mg 以下であること	土壌 1 kg につきふっ素 4,000mg 以下であること
ほう素及びその化合物		検液 1 L につきほう素 1 mg 以下であること	土壌 1 kg につきほう素 4,000mg 以下であること
第二種特定有害物質 (農薬等/農薬+PCB)	シマジン	検液 1 L につき 0.003mg 以下であること	/
	チオベンカルブ	検液 1 L につき 0.02mg 以下であること	
	チウラム	検液 1 L につき 0.006mg 以下であること	
	ポリ塩化ビフェニル (PCB)	検液中に検出されないこと	
	有機りん化合物	検液中に検出されないこと	

2. 土壌・地下水汚染対策技術について

土壌・地下水汚染が発覚した場合、なんらかの対策を実施することとなる。地盤中に浸透した特定有害物質の対策は大きく分けて物理的に土壌・地下水を掘削・除去して区域外の処理場へ搬出して処理する手法と、土壌・地下水を区域から移動することなく区域内で処理をする手法の2種類がある。前者は区域外への汚染拡散のリスクもさることながら、土壌・地下水を撤去する費用や処理場への土壌・地下水の運搬費用、また、処理場での処理費用がかかり、莫大な費用がかかる。他方、後者は区域内で処理することから、区域外への汚染拡散リスクはほとんどない。区域内での処理は、現地で土壌を地上に掘り上げて処理するオンサイト処理に対し、土をほとんど動かさず、原位置で処理する原位置浄化がある。原位置浄化は、土壌・地下水を掘削することなく原位置において処理する手法のため、汚染拡散リスクが低く、コストも低く抑えることが可能である。コストについては、原位置浄化を用いた場合、単純な場外搬出処理と比較し、非常に低くなる。例えば、塩素化エチレン類を対象とした場合、原位置浄化では、15,000 円/m³～30,000 円/m³ 程度になることが多いが、掘削除去の場合、35,000 円/m³～70,000 円/m³ 程度かかることが多い。深度やその他諸条件等により、掘削除去の処理コストさらに上振れすることもある。例えば、1,000m² が深度 10m まで汚染されていたと仮定した場合、掘削除去だと単純計算で 3.5 億円～7.0 億円は土壌汚染対策だけでかかることとなる。原位置浄化であっても 1.5 億円～3.0 億円程度はかかることとなり、土壌汚染対策によるコスト負担は非常に重いことがわかる。このような状況から、土壌・地下水汚染の対策は、土壌汚染対策法で様々な規定がされているものの、対策が進まない事例が多くある。中にはブラウンフィールドとして、塩漬けにされる土地もある(4)。都市部以外においては、土壌・地下水汚染の対策費用が、土地の値段を超えてしまうケースも多くあるため、当然の結果である。

また、今後は沖縄県等において、すでに顕在化しているが、米軍の基地返還に伴って、あらたな土壌・地下水汚染が発覚するケースも想定される。沖縄県のような離島の場合、

汚染土壌の処理場がほとんどなく、汚染土壌を船で本州に運搬する必要があり、掘削・場外搬出はコスト的にもさらに上がることとなり、現実的ではない。したがって、沖縄県の場合、原位置浄化が適用されないと対策自体が難しい状況にある。

上記の状況から、コストが低く、環境負荷も低い原位置浄化でいかに確実に対策を進めることができるかが非常に重要である。

3. 原位置浄化について

原位置浄化においては、揚水や不溶化、化学酸化や還元、熱処理等様々な技術が確立されつつある。揚水や不溶化は、より低コストな技術であるものの、汚染物質そのものを根本的に除去するわけではなく、対処療法的な工法である。したがって、対策に終わりがなく、対策の継続やモニタリングの継続が必須となる。一方、化学的な酸化や還元には、フェントン反応剤や還元鉄粉を用いる方法がある(6)。概要を Fig.1-1 に示す。フェントン反応剤とは、過酸化水素水を主体とし、触媒として鉄を添加することで、ヒドロキシラジカルを発生させる手法である(7)。ヒドロキシラジカルは、非常に酸化力が強く、無差別に有機物や金属類を酸化していく。したがって、地盤中において、汚染物質を分解するだけでなく、重金属類の溶出等も引き起こす恐れがある。また、ヒドロキシラジカルの寿命は極めて短いことから、酸化反応を起こす時間は非常に短い。したがって、地盤中に投入しても、反応中に汚染物質に直接触れない限り、汚染物質の分解はされず、汚染物質が残留することもある。なお、過酸化水素水は反応後、水と酸素に分解される。また、還元鉄粉は、自身が酸化鉄に酸化される際に汚染物質を還元することで、汚染物質を還元分解する手法である。対象物質は、塩素化エチレン類であり、塩素化エチレン類は、脱塩素化されることで、無害なエチレンやアセチレンへと還元される(8)。還元鉄粉で使用される材料は、アドマイズ鉄粉等のいわゆる粉体の鉄であり、鉄の相場に左右されるものの、他の薬剤と比較して、高額である。また、鉄粉自体を地盤中に投入するためには、大型の重機を

用いる必要があり、施工費用も高額となってしまう。なお、鉄粉自体は、浄化後も地盤中に残したままとなる。フェントン反応剤や還元鉄粉を用いた原位置浄化も当然、土壌の条件によって、適用できる範囲に限りがあり、どこのサイトにも適用できるわけではない。事前の室内試験結果から、適用の可否を判断することとなる。一方、熱処理は、近年注目されている技術の一つである。地中を加熱し、揮発性有機化合物を揮発・回収する技術(9)で、米国では実績数が急増しているが、国内ではまだ数例しかない。対象とする汚染物質の濃度に制限がなく、原液が存在しても適用ができる。また、土質パラメータや地下水の有無等に左右されないという汎用性の高さがあり、非常に有望な技術の一つと考えられる。しかしながら、地中を加熱する際に用いるヒーターに大電力が必要であり、電気代が日本の半分程度である米国では普及したものの、日本ではヒーターの効率化等を図る必要がある。また、地上に設置する無害化設備も大型になることから、適用できる地中の条件には制約がなくとも、地上の処理設備を設置するヤードやコスト、電気代の問題から、日本で普及していくには課題が多いと考えられる。

そして、バイオレメディエーションがある。バイオレメディエーションは、使用する薬剤は生分解性であり、安全性が問題になることはない。また、薬剤費用も酸化や還元を用いる薬剤と比較すると、すでに市場に他の用途で流通しているものを用いることが多く、安価であるとともに近傍の工場等から入手もしやすい。したがって、原位置浄化の中でもバイオレメディエーションは最も二酸化炭素排出量等の観点からも低環境負荷、かつ低コストの工法の一つであり、優れた浄化工法の一つであるといえる(10)。

バイオレメディエーションは、元々水処理の分野では古くから用いられてきた手法であるが、土壌・地下水において適用され始めた歴史は比較的浅い。米国においては、1970年代に、農薬をはじめとする様々な化学物質が投棄されたことが原因となって、住民の健康被害が明らかとなったラブカナル事件を発端とし、1980年には包括的環境対処補償責任法（スーパーファンド法）が制定され、その対策技術が発展していくことになる。バイオレ

メディエーションは、当初からすぐれた対策技術として注目されており、1990年代において、すでにスーパーファンド法の適用を受けたサイトのうち1割近くは、バイオレメディエーションが適用されていた(11)。一方、国内においては、1990年代に最初のバイオレメディエーションの実証試験が千葉県君津市のサイトにおいて行われた(12)。本件は、現地に酸素、メタン、窒素やリンを供給することで、土着のTCE分解細菌を活性化させる手法であった。試験結果から、TCEの分解を担っているとされるメタンモノオキシゲナーゼ生成菌数の増加やTCEの濃度低減がみられ、有効性が確認された。本件を皮切りに、徐々に土壌・地下水汚染の対策技術として、バイオレメディエーションの技術が浸透してきた。その後、上述の通り、国内においては、米国から約20年遅れること2003年に土壌汚染対策法が制定され、ようやく本格的に対策技術が発展していくこととなる。

しかしながら、バイオレメディエーションは汚染物質を分解する主体が微生物であることから、微生物の存在量や微生物の活性を左右する環境要件によって分解が止まってしまうことや、分解までに長期間を要する等その性能が大きく影響されてしまう不安定な側面も徐々に明らかになってきた。そのため、バイオレメディエーションを成功させるためには、微生物の存在量や様々な環境パラメータ等をモニタリングしながら、適切に管理していかないと確実な浄化は達成できない。その技術的な難しさから、土壌・地下水汚染対策において、バイオレメディエーションは低環境負荷、低コストにも関わらず、これまでの対策工法において、適用された件数は多くはない。例えば最新の統計データで、平成30年度の環境省集計データによれば、対策事例239事例中、原位置浄化はわずか3例であり(13)、全体のおよそ1%程度である(3例の工法は不明)。ここまで少ない理由はいくつか考えられるが、一つには土壌汚染対策法の改正により、特定有害物質にクロロエチレンが指定基準0.002mg/Lで追加されたことが考えられる。その基準値の低さから、より確実な場外搬出を選択した実施者が増えた可能性が考えられる。また、クロロエチレンは、塩素化エチレン類の嫌氣的な脱塩素化最終生成物であり、塩素化エチレン類の嫌氣的な脱塩素

化においては、クロロエチレンに変換された後に無害化される経路をたどる。故に、既存のバイオレメディエーションでは塩素化エチレン類の完全脱塩素化まで非常に時間がかかることが多く、対策に要する工期が非常に長期化することやそもそもクロロエチレンまでの完全な浄化が難しいといったことが懸念されている。したがって、塩素化エチレン類の浄化は、既存技術のままではバイオレメディエーションを含む原位置浄化の件数がさらに減っていくと推定される。

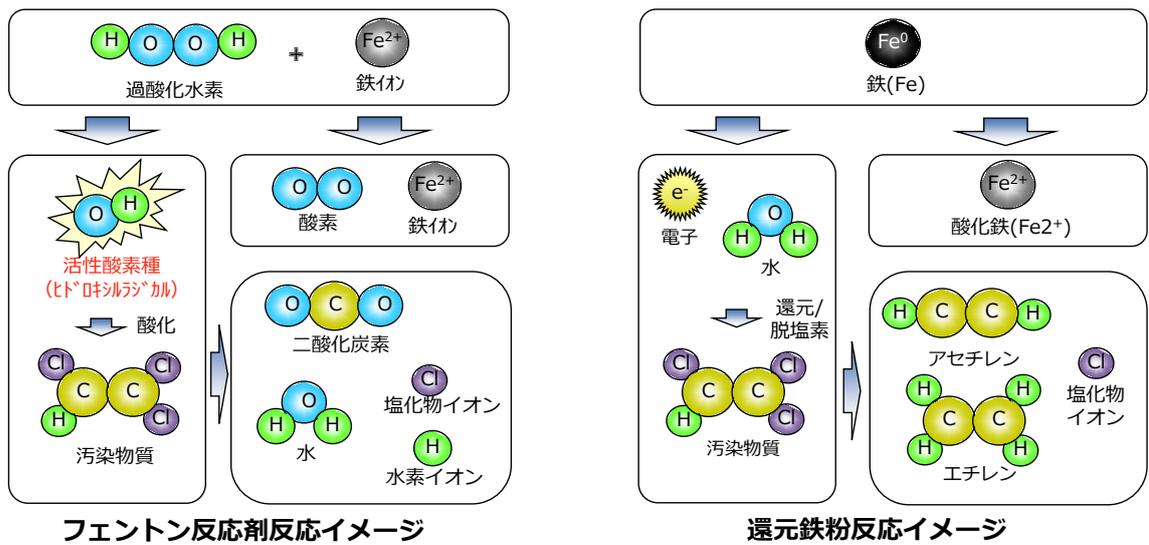


Fig.1-1 Overview of treatment of soil contamination by Fenton reaction and Zero valent iron.

4. バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーション

バイオレメディエーションにはバイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションの2つの手法がある。概要を Fig.1-2 に示す。バイオスティミュレーションは薬剤のみを投入することで、土着の微生物を活性化させる手法である。そのため、土着の微生物の種類や菌密度によって、分解活性が大きく左右されてしまい、適用できないサイトも多い(14)。特に、近年の土壤汚染対策法改正に伴い、特定有害物質にクロロエチレンが追加されたことから、適用できないサイトが大幅に増えたと考えられる。なお、これまで塩素化エチレン類を対象として国内で実施されてきたバイオレメディエーションは、ほぼ全てがバイオスティミュレーションである。

一方、バイオオーグメンテーションは分解性能が優れた微生物を薬剤と一緒に投入する手法である。バイオオーグメンテーションは、近年の DNA 解析技術が進歩により、分解菌の全ゲノム解析等も行われており(15)、安全性が高く、かつ分解能力が高いことがわかっている微生物等を投入することが可能であることから、バイオスティミュレーションと比較し、サイトによる分解活性の差を少なくすることが可能であり、適用範囲が広がる可能性が高い。クロロエチレンの対応も可能である。反面、投入した微生物が現場に適応できず、十分にその分解活性を維持できない可能性も指摘されている。原因として、投入した微生物がサイトの環境条件に適応できないこと、投入した微生物と土着の微生物との相性（基質や電子供与体等のやりとり）等により、投入した微生物が十分生育できず、死滅してしまうことが知られている(12, 16)。そのような事象を防ぐためには、導入した菌種の適切な分析や解析、また、サイトに存在する微生物種全体の群衆解析等の様々なモニタリング手法や微生物に関する知識が必要となり、実用化を妨げていると考えられる。我が国においては、環境省と経済産業省が共同で事業者に対し、バイオオーグメンテーション事業の発展及び環境保全に資することを目的として、生態系等への影響に配慮した適正な安全性評価及び管理手法のための基本的な考え方を「バイオレメディエーション利用指

針」として制定（平成 17 年 3 月）し、指針に適合しているかを確認する制度を導入している。しかしながら、これまでの約 15 年間において、適合が確認された事業は 11 件しかない(17)。これまで適合が確認された事業は、油分やベンゼンを対象としている事業が 5 件、塩素化エチレン類を対象としている事業が 5 件、ダイオキシン類を対象としている事業が 1 件である。したがって、重金属類を対象とした事業は 0 件である。なお、シアン化合物は、土壌汚染対策法上は、重金属類に分類されている。したがって、シアン分解の指針適合事業は 0 件である。一方、平成 20 年 6 月 9 日に適合確認された栗田工業株式会社の例が、国内で初めて嫌気的な塩素化エチレン類の分解によって、完全に無害化可能として確認された事業であり、*Dehalococcoides* 属細菌を含むコンソーシアとしての申請である。なお、*Dehalococcoides* 属細菌以外の細菌は、意図的に添加したわけではないと考えられる。適合確認においては、安全性について、病原菌が存在しないことが確認されている。また、培養にはクロロエチレンを用いている。室内試験の結果においては、30 日程度で、特定の条件下において、クロロエチレンの完全な脱塩素化が確認されているものの、実際の試験施工の結果から、クロロエチレンまでの完全な無害化は 120 日かかってもできていないケースが確認されている(18)。このことから、バイオオーグメンテーションであっても、分解がうまく進まないケースがあることが示唆される。また、ほかの事例については、適合確認は受けているものの、学会等の散発的な発表のみが見受けられ、継続的に実施されているわけではなく、国内においては、ほとんど普及していない。

しかしながら、先に述べた通り、塩素化エチレン類においては、特定有害物質にクロロエチレンが追加されたことに伴い、土着の微生物だけでは完全な分解には、非常に長い時間がかかることや分解ができないことが想定される。土着菌としてそもそも *Dehalococcoides* 属細菌が存在していないサイトや、*Dehalococcoides* 属細菌が存在してもクロロエチレンの脱塩素化酵素を持っていないことが多いためである。したがって、塩素化

エチレン類の確実な完全脱塩素化においては、特定の微生物を投入する必要性が非常に高まっている。

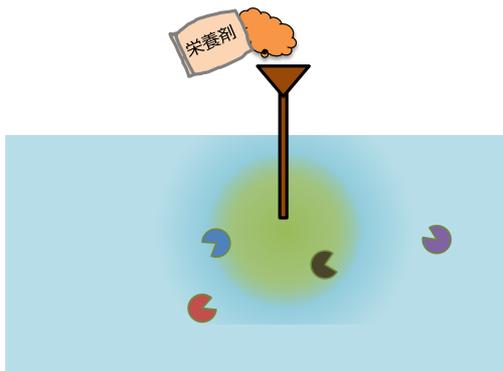
そこで、筆者らは、実用化がほとんど進んでいないバイオオーグメンテーションに着目した。バイオオーグメンテーションを活用すれば、これまでバイオスティムレーションで行われてきた塩素化エチレン類において、土着の微生物の菌叢や活性の問題、法改正によるクロロエチレンの追加によりバイオレメディエーションの適用ができなかったサイト等においてもバイオレメディエーションの適用が可能になることが考えられる。また、これまでバイオレメディエーション利用指針に適合確認がされたことがないシアン化合物についても、バイオオーグメンテーションを活用すれば、バイオレメディエーションが適用可能となると考えられる。

その結果、より低環境負荷、低コストであるバイオレメディエーションがさらに普及することにより、例えば、土壌・地下水汚染が原因の一つとなって放置されてしまっているいわゆるブラウンフィールド問題(5)の解決につながり、人の健康被害を防ぐことはもちろんのこと、生態系の保全や、不動産のより一層の流動化にも寄与できると考えられる。

スティミュレーション法

栄養剤で浄化微生物活性化

- ・浄化微生物の存在必須
- ・浄化期間3か月～数年単位
- ・浄化速度は土着微生物の数と種類に依存



オーグメンテーション法

浄化微生物を外部から投入

- ・単独では成長が遅い場合も
- ・環境に順応しなければ低効率
- ・培養が困難な場合も

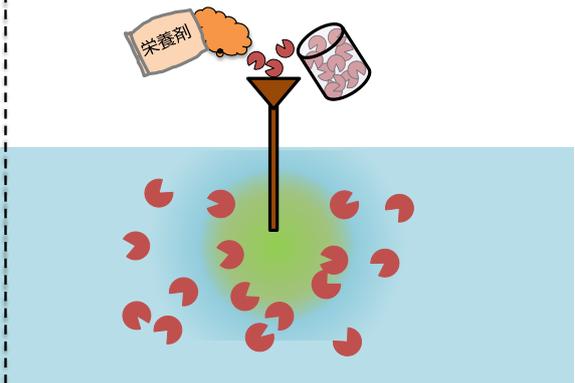


Fig.1-2 Overview of biostimulation and bioaugmentation

5. 塩素化エチレン類について

5. 1 塩素化エチレン類の特徴

塩素化エチレン類（例えばテトラクロロエチレン；以下，PCE，トリクロロエチレン；以下，TCE，シス-1,2-ジクロロエチレン；以下，*cis*-DCE，トランス-1,2-ジクロロエチレン；以下，*trans*-DCE，1,1-ジクロロエチレン；以下，1,1-DCE，クロロエチレン；以下，CE）は土壤汚染対策法における第一種特定有害物質指定されている。生分解性が低く，比較的安定であり，自然界中で難分解性である。その安定性から産業的に非常に使い勝手が良く，例えば，ドライクリーニング用の溶剤や，金属加工における切削油の脱脂，金属メッキ等，1980年代まで広く大量に産業利用されてきた。その結果，土壤・地下水汚染の発生件数が土壤汚染対策法の対象物質の中でも環境省の統計上，3番目に多くなっている(13)。

塩素化エチレン類は，ひとたび漏洩してしまった場合，比重が水より大きく（PCE；1.62g/cm³，TCE；1.46 g/cm³），地盤中を地下深部まで浸透することが多い。難分解性で安定であることから，長期間分解されずに地下深部まで浸透していき，その過程で，地下水中へ溶存し，地下水を介して地下水流域へと拡散していく。結果，汚染範囲が広範囲になりやすく，これまでも汚染原因者の敷地の外側まで汚染範囲が拡大し，重篤な環境問題を引き起こした事例もあり(19)，措置命令が出されることが多い物質の代表例である。

また，塩素化エチレン類の人体に対する毒性が徐々に判明してきており，例えば，発がん性は1980年代から指摘されている。近年ではパーキンソン病等の原因となる可能性(20)も指摘されてきており，人体に対する影響が非常に大きい汚染物質の一つである。

以上から，塩素化エチレン類はその対策が必須であるものの，上述した性質の通り，汚染範囲が深部，かつ広範囲になることが多い。故に，土壤・地下水対策費用が高額になるサイトが多く，対策が進まず，ブラウンフィールド化するサイトも多い。したがって，安価で環境負荷が低く，より確実な対策技術の開発が急務である。

5. 2 塩素化エチレン類を対象としたバイオレメディエーション

PCE や TCE などは嫌氣的微生物による還元脱ハロゲン呼吸により脱塩素化されることから、水素供与体の供給によるバイオスティミュレーションによる浄化が行われている。しかし、PCE や TCE をエチレンまで完全に脱塩素化できるのは、数種の *Dehalococcoides* 属細菌のみであり(21)、これらの *Dehalococcoides* 属細菌が存在しない場合には、中間体である、*cis-DCE*、CE で脱塩素化が止まってしまう。このため、*Dehalococcoides* 属細菌を用いたバイオオーグメンテーションが期待されている。ところが、*Dehalococcoides* 属の細菌は栄養要求性等の理由から、単独では非常に生育が遅く、純粋培養が困難である(22)。また、*Dehalococcoides* 属の細菌は、サイトに適用しても機能しない事例が多くある(12,16)。

なお、経済産業省と環境省の合同で平成 18 年から行われているバイオレメディエーション利用指針の適合確認事業として、*Dehalococcoides* 属細菌が用いられた適用事業は 3 件確認されるのみである。

そこで、バイオオーグメンテーションの短所を克服し、かつ、長所を活かすために、我々は元々サイトに生息している土着の微生物を利用して複数の細菌をあえて含んだコンソーシアを用いたオーグメンテーションを行う手法を試みた。また、構成細菌の組成を簡素化したコンソーシアを作成し、実汚染サイトの試料において、その性能を評価した。詳細を第 2 章、第 3 章に示す。

6. シアン化合物とは

6. 1 シアン化合物の特徴

シアン化合物は、電気メッキや金属鋳業等に広く用いられており、設備の老朽化や事故による破損、機器の不具合等による流出や不法投棄により、土壌・地下水に漏洩する。漏洩したシアン化合物は地下水を介して地盤中に広がり、深刻な土壌・地下水汚染の原因となる。

また、シアン化合物は強い毒性を持ち、様々な生物に影響を及ぼすが、例えば脊椎動物に及ぼす影響は、細胞内呼吸の阻害が挙げられる。シアン化合物は経口・経皮・経気道により体内に取り込まれるとシアン化物イオンとなり、ミトコンドリア内の呼吸鎖を担うシトクロム等の鉄イオンと強く結合することで、細胞内呼吸の阻害を引き起こす(23)。

また、土壌環境中では、シアン化合物は金属イオンと結合して難分解性シアンを形成するため、残留性が高い(24)。なお、難分解性シアンは無害だが、物理化学的な影響で毒性の高い遊離型シアンとなりえる。遊離型シアンは強い毒性をもつため、難分解性シアンも対策を実施する必要がある。土壌汚染対策法においては、遊離シアンとそれ以外のシアンを含め、全シアンとして指定基準が設けられている。

6. 2 シアン化合物のバイオレメディエーションと分解微生物

シアン化合物はバイオレメディエーションが適用可能にも関わらず、国内においては、ほとんどが物理的に土壌を入れ替える掘削除去工法によって対策されている。また、これまでバイオレメディエーション利用指針の適合申請を受けた微生物の中にシアン分解菌はない(17)。一方で、先行研究においては、様々な生物がシアン化合物を分解可能であることが示されている。例えば真菌では、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属、*Scytalidium* 属、*Trichoderma* 属等で(25,26)、また、細菌では *Pseudomonas* 属 や *Arthrobacter* 属、*Acinetobacter* 属、*Alcaligenes* 属、*Bacillus* 属、*Chlorella* 属、*Cryptococcus* 属等(27-31)でシアン化合物の分解菌が確認されている。この中でも、13種の *Bacillus* 属細菌のコンソーシアムによるシア

ン分解の実験では、高いシアン化合物の分解活性が確認されている(32)。そこで本研究においては、まだバイオレメディエーション利用指針にも適合確認事例がないシアン化合物について、バイオオーグメンテーションの国内における実用化を目的とし、実汚染サイトからシアン分解細菌を単離し、その酵素活性について、調べた。詳細を第4章に示す。

第2章 塩素化エチレン類の VOC 脱塩素化コンソーシアの作成

1. はじめに

塩素化エチレン類は、工業的に非常に利便性が高く、広く使用されてきた。よく使われていたのは、PCE や TCE で、PCE は塩素原子が 4 つ、TCE は塩素原子が 3 つ入った構造である。PCE や TCE が地盤中に浸透した場合、好気条件下においてはほとんど生分解を受けないが、嫌気条件下においては、塩素原子が脱塩素化され、塩素原子が 2 つの *cis*-DCE や *trans*-DCE、1,1-DCE や塩素原子が 1 つの CE が生成することがある。これら脱塩素化された生成物も有害であり、塩素原子が減るほど、オクタノール水分配係数が下がることで、より土粒子に吸着されにくくなり、地下水により遠くまで移動しやすくなってしまふ(33)。さらに、最終的な脱塩素化生成物である CE は発がん性が示唆されており(34)、土壤汚染対策法における指定基準値が塩素化エチレン類の中で最も低い。したがって、塩素化エチレン類は、脱塩素化生成物も含めて、完全に脱塩素化することが非常に重要である。

そこで、サイトによってクロロエチレンまで完全に脱塩素化することが難しい、既存のバイオスティムレーションではなく、より確実に完全な脱塩素化が可能なバイオオーグメンテーションに着目した。さらに、バイオオーグメンテーションの短所を克服し、かつ、長所を活かすために、我々は元々サイトに生息している土着の微生物を利用して複数の細菌をあえて含んだコンソーシアを用いたオーグメンテーションを行う手法を試みた。

バイオスティムレーションだけでは塩素化エチレン類の脱塩素化が非常に遅い、もしくはほとんど脱塩素化が起こらない TCE 汚染サイトから土壤・地下水を採取し、PCE や TCE を添加して継代培養を実施し、*Dehalococcoides* 属の細菌を含む微生物群（以後、コンソーシア）を増殖させ、PCE や TCE の脱塩素化活性を高めた後に、サイトに戻す新しい手法を試みた (Fig.2-1)。本手法のメリットは、1) *Dehalococcoides* 属の細菌を含む微生物群を元のサイトから取得しているため、その環境に合った生残性が高い微生物群が取得でき、高い脱塩素化活性が期待できること、2) 元々サイト由来の微生物のため、生態系に与

える影響が最小限と考えられること，である．一方，コンソーシアを用いたバイオオーグメンテーションで最も大きな問題となるのは，投入するコンソーシアの安全性の評価である．近年の DNA 解析技術の進歩により，コンソーシアの微生物群の遺伝情報を解析することで安全性の評価が可能となっている(15)．

本研究においては，沖縄県内のある試験サイトにおいて，TCE 脱塩素化微生物コンソーシアの取得と構築，解析，また，実サイトにおける実証試験の実施を行い，TCE 脱塩素化微生物コンソーシアの有用性を確認することができたので以下に述べる．

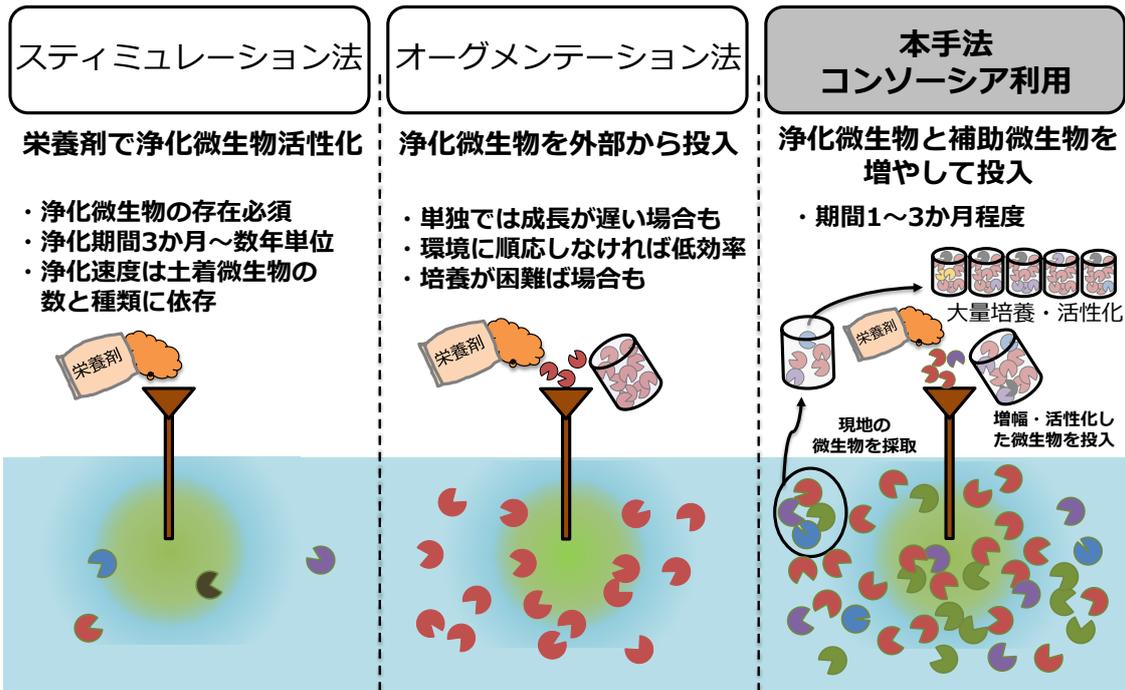


Fig.2-1 Overview of new bioaugmentation method in this study.

2. 材料と方法

2. 1 OKINAWA コンソーシアの取得

2. 1. 1 OKINAWA コンソーシアの構築

サンプリングした土壌・地下水は嫌氣的に塩素化エチレン類の脱塩素化が促進される条件で培養をおこなった。培地組成を Table2-1,2-2 に示す。炭素源や微量ミネラル及び TCE もしくは PCE を添加した培地を用い、アルゴンで置換した気相中に水素を添加し、密閉したバイアル中で培養した。定期的に TCE や PCE および脱塩素化生成物の濃度測定を行い、脱塩素化が確認された場合、培養液の一部を新しい培地に接種し、継代を行い、安定して TCE や PCE をエチレンまでを完全に脱塩素化できるコンソーシア（以後、OKINAWA コンソーシア）を構築した。また、次世代シーケンサー（MiSeq, Illumina 社）の解析により菌叢解析も行った。安全性については、次世代シーケンサーで得られた菌叢情報を独立行政法人製品評価技術基盤機構の微生物有害情報リストと比較することで確認した。

2. 1. 2 事前の室内試験

実証試験の実施サイトから取得した OKINAWA コンソーシアについて、実際の土壌中における脱塩素化活性の有無や、OKINAWA コンソーシアの添加率、また、使用する薬剤の検討を行う目的で、事前検討を行った。事前検討は、実証試験を実施するサイトから採取した土壌・地下水を 100mL 容バイアルに入れ、TCE、PCE と浄化薬剤、そして OKINAWA コンソーシアを添加し、培養を行った。培養期間中は、定期的に TCE や PCE および脱塩素化生成物の濃度を分析し、脱塩素化の状況を確認した。

2. 2 OKINAWA コンソーシアの取得と実証試験

実証試験は沖縄県内のあるサイトにおいて、関係者に合意をとった後に行った。当該サイトの汚染原因は不明であるが、当該サイトは地下水において環境基準前後で、PCE や TCE とその脱塩素化生成物が検出されていることが事前の調査から判明していた。

実証試験においては、1回のみ注入する浄化薬剤は注入管を用いて注入した。OKINAWA コンソーシアは注入井戸を用いて注入し、注入井戸の周囲に設置した観測井戸を用いて、PCE や TCE とその脱塩素化生成物の濃度について定期的に測定を実施した。井戸の配置と深度を Fig.2-2, Fig.2-3 示す。反応区においては、ポリ乳酸系の薬剤を予め OKINAWA コンソーシアを注入する実証試験範囲全体に注入した。ポリ乳酸系の薬剤（HRC, REGENESIS 社）注入 2 週間後、培養後の OKINAWA コンソーシアを注入井戸からおよそ 5L 程度注入した。対照区は反応区において OKINAWA コンソーシアを注入したのと同時期に約 5L のミネラルウォーターを注入した。注入後は約 120 日間にわたって地下水のモニタリングを続けた。地下水をサンプリングし、ガスクロマトグラフィーによる塩素化エチレンの定量と定量 PCR による *Dehalococcoides* 属細菌 16S rRNA 遺伝子の定量を行った。

Table 2-1 Componets of medium

Component	amount
MilliQ	1000 mL
1000×Trace element	1 mL
NH ₄ Cl	500 mg
K ₂ HPO ₄	2140 mg
KH ₂ PO ₄	1170 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	120 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	28 mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	4.8 mg
Yeast extract	100 mg
L-cysteine · HCl · H ₂ O	300 mg
NaHCO ₃	2520 mg
Na ₂ S · 9H ₂ O	48 mg
Na resazurin	1 mg
Vitamin B12 solution	1 mg
5 M CH ₃ COOK	200 μL

Table 2-2 Components of trace element

Components	amount
MilliQ	1000 mL
MnSO ₄ · 5H ₂ O	600 mg
H ₃ BO ₃	50 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	10 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	600 mg
NiSO ₄ · 6H ₂ O	60 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	60 mg

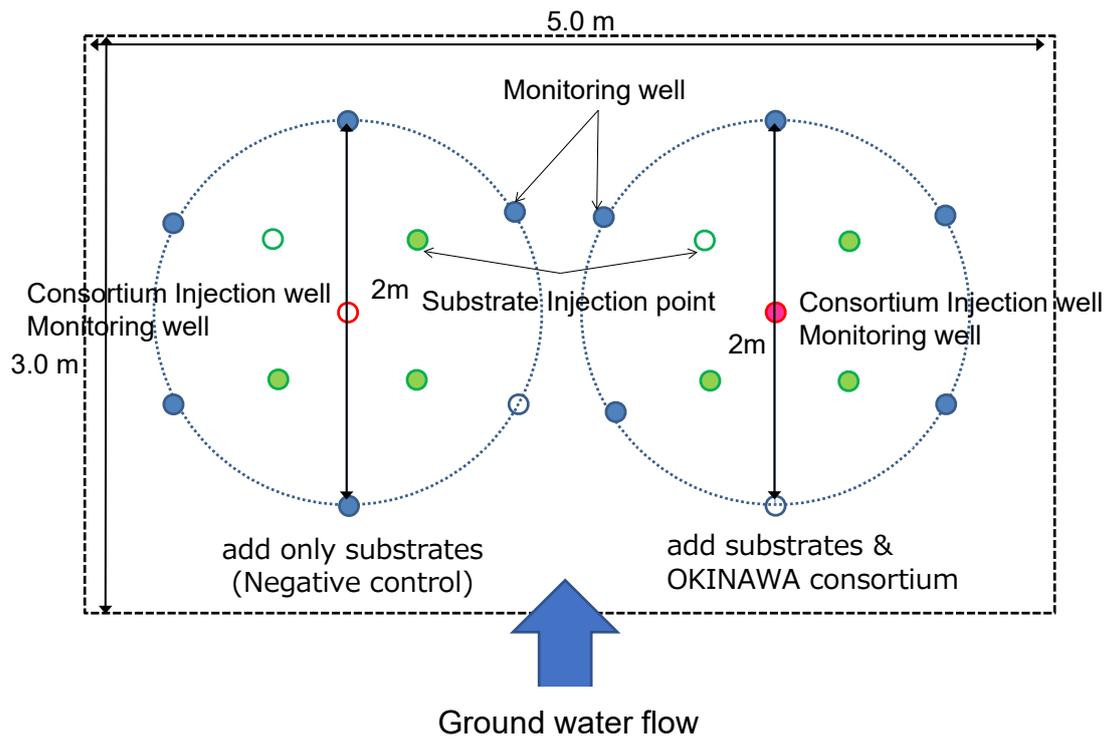


Fig.2-2 Well location of pilot test

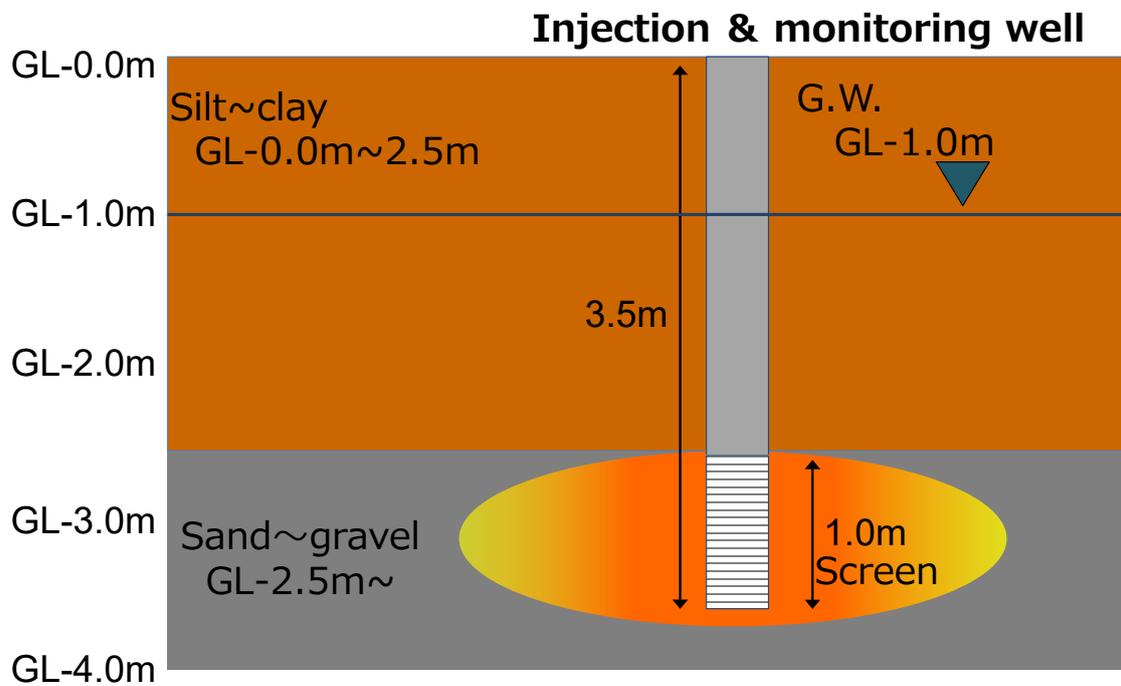


Fig.2-3 Well depth of pilot test

Table 2-3 Components of lab.test medium

Component	amount
Ground Water	1000 mL
Yeast extract	100 mg
NaHCO ₃	2520 mg
Na ₂ S · 9H ₂ O	48 mg
Na resazurin	1 mg
Vitamin B12 solution	1 mg
CH ₃ COONa or C ₃ H ₅ NaO ₃	1000 mg

3. 結果と考察

3. 1 OKINAWA コンソーシアの取得

3. 1. 1 OKINAWA コンソーシアの脱塩素化活性など

沖縄県内の様々な地点の湧水や土壌のサンプリングを行い、塩素化エチレン類脱塩素化コンソーシアの構築を行った。サンプリングを行ったサイトを Fig.2-4 に示す。サンプリングは、過去に塩素化 VOC が検出されていたか、現在も検出がされているサイトやその地下水流向下流側と推定されるサイトを重点的に、沖縄本島及び石垣島において行った。サンプリングされた地下水を速やかに実験室に送り、培地と水素、塩素化 VOCs を添加して培養すると、いくつかのサイトからサンプリングした地下水において、塩素化 VOC の脱塩素化が確認された（データ無し）。その中で、現在も TCE やその脱塩素化生成物が検出されている沖縄本島のサイトから採取した地下水に着目し、集積培養を行った。その結果、PCE や TCE を速やかにエチレンまで脱塩素する OKINAWA コンソーシアを獲得した（Fig.2-5）。OKINAWA コンソーシアには *Dehalococcoides* 属細菌が非常に高い密度(1.0×10^7 copies/mL)で存在していた。また、次世代シーケンサーの解析により、およそ 1,118 種の細菌により構成されていると推定された（Fig.2-6, 2-7）。そのうち、*Dehalococcoides* 属細菌の OTU はわずか全体の 0.4%であり、*Dehalococcoides* 属細菌以外の細菌が非常に多く含まれていることがわかった。なお、*Dehalococcoides* 属細菌が 0.4%であるのが、バイオオーグメンテーションを目的としたコンソーシアとして考えた場合、多いか少ないかについては、現時点では判断は難しい。

3. 1. 2 OKINAWA コンソーシアの事前の室内試験

Dehalococcoides 属細菌の培養では水素ガスを使用していたが、屋外において大量に使用することは危険を伴うことから、水素ガスを使わない方法をとることとした。有機物の嫌気脱塩素化過程で発生する水素を *Dehalococcoides* 属細菌が脱塩素化に用いることが知られて

いることから、水素を添加することなく、脱塩素化がおこる基質を探索することを目的に複数の組成の培地で試験を実施した。その結果、ポリ乳酸系の薬剤を基質として用いた系において、最終的な脱塩素化生成物まで脱塩素化が進んだ (Fig.2-8)。このことから、ポリ乳酸系の薬剤を使用すれば、水素ガスの添加無しで OKINAWA コンソーシアによる脱塩素化が起こることが確認された。したがって、試験施工においては、ポリ乳酸系の基質を用いることとし、水素ガスを使わないこととした。

また、室内試験の結果から、OKINAWA コンソーシアの添加量が多いほど脱塩素化活性は高まったものの、土壌の体積に対して 0.1%の OKINAWA コンソーシアを添加でも十分な脱塩素化が確認された (Fig.2-8)。最終的な実用化を想定した場合、できるだけ少ない添加量で実施することが望ましいと考え、OKINAWA コンソーシアの添加量を土壌の体積に対して 0.1%とすることとした。

3. 2 OKINAWA コンソーシアを用いた実証試験の結果

注入井戸と観測井戸の配置を Fig.2-2, 2-3 に、地下水モニタリング結果を Fig.2-9 に示す。対照区においては、濃度にばらつきがあり、突発的に検出下限値未満となる日もあるが、TCE 濃度が緩やかに減少していき、80 日後以降 TCE が検出下限値未満となった。一方、TCE の脱塩素化生成物である *cis*-DCE 濃度が上昇し、およそ 120 日目でピークとなった。しかし、*cis*-DCE がさらに脱塩素された CE は試験期間中検出されなかった。*Dehalococcoides* 属細菌以外の細菌も TCE から *cis*-DCE までは脱塩素できるので(35)、対照区においては、*Dehalococcoides* 属細菌が存在せず、土着の様々な脱塩素化微生物による TCE の脱塩素反応が進行したと考えられる。一方、反応区においては、TCE が速やかに減少していき、30 日前後で定量下限値未満となった。さらに、脱塩素化生成物である *cis*-DCE は 20 日前後でピークを迎え、CE も 30 日後に検出された後、検出下限値未満となった。その後は、*cis*-DCE が定量下限値前後でわずかに検出されたものの、その他の塩素化エチレン類は検出されな

かった。したがって、反応区においては、TCE が投入された OKINAWA コンソーシアにより速やかにエチレンまで脱塩素化されて、消失したと考えられる。

定量PCRで地下水中の *Dehalococcoides* 細菌の 16S rRNA 遺伝子を測定し、*Dehalococcoides* 属細菌の存在量をモニタリングした (Fig.2-9)。*Dehalococcoides* 属細菌は、対照区においては検出下限値前後であった。一方、反応区においては、OKINAWA コンソーシア投入直後に *Dehalococcoides* 属細菌が 1.0×10^7 copies/mL の密度で存在し、最大値を示している。その後、 1.0×10^6 copies/mL 程度で約 50 日間にわたり維持された。50 日間の間に TCE の脱塩素化生成物である CE の発生まで確認されていることから、TCE の脱塩素反応は、*Dehalococcoides* 属細菌が 1.0×10^6 copies/mL 程度を維持している 50 日間において特に活発であったと考えられる。その後、塩素化エチレン類の濃度が低下した 60 日目以降は徐々に減少傾向となり、100 日目でほとんど検出下限値近くにまで下がった。投入された *Dehalococcoides* 属細菌は地下水中の TCE やその脱塩素化生成物を脱塩素することで、密度を維持していた一方、TCE やその脱塩素化生成物濃度が十分下がった後には、基質となる塩素化エチレン類がなくなったことで徐々にその密度を減らしていった可能性が考えられる。このことは、外部から投入された *Dehalococcoides* 属細菌は塩素化エチレン類が脱塩素されて役目を終えた後に、すみやかにその密度を減らすことを示唆している。また、OKINAWA コンソーシアは、共存する微生物も同サイト由来のものであり、環境影響は最小限と考えている。

以上から、*Dehalococcoides* 属の細菌を含む微生物群を汚染源の近傍のサイトから取得する手法が有効であることが確認された。ただし、本手法は、コンソーシアの構築に要する時間や、コンソーシアを構成する細菌種が非常に多く安全性の評価には次世代シーケンサーによる高精度の解析が必要という問題がある。このため、時間的制約や利害関係者の多い実汚染案件には適用が難しく、実用化には課題がある。そこで、現実的に実用可能なバイオオーグメンテーションの技術を構築することを目的とし、より単純化した汎用性のあるコンソーシアを構築することを考えた。第3章で示す。

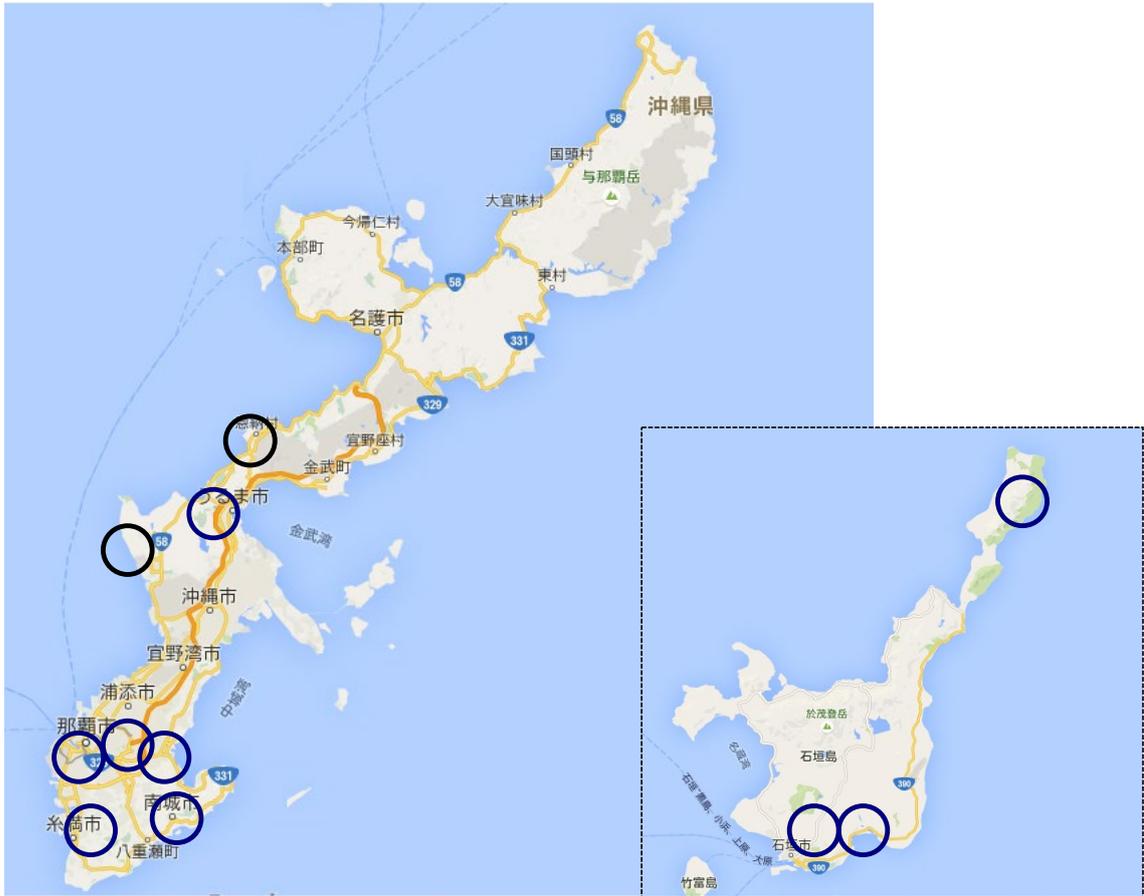


Fig.2-4 Smpling location of ground water or soil

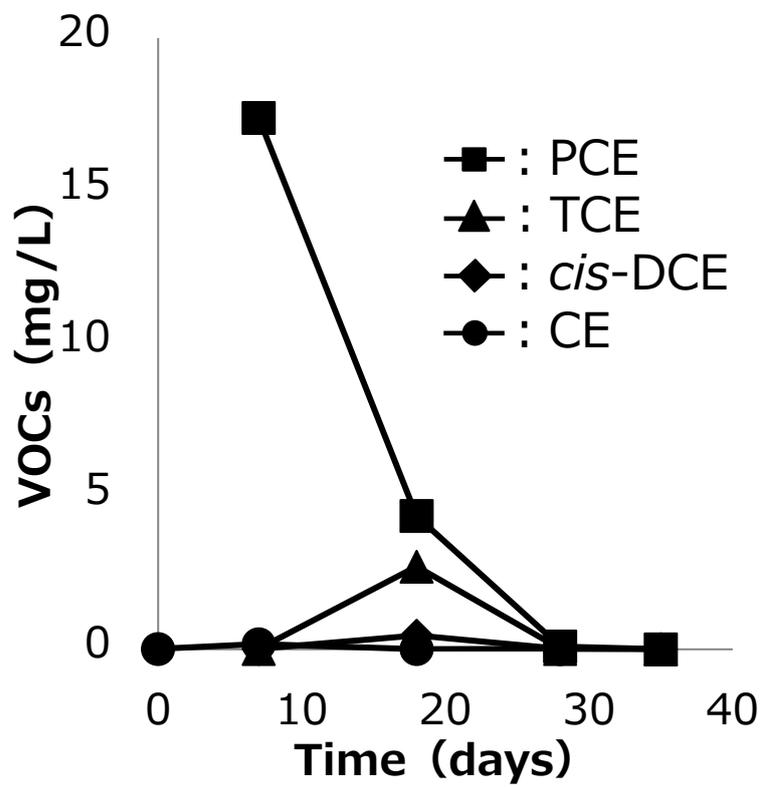


Fig.2-5 Dechlorination activity of OKINAWA consortium. OKINAWA consortium dechlorinated completely from PCE to ethylene about 30days.

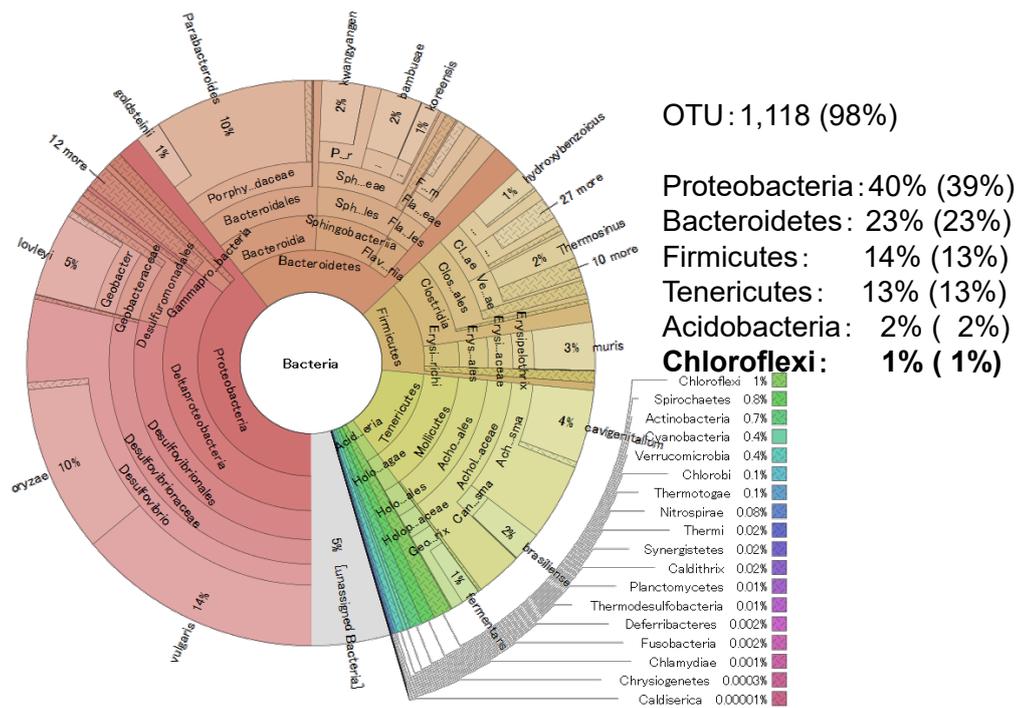


Fig.2-6 Result of 16SrRNA gene analysis of OKINAWA consortium using Next-generation sequencer(MiSeq). *Dehalococcoides* bolens to Choloflexi.

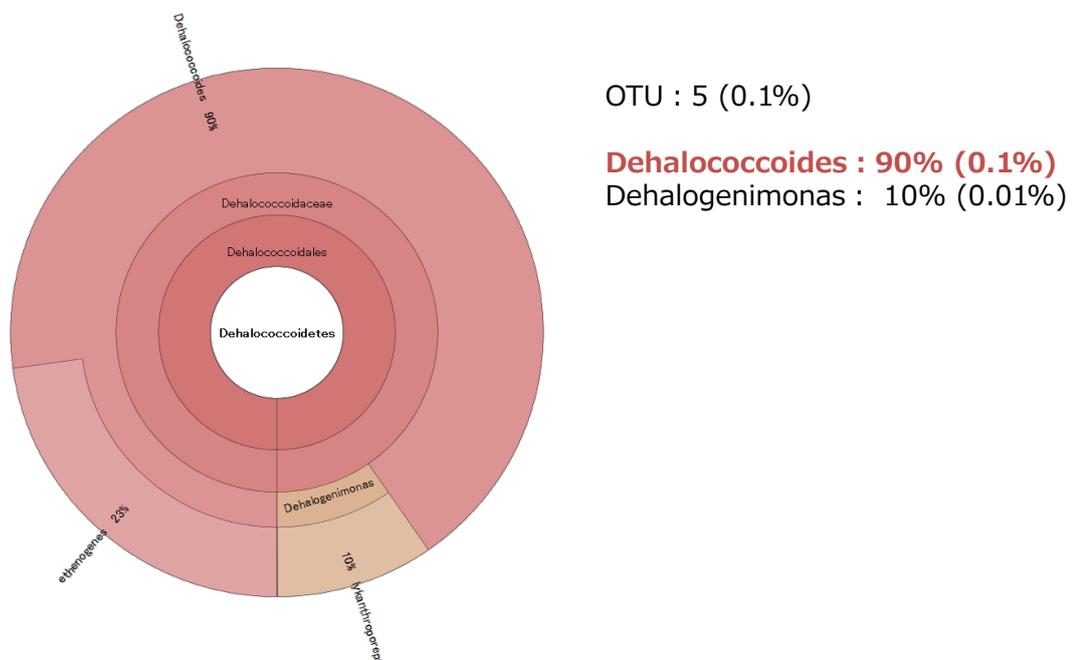
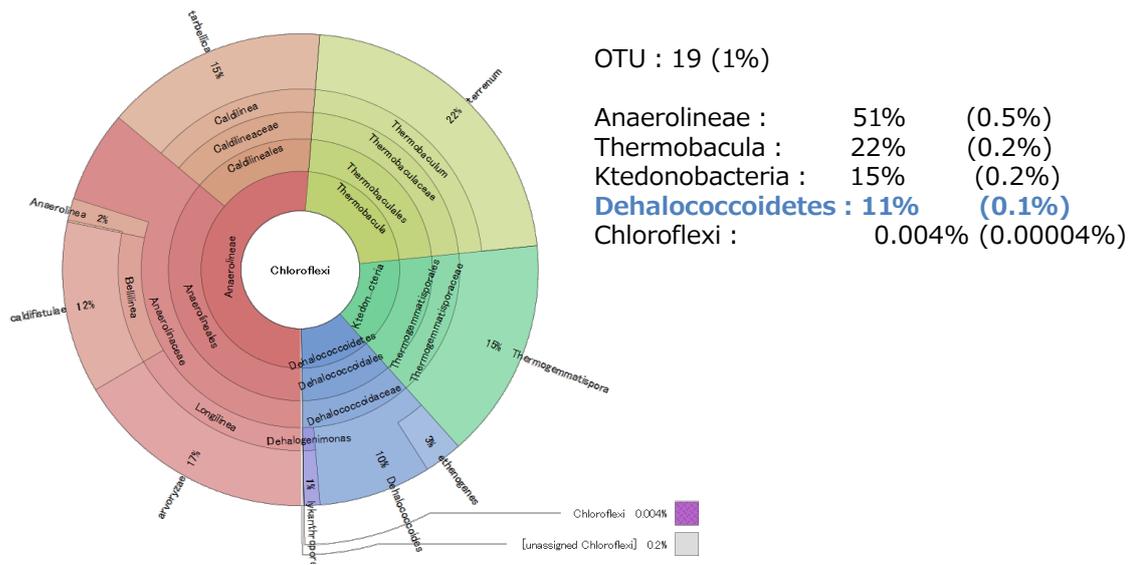


Fig.2-7 Result of 16SrRNA gene analysis of OKINAWA consortium using Next-generation sequencer(MiSeq). *Dehalococcoides* was only 5 OTU(5/1118).

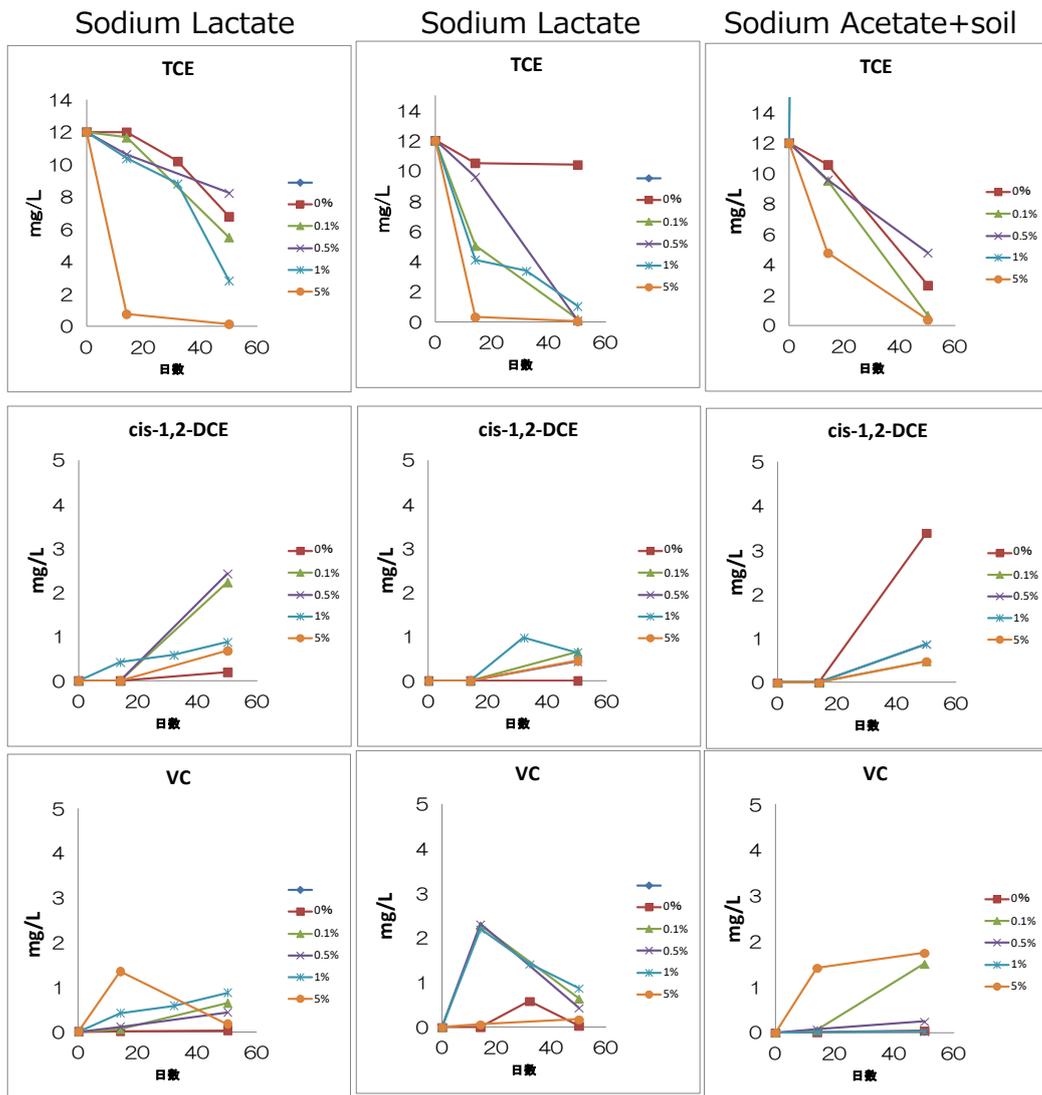


Fig.2-8 Result of dechlorination activity of OKINAWA consortium with several substrates.

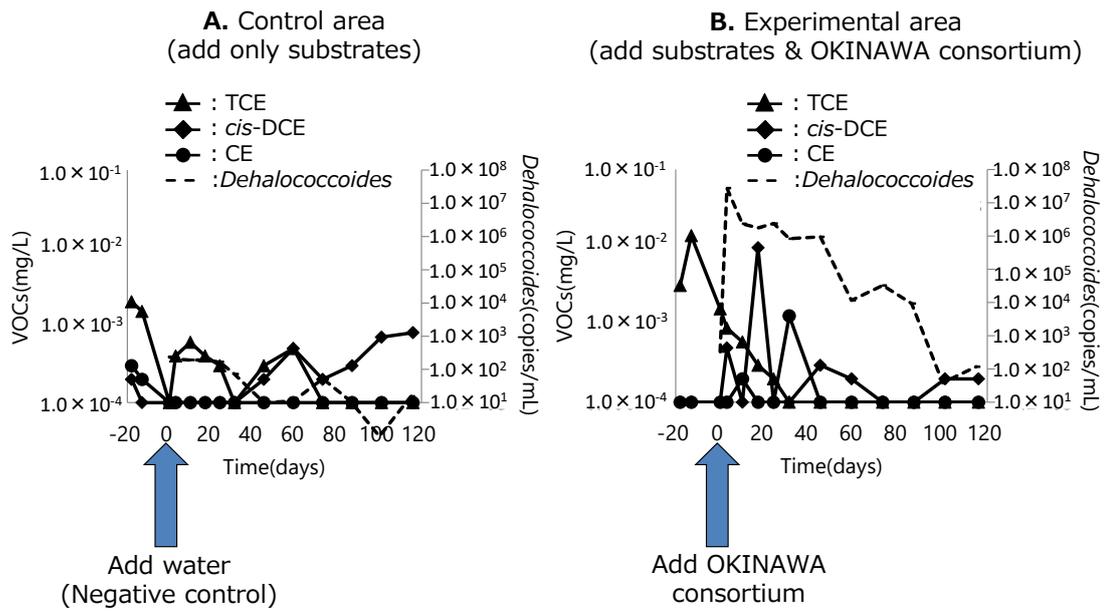


Fig.2-9 Result of pilot test in polluted site in OKINAWA.

4. まとめ

以上から、実汚染サイトから試料を採取し、土着菌を用いた塩素化エチレン類におけるコンソーシアを構築し、その有用性が確認した。今後は、実際のサイトに適用するために、コンソーシアの構築方法の標準化や現地への供給方法等を検討するとともに、様々なサイトに適用し、実用化していくことを考えている。本手法は、煩雑な脱塩素化菌の単離作業を必要としないメリットがある。

一方、サイトに全く脱塩素化菌が存在しない場合は適用することが難しいため、外部の脱塩素化菌を導入する必要がある。第3章においては、全く脱塩素化菌が存在しないサイト等にも適用できるよう、より単純化した汎用性があるコンソーシアの構築について述べる。

第3章 より単純化した塩素化エチレン類の脱塩素化コンソーシアの作成

1. はじめに

第2章本においては、沖縄県内のある試験サイトにおいて、TCE 脱塩素化コンソーシアの取得と構築、解析、また、実サイトにおける実証試験の実施を行い、TCE 脱塩素化コンソーシアの有用性を確認することができた。しかし、本手法で構築された TCE 脱塩素化微生物コンソーシアは、単離作業等の煩雑な作業の必要がない一方、サイトに全く脱塩素化菌が存在しないサイトには適用できない。そこで、我々は、*Dehalococcoides* 属の細菌とその生育を補助する数種の細菌を混合培養することで、より少ない細菌種からなる単純化された TCE 脱塩素化コンソーシアを構築した。構築したコンソーシアは、*Dehalococcoides* 属の細菌とその生育を補助すると考えられる細菌を含む4種により構成されている。本コンソーシアを実汚染サイトに適用できるか評価する目的で室内における適用性試験を行った。その結果、およそ30日で対象物質が環境基準値以下となり、その有効性が確認することができた。

今後は、本コンソーシアを用い、実汚染サイトから採取した土壌・地下水における室内試験を実施した後、実サイトに適用する検討を行っていく予定である。

以降は、コンソーシアを利用したバイオオーグメンテーションについて詳細を示す。

2. 材料と方法

2. 1 ATV1 コンソーシアの構築

愛知県内の TCE 汚染サイトより採取した地下水から構築した Aichi コンソーシアから単離された *Dehalococcoides mccartyi* UCH-ATV1 (以降, ATV1 とする) と先行研究(36)によって構築された IBARAKI コンソーシアの共存菌を混合することで, 新規のコンソーシアを製作し ATV1 コンソーシアとした.

2. 2 ATV1 コンソーシアの解析

構築したコンソーシアからメタゲノムを抽出し, 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE と次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina 社) で解析を行い, コンソーシアの構成細菌を網羅的に解析した. 安全性については, 次世代シーケンサーで得られた菌叢情報を独立行政法人製品評価技術基盤機構の微生物有害情報リストと比較することで確認した.

2. 3 ATV1 コンソーシアの脱塩素化性能試験

塩素化エチレンの脱塩素化は, 実験全体を通して, 容器内の気相部分 (ヘッドスペース) を分取し, ガスクロマトグラフィーによって評価した. ガスクロマトグラフ装置は Shimadzu GC 1024, 検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) を使用した. ヘッドスペース成分は 100 μ L を分取し, ガスクロ装置へ注入した. ヘッドスペース成分は, DB-624 カラム (60m by 0.32mm, Agilent Technology) を用いて分離した.

2. 4 実汚染サイトの試料を用いた室内試験

関東の実汚染サイトからボーリング作業によって採取した土壌・地下水試料を速やかに研究室に持ち帰った. 得られた ATV1 コンソーシアをおよそ mL あたり *Dehalococcoides* 属細菌のコピー数で 10⁵cell 程度となるように調整し, 100mL バイアルに添加した. また, 基質は, より実際のサイトへの適用を想定し, 乳酸ナトリウムまたは酢酸ナトリウムを主体と

し、水素ガスは添加しなかった。培地組成を Table2-3 に示す。

塩素化エチレンの脱塩素化は、実験全体を通して、容器内の気相部分（ヘッドスペース）を分取し、ガスクロマトグラフィーによって評価した。ガスクロマトグラフ装置は Shimadzu GC 1024, 検出器は水素炎イオン化検出器（FID）を使用した。ヘッドスペース成分は 100 μ L を分取し、ガスクロ装置へ注入した。ヘッドスペース成分は, DB-624 カラム (60m by 0.32mm, Agilent Technology) を用いて分離した。

3. 結果と考察

3. 1 ATV1 コンソーシアの構築

既存研究において、愛知県内の TCE 汚染サイトより採取した地下水から、TCE をエチレンまで脱塩素化するコンソーシアを構築している。この Aichi コンソーシアは非常に高い脱塩素化能を有していたが、比較的多数の菌が共存していることから、そのままバイオオーグメンテーションに利用することは困難であると判断した。その後、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター内野氏により、シェイクアガー法にて Aichi コンソーシアに存在する *Dehalococcoides* 属細菌の単離が行われた。単離された *Dehalococcoides* 属細菌は脱塩素酵素のコードする遺伝子である *tceA* と *vcrA* を保有しており、*Dehalococcoides mccartyi* UCHATV1 (以降, ATV1 とする) と命名した(15)。単離した ATV1 の増殖は遅く、単独でバイオオーグメンテーションに利用することは不可能であった。

また、先行研究(36)によって、蓮池の底泥を接種源とし、*cis*-DCE を添加して継代培養を繰り返すことで、*Dehalococcoides* 属細菌を含む *cis*-DCE をエチレンにまで完全に脱塩素化する IBARAKI コンソーシアを取得していた。PCR-DGGE 及び次世代 DNA シーケンサーによる解析により、*Dehalococcoides* 属細菌次いで *Desulfovibrio* 属細菌が多く存在していることが示されていた。しかし、IBARAKI コンソーシアは Aichi コンソーシアと比較して TCE が脱塩素化できない等、脱塩素化能が低く実用性は低かった。そこで、IBARAKI コンソーシアに共存する微生物が *Dehalococcoides* 属細菌の生育を促進していると考え、TCE の脱塩素化活性も有する ATV1 と組み合わせてコンソーシアを再構築することを考えた。まず、IBARAKI コンソーシアを、*cis*-DCE を添加せずに培養を行い、元々の *Dehalococcoides* 属細菌を死滅させたコンソーシアに単離した ATV1 を加え、ATV1-IBARAKI コンソーシアを構築した。この ATV1-IBARAKI コンソーシアは、80 日間においても *cis*-DCE を完全脱塩素化できなかった ATV1 の純粋培養の場合(2)と比較して高い脱塩素化能を示したが、15 日間程度で *cis*-DCE を完全脱塩素化した Aichi コンソーシア(36)と比較してエチレンまでの脱塩

素化は遅かった (Fig.3-1).

そこで、元の IBARAKI コンソーシアの共存菌を単離し、ATV1 との共培養を行った。その結果、*Desulfovibrio* 属細菌と共培養した系において、TCE から *cis*-DCE への脱塩素が確認された (データ無し)。この結果から ATV1-IBARAKI コンソーシアにおいては、*Desulfovibrio* 属細菌が ATV1 の脱塩素を促進する細菌の一つであることが推定された。以後、本コンソーシアを ATV1 コンソーシアとした。

3. 2 ATV1 コンソーシアの脱塩素化能力

ATV1 と *Desulfovibrio* 属細菌との共培養系である ATV1 コンソーシアについて、継代を 4 代続けたところ、TCE の脱塩素化活性が非常に高い結果が得られた (Fig.3-2)。この結果は、*Desulfovibrio* 属細菌の代謝産物が ATV1 の脱塩素や生育を促進していることを示唆すると考えた。ここで、TCE の脱塩素が安定した本コンソーシアについて、念のため、その菌叢について解析を行った (Fig.2-12)。ATV1 コンソーシア内には、ATV1、*Desulfovibrio* 属細菌以外に *Petrimonas* 属細菌と *Clostridium* 属細菌が存在していた。なお、*Clostridium* 属細菌は IBARAKI コンソーシアの共存菌の 1 つであることから、*Desulfovibrio* 属細菌の単離が不完全であることが原因であった。一方、*Petrimonas* 属細菌は、初期の段階の IBARAKI コンソーシアに存在していたことから、微量に残存していた *Petrimonas* 属細菌によるものであると考えられる。4 代目以降も脱塩素化活性が安定していた (データ無し) ことから、継代を続ける段階で、徐々に存在比が増え、4 代目の TCE 脱塩素化能力が非常に高くなってきた段階において、現在の組成になったと推定される。

したがって、ATV1、*Desulfovibrio* 属細菌、*Petrimonas* 属細菌、*Clostridium* 属細菌の Fig.2-11 に示す構成をもって、高い TCE の脱塩素能力をもつ ATV1 コンソーシアの完成とした。

3. 3 ATV1 コンソーシアの構成菌について

Petrimonas 属細菌と *Clostridium* 属細菌はともにその近縁種が *Dehalococcoides* 属細菌の生育に欠かせない酢酸や水素を生成できることや、*Petrimonas* 属細菌は *Desulfovibrio* 属細菌が生育に必要な硫酸塩を生成できること等が分かっている (37, 38). さらに *Petrimonas* 属細菌は、遺伝子解析の結果、*Dehalococcoides* 属細菌の生育に必須なビタミン B12 の前駆物質を生成する遺伝子を保有していることが分かっている (Data not shown). *Dehalococcoides* 属細菌は自らコリノイドの合成ができないことができないことが分かっており (39), *Petrimonas* 属細菌は ATV1 コンソーシア内においても *Dehalococcoides* 属細菌へのコリノイドの供給に深く関与していることが示唆され、ATV1 コンソーシア内において、脱塩素に寄与していると考えられる。以上から ATV1 コンソーシアの推定される細菌同士のやり取りを Fig.3-3 に示す。

3. 4 実汚染サイトにおける ATV1 コンソーシアの脱塩素化活性

ATV1 コンソーシアを実際の汚染サイトにおける実用化を目的とし、実汚染サイトの非滅菌土壌・地下水を用いて、室内試験を実施した。結果を Fig.3-4 に示す。結果、ATV1 コンソーシアについて、*Dehalococcoides* 属細菌数を終濃度でおよそ 1.0×10^5 copies/mL 添加した試験系において、基質として乳酸 Na を用いた場合、0.3mg/L の PCE 及び *cis*-DCE, 0.1mg/L の TCE が完全に脱塩素化され、最終的な脱塩素化生成物である CE が 30 日で環境基準値以下にまで低減した。また、基質に培養時と同じ酢酸 Na を用いた場合、CE が 0.1mg/L 程度残留した。なお、ATV1 コンソーシアを添加せず、基質のみ添加した試験区においては、30 日でようやく途中の脱塩素化生成物である *cis*-DCE が低減し、最終的な脱塩素化生成物である CE の濃度上昇が確認されたのみであった。

このことから、ATV1 コンソーシアは、実汚染サイトにおいて、土着菌が存在していても、塩素化 VOCs を完全に脱塩素化し、最終的な脱塩素化生成物を速やかに低減させることが可能であると考えられた。一方、ATV1 コンソーシアを添加しなかった試験区においては、

ATV1 コンソーシアを添加した系と比較し、*cis-DCE* の濃度低減の開始が 10 日程度遅く、30 日間の培養において、CE の濃度低減までは確認されなかった。よって、本サイトにおいては、基質としての薬剤の投与だけでは、ATV1 コンソーシアを添加した場合と比較して、完全な脱塩素化までは時間がかかるか、CE 以降の脱塩素化が起きない可能性が高く、ATV1 コンソーシアのような *Dehalococcoides* 属細菌の投与をしない限り、浄化が進まない可能性が考えられた。なお、塩素化エチレン類の汚染サイトにおいて、薬剤の投与のみでは *cis-DCE* で脱塩素化が止まってしまうサイトが非常に多い。

また、今回、酢酸 Na を用いた試験区においては、30 日間の培養において、CE が残留し、完全な脱塩素に至らなかった。考えられる原因として、酢酸 Na は嫌気性条件下において、非常に生分解性が高い基質であることから、*Dehalococcoides* 属細菌に使われる前にメタン生成菌等の他の土着の細菌に使われてしまい、基質が足りなくなったことが考えられた。培養系においては、基質をコンソーシアが独占できるが、土着菌の存在下においては、ほかの細菌との競合が起こることから、基質の選択も重要な要素であることが示唆された。

また、培養 30 日目における *Dehalococcoides* 属細菌を 16SrRNA 遺伝子を鋳型として、リアルタイム PCR にて定量した結果を Table3-1 に示す。試験に用いたサイトの地下水において *Dehalococcoides* 属細菌は定量下限値未満であったが、コンソーシアをおよそ 1.0×10^5 copies/mL となるように添加した結果、乳酸 Na を用いた系においては、培養終了時にはおよそ 7.4×10^4 copies/mL となっていた一方、完全な脱塩素化が確認されなかった酢酸 Na を用いた系や基質のみを用いた系においてもそれぞれ 4.9×10^5 copies/mL、 6.1×10^4 copies/mL と *Dehalococcoides* 属細菌は乳酸 Na の系より多いか同等であった。なお、試験に使用した地下水においては定量下限値未満であった。

このことから、元々使用したサイトから採取した試料においても *Dehalococcoides* 属細菌は定量下限値未満で存在しており、基質の添加によって、*cis-DCE* までを脱塩素化して増殖したと考えられる。しかしながら、CE 濃度がほとんど低減していないことから、CE 脱塩素

化する酵素を持っていない *Dehalococcoides* 属細菌が増殖した可能性が考えられた。16SrRNA 遺伝子を鋳型としたリアルタイム PCR では *Dehalococcoides* 属細菌は属レベルの定量であるため、CE を脱塩素化できない *Dehalococcoides* 属細菌を区別することができない。また、酢酸 Na を用いた系においては、乳酸 Na を用いた系と比較して、*Dehalococcoides* 属細菌はおよそ 10 倍のコピー数が検出された。添加したコンソーシア由来の *Dehalococcoides* 属細菌に加え、土着の *Dehalococcoides* 属細菌も増加したことで、*Dehalococcoides* 属細菌としては総数が多くなった可能性が考えられる。しかしながら、酢酸 Na の競合がおきたことで、コンソーシア由来の *Dehalococcoides* 属細菌が十分に脱塩素化できなかった可能性がある。このことから、*Dehalococcoides* 属細菌同士の競合も鑑み、基質の選択を行う必要があると考えられた。

以上から、薬剤の投与のみでは脱塩素化が遅い、もしくは完全な脱塩素化が起きないサイトにおいて、ATV1 コンソーシアの有効性を確認した。

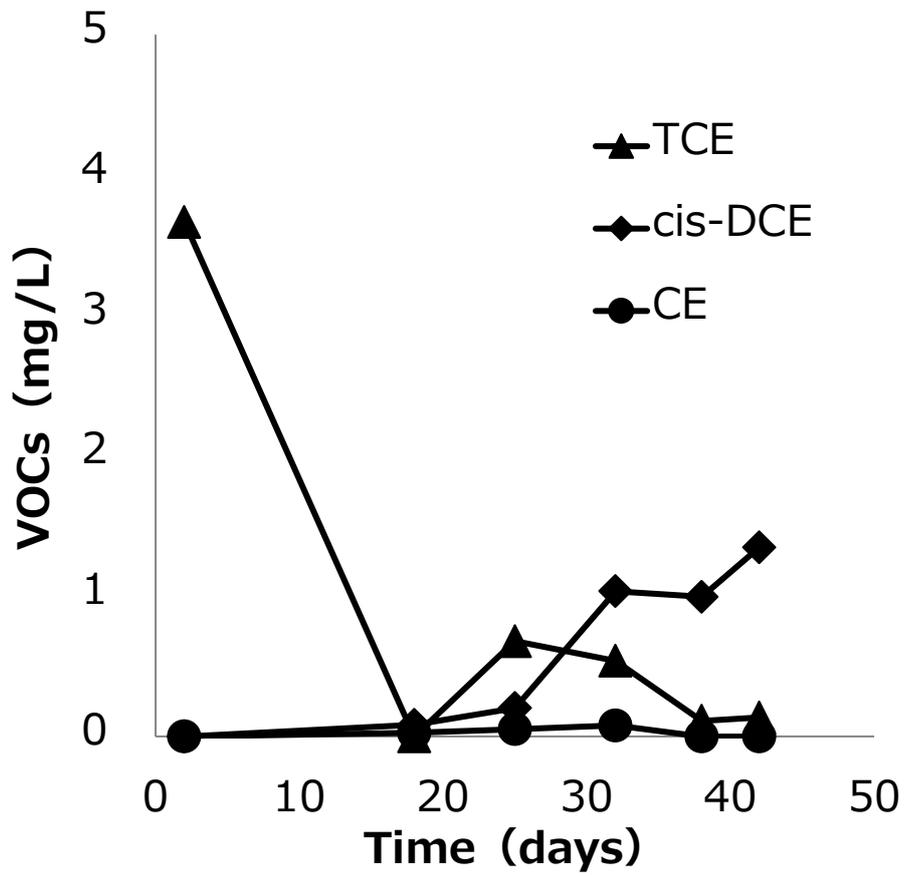


Fig.3-1 Dechlorination activity of ATV1-IBARAKI consortium.

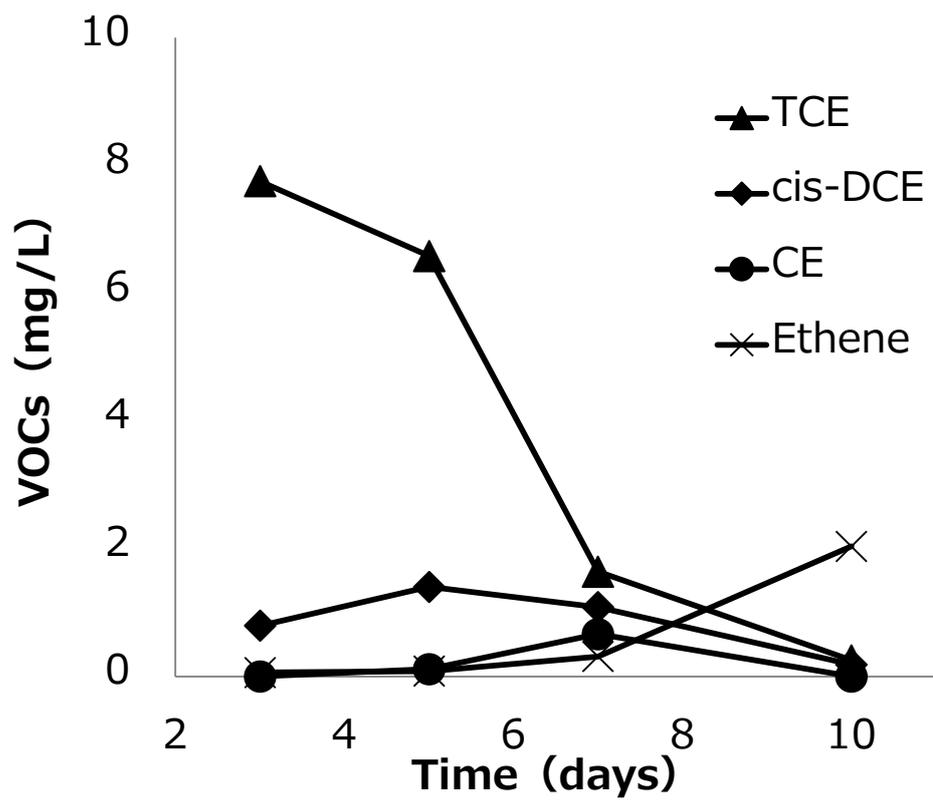


Fig.3-2 Dechlorination activity of ATVI consortium.

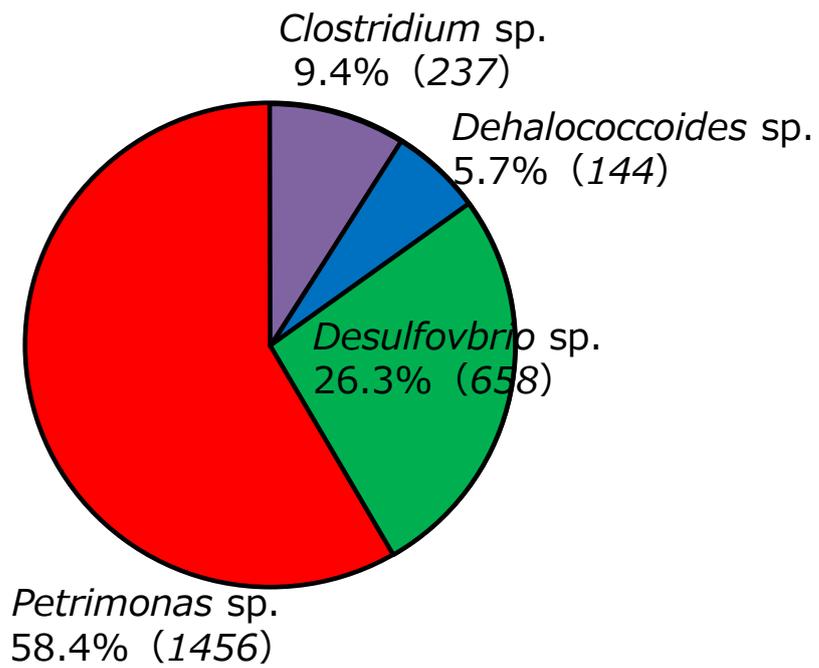


Fig.3-3 Result of 16S rRNA gene analysis of ATV1 consortium using Next-generation sequencer (MiSeq).

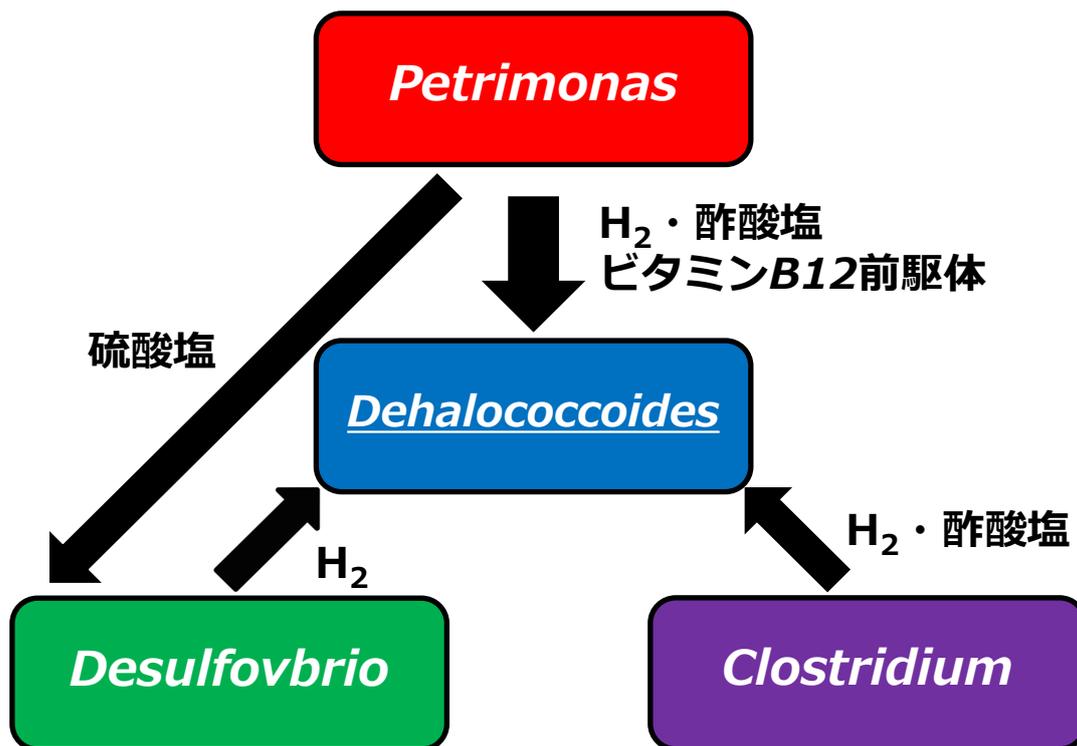


Fig.3-4 Possible relationships among bacteria in ATV1 consortium.

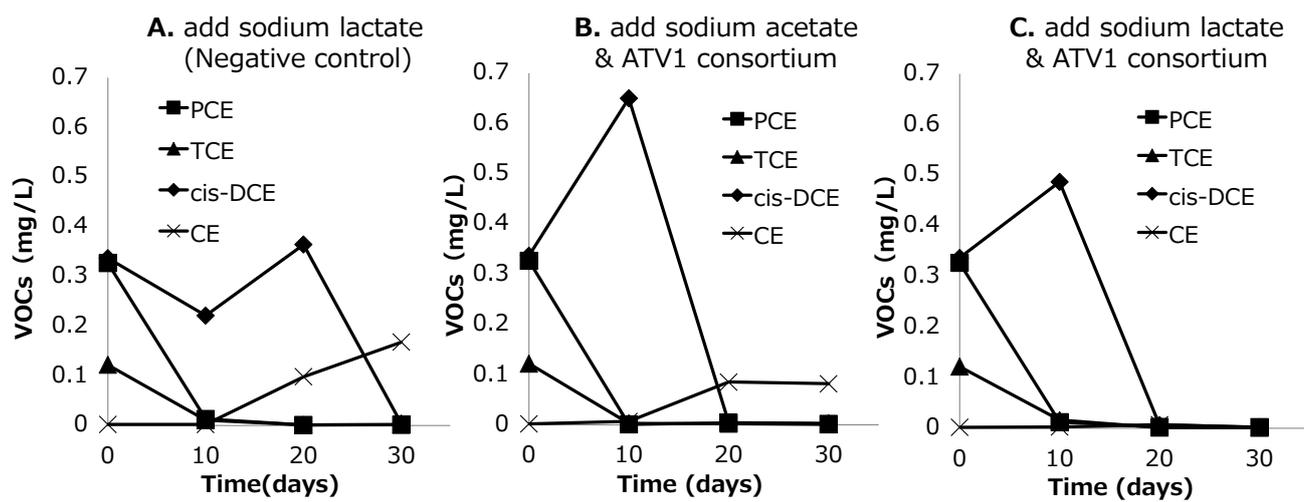


Fig.3-5 ATV1 dechlorination activity in sample from contaminated site.

Table3-1 Copies of *Dehalococcoides* measured by real time PCR(16SrRNA gene).

sample	<i>Dehalococcoides</i> (copies/g) or (copies/mL)
A. add sodium lactate (Negative control)	6.1×10^4 copies/g
B. add sodium acetate & ATV-1 consortium	4.9×10^5 copies/g
C. add sodium lactate & ATV-1 consortium	7.0×10^4 copies/g
D. ATV-1 consortium	1.2×10^8 copies/mL
E. ground water	$<1.0 \times 10^3$ copies/mL

4. まとめ

以上から、塩素化エチレン類におけるコンソーシアの有用性が確認されたとともに、非常に塩素化エチレン類の脱塩素化活性が高い ATV1 コンソーシアの構築に成功した。また、実汚染サイトの試料を用いて、室内試験ではあるものの、他の土着細菌等が存在する環境下においてもその高い脱塩素化活性により、PCE の完全な脱塩素化に成功した。今後は、実際のサイトに適用するために、コンソーシアの現地への供給方法等を検討するとともに、現地における試験施工を実施し、バイオレメディエーション利用指針の適合確認を受けるための追加試験を実施していく。適合確認を受けた後には、様々なサイトに適用し、実用化していく。

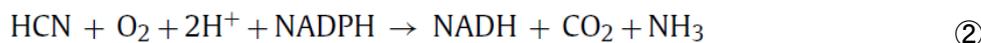
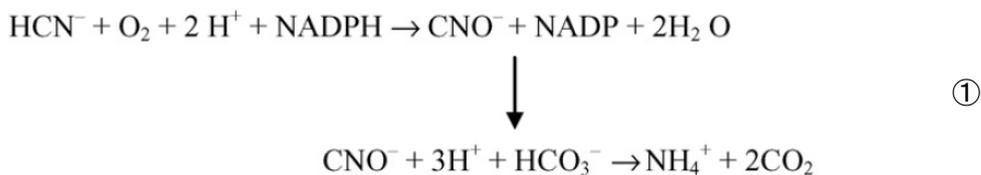
第4章 シアン化合物のバイオレメディエーション

1 はじめに

1. 1 酸化分解酵素

シアン化合物の生分解においては、大きく分けて加水分解、酸化分解、還元分解、置換・転移、合成の4つのタイプが知られている(40).

このうち、酸化分解による生分解を触媒する代表的な酵素は、cyanide monooxygenase や cyanase と、cyanide dioxygenase がある(39,40). このうち、Cyanase の反応経路を①に、cyanide dioxygenase の反応経路を②に示す. シアン化合物の酸化分解においては、NADPH を必要とし、この経路を利用する微生物はシアンとは別に炭素源を必要とする. また、これらの酵素は、土壌環境中等において、シアン化合物から遊離してきた毒性の強い HCN の分解を触媒することが可能である. 重炭酸塩を求核試薬として用い、シアンは不安定なカルバメートに変換された後、即座に脱炭酸反応が起こり、アンモニウムイオンと二酸化炭素にまで分解される.



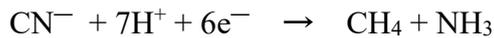
例えば、*Pseudomonas fluorescens* NCIMB11764 が持つ Cyanide oxygenase (CNO) は、4つのサブユニット (P1-P4) からなる酵素で、シアン化合物からアンモニアとギ酸に分解する. このうち、P1 は多量体で 230-kDa のフラボタンパク質であり、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼの機能を持つ. P2 は過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼである. P3 は比較

的大きなオリゴマータンパク質で、シアン化合物加水分解活性を示す。最後の P4 は、炭酸脱水素酵素であり、Cyanide dioxygenase もまた、プテリン依存型酵素として知られている (43).

1. 2 酸化分解酵素

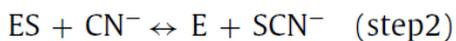
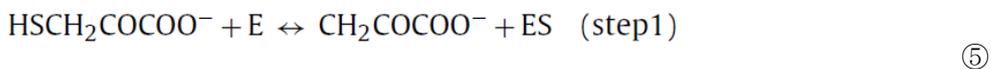
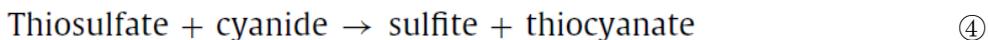
還元的経路の生分解を触媒する代表的な酵素は、ニトロゲナーゼ (41) であり、シアンからメタンとアンモニアを生成する。この経路の反応は主に嫌気的条件下で起こると考えられている (3)。

③



1. 3 置換・転移分解酵素

置換・転移経路の生分解を触媒する代表的な酵素は、ロダネーゼとメルカプトピルビン酸塩硫酸転移酵素 (42) の2つであり、シアン化合物をチオシアン酸塩に変換する(4, 5)。これらの酵素はシアンの同化作用に関与し、シアンとは別に窒素源を与え、シアンの毒性から守ることで微生物の増殖が促進する傾向にある。



1. 4 加水分解酵素

一方、微生物によるシアン化合物の分解経路のうち、最も多く知られているのは加水分解経路を用いた経路である。ニトリラーゼは、当初オオムギの葉からインドールアセトニトリ

ルからインドール酢酸を生成する酵素として見つかったが、その後、様々な加水分解酵素が真菌や細菌からも見つかった(44)。ニトリラーゼの加水分解経路には、炭素と窒素の3重結合を切断し、アミド化合物やアンモニアを生成する経路が知られている。一般には $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$ 構造に折りたたまれたホモオリゴマーであり、ニトリラーゼの活性中心にはシステイン、グルタミン酸、リシンが存在している(45)。また、ニトリラーゼは、比較的広い基質特異性を持ち、いくつかの有機シアンと遊離シアンの両方を分解可能である。

一方、同じニトリラーゼのグループに属する加水分解酵素で cyanide hydratase と cyanidase (cyanidase, CynD) は遊離シアンのみを分解することが可能である(46)。Cyanide hydratase は、真菌類に多く見られ、シアン化合物をホルムアミドとアンモニアに分解する。CynD は、ギ酸を生成することが知られており、他の細菌がもつ nitrilase とは高い相同性を持つ。また、Cyanide hydratase も他の細菌がもつ nitrilase と高い相同性が認められている。しかしながら、CynD と Cyanide hydratase は互いに約 25-30% しか相同性がなく、むしろ他の nitrilase との相同性の方が高い。

本研究においては、シアン化合物のバイオレメディエーションを実用化することを目的として、実汚染サイトの試料から *Pedobacter* strain EBE-1 と *Bacillus* strain EBE-2 の2種のシアン分解菌を単離した。単離したシアン分解菌について、シアン分解酵素を調べ、よりシアン分解活性が高かった *Bacillus* strain EBE-2 について、シアン分解酵素についてシアン分解活性を調べ、モデリングを行った。

2. 材料と方法

2. 1 実汚染サイトの地下水におけるシアンの分解

2. 1. 1 サンプルング

愛知県内の金属表面処理工場（サイト A）において、シアン化合物濃度が環境基準値を超過している井戸から、地下水のサンプルングを行った。井戸は全長 13m あり、サンプルングはベラーやペリスタルティックポンプを用い、井戸の底付近の地下水を採取した。採取した地下水は冷蔵し、速やかに研究室に持ち込んだ。

2. 1. 2 シアン分解活性の確認

サイト A の地下水は、研究室に到着後、滅菌済み 300mL 容の三角フラスコに分抽し、KCN をおよそ 12mg/L 添加した。一方に酵母エキス BSP-B（オリエンタル酵母工業）を 0.1%（W/W）添加し、反応区とした。もう一方には何も添加せず対照区とした。室温暗所にて 1 か月培養し、水中のシアン化合物濃度をピリジンカルボン酸・ピラズロン吸光光度法にて、全菌数は CFU 法にて測定した。

2. 2 シアン化合物分解菌の単離と系統解析

2. 2. 1 コロニー形成と単離

シアン分解後の地下水サンプルを寒天培地に塗布し、生成された単一コロニーを採取した。次に、採取したコロニーを液体培地へ植菌し、培養を行った。シアンの分解が確認された培養液を選んで、寒天培地に塗布し、同様にコロニー生成と液体培地での培養の操作を繰り返すことで、シアン化合物分解細菌の単離を試みた。

2. 2. 2 16SrRNA 遺伝子の解析

単離した細菌の DNA をテンプレートとして PCR を行った。使用した 16S rRNA 遺伝

子のユニバーサルプライマー配列, PCR 反応液組成, PCR 条件を Table4-1 に示す. PCR 産物は GEN 社の DNA 精製キット GENE CLEAN II を使用し, 精製した. 精製した PCR 産物は Ligation Mix を用いて, T-Vector pMD20 へライゲーションした.

次に, ヒートショックにより形質転換したコンピテントセルサンプルは, 37°C で 30 分間前培養しアンピシリンを加えたプレートに塗布し, 37°C で 16 時間培養した.

出現した白色のコロニーを採取し, pMD20 のマルチクローニングサイトの配列に結合する M13 Primer M4 及び M13 Primer Rv を用いて, コロニー PCR を行った. プライマー配列を Table4-4 に, 反応液組成を Table4-5 に, PCR 条件を Table4-6 に示す. アンピシリン入りの LB 培地に形質転換したコロニー懸濁液を 37°C で 16 時間振盪培養を行った. 菌体溶液を 2 ml チューブに移して 15,122g で 1 分間遠心分離し, 集菌した.

集菌後, キットによって, DNA 抽出し, 精製後, ユーロフィンジェノミクス株式会社にてシーケンス解析した.

2. 3 シアン分解酵素の解析

2. 3. 1 *Pedobacter* strain EBE-1 のニトリラーゼのクローニング

Pedobacter strain EBE-1 にもっとも近縁とされた *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 はシアン加水分解酵素であるニトリラーゼを 3 種類所有することがわかっている(23). それぞれ, ニトリラーゼ 1, 2, 3 とする. そこで, *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 由来のニトリラーゼ遺伝子配列からプライマーを設計し, 単離菌から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして KOD plus Neo を用いた Nested PCR による遺伝子の増幅を試みた. 使用したプライマー配列について, 外側を Table4-7, 内側を Table4-8, PCR 反応液組成を Table4-9, PCR 条件を Table4-10 に示す. また, TA クローニングを行うために, PCR 産物を鋳型にして *TaKaRa Ex Taq* を用いた PCR を行った. PCR 反応液組成を Table4-11, PCR 条件を Table4-12 に示す. 外側プライマーを用いた KOD plus Neo の 1 段階目の PCR で増幅さ

れる遺伝子は、ニトリラーゼ 1 の目的配列長が 837 bp, ニトリラーゼ 2 が 682 bp, ニトリラーゼ 3 が 625 bp であった。内側プライマーを用いた 2 段階目の PCR で増幅される遺伝子は、ニトリラーゼ 1 が 688 bp, ニトリラーゼ 2 が 619 bp, ニトリラーゼ 3 が 530 bp であった。更に、この PCR 産物をテンプレートとして行った *Ex Taq* の PCR で増幅される遺伝子は、ニトリラーゼ 1 の目的配列長が 688 bp, ニトリラーゼ 2 が 619 bp, ニトリラーゼ 3 が 530 bp であった。次に、PCR 産物を電気泳動し、増幅された目的の配列を精製した。精製したサンプルを pMD20 にライゲーション、DH α にトランスフォーメーションし、プラスミド抽出をした。その後、目的の遺伝子が正しくクローニングされているか確認するために、制限酵素切断確認を行った。抽出したプラスミドのインサートの両端のうち 1 ヶ所及び 2 ヶ所を切断するように適切な制限酵素で切断した。プラスミドマップを Fig2-1~2-3 に示す。

制限酵素には、T-Vector pMD20 のインサート両端を切断することが可能な *EcoRI*-HF , *SphI*-HF を使用した。バッファーは cut smart buffer を使用し、反応溶液を作成した。制限酵素切断確認の反応溶液組成を Table4-13 に示す。反応溶液は 37 °C で 17 時間反応させた。制限酵素処理を行ったサンプルを 1.5%アガロースゲル電気泳動し、目的の位置にバンドが得られたサンプルをユーロフィンジェノミクス株式会社にてシーケンス解析した。

2. 3. 2 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼのクローニング

Bacillus pumilus strain PDSLzg-1 はシアン加水分解酵素であるニトリラーゼを所有する。そこで、*Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 由来のニトリラーゼ遺伝子配列からプライマーを設計し、単離菌から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして *TaKaRa Ex Taq* を用いた PCR による遺伝子の増幅を試みた。使用したプライマー配列を Table4-14, PCR 反応液組成を Table4-15, PCR 条件を Table4-16 に示す。PCR で増幅される遺伝子は、795 bp であった。

次に、PCR 産物を電気泳動し、増幅された目的の配列を精製した。精製したサンプルを

pMD20 にライゲーション, DH α にトランスフォーメーションし, 植菌・プラスミド抽出をした。その後, 目的の遺伝子が正しくクローニングされているか確認するために, 制限酵素切断確認を行った。抽出したプラスミドのインサートの両端のうち 1 ヶ所及び 2 ヶ所を切断するように適切な制限酵素で切断した。プラスミドマップを Fig. 2-4 に示す。

制限酵素には, pMD20 のインサート両端を切断することが可能な *NdeI*, *XhoI* を使用した。バッファーは cut smart buffer を使用し, 反応溶液を作成した。制限酵素切断確認の反応溶液組成は以下の通りである (Table4-17)。反応溶液を 37 °C で 17 時間反応させた。

制限酵素処理を行ったサンプルを 1.5%アガロースゲル電気泳動し, 目的の位置にバンドが得られたサンプルをユーロフィンジェノミクス株式会社にてシーケンス解析した。

2. 3. 3 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼの大腸菌による発現

大腸菌に組み込まれた目的のニトリラーゼ遺伝子を pET23b (Fig. 2-5) に乗せ換えた。制限酵素は, pMD20 のインサート両端を切断することが可能な *NdeI*, *XhoI* を使用した。バッファーは cut smart buffer を使用し, 反応溶液を作成した。制限酵素切断確認の反応溶液組成を Table4-18 に示す。反応溶液を 37 °C で 17 時間反応させた。

反応溶液はアガロースゲルを用いて切り出し精製した。精製したサンプルをライゲーションさせて, DH5 α にトランスフォーメーションし, 植菌・プラスミド抽出をした。

乗せ換えができたか, 制限酵素にて確認をした。制限酵素には, pET23b のインサート内部と外部を切断することが可能な *EcoRI*, *ScaI* を使用した。バッファーは cut smart buffer を使用し, 反応溶液を作成した。制限酵素切断確認の反応溶液組成を Table4-19 に示す。反応溶液を 37 °C で 17 時間反応させた。

制限酵素処理を行ったサンプルを 1.5%アガロースゲル電気泳動し, 目的の位置にバンドが得られたか確認をした後, 乗せ換えしたプラスミドを BL21 (DE3) にトランスフォーメーションし, LB 培地で 18 °C で 40 時間培養した。

遠心分離により沈殿した菌体 1g を 50mM Tris Buffer (pH8.0) 20ml で溶かし、超音波破碎機を用いて菌体を氷上で破碎した。破碎により溶液が熱を持つため、2 分ごとに 2 分間の冷却を挟んで 5 回破碎を行った。この溶液を 15000 rpm で 30 分間遠心分離した。上清は可溶性画分として新しいファルコンに移し、沈殿は 50 mM Tris-HCl (pH8.0) を用いて再懸濁した。

次に、ニトリラーゼが発現したか、SDS-PAGE を用いて確認をした。各サンプル 7.5 μ l に対して 2 \times Sample Buffer を 7.5 μ l 加え、サーマルサイクラーを用いて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理をした。得られたサンプルを SDS-PAGE 用いて泳動した。マーカー、可溶性画分(S.S.)と不溶性画分(S.P)、インサートが入っていないベクターをコンピテントセルに同量加えたサンプル(N.C.)とし、可溶性画分と不溶性画分をそれぞれ 1 レーンずつ定電流で 30 mA, 1 時間程度流した。

2. 3. 4 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼ精製

菌体の破碎液を用意した。50mM Tris Buffer 50 ml で菌(4.9 mg)を溶かし、25 ml x 2 本に分けて、40 ml に薄めた。破碎する前に、プロテアーゼインヒビターをファルコン1本に 1 タブレット投入し、タンパク質を破壊するプロテアーゼを無力化させた。超音波破碎機を用いて菌体を氷上で破碎した。破碎により溶液が熱を持つため、2 分ごとに 2 分間の冷却を挟んで 5 回破碎を行った。破碎液は、4 $^{\circ}$ Cにて 24000 rpm , 30 min 遠心した。シリンジにフィルター(孔径 0.45 μ m)を装着し、上清をろ過した。

得られた上清は、陰イオン交換カラム(TOYOPEARL DEAE-650M, Toyobo, Osaka, Japan)を用い、NaCl 濃度を徐々に上げながら(リニアグラジエントで0-400 mM/NaCl), buffer A にてアプライした。得られたサンプルについて、buffer A にて一晩かけて透析(3.3 ml/cm \cdot 細孔径3-8 kD)した。

透析後のサンプルについてRESOURCE Q カラム(Cytiva, Tokyo, Japan)を用い、NaCl 濃度を徐々に上げながら(リニアグラジエントで0-400 mM/NaCl), buffer A にてアプライした。

得られたサンプルについて、限外濾過を実施し(micon Ultra, Merck Millipore, Billerica, CA),

その後, HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Cytiva)のカラムを用いて, buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, and 150 mM NaCl)にて, ゲル濾過クロマトグラフィーを行った.

2. 3. 5 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼ活性測定

精製されたシアン分解酵素について, KCN 270 ngを1.5 mlのbuffer Aに添加し, 30°Cで30分培養後, シアン濃度を測定した. また, CyanD 活性を以下の方法で測定した. 100 μ lの精製されたサンプルをbuffer A に0.8 mg/mlとなるように調整し, 676 ngのKCN, 6.9 μ MのNAD⁺, 1 unitのギ酸加水分解酵素 (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)を添加し, 1.4mlに調整した. ギ酸の生成について, NADHの増加を吸光度340 nmで測定した.

Table4-1 16S rRNA universal primer

Primer 名	配列
16SrRNA_Fw	5'-AGAGTTTGATCCTGCCTCAG-3'
16SrRNA_Rv	5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'

Table4-2 Component of PCR reaction liquid.

component	mass	concentration
<i>Ex</i> Taq (5 units / μl)	0.125 μl	2.5×10^{-2} units / μl
10 \times <i>Ex</i> Taq Buffer	2.5 μl	
dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μl	2.0×10^2 μM
Templete	1 μl	
10 μM primer (Fw)	1 μl	0.4 μM
10 μM primer (Rv)	1 μl	0.4 μM
milliQ	15.4 μl	
Total	25 μl	

Table4-3 Thermal cycle of PCR.

	°C	time	
Denature	96	5 m	
Denature	96	30 s	} 30 cycles
Annealing	50	30 s	
Extension	72	2 m	
	72	7 m	
	4	∞	

Table4-4 M13 primer.

Primer	sequence
M13 RV	5'-CAGGA AACAGCTATGAC-3'
M13 M4	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Table4-5 Component of PCR reaction liquid.

Components	mass	concentration
Colony sus	1.0 μ l	
10 \times ThermoPolBuffer	1.0 μ l	
2.5 mM dNTP Mixture	1.0 μ l	2.5 \times 10 ² μ M
10 μ M primer (Fw)	0.5 μ l	0.5 μ M
10 μ M primer (Rv)	0.5 μ l	0.5 μ M
Taq polymerase	0.05 μ l	
dH ₂ O	6.0 μ l	
Total	10 μ l	

Table4-6 Thermal cycle of PCR.

	°C	time	
Denature	95	15 m	
Denature	95	30 s	} 30 cycles
Annealing	50	30 s	
Extension	72	2 m	
	72	7 m	
	4	∞	

Table4-7 *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 Nitrilase primer (out).

Prime	sequence
Nitrilase1_Fw1	5'-TGGTACAGATGAGCTGTACCGG-3'
Nitrilase1_Rv1	5'-ACCTCTTGGTAATTGGCTGATATGAATCTAT-3'
Nitrilase2_Fw1	5'- TTGCAGGAAC TTTT TACTTCATTGTACTTTTGT-3'
Nitrilase2_Rv1	5'- GCAAAATCAGAAGGGGTAAATACGGC-3'
Nitrilase3_Fw1	5'- TCAATACAGGTTTTAGCATGAATGCGG-3'
Nitrilase3_Rv1	5'- TCTGCATCTTTTAAAAAGGGGAAGTTCTG-3'

Table4-8 *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 Nitrilase primer (in).

Primer	sequence
Nitrilase1_Fw2	5'- TTGCAGGAACTTTTTACTTCATTGTACTTTTGT -3'
Nitrilase1_Rv2	5'- GCCAGTGCTTACGGAAAAAATCAGA-3'
Nitrilase2_Fw2	5'- GAAGCTTTTTATGAACAGGTAGAGTTTTTTGTAG-3'
Nitrilase2_Rv2	5'- ACTGGGCAAACGTATATCCATATTGTTTACT-3'
Nitrilase3_Fw2	5'- CTTGCCGAAGAAATGAATGGAAAGACC-3'
Nitrilase3_Rv2	5'- AAAGTATAGAGGTCTTCATCTTCCGGC-3'

Table4-9 Component of PCR reaction liquid.

componets	mass	concentration
KOD plus NEO	0.5 μ l	
10 \times KOD plus NEO Buffer	2.5 μ l	
2mM dNTP Mix	2.5 μ l	$2.0 \times 10^2 \mu$ M
25 mM MgSO ₄	1.5 μ l	$1.5 \times 10^3 \mu$ M
テンプレート	0.2 μ l	
10 μ M プライマー (Fw)	1.5 μ l	$6.0 \times 10^2 \mu$ M
10 μ M プライマー (Rv)	1.5 μ l	$6.0 \times 10^2 \mu$ M
dH ₂ O	14.8 μ l	
Total	25 μ l	

Table4-10 Thermal cycle of PCR.

	°C	time	
Denature	94	5 m	} 25 cycle
Denature	98	30 s	
Annealing	50	30 s	
Extension	68	1 m	
	68	7 m	
	4	∞	

Table4-11 Component of PCR reaction liquid.

componets	mass	concentration
<i>Ex</i> Taq	0.125 μ l	2.5×10^{-2} units / μ l
10 \times <i>Ex</i> Taq Buffer	2.5 μ l	
dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μ l	2.0×10^2 μ M
テンプレート	0.2 μ l	
プライマー (Fw)	1.5 μ l	0.4 μ M
プライマー (Rv)	1.5 μ l	0.4 μ M
dH ₂ O	17.2 μ l	
Total	25 μ l	

Table4-12 Thermal cycle of PCR.

	°C	time	
Denature	96	5 m	} 30 cycles
Denature	96	30 s	
Annealing	50	30 s	
Extension	72	2 m	
	72	7 m	
	4	∞	

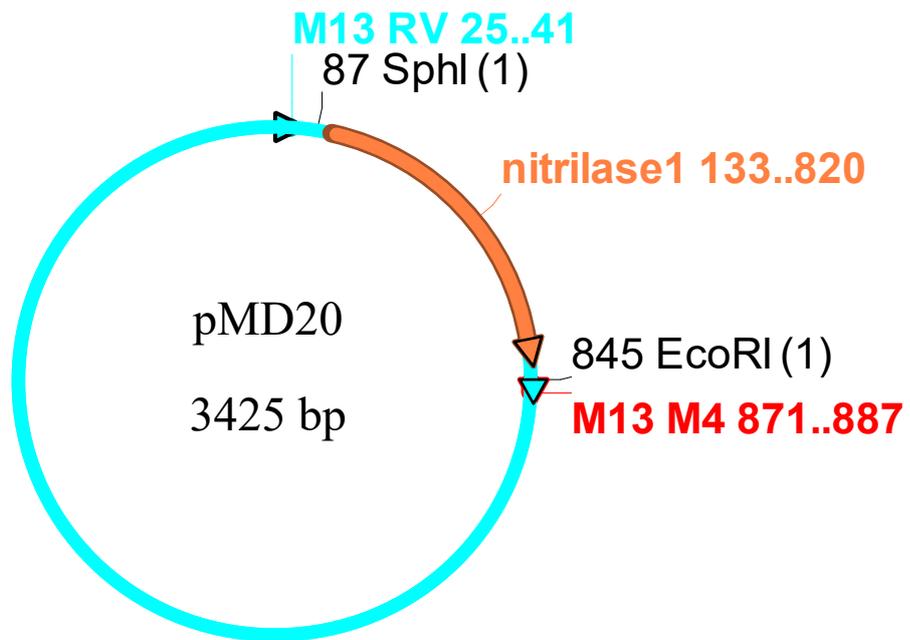


Fig. 2-1 Plasmid map of Nitrilase1.

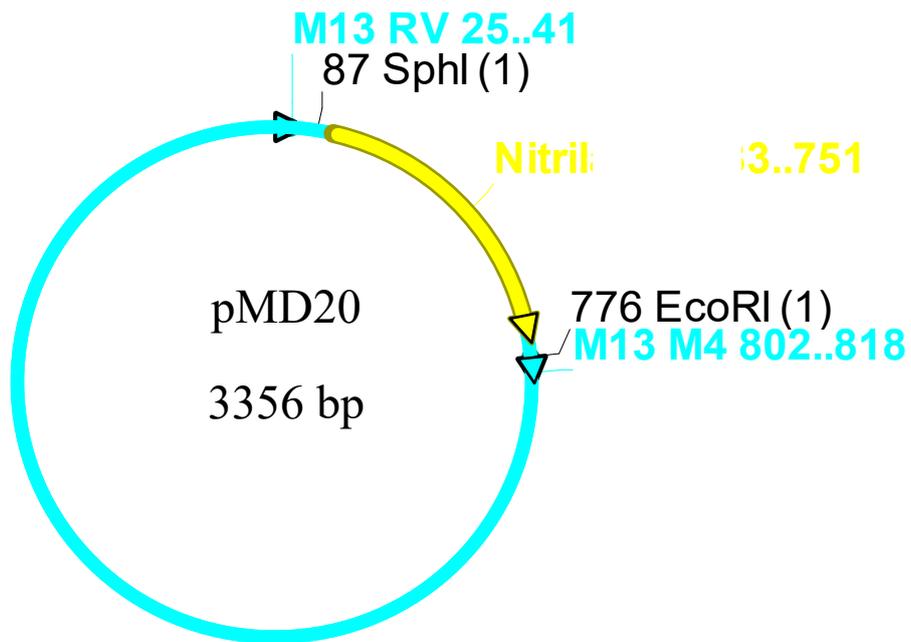


Fig. 2-2 Plasmid map of Nitrilase 2.

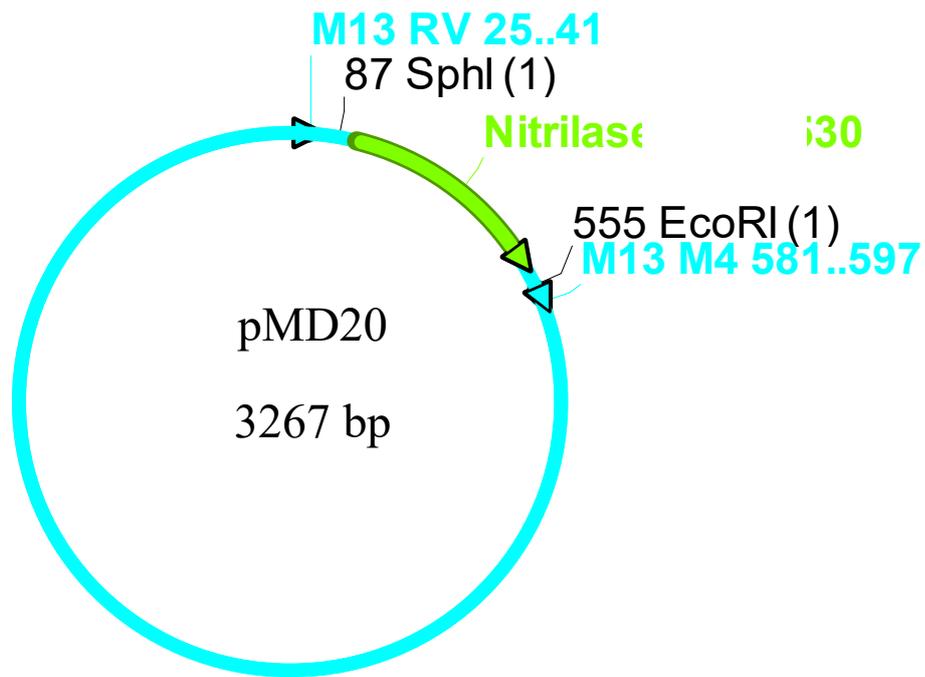


Fig. 2-3 Plasmid map of Nitrilase 3.

Table4-13 Component of PCR reaction liquid when using restriction enzyme.

componets	μl of 1cut	μl of 2cut
Plasmid extraction (100 ng/μl)	1	1
Cut Smart buffer	1	1
<i>EcoRI</i> -HF (20 unit/μl)	0.2	0.2
<i>SphI</i> -HF (20 unit/μl)	—	0.2
dH ₂ O	Up to 10	Up to 10

Table4-14 *Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 nitrilase primer

Primer 名	sequence
Nitrilase1_Fw	5'- CATATGAAAATCGCCCTTGT -3'
Nitrilase1_Rv	5'- CTCGAGCTAATAGATATCCAGACG -3'

Table4-15 Component of PCR reaction liquid.

componet	mass	concentration
<i>Ex</i> Taq	0.125 μ l	2.5×10^{-2} units / μ l
10 \times <i>Ex</i> Taq Buffer	2.5 μ l	
dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μ l	2.0×10^2 μ M
templete	0.2 μ l	
primer (Fw)	0.5 μ l	0.4 μ M
primer (Rv)	0.5 μ l	0.4 μ M
dH ₂ O	19.2 μ l	
Total	25 μ l	

Table4-16 Thermal cycle of PCR.

	°C	time	
Denature	96	5 m	} 30 cycles
Denature	96	30 s	
Annealing	55	30 s	
Extension	72	2 m	
	72	7 m	
	4	∞	

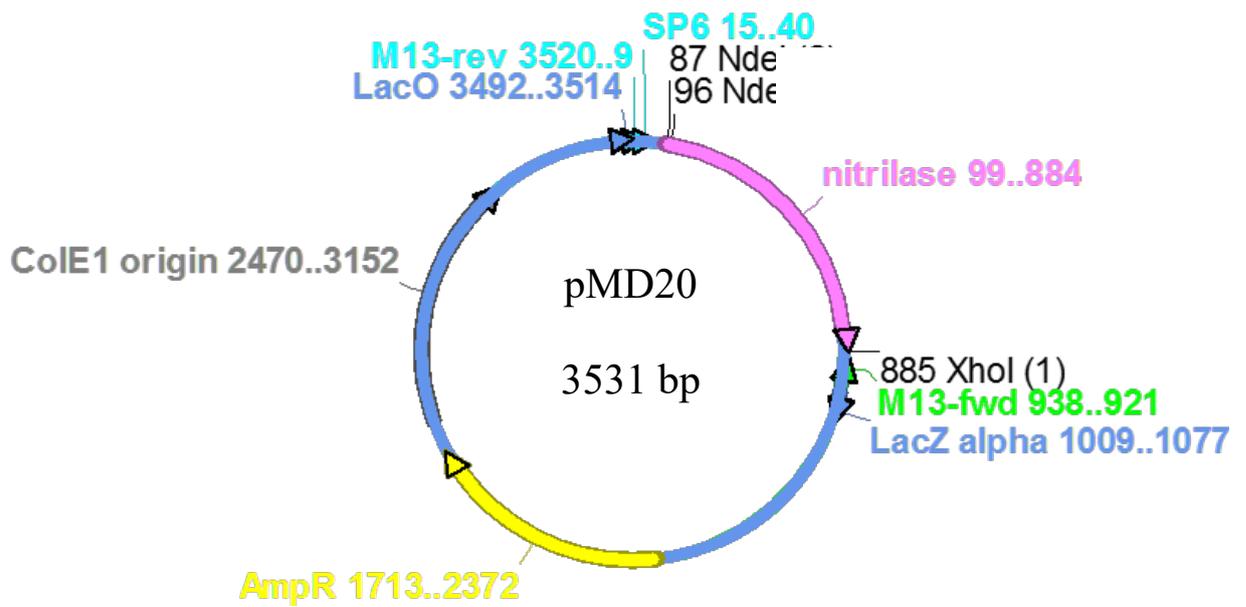


Fig. 2-4 Plasmid map of nitrilase (pMD20).

Table4-17 Component of PCR reaction liquid when using restriction enzyme.

componenst	μl of 1 cut	μl of 2 cut
Plasmid extraction (100 ng/μl)	1	1
Cut Smart buffer	1	1
<i>NdeI</i> (20 unit/μl)	0.2	0.2
<i>XhoI</i> (20 unit/μl)	—	0.2
dH ₂ O	Up to 10	Up to 10

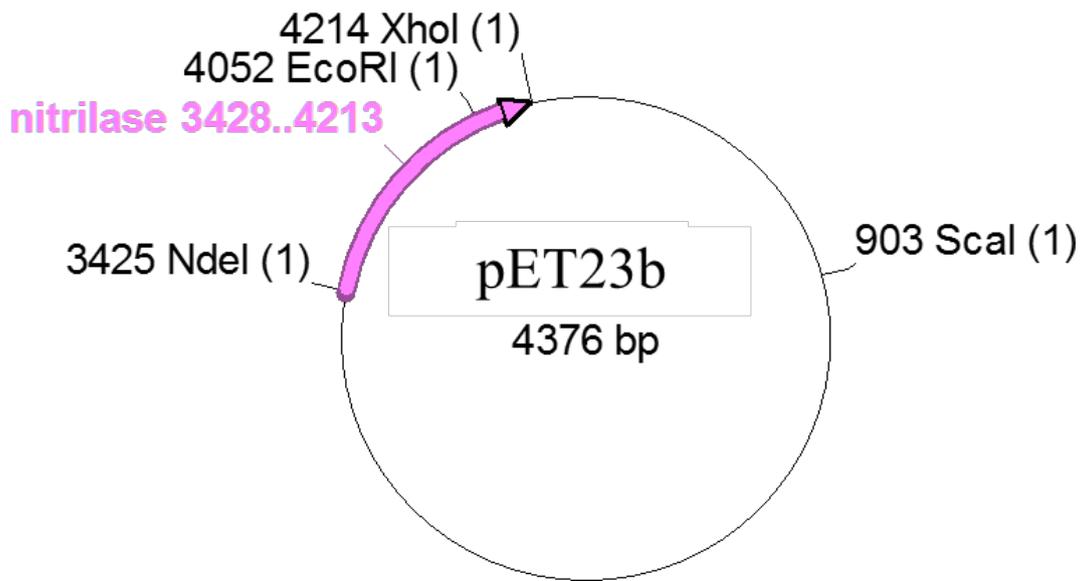


Fig. 2-5 Plasmid map of nitrilase (pET23b).

Table4-18 Component of PCR reaction liquid when using restriction enzyme.

Component	Insert (μl)	Bector (μl)
Plasmid extraction (100 ng/μl)	9	
pET23b (100 ng/μl)		9
Cut Smart buffer	2	2
<i>NdeI</i> (20 unit/μl)	0.5	0.5
<i>XhoI</i> (20 unit/μl)	0.5	0.5
dH ₂ O	Up to 20	Up to 20

Table4-19 Component of PCR reaction liquid when using restriction enzyme.

components	μl of 1cut	μl of 1cut	μl of 2cut
Plasmid extraction (100 ng/μl)	1	1	1
Cut Smart buffer	1	1	1
<i>EcoRI</i> (20 unit/μl)	0.2	—	0.2
<i>ScaI</i> (20 unit/μl)	—	0.2	0.2
dH ₂ O	Up to 10	Up to 10	Up to 10

3. 結果と考察

3. 1 実汚染サイトの地下水におけるシアン化合物の分解

愛知県内のサイト A から採取したシアン含有地下水に KCN 約 12mg/L と酵母エキスを 0.1% (w/w) 添加し、25°C 暗所で培養した。結果を Fig.4-1 に示す。結果、酵母エキスを添加した反応区は何も添加しなかった対照区と比較し、明らかなシアン化合物の濃度低下が確認された。同時に菌数の増加も確認された。シアン化合物は培養開始 10 日後に初期の 8mg/L まで濃度が低下した後、培養開始 15 日後にはほぼ検出下限値前後まで分解された。対照区においては、生菌数の増殖もシアン化合物濃度の低下も確認されなかったこと、酵母エキス自体にシアン分解能は確認されていない（データ無し）ことから、反応区におけるシアン化合物濃度の低下は微生物分解が関わっていると考えられた。また、シアン化合物の濃度低下速度は培養開始～10 日後までと 10 日後～15 日後で約 5 倍大きくなっていた。このことは、培養開始初期においては、シアン化合物の分解菌数が少ないことや、分解酵素が十分に誘導されていない状態であるため分解速度が大きくなかったが、培養期間を経過することでシアンを分解しながら分解菌数の増加や分解酵素の誘導が進み、シアン化合物の分解速度が大きくなっていったと考えられ、シアン化合物の濃度低下が微生物分解によるものであることを支持している。

3. 2 シアン化合物分解菌の単離

シアン化合物の分解が確認された地下水からシアン化合物の分解菌の単離を試みた。シアン化合物分解後の地下水を寒天培地に接種し、生えたコロニーをシアン化合物入りの液体培地に接種し、シアン化合物が分解されるかを確認した。その結果、いくつかのコロニーを接種した液体培地において、シアン化合物の分解が確認された（データ無し）。その後、分解が確認された液体培地において、繰り返しシアン化合物を含む液体培地に接種

し、継代培養を行い、シアン化合物の分解能が安定であることを確認した後、シアン化合物の分解菌の単離作業を行い、2つのコロニーを得た。

3. 3 単離したシアン分解菌の系統解析

複数回の継代培養後、DNA抽出を行い、16SrRNA遺伝子のクローニングを経て、シーケンス解析を行い、Blast検索により近縁種の検索を行った。Blast検索結果から、上位3種の近縁種をTable4-1に示す。結果、2つのサンプルから、それぞれ*Pedobacter*属に近縁な単離菌(*Pedobacter* strain EBE-1)と*Bacillus*属に近縁な単離菌(*Bacillus* strain EBE-2)を得た。*Pedobacter* strain EBE-1と相同性が高い*Pedobacter heparinus* strain DSM 2366は、シアン分解細菌としては知られていないものの、シアン分解酵素のうちnitrilaseを持っていることが知られている(47)。一方、*Bacillus* strain EBE-2に最も相同性がある細菌の一つの*Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1は油分解能をもつことが知られている。また、*Bacillus pumilus*の他の株は、シアン分解細菌として古くから知られており、シアン分解酵素を複数種持ち、nitrilaseを持っていることが確認されている(48)。

3. 4 単離した細菌のシアン分解能

3. 4. 1 *Pedobacter* strain EBE-1のシアン分解能

単離した*Pedobacter* strain EBE-1のシアン分解能を確認するために、液体培地にKCNを添加し、*Pedobacter* strain EBE-1の培養を行った。結果をFig.4-2に示す。*Pedobacter* strain EBE-1を添加した区は、シアン濃度が7日間で約4mg/l減少した一方、対照区はシアン濃度が減少しなかったことから、単離した*Pedobacter* strain EBE-1がシアンを分解したと考えられ、*Pedobacter* strain EBE-1がシアン分解能を有することが示唆された(Fig.4-2)。よって、サイトAの試料に酵母エキスを添加し、シアンの濃度低下が確認された実験におけるシアンの分解は、*Pedobacter* strain EBE-1が寄与していた可能性が考えられた。

なお、既知のシアン分解菌と比較して、単離された *Pedobacter* strain EBE-1 のシアン分解速度は、あまり大きくはなかった。

3. 4. 2 *Bacillus* strain EBE-2 のシアン分解能

単離した *Bacillus* strain EBE-2 のシアン分解能を確認するために、液体培地に KCN を添加し、培養を行った。結果を Fig.4-3 に示す。*Bacillus* strain EBE-2 を添加した区はシアン濃度が 3 時間で約 70 mg/l 減少した一方、対照区はシアン濃度がほとんど減少しなかったことから、*Bacillus* strain EBE-2 がシアン分解能を有することが示唆された。前述の *Pedobacter* strain EBE-1 や既知のシアン分解菌と比較して、*Bacillus* strain EBE-2 の分解速度は圧倒的に早く、シアン分解能力が高いと考えられた。サイト A の試料に酵母エキスを添加した実験におけるシアン分解速度と比較しても、*Bacillus* strain EBE-2 の分解速度の方が圧倒的に速いことから、当該実験時には *Bacillus* strain EBE-2 はシアンの分解にほとんど寄与していなかった可能性も考えられる。

3. 5 単離した細菌のシアン分解酵素

3. 5. 1 *Pedobacter* strain EBE-1 のニトリラーゼ

単離した *Pedobacter* 属細菌に最も近縁な *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 はシアン加水分解酵素であるニトリラーゼを 3 種類所有する事が分かっているため(47)、*Pedobacter heparinus* strain DSM2366 由来のニトリラーゼ遺伝子配列から設計したプライマーを用い、単離した *Pedobacter* 属細菌が類似のニトリラーゼ遺伝子を所有するかを確認する目的で、Nested PCR による遺伝子の増幅を試みた。

外側のプライマーを用いた 1 段階目の PCR を KOD plus Neo①とした。さらに、KOD plus Neo①の PCR 産物を鋳型として、内側のプライマーを用いた 2 段階目の PCR を KOD plus Neo②とした。さらに、KOD plus Neo①における PCR 産物を鋳型として、*Ex taq* を用いた

PCR 産物を電気泳動した結果を Ex Taq とした。

Nested PCR の結果, KOD plus NEO②を用いた PCR 産物の電気泳動では, バンドがうまく確認できなかったものの, EX taq を用いた PCR 産物の電気泳動において, 目的の位置付近にはっきりとしたバンドを確認することができた (Fig.4-4). よって, 目的の遺伝子配列の増幅が示唆された。

次に, ⑧, ⑨, ⑩のバンドから切り出した PCR 産物を精製し, pMD20 へのライゲーション, 及び DH5 α への形質転換を行った。青白選別によるプレート培養の後, 白色コロニーを採取した。各サンプルのコロニーについて, コロニー PCR を行った。電気泳動の結果, 目的配列長付近にバンドを観察することができたコロニーからプラスミドを抽出し, 制限酵素処理により目的の遺伝子配列がライゲーションされているか確認を行った。制限酵素処理産物の電気泳動の結果, ニトリラーゼ 1,3 はインサートが切断されたものの, 目的の位置付近にバンドが確認された (Fig.4-5)。

以上より, コロニー1-①,②と 2-①,②, 3-①,②の菌体より抽出したプラスミドのシーケンス解析を行った。得られた配列について, BLAST で検索し, *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 のニトリラーゼと相同性を持つか確認した。その結果, ニトリラーゼ 2-①,②は *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 のニトリラーゼと相同性を持つことが確認された (Table4-2, Fig.4-6, Fig.4-7)。その他のコロニー由来の配列は *Pedobacter heparinus* strain DSM2366 のニトリラーゼとの相同性が確認できなかった。

3. 5. 2 単離した *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼ

一方, 単離した *Bacillus* strain EBE-2 に最も近縁の *Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 がニトリラーゼを持っていることが分かっている。従って, *Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 が保有するニトリラーゼの遺伝子配列からプライマーを作成し, 単離した *Bacillus* 属細菌の DNA を鋳型として PCR による遺伝子増幅を試みた。電気泳動をした結果, 目的の位置付近にバンドを観察することができた (Fig.4-8)。よって, 目的の遺伝子配列の増幅が示唆された。増幅された目的の配列を精製してクローニングをしたものをシーケンス解析した。

得られた配列を BLAST で検索し、*Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 のニトリラーゼと相同性を持つか確認した。その結果、*Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 のニトリラーゼと相同性を 91%持つことが確認された (Table4-3, Fig.4-9)。

また、得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、BLAST 検索を行った。その結果、ニトリラーゼは他のニトリラーゼグループとも非常に高い相同性が確認された (Fig.4-10)。よって、*Bacillus* strain EBE-2 もニトリラーゼを保有することが確認された。

3. 5. 3 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼの大腸菌による発現

高いシアン分解能をもつ *Bacillus* strain EBE-2 の保有するニトリラーゼについて詳しく解析をするためにニトリラーゼの大腸菌による発現を試みた。pMD20 に組み込んだ目的のニトリラーゼ遺伝子を pET23b に乗せ換えた。目的のニトリラーゼ遺伝子の乗せ換えができたか、制限酵素確認をした。その結果、目的配列長付近にバンドを確認したため、pMD20 から pET23b へのインサートの乗せ換えができたことを確認した (Fig.4-11)。その後、SDS-PAGE によってニトリラーゼの発現確認を行った。菌体破碎後の可溶性画分から、アミノ酸配列から推定される分子量の 30 kDa 付近の位置にバンドを確認したため、*Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼが発現されたと考えられた (Fig.4-12)。

その後、ニトリラーゼを含む可溶性画分を用いて、KCN の分解実験を行った。その結果を Fig.4-13 に示す。結果、Blank と比較して、Nitrilase 可溶性画分を添加した区は 3 時間で約 6 mg/l のシアン濃度が減少したため、発現させた *Bacillus* 属細菌由来のニトリラーゼはシアン分解能を持つことが確認された。

3. 5. 4 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼ精製

発現させた *Bacillus* 属細菌由来のニトリラーゼがシアン分解能を有することが示唆されたため、より正確なシアン分解能を計測し、タンパク質の解析を行うために精製を試みた。精

製には陰イオンカラムである DEAE, RESOURCE Q, ゲルろ過クロマトグラフィーカラムである HiLoad 26/60 Superdex 200 pg を使用した.

DEAE カラムを通したサンプルについて, アプライした後サンプルについて, SDS-PAGE の結果を Fig.4-14 に示す. 30kDa 付近のバンドのピークが溶出 31,32 と 41,42 に出ていることを確認したため, 溶出 28-44 をビーカー回収した.

続いて, RESOURCE Q カラムを通した. RAN 中に測定した 280 nm の UV 吸光を Fig.4-15 に示す. また, SDS-PAGE の結果を Fig.4-16 に示す. SDS-PAGE の結果より, 目的の分子量のバンドが溶出 4-8, 16-22, 36-40 の 3 つのピークに出ていることが確認された. そこで, 溶出 4-8, 16-22, 36-40 をそれぞれ回収し, もっとも精製されていると考えられた溶出 36-40 について, ゲルろ過クロマトグラフィーにて精製を試みた.

用いたゲルろ過クロマトグラフィーの RAN 中に測定した 280 nm の UV 吸光を Fig.4-17 に SDS-PAGE の結果を Fig.4-18 に示す. その結果, UV の吸光は溶出 13-17, 36-39 の 2 つのみピークが確認された. 溶出 13-17 をサンプル①, 36-41 をサンプル②とした. 一方, SDS-PAGE の結果は, どちらも 30kDa 付近にバンドが確認された. アミノ酸配列からは, 約 30kDa であると考えられることから, 本ニトリラーゼは, 多量体を形成している可能性が考えられた. これらがそれぞれ活性を有するのか, 2 つのサンプルのシアン分解活性を測定することとした.

3. 5. 5 *Bacillus* strain EBE-2 のシアン分解活性測定

結果を Fig.4-19 に示す. 結果からサンプル①のみがシアン分解活性を持つことが分かった. このことから, *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼは, 多量体を形成し, 多量体の状態のみ活性を示すことが示唆された. なお, 過去の報告において, *Rhodococcus* 属細菌のニトリラーゼは, 基質のベンズニトリルが存在している場合は, 二量体から活性をもつ 10 量体が形成されることが報告されている(49).

3. 5. 6 *Bacillus* strain EBE-2 の cyanide hydrolase 活性測定

結果を Fig.4-20 に示す. 本試験は, ギ酸が生成された場合, ギ酸デヒドロゲナーゼによって, NAD⁺から NADH が生成される. 結果から, コントロールと比較し, *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼを添加した場合, 明らかに NADH が生成されていることを確認した. よって, 本ニトリラーゼは, 基質としてのシアンからギ酸が生成することがわかった. また, *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼに過剰量のホルムアミドを添加してもシアンの生成は確認されなかった (データ無). したがって, 本ニトリラーゼは, cyanide hydrolase に分類されることが示唆された.

3. 5. 7 *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼ立体構造モデリング

得られた塩基配列から, 立体構造が似ていると推定される既知の酵素との比較を行うことで, 3次元立体構造を推定するホモロジーモデリング手法を利用した SWISS-MODEL を用いて(50), *Bacillus* strain EBE-2 のニトリラーゼの立体構造のモデリングを行った.

Bacillus strain EBE-2 のニトリラーゼは, 炭素-窒素結合の加水分解酵素として知られている *Staphylococcus aureus* と高い相同性が確認された. ことから, *Staphylococcus aureus* の酵素の立体構造を鋳型として, モデリングを行った. 結果を Fig.4-21 に示す. 過去の報告から(51), 推定される反応経路は, 以下の通りである. ①システインのチオール基が炭素-窒素の3重結合にアタックし, チオイミダード複合体を生成, ②1分子の水が添加され, アンモニアが発生する. ③平面状のチオイミダードは四面体の中間生成物を経て平面状のチオールアシル酵素に変換される. ④二つ目の水分子の添加によって, 酸が生成され, 酵素が再び発生する. 活性部位は, プラスの電荷となっており, マイナス電荷のシアニオンを吸着できるようになっている(Fig.4-21 (B)). また, Cys147 と Glu41, Lys112 の触媒三残基で活性部位を形成している. Glu は求核試薬である Cys の足場となっており, Lys は基

質へプロトンを送り込む触媒としての役割をもっていると推定される。およそ 20 回ほどシミュレートを行い、シアン化合物が複合体を形成すると最も可能性が高く、活性部位と推定される位置に入ることが確認された。

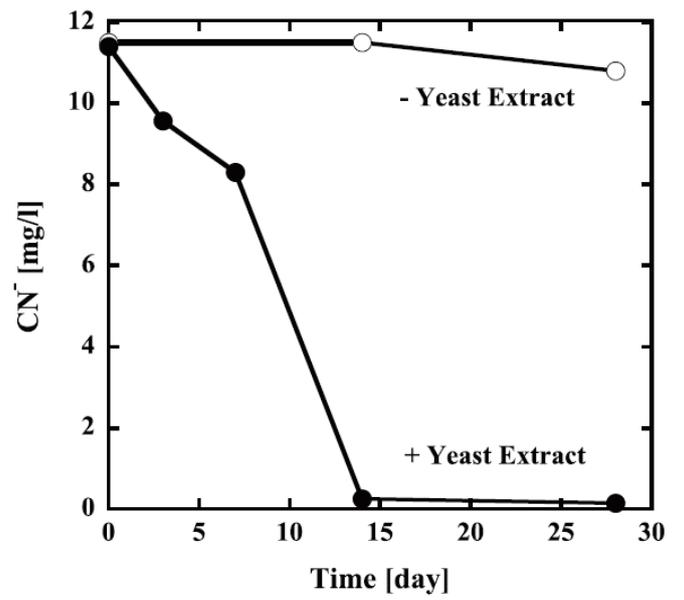
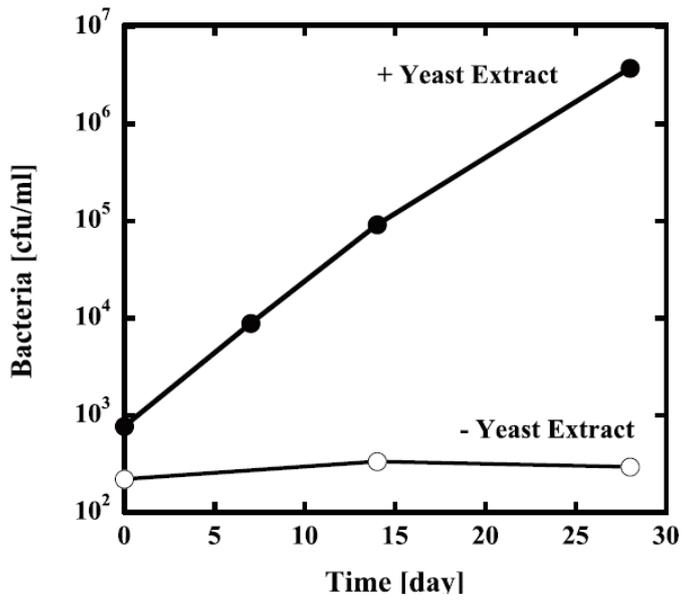


Fig.4-1 Change in concentration of cyanide with or without substrate(Yeastextract).

Table4-1 Closely related species shown in Blast search results(Top3).

No. of sample	Bacteria	Accession	similarity
①	Pedobacter heparinus strain DSM 2366	NR_074519.	97%
	Pedobacter sp. S8-2	GQ294578.1	97%
	Pedobacter metabolipauper strain WB 2.3-71	NR_042603.1	97%
②	Bacillus pumilus strain PDSLzg-1	CP016784.1	99%
	Bacillus pumilus strain 38	KF923448.1	99%
	Bacillus safensis strain EC3	KX242453.1	99%

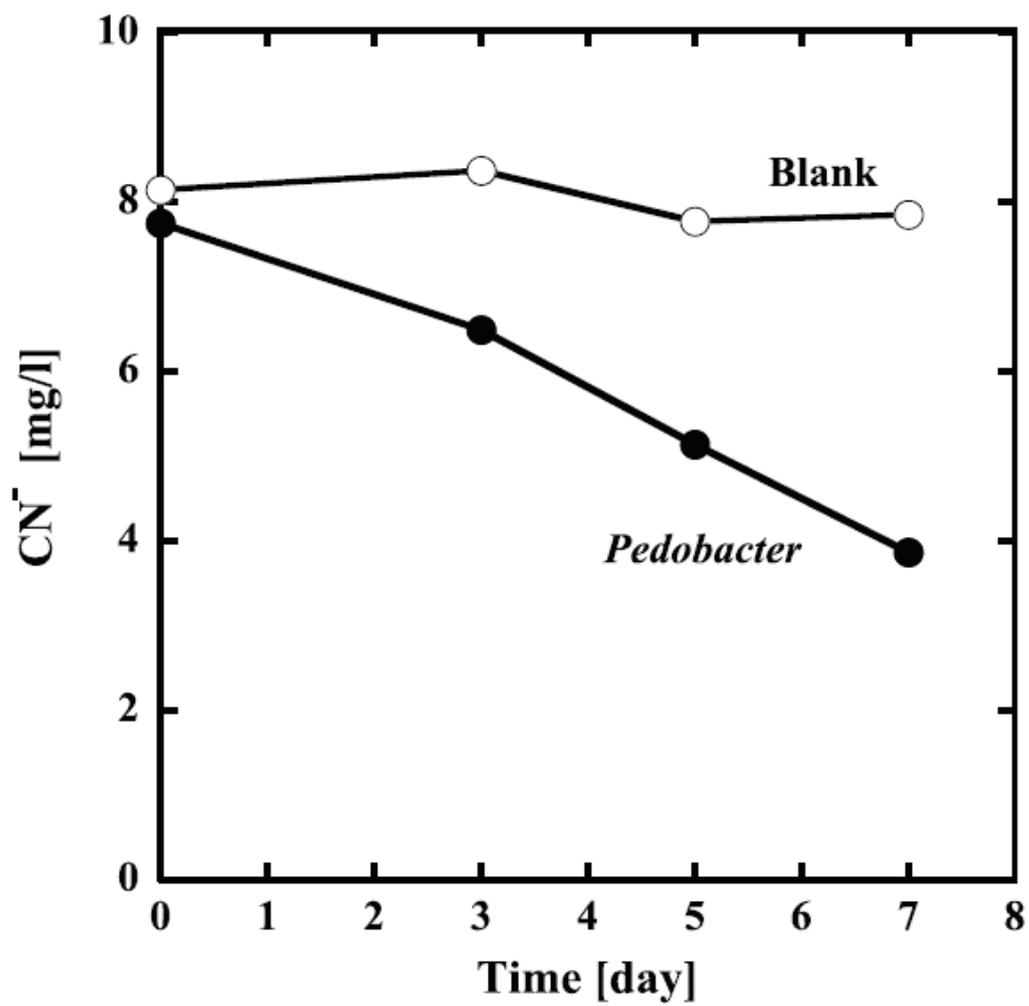


Fig.4-2 Degradation of cyanide with *Pedobacter* strain EBE-1. Blank is without Degradation of cyanide with *Pedobacter* strain EBE-1.

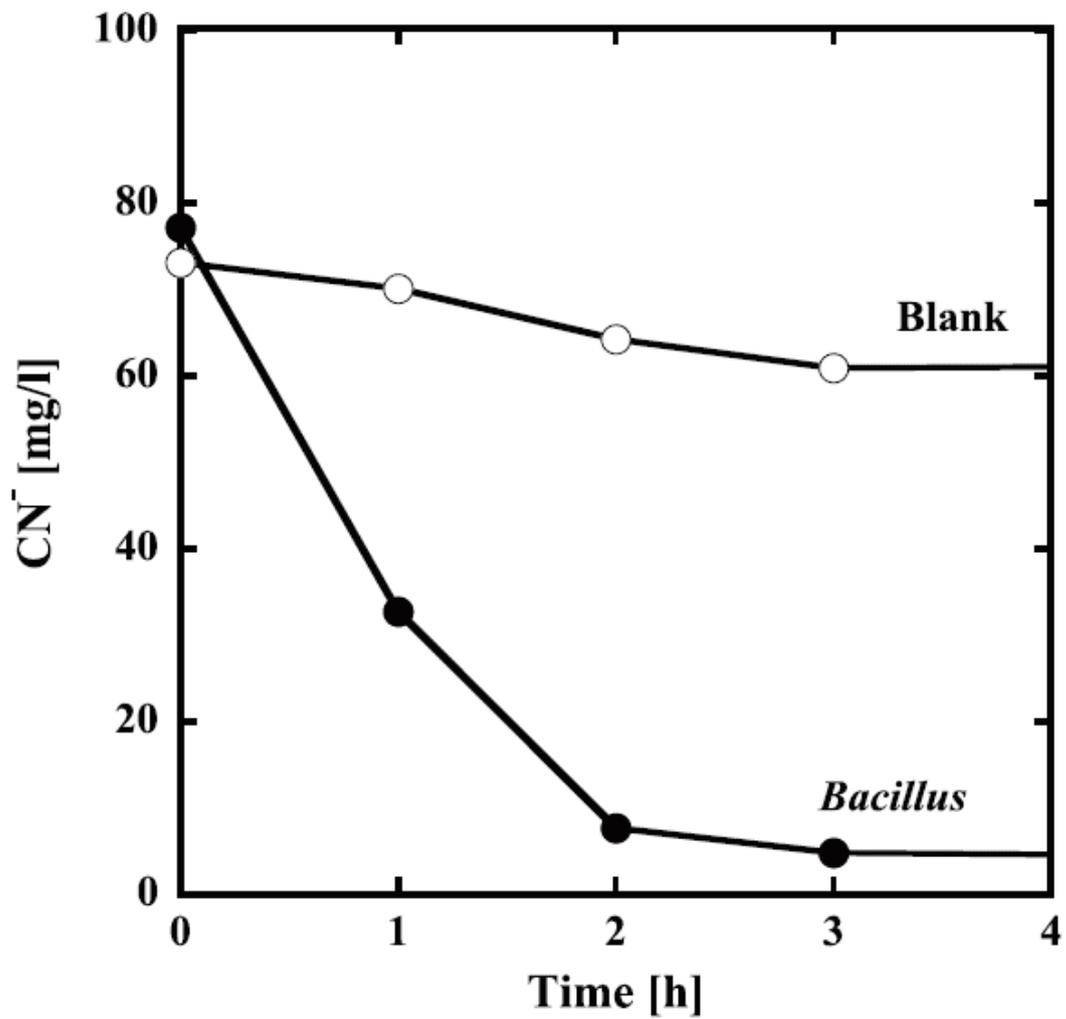


Fig.4-3 Degradation of cyanide with *Bacillus* strain EBE-2. Blank is without *Bacillus* strain EBE-2.

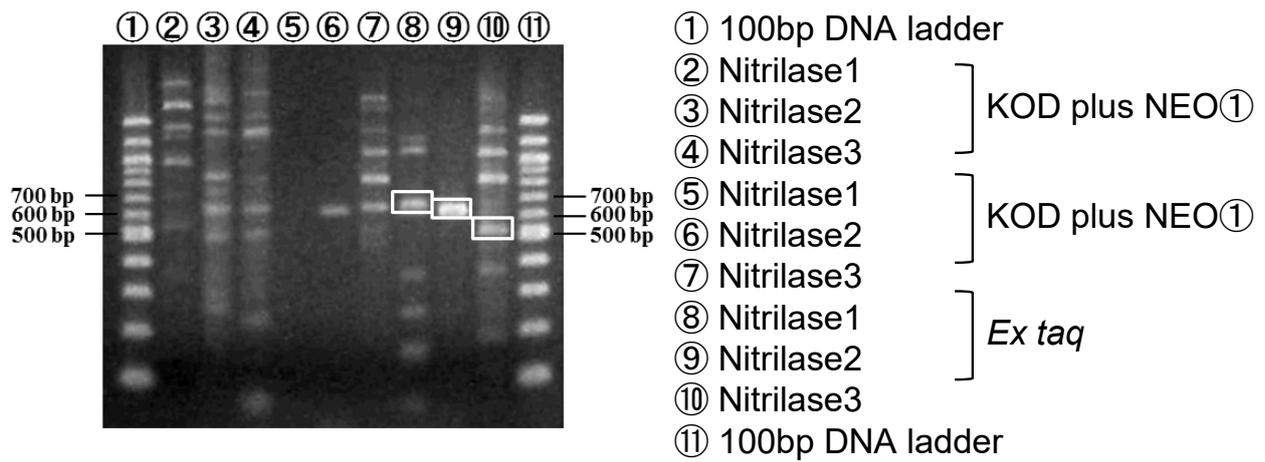


Fig.4-4 Result of Nested-PCR of *Pedobacter strain EBE-1* Nitrilase.

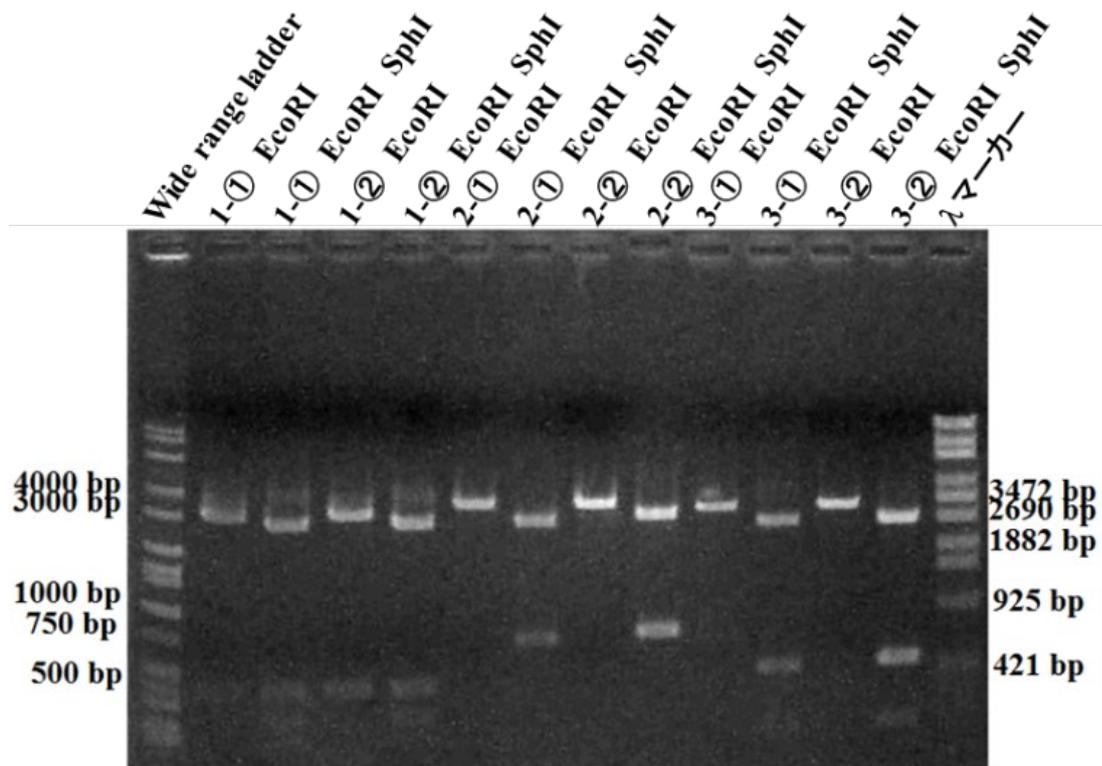


Fig.4-5 Result of PCR after restriction enzyme treatment.

Table4-2 Closely related species shown in Blast search results of Nitrilase sequence from

Pedobacter strain EBE-1.

Sample	Bacteria	Accession	similarity
Nitrilase1-①	No data		
Nitrilase1-②	No data		
Nitrilase2-①	Pedobacter heparinus DSM 2366	CP001681.1	84%
Nitrilase2-②	Pedobacter heparinus DSM 2366	CP001681.1	84%
Nitrilase3-①	No data		
Nitrilase3-②	No data		

```

* * * * *
1>TGAAGCTTTTATGAACAGGTAGAGTTTTTTGTAGATGCAGTAAGCGGATATAAATCGGACTTTATCATG--TTCCTGAACTGTTCAACACCCC-TCTI>97
1>tgaagctttttatgaacaggtagagttttttgtagatgctgtgagcggctataaatcagaatttat--tgcaattcccgaactttcaacaccccatttg>97

* * * * *
98>TTACATCCTTATAATGATTTGCCGGAAATGGAGGCCATGCGAAAATGGCAGGACTTACAGAGGAGATCGTTGCAAAA---ATACAGGAATACGCGGTTT>194
98>ttcatccatacaatcatttaccgaaatggaggccatgccaactggcggacaaacagccgaga---ttgaaaaaggatccagcaatacgccttt>194

* * * * *
195>CTATAATGTAATGTGAT--TA-CCGGAAGTATGCCTATTCTTGAAAACAACAACCTCTATAACGCGACCTATTTATGCCACAGAAGCGGAAAAACGGA>291
195>ctataatgtaaat---atcataccggcagatagcctattgttagaacaacaagctctataaagccacctatttatgccacagaagcggaaaaacaga>291

* * * * *
292>TGAATACCGGAAATCCACATTACACCAATGAGCTGAAATATTACGGTATGGTAGGCGGTGACAAGAT-CAGGGTATTTGATACCGACTGCGGTAAAGT>390
292>tgaataccggaaaatccacattaccgcaatgacagaaatactaggatggtagggcgaagaatca-ggtgtttgataccgatcgcggtaaat>390

* * * * *
391>AGGCATATTGATCTGTTATGATGTGGAATTTCCAGAATTGAGCAGGATTTATGCCGACAGGGTATGAGATTTCTTCTGTTCTTTCTGACCGATACC>490
391>aggcatattgatctgttatgatgtggaatttccagaaatgagcaggatttatgccgacagggatgagatctgttctgtaaccttctaccgatacc>490

* * * * *
491>CAGAACGGCTATACCCGGGTACGGCGA-TGTGCACAGGCCCGGGCCATCGAAAATGAATGTTATGTGGCCATAGCCGGCTGCGTGGGTAATTTACC-AAA>588
491>cagaaaggctataccgggtaaggcaatgtgacagggccgggcatgaaaaatgaatgttatgtggccatagcggctgctgctgggaatttgcctaaa>588

* * * * *
589>GGTAAACAATATGGATATACAGTTTGCCCACT>620
590>gtaacaatatggatatacagtttgcccact>620

```

Fig.4-6 Result of sequence analysis of *Pedobacter* strain EBE-1 Nitrilase2-①(Top), and comparing with *Pedobacter heparinus* strain DSM2366(Under).

```

* * * * *
1>TGAAGCTTTTTATGAACAGGTAGAGTTTTTTGTAGATGCAGTAAGCGGATATAAATCGGACTTTATCATG--TTCCCTGAACTGTTCAACACCCC-TCTI>97
1>tgaagctttttatgaacaggtagagttttttgtagatgctgtgagcggctataaatcggactttatcatg--ttccctgaaactgttcaacacccc-tcti>97

* * * * *
98>TTACATCCTTATAATGATTTGCCGAAATGGAGGCCATGCG-AACACTGGCAGGACTTACAGAGGAGATCGTTGCAAAA---ATACAGGAATACGCGGTT>193
98>ttcatccatacaatcatttaccgaaatggaggccatgctgaaactggcggacaaacagccgaga---ttgtaaaaaggatccagcaatacgcctt>193

* * * * *
194>TCTTATAATGTAATGTGAT--TA-CCGGAAGTATGCCTATTCTTGAAAACAACAACCTCTATAACGCGACCTATTTATGCCACAGAAGCGGAAAAACGG>290
194>tcataaatgtaaat---atcataccggcagtatgcctattgtgagaacaaagaactctataaagccacctatattatgccacagaagcggcaaacag>290

* * * * *
291>ATGAATACCGGAAAAATCCACATTACACCAATGAGCTGAAATATTACGGTATGGTAGCGGTGACAAGAT-CAGGGTATTTGATACCGACTGCGGTAAG>389
291>atgaataccggaaaaatccacattaccgcaatgacagaaatactatgggatggtaggagcaagatcagggtcttgataccgactgctggtaaacg>389

* * * * *
390>TAGGCATATTGATCTGTTATGATGTGGAATTTCCAGAATTGAGCAGGATTTATGCCGACCAGGGTATGCAGATTCTCTTCGTTCCTTTCTGACCGATAC>489
390>taggcataattgatctgttatgatgtggaatttccagaaactgagcaggctttatgccgaccagggatgcagatctgttctgtaccctttctcaccgatac>489

* * * * *
490>CCAGAACGGCTATACCCGGGTACGGCGA-TGTGCACAGGCCCGGGCCATCGAAAATGAATGTTATGTGGCCATAGCCGGCTGCGTGGGTAATTTACCAAA>588
490>ccagaaaggctataccgggtaaggc-actgtgcgaggccagggccatagaaaatgaatgttatgtagccatagcaggctgctgtgggcaattgccaa>588

* * * * *
589>AGTAAACAATATGGATATACAGTTTGCCCACT>620
589>agtaaacatgatggatatacagtttgcccact>620

```

Fig.4-7 Result of sequence analysis of *Pedobacter* strain EBE-1 Nitrilase2-②(Top), and comparing with *Pedobacter heparinus* strain DSM2366(Under).

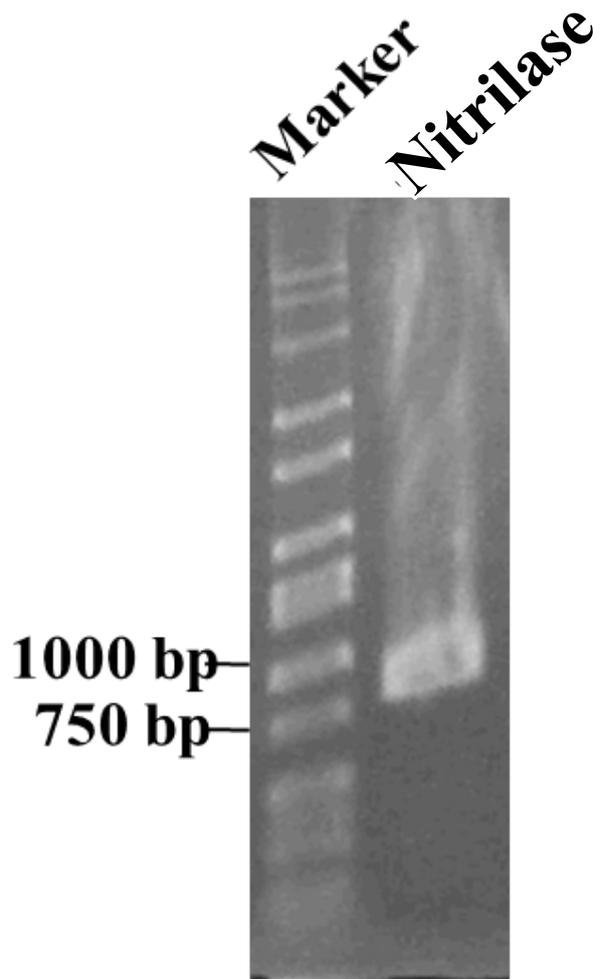


Fig.4-8 Result of PCR of *Bacillus* strain EBE-2Nitrilase.

Table4-3 Closely related species shown in Blast search results of Nitrilase sequence from *Bacillus* strain EBE-2.

Sample	Bacteria	Accession	Similarity
Nitrilase	<i>Bacillus pumilus</i> strain PDSLzg-1	CP016784.1	91%

```

* * * * *
1>ATGAAAAATCGCCCTTGTCCAATGGACGTACAAATGGAGAACCTAATGTGAACCTTTCAAAAAGCAGAAGCGTTTTTAGAAGAAGCCATCCATCAGCAGC>100
1>ATGAAAAATCGCCCTTGTCCAATGGACGTACAAATGGAGAACCTGAAGTGAAATTTAAAAAGCAGAAGCGTTTTTAGAGAAGCGTCCGCGAGCAGT>100

* * * * *
101>CTGATCTGATCATTTTACCCGAAATGTGGAATACCGGTTACGATCTTGAACAAGCCGAGCAGCTTGCAGATGTAACCGGTGAACGCACAAAAACAGCTCTT>200
101>CGATCTGATCATTTTACCCGAAATGTGGAATACCGGTTACGCGCTTGAACAAGCCGAGCAGCTTGCAGATGTAACCGGTGAACGCACAAAAACAGCTCTT>200

* * * * *
201>CTCTTCCTTTGCCCGCAAACACCAAGTGGTCTCATCGCAGGAAGTGTATTGAACAAGCCGACAGAAGATGACAACATCACCAACACGATGTATGTCTTT>300
201>CTCTTCCTTTGCCCGCAAACACCAAGTGGTCTCATCGCAGGAGTGTATTGAACAAGCCGACAGAAGATGACAACATCACCAACACGATGTATGTCTTT>300

* * * * *
301>AACCGCCAAGGTGAGCTCTTAGTGGATTATGATAAAATTCACTTATTCCGCTTAATGGATGAGCACAACTATTTAACAGCTGGTGATCAGCTTGGTTTAT>400
301>AACCGCCAAGGTGAGCTTGTGTGATTATGATAAAATTCACTTATTCCGCTTAATGGATGAGCACAACTATTTAACAGCTGGTGATCAGCTTGGTTTAT>400

* * * * *
401>TTGACTATGATGAGGATGTGAAGATCGGTGCGATGATCTGCTACGACCTTCGCTTCCGCGAGCTTCCAGAACACTTGTAAACAAAGGGCGAAAGTGCT>500
401>TTGACTATGATGAGGATGTGAAGATCGGTGCGATGATCTGCTACGACCTTCGCTTCCGCGAGCTTCCAGAACACTTGTAAACAAAGGGCGAAAGTGCT>500

* * * * *
501>CATCAATACGGCGCAATGGCCGTCAGCAAGAGTGGATCATTGGCGTTGCCTGCTCATCGCAAGAGCGATTGAGAACCAGTCATTTATGATTGCTGTAAAC>600
501>CATCAATACGGCGCAATGGCCGTCAGCAAGAGTGGATCATTGGCGTTGCCTGCTCATCGCAAGAGCGATTGAGAACCAGTCATTTATGATTGCTGTAAAC>600

* * * * *
601>AGAACAGGCACAAGCAGAGACACTGAATTCCTGGCCACTCCATGGTGATTGATCCACTTGGCCGTATCTGCTTGAAAACAAGCCATGAGGAAGACATTT>700
601>AGAACAGGCACAAGCAGAGACACTGAATTCCTGGCCACTCCATGGTGATTGATCCACTTGGCCGTATCTGCTTGAAAACAAGCCATGAGGAAGACATTT>700

* * * * *
701>ATTATGCGGAAATTGATCTTCAGCTAGTGGATGAAGTGAGCAGCAAAATTCCTGTGATGACGGATCAGCGTCTGGATATCTATTAG>786
701>ATTATGCGGAAATTGATCTTCAGCTAGTGGATGAAGTAGCAGCAAAATTCCTGTGATGACGGATCAGCGTCTGGATATCTATTAG>786

```

Fig.4-9 Result of sequence analysis of *Bacillus* strain EBE-2 Nitrilase(Top), and comparing with *Bacillus pumilus* strain PDSLzg-1 (Under).

```

Bacillus_Nitrilase      --MKIALVQMDVQIGPEVNFKKAFAFLAEAVRQSDLIILPEMWNNTGYALEQADQLADV      58
A0A0H2WXM0             --MKVQIYQLPIVFGDSSKNETQITQWFEKNMNAEVDVVVLPPEMWNNGYDLEHLNEKADN      58
Q9UYV8                 --MVKVAVVQMNPILEPDKNYSKAEKLIKEASKQGAQLVVLPELFDGTGYNFETREEVFEI      59
Q5JEU9                 --MKVAVVQMEPVFLDPEANYSRAEKLIREAADQGAKLVVLPELFDGTGYNFRSREEVEEV      58
B1L5H4                 --MKRVGFVQTNPEFGAVESNLKRALD---LASKVESDLLVFPPELFDNTGYLFLSREEALKL      56
Q2LUZ0                 --MKAGFIQIGPVFGKVAENLQQTESLIN---CTKADLLVLPPELFDNTGYLFTAHQEVAEL      55
Q2S2E4                 MPVRAAYLQFAPAYLEVDQNLAAVESLLR---SVEADLLVLPPELFTSGYFFQSKDDLERV      57
      :      *      *      . : : : * * : : : #

Bacillus_Nitrilase      ---NGEHTKQLFSSFARKHQVYLIAGSVLNKRTEDENI TNTMYVFNRQG-ELVLDYDKI      113
A0A0H2WXM0             ---NLGQSFSPFIKHLAEKYKVDIVAGSVSNIR--NNQIFNTAFSVNKSQ-QLINEYDKV      111
Q9UYV8                 AQKIPEGETTTFLMDVARDTGVYIVAGTAE--KDG-DVLYNSAVVVGPR--GFIGKYRKI      114
Q5JEU9                 AGQIPDGPTEFLVELAKELEVFIAGTAE--KDEKGNLYNSAVLVGVPVGGWYIGKYRKI      116
B1L5H4                 SEG-LDGPITIKRSLDFASEHSTAIVAGFPE--RDG-GKVYNSAVAIDIDG-DVKGVYRKT      111
Q2LUZ0                 AEEIPGGRTEFLCGMARRGGSFIVAGLAE--REK-GRFYNSAVLVSPR--GYLGTYRKI      110
Q2S2E4                 AEPINPKSVAALRGWADSLGATLVAGLAE--RDG-DHFYNSAVVVRPD--GRVDTYRKY      112
      :      :      *      : : * *      :      * :      .      * *

Bacillus_Nitrilase      HLFRLMDEHNYLTAGDQLG-LFDYSE---DVIIGAMICYDLRFPQLSRTLNVNKGAKVLV      168
A0A0H2WXM0             HLVPLREHEFLTAGGYVAEPPQLSD---GTVVTQLICYDLRFPPELLRYPARSGAKIAF      167
Q9UYV8                 HLFY--REKFFFEPGDLGFRVFDLG----FMKVGVMICFDWFFPESARTLALKGADVIA      167
Q5JEU9                 HLFN--REKLFRRPGNLGFHFVFNIG----IAKVGVMICFDWFFPESARTLALKGADVIA      169
B1L5H4                 HLFY--EEKLIFDPDGTGFRVFDLA----GMRVGIMICFDWFFPESARSLALSGAQIIA      164
Q2LUZ0                 HLFN--EEKLWFQPGDRAPELYDLG----ICRIGIMICFDWFFPEFMRILSLKADVIC      163
Q2S2E4                 HLFY--EETILFEAGDLGFRVFEETAAAGTSYRLGVMVCFDWFYFPEAARTLALRGADVIA      170
      **      *      :      * :      : :      : : : * * * :      *      * * : :

Bacillus_Nitrilase      NTAQWPSARVDHWSLLIARAIENQSFMIAVNRTGTS---RDTEFPGHSMVIDPLGRIL      224
A0A0H2WXM0             YVAQWPM SRLQHWSLLKARAIENNMVFIGTNSTGFD---GNTEYAGHSIVINPNGDLV      223
Q9UYV8                 HPANLVM---PYAPRAMPIRALENKVYTVTADRVGEE---RGLKFIGKSLIASPKAEVL      220
Q5JEU9                 HPSNLVM---PYAPRAMPIRALENRVYTTANRIGEE---FGLRFIGKSTIASPRAEVL      222
B1L5H4                 HPSCLVM---PYAPKADPVRAFENRVFIILSDRSGVEERGGKKLRYHGMSLISDPKMNIL      221
Q2LUZ0                 HCANLVL---PFCQDAMKTRCLENHVVYAITANRTGQDVRDGRTLSFTGKSQVTGPHADVL      220
Q2S2E4                 HPSNLVL---PHCPD SMPVRARENHVFTITANRHGREEKEGESLRFI GMSEVCAPS GTIL      227
      :      .      * . * * : : : * .      : * * : * : :

Bacillus_Nitrilase      LETRDEEDI-YYAEIDLQLVDEVRRQ--IPVMTDQRLDIY----- 261
A0A0H2WXM0             GELNESADI-LTVDLNLNEVEQOREN--IPVFKS IKLDLYK----- 261
Q9UYV8                 SMASETEEEVGVAEIDLVLVRNKRINDLNDIFKDRREEYFR----- 262
Q5JEU9                 AMGSEDKEEVGVVEIDLSLARDKRINEMNDIFKDRRPQYITL----- 264
B1L5H4                 TQAPEEGEHVGVIAIDPKLAEDKRVNELNDIFLDRRPEFYGKIC----- 265
Q2LUZ0                 YQAGSIGDEVAVVDIDVSRARNKNLNPFNHLYRDRRVEFYRELCEGGK----- 268
Q2S2E4                 TRADESADVVEVELNPREARDRNINAHNDVLRDRRPA TYAATSEEGTALES GS      281
      .      :      . : :      . : :      :      :      :      *

```

Fig.4-10 Sequence alignment of *Bacillus* nitrilase with other nitrilases. Amino acid sequence of *Bacillus* nitrilase (Bacillus_Nitrilase) was aligned with other nitrilase family proteins (A0A0H2WXM0, *Staphylococcus aureus* hydrolase, carbon-nitrogen family; Q9UYV8, *Pyrococcus abyssi* nitrilase; Q5JEU9, *Thermococcus kodakarensis* carbon-nitrogen hydrolase; B1L5H4, *Korarchaeum cryptofilum* nitrilase/cyanide hydratase; Q2LUZ0, *Syntrophus aciditrophicus* carbon-nitrogen hydrolase family protein; Q2S2E4, *Salinibacter ruber* hydrolase, carbon-nitrogen family).

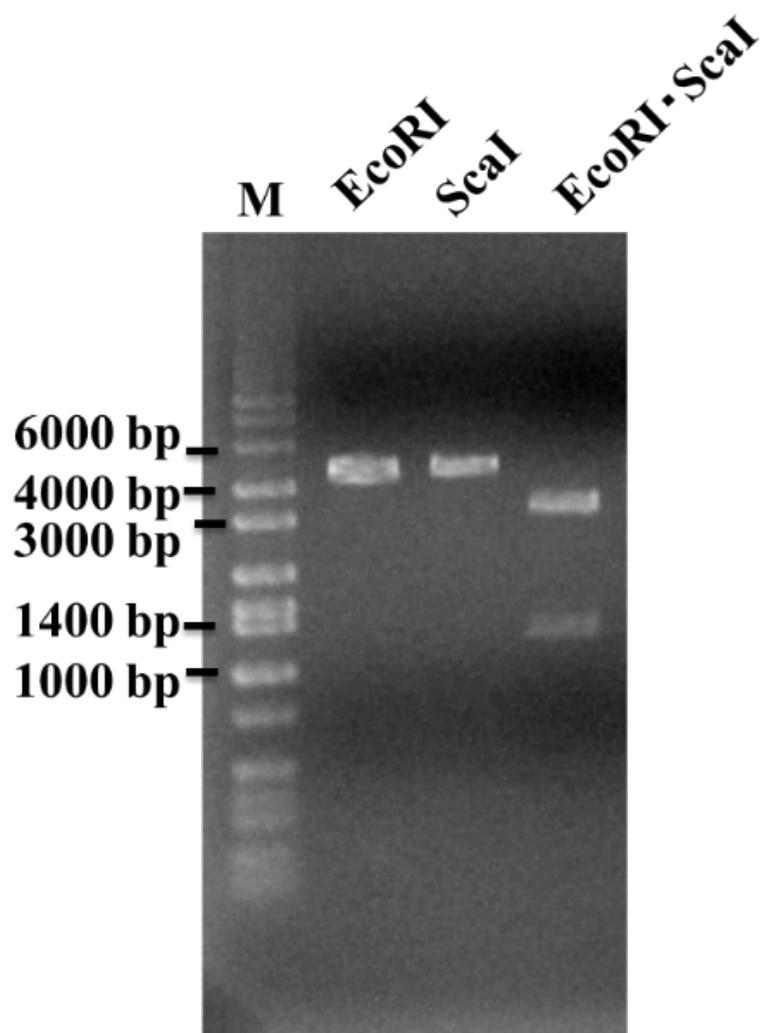


Fig. 4-11 Result of PCR after restriction enzyme treatment.

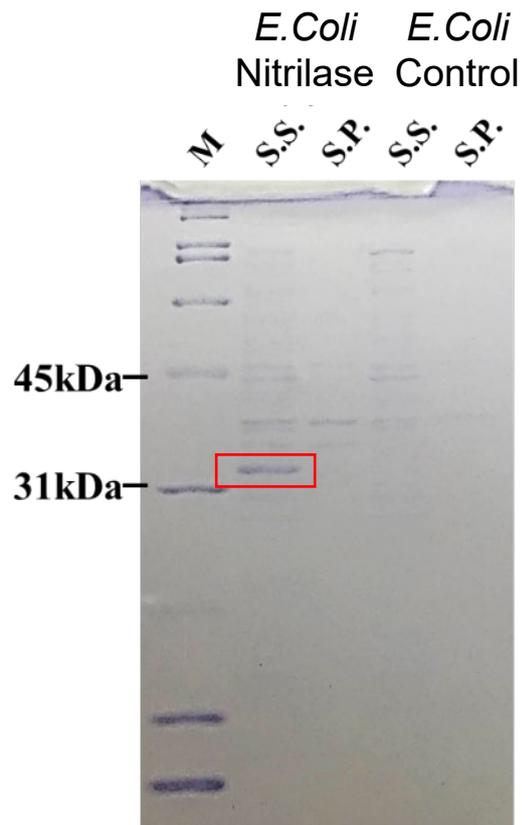


Fig. 4-12 SDS-PAGE analysis of the expression of *Bacillus* nitrilase. S, supernatant of crude extract; P, precipitate of crude extract.

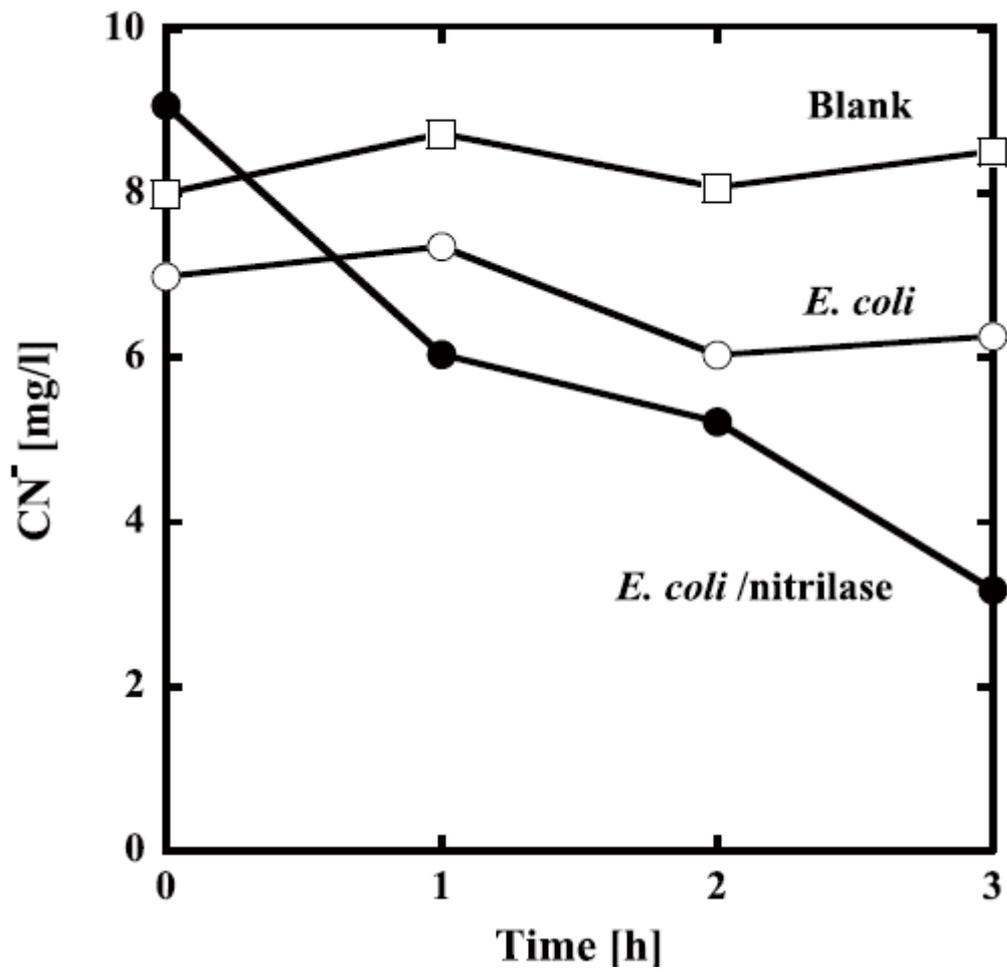


Fig.4-13 Cyanide-degrading activity of recombinant *E.coli* expressing *Bacillus* nitrilase.

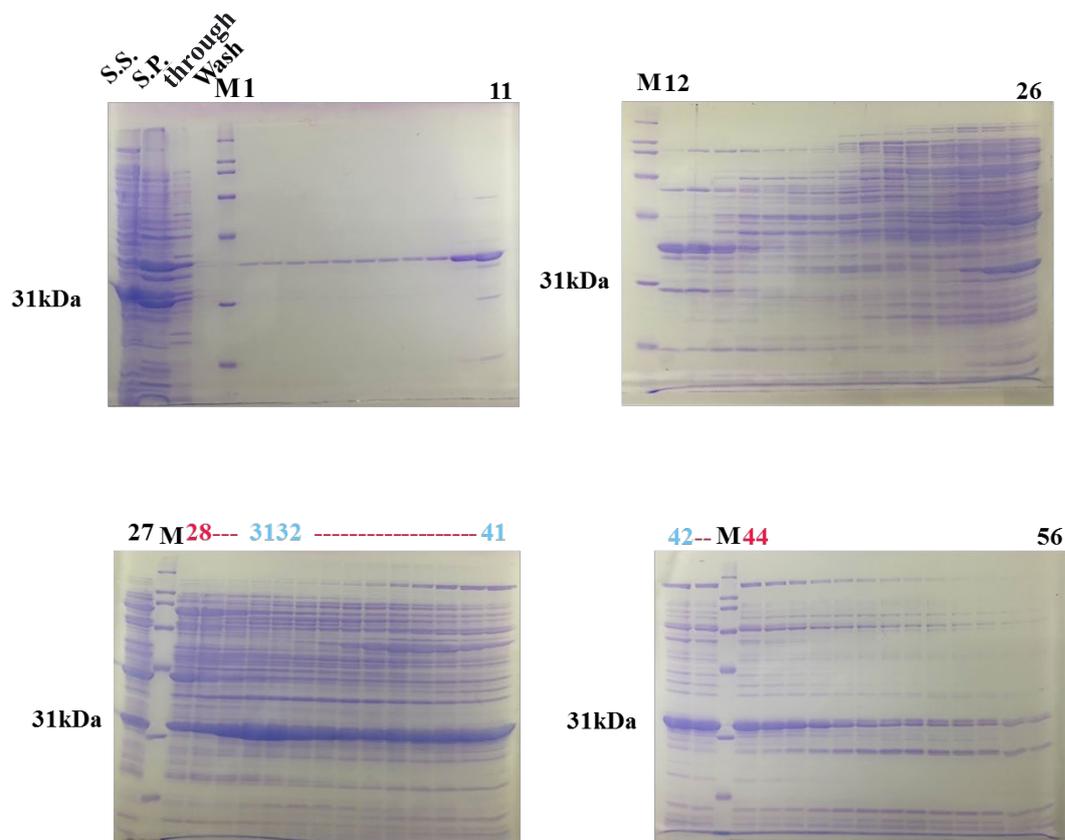


Fig.4-14 SDS-PAGE analysis of the sample after applied to an anion-exchange column(DEAE culumn). No. 28-44 was used next treatment.

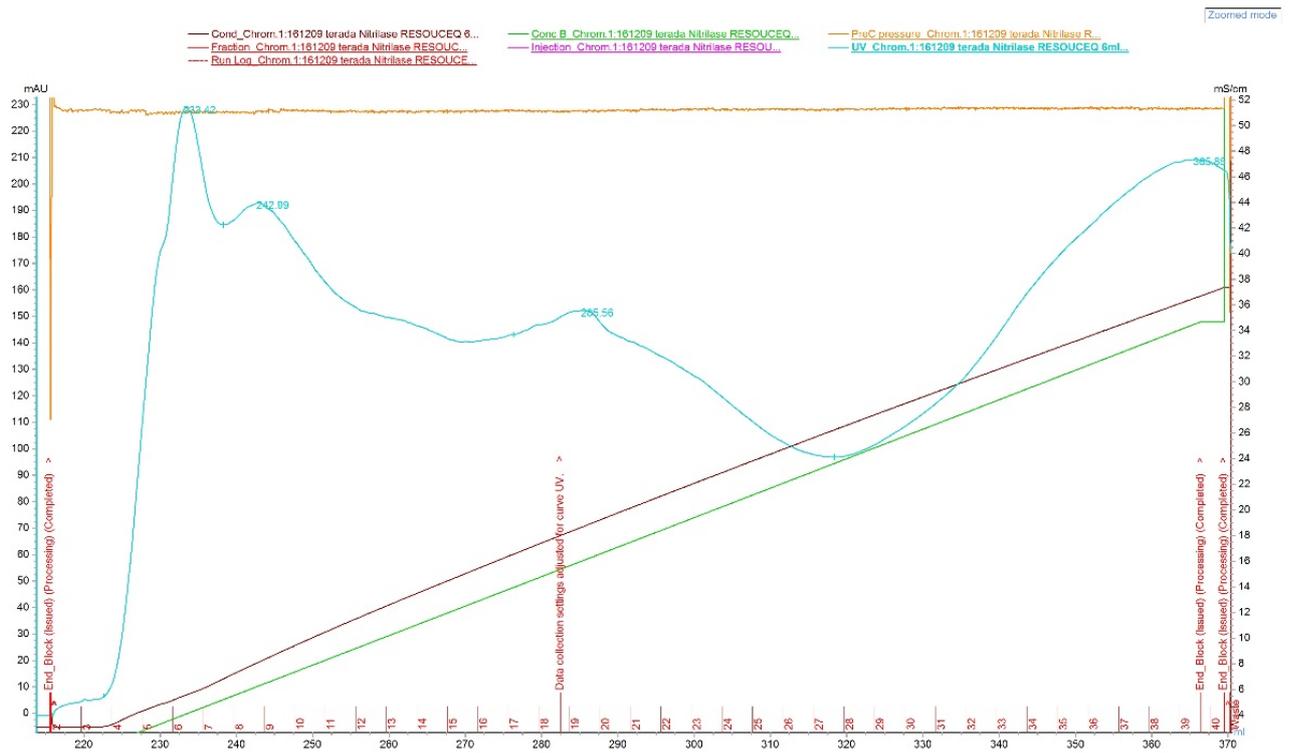


Fig.4-15 UV 280nm analysis of the sample after applied to an anion-exchange column (RESOURCE Q column). No. 4-8, 16-22, 36-40 was collected.

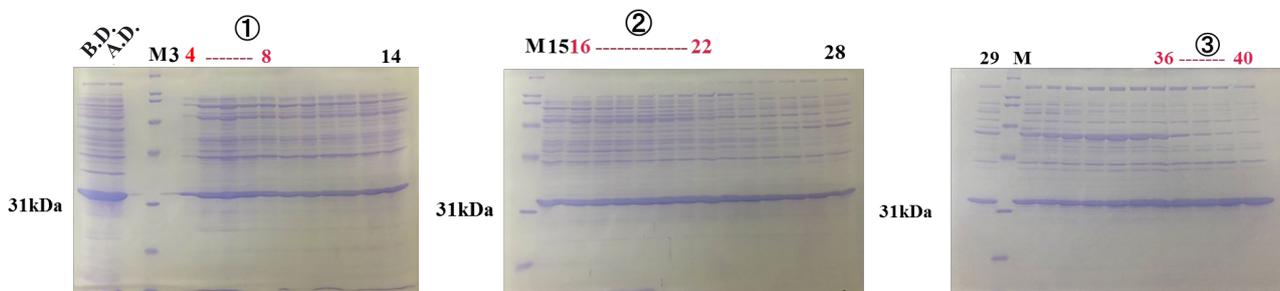


Fig.4-16 SDS-PAGE analysis of the sample after applied to an anion-exchange column

(RESOURCE Q column). No. 4-8, 16-22, 36-40 was collected.

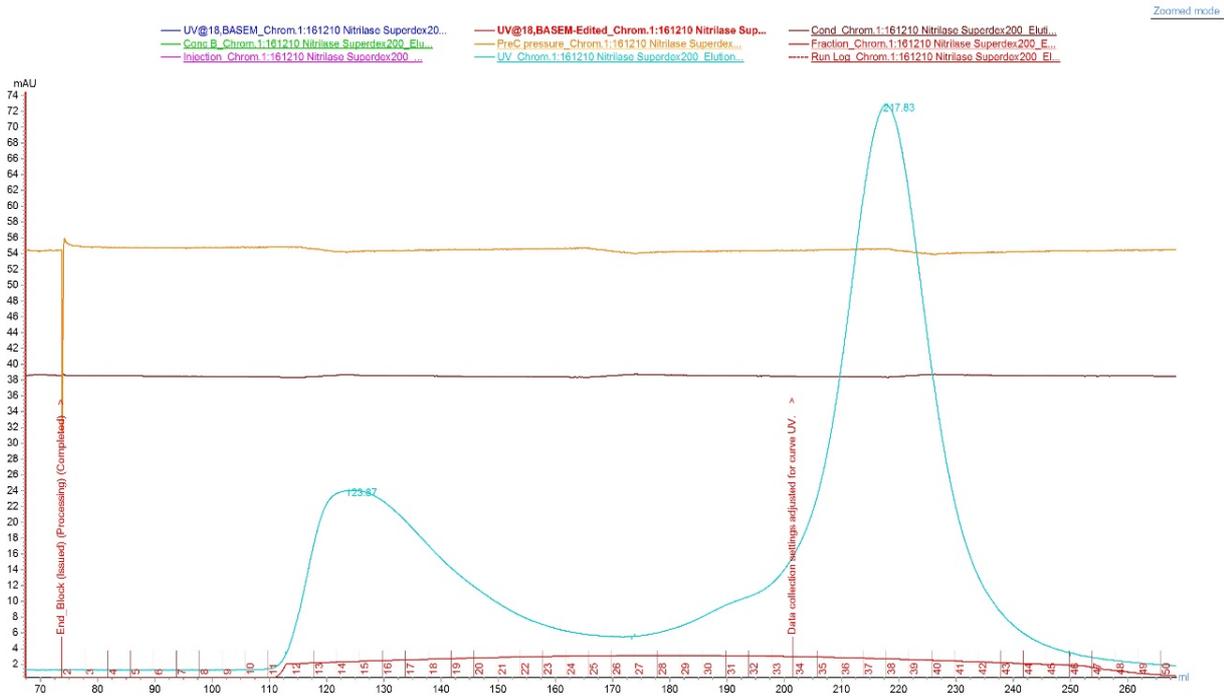


Fig-4-17 UV 280nm analysis of the sample after applied to a gel filtration chromatography column (HiLoad 26/60 Superdex 200 pg).



Fig.4-18 SDS-PAGE analysis of the sample after applied to a gel filtration chromatography column

(HiLoad 26/60 Superdex 200 pg). No. 13-17, 36-41 was collected.

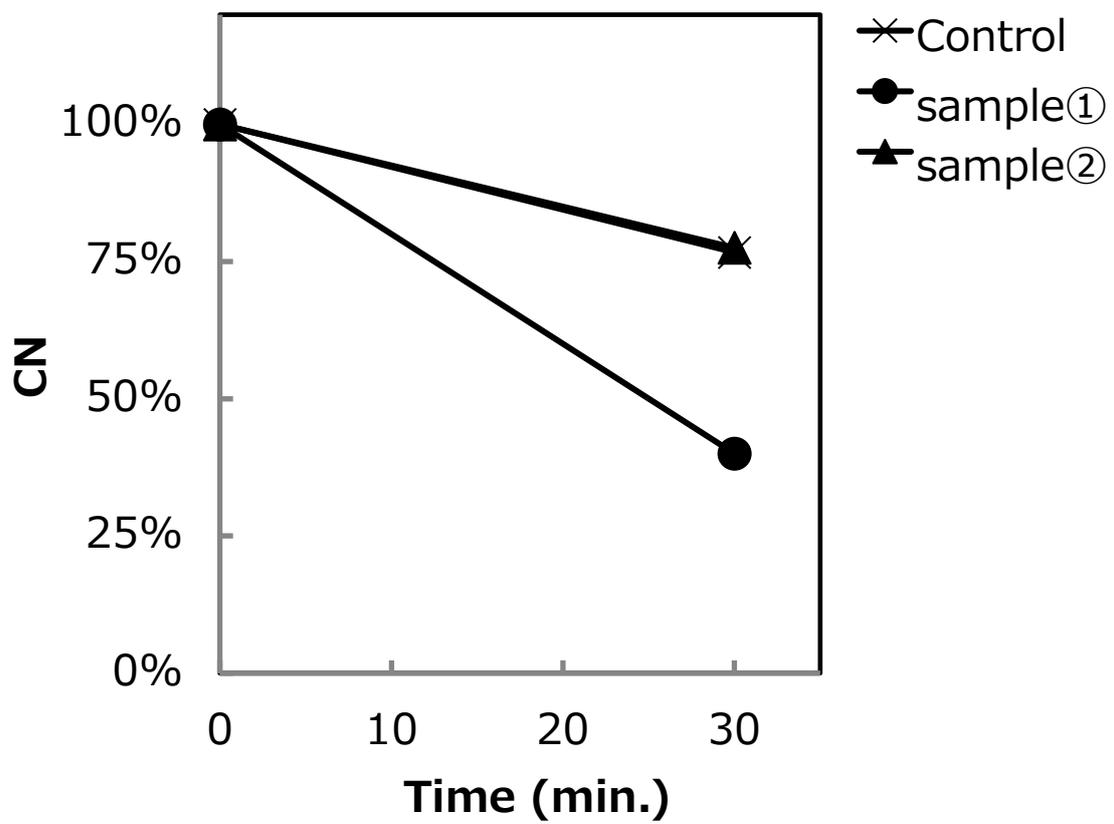


Fig.4-19 Cyanide-degrading activity of the purified *Bacillus nitrilase*.

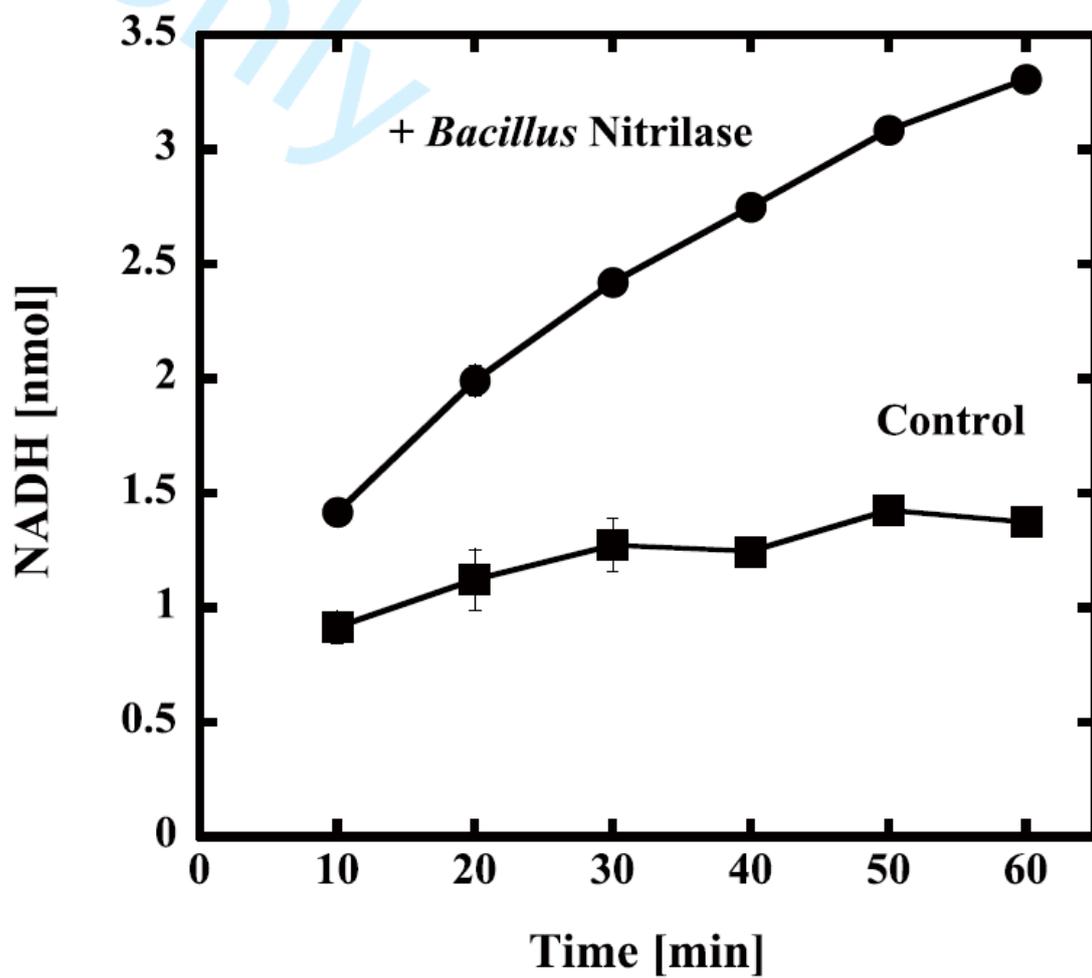


Fig.4-20 Cyanide hydrolase activity of the purified *Bacillus nitrilase*.

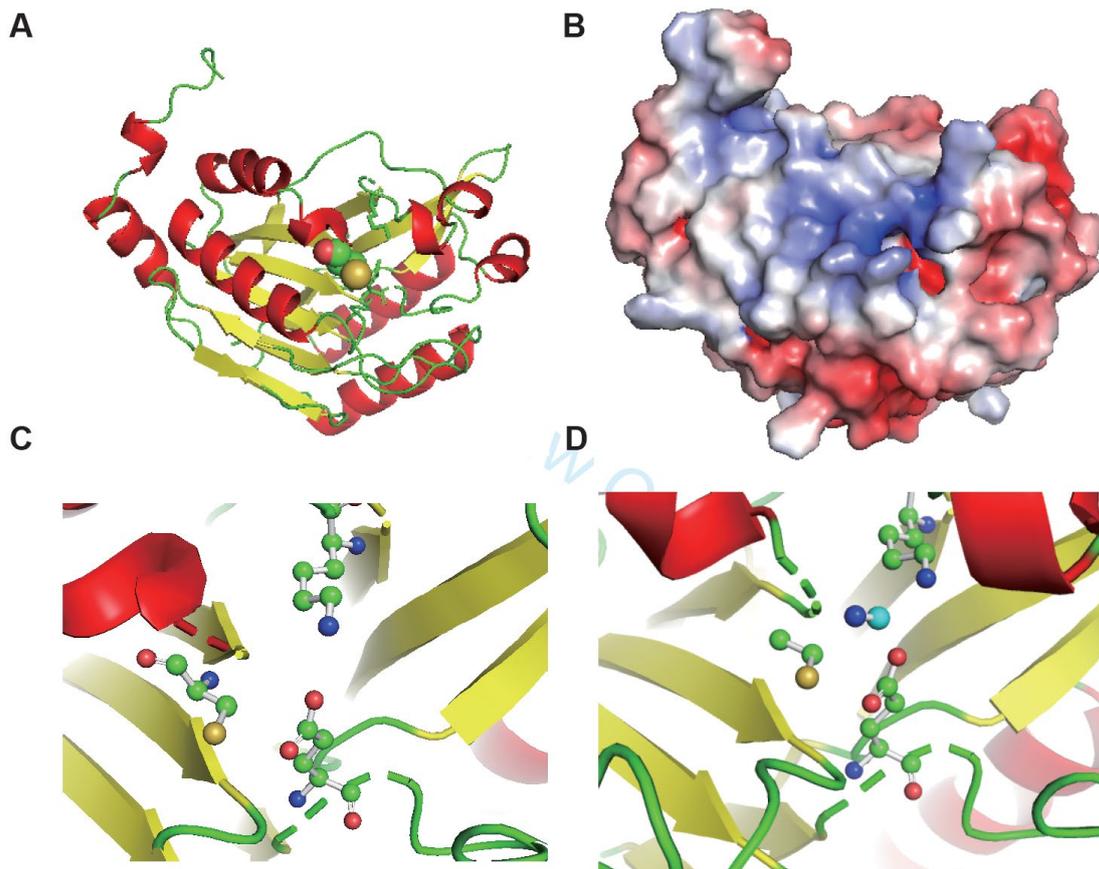


Fig.4-21 Predicted structure of *Bacillus nitrilase*.(A) Homology-based structure of *Bacillus nitrilase*. The catalytic cysteine residue is shown as a sphere model. (B) Electrostatic surface potential shown with positive charge colored blue and negative charge colored red. (C) Catalytic triad of *Bacillus nitrilase*. Cys, Glu and Lys residues that compose the catalytic triad residues are shown as ball-and-stick models. (D) The docking model. Cyanide is also shown as a ball-and-stick model.

4. まとめ

以上から、実汚染サイトから採取した地下水において、2種類のシアン化合物分解細菌を取得した。実際のサイトにおいても、これらの細菌がシアン化合物の分解を行っている可能性が考えられた。したがって、炭素源となる基質をサイトに供給することで、シアン化合物の分解が起こる可能性も考えられる。しかしながら、今回見つかったシアン化合物の分解菌2種は、シアン化合物の分解において、シアンを炭素源やエネルギー源にはできないことから、基質を添加しても他の細菌との競合に有利なわけではなく、選択的に増やすことは難しいことがわかった。したがって、これらの細菌を培養して増やした後に、投入するバイオオーグメンテーションでの利用が考えられる。特に *Bacillus strain EBE-2* は非常にシアン化合物分解活性が高く、有用であると考えられる。したがって、今後は、*Bacillus strain EBE-2* をバイオオーグメンテーションに利用することを想定し、さらに実験を続けていくことを考えている。

第5章 総合まとめ

塩素化エチレン類については、主に脱塩素化をおこなう *Dehalococcoides* 属細菌が単独では、非常に成長が遅く、分解活性も低いことから、*Dehalococcoides* 属細菌を補助するほかの細菌も利用することで、活性が高い分解コンソーシアの作成に成功した。今回は、土着菌を利用し、細菌の単離を必要としない手法（第2章）と、土着菌を用いず、活性が高く、単純な構造のコンソーシア（第3章）の両方について、取り組んだ。第2章手法だとある程度集積培養するためリードタイムが必要となる一方、土着菌を持ちいるため、より環境負荷が低く、手法も煩雑ではない。一方、第3章の手法だと、手法自体が煩雑であるものの、より活性の高いコンソーシアを直接投与するだけであり、培養時間程度で長いリードタイムは必要としない。どちらの手法が良いかは、サイトによって異なることから、今後、実用化をしつつ、複数サイトで試験をしていく必要があると考えられ、どちらが良いというわけではないと考えている。

また、シアン化合物を対象とした試験においては、あるサイトにおけるシアンの分解を担っている可能性があるシアン分解菌を単離し、その分解酵素について詳しく調べた。また、高活性のシアン分解菌の単離にも成功した。国内において、シアン化合物のバイオレメディエーションがほとんど実施されておらず、本研究において、単離された細菌をサイトに適用することで、シアン化合物のバイオレメディエーションを進めていきたいと考えている。

土壌汚染は、事業活動が続く限り、なくなることはない問題の一つである。また、過去に汚染されてしまったサイトが様々な理由によって、浄化されず放置されている事例も多い。今後、本研究のようにバイオレメディエーションの実用化がより進めば、少なくともコストの問題によって、それまで塩漬け状態のブラウンフィールドが再び活用される事例が増えてくると考えられる。今後、本研究の成果を土壌汚染問題の解決手段の一つとして、活用していくことを考えている。

第6章 引用文献

1. 第1章引用文献

- 1) 環境省 (2019): パンフレット「土壤汚染対策法のしくみ」
<http://www.env.go.jp/water/dojo/gl-man.html>.
- 2) 丸茂克美. (2007) 自然由来の重金属に起因する土壤汚染問題への地球科学的アプローチ. *Journal of Geography*. **116**, 877-891
- 3) 環境省 (2019): 土壤汚染対策法に基づく調査及び措置に関するガイドライン (改訂第3版) . Appendix-1.
http://www.env.go.jp/water/dojo/gl-man/dojogl2019_1_a-r.pdf
- 4) 東京都環境局 (2020) : 土壤汚染情報公開システム
<https://www.dojou.kankyo.metro.tokyo.lg.jp/SoilPollution/Search/Search/Index>
- 5) 環境省 (2009) : 土壤汚染をめぐるブラウンフィールド問題の実態等について中間とりまとめ
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/9506.html>
- 6) 環境省 (2013) : 汚染土壤処理業の許可審査等に関する技術的留意事項.
http://www.env.go.jp/water/dojo/kyoka_shinsa/index.html
- 7) 吉田舞奈, 李炳大, 細見正明. (2000) フェントン処理によるテトラクロロエチレン分解過程における炭素と塩素収支. *水環境学会誌* **23**, 433-437
- 8) 根岸昌範, 下村雅則, 樋口雄一, 高岡昌輝, 武田信生. (2006) 金属還元剤による有機塩素化合物の脱樽俎反応とその持続性. *土木学会論文集G*. **62**, 268-277
- 9) Heron, G., Lachance, J. and Baker, R. (2013) Removal of PCE DNAPL from Tight Clays Using In Situ Thermal Desorption. *Groundwater Monit R*. **33**, 31-43.
- 10) 古川靖英, 小林剛, 保高徹生, 本藤祐樹, 藤江幸一. (2018)揮発性有機塩素化合物汚染における土壤汚染対策技術選定時のサステナブルアプローチの有効性検討と従来手法との比較. *土木学会論文集G(環境)*. **74**, 152-164
- 11) 矢木修身, 内山裕夫. (1994) バイオレメディエーション技術. *ファルマシア*. **31**, 248-252

- 12) 西村実.(1995) 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
- 13) 環境省 (2019): 平成 29 年度土壌汚染対策法の施行状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果
<http://www.env.go.jp/water/report/r1-01/04.pdf>
- 14) Men Y., Seth E. C., Yi S., Crofts T. S., Allen R. H., Taga M. E., Alvarez-Cohen L. (2015) Identification of specific corrinoids reveals corrinoid modification in dechlorinating microbial communities. *Environ Microbiol.* **17**, 4873-4884.
- 15) Yohda, M., Ikegami, K., Aita, Y., Kitajima M., Takechi, A., Iwamoto, M., Fukuda, M., Tamura N., Shibasaki, J., Koike, S., *et al.*(2017) Isolation and genomic characterization of a *Dehalococcoides* strain suggests genomic rearrangement during culture. *Sci. Rep.* **7**, 2230-2240.
- 16) Men, Y., Seth E. C., Yi S., Allen, R. H., Taga, M. E., Alvarez-Cohen, L. (2014) Sustainable Growth of *Dehalococcoides mccartyi* 195 by Corrinoid Salvaging and Remodeling in Defined Lactate-Fermenting Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2133-2141.
- 17) 環境省 (2019): 微生物によるバイオレメディエーション 利用指針適合確認状況。
<https://www.env.go.jp/air/tech/bio/05.html>
- 18) 上野俊洋, 奥津徳也, 水本正浩, 石田浩昭.(2010) 塩素化エチレンを対象とした嫌気性バイオレメディエーション技術の開発と現場適用. *Journal of Environmental Biotechnology.* **10**, 79-89.
- 19) 吹田市 : 南吹田地域の地下水汚染
<https://www.city.suita.osaka.jp/home/soshiki/div-kankyo/kankyohozen/chikasui-kisei/minami-chikasui-kisei.html>
- 20) Goldman S. M., Quinlan P. J., Ross G. W., Marras C., Meng C., Bhudhikanok G. S., Kathleen Comyns K., Korell M., Chade A. R., Kasten M., Priestley B., Chou K. L., Fernandez H. H., Cambi F., Langston J. W., Tanner C. M. (2012) Solvent exposures and parkinson disease risk in twins. *Ann. Neurol.* **71**: 776-784.

- 21) Smidt H., de Vos W. M., (2004) Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 43–73.
- 22) He J., Ritalahti K. M., Yang K. L., Koenigsberg S. S., Löffler F. E. (2003) Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature.* **424**: 62–65.
- 23) Way, James, L. (1984) Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **24**, 451-481.
- 24) Thilo, R., Tim, M. (2002) Sorption of iron–cyanide complexes on goethite in the presence of sulfate and desorption with phosphate and chloride. *Published in J. Environ. Qual.* **31**, 745–751.
- 25) Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M. B., Kang, C. U., Baek, S. H., Jeon, B. (2017) Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering* **20**, 28-40.
- 26) Barclay, M., Hart, A., Knowles, C. J., Meeussen, J. C. L., Tett, V. A. (1998) Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme and microbial Technology* **22**, 223-231.
- 27) Acera, F., Carmona, M. I., Castillo, F., Quesada, A., Blasco, R. (2017) A Cyanide-Induced 3-Cyanoalanine Nitrilase in the Cyanide-Assimilating Bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Strain CECT 5344. *Appl Environ Microbiol* **83**.
- 28) Singh, U., Arora, N. K., Sachan, P. (2018) Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*. *Braz J Microbiol* **49**, 38-44.
- 29) Manso Cobos, I., Ibanez Garcia, M. I., de la Pena Moreno, F., Saez Melero, L. P., Luque-Almagro, V. M., Castillo Rodriguez, F., Roldan Ruiz, M. D., Prieto Jimenez, M.A., Moreno Vivian, C. (2015) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanidedegrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microb Cell Fact* **14**, 77.
- 30) Nallapan Maniyam, M., Sjahrir, F., Ibrahim, A., Cass, A. (2013) Biodegradation of cyanide by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Biologia* **68**.

31) Karamba, K. I., Ahmad, S. A., Zulkharnain, A., Yasid, N. A., Ibrahim, S., Shukor, M. Y. (2018) Batch growth kinetic studies of locally isolated cyanide-degrading *Serratia arcscens* strain AQ07. *3 Biotech* **8**, 11.

32) Mekuto L., Jackson V.A., Ntwampe S.K.O. (2013) Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp. Consortium Dominated by *Bacillus Safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *J Bioremed Biodeg* **S18**, 004.

2. 第2章, 第3章引用文献

- 33) 環境省(2003) : 化学物質の環境リスク評価 第2巻.
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h15-01/index.html>
- 34)IARC (2008) : Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. **97**,311-426
- 35) Holliger C., Hahn D., Harmsen H., Ludwig W., Schumacher W., Tindall B., Vazquez F., Weiss N., Zehnder A. J. (1998) *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch Microbiol.* **169**, 313-21.
- 36) Yohda M., Yagi O., Takechi A., Kitajima M., Matsuda H., Miyamura N., Aizawa T., Nakajima M., Sunairi M., Daiba A., Miyajima T., Teruya M., Teruya K., Shiroma A., Shimoji M., Tamotsu H., Juan A., Nakano K., Aoyama M., Terabayashi Y., Satou K., Hirano T. (2014) Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on *cis*-1,2-dichloroethene, *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 69 -77
- 37) Grabowski A., Tindall B. J., Bardin V., Blanchet D., Christian J. (2005) *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1113-1121.
- 38) Lawson, P. A., Wawrik, B., Allen, T. D., Johnson, C. N., Marks, C. R., Tanner, R. S., Harriman, B. H., Strapoc, D. and Callaghan, A. V. (2014) *Youngiibacter fragile* gen. nov., sp. nov., isolated from natural gas production-water and reclassification of *Acetivibrio multivorans* as *Youngiibacter multivorans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 198-205.
- 39) Seshadri R., Adrian L., Fouts D. E., Eisen J. A., Phillippy A. M., Methe B. A., Ward N. L., Nelson W. C., Deboy R. T., Khouri H. M., Kolonay J. F., Dodson R. J., Daugherty S. C., Brinkac L. M., Sullivan S. A., Madupu R., Nelson K. E., Kang K. H., Impraim M., Tran K., Robinson J. M., Forberger H. A., Fraser C. M., Zinder S. H., Heidelberg J. F. (2005) Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science.* **307**, 105–108.

3. 第4章引用文献

- 40) Sharma, M., Akhter, Y., Chatterjee, S. (2019) A review on remediation of cyanide containing industrial wastes using biological systems with special reference to enzymatic degradation. *World J Microbiol Biotechnol* **35**, 70.
- 41) Dash, R. R., Gaur, A., Balomajumder, C. (2009) Cyanide in industrial wastewaters and its removal: a review on biotreatment. *J Hazard Mater* **163**, 1-11
- 42) Ebbs, S. (2004) Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 231-236.
- 43) Kunz, D. A., Fernandez, R. F., Parab, P. (2001) Evidence that bacterial cyanide oxygenase is a pterin-dependent hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 514-518.
- 44) O'Reilly, C. Turner, P., D. (2003) The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes – a comparative study. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1161–1174.
- 45) Fernandes, B.C., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., van Rantwijk, F., Stolz, A. and Sheldon, R. (2006) Nitrile Hydratase Activity of a Recombinant Nitrilase. *Adv. Synth. Catal.*, **348**, 2597-2603.
- 46) Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P. R., Sewell, B. T., Willson, R. C., Benedik, M. J. (2003) CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: gene cloning and structural studies. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4794-4805
- 47) Han, C., Spring, S., Lapidus, A., Glavina D.R.T., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J. F., Lucas, S., Chen, F., Nolan, M., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova N., *et al.* (2009) Complete genome sequence of *Pedobacter heparinus* type strain (HIM 762-3^T). *Stand in Genomic Sci* **1**, 54–62.
- 48) Hao, K., Li, H., Li, F., Guo, P. (2016) Complete Genome Sequence of *Bacillus pumilus* PDSLzg-1, a Hydrocarbon-Degrading Bacterium Isolated from Oil-Contaminated Soil in China. *Genome Announc* **4**, e01079-16.
- 49) Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., Gekko, K. (2000) Nitrilase of *Rhodococcus rhodochromus* J1. Conversion into the active form by subunit association. *Eur J Biochem* **267**, 138-144.

50) Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**, W296-W303.

51) Pace, H. C., Hodawadekar, S. C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C. M., Brenner, C. (2000) Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr Biol* **10**, 907-917.