

氏名(本籍)	なか じま とし あき 中 島 敏 明 (埼玉県)
学位の種類	博 士 (学 術)
学位記番号	博 甲 第 1042 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審査研究科	農 学 研 究 科
学位論文題目	AEROBIC DEGRADATION OF TRICHLOROETHYLENE BY A METHANOTROPH ' <i>METHYLOCYSTIS</i> ' SP. M (メタン資化性菌 ' <i>Methylocystis</i> ' sp. M によるトリクロロエチレンの好気分解)
主 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学教授 工学博士 中 村 以 正
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学助教授 農学博士 祥 雲 弘 文

論 文 の 要 旨

揮発性有機塩素化合物の一種であるトリクロロエチレンは、機械金属部品の脱脂・洗浄剤として IC 産業などの分野で広い用途がある。一方、本物質が発癌性でありかつ難分解性であることから、環境汚染物質として大きな社会問題となっている。

本研究では、微生物によりトリクロロエチレンを好氣的に分解することを試みた。すなわち、トリクロロエチレン高分解能を有する細菌を検索し、その菌学的諸性質、トリクロロエチレンに対する分解特性、分解経路および分解に関与する酵素について検討を加えた。

まず、土壌よりスクリーニングを行い、トリクロロエチレン高分解能を有する混合微生物系 MU-81 を得た。本混合系は、メタンを唯一の炭素源として好氣的に生育し、3.5ppm のトリクロロエチレンを 8 日間で 90% 以上分解した。また本混合系は、各種のジクロロエチレン、モノクロロエチレン、1,2-ジクロロエチレン、1,1,2-トリクロロエタン、1,1,2,2-テトラクロロエタン、クロロホルム等分解できた。しかし、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタン、四塩化炭素などは分解できず、これら揮発性有機塩素化合物に対する分解能は、対象となる物質の化学構造と深い関係があった。

次に、本混合微生物系のトリクロロエチレン分解において、中心的役割を担っていると考えられたメタン資化性菌、M 株を単離し、その菌学的諸性質を検討した結果、obligate methanotroph のタイプ II に属する *Methylocystis* 属細菌であることが明らかにされた。そこで、本菌の純粋培養系におけるトリクロロエチレン分解経路について検討を進めた。変換反応を用い、トリクロロエチレン分解

終了後の反応液を酸性下でエーテル抽出した後、メチル化してGC-MSにて分解産物を同定したところ、反応液中にジクロロ酢酸とグリオキシル酸が認められ、この他にもトリクロロ酢酸および微量の1,1,1-トリクロロエタノールが検出された。後者の2物質については、分解のキーエンザイムであるメタンモノオキシゲナーゼによりトリクロロエチレンの塩素転移が起こり生じたものと考えられた。

純粋培養系における分解速度の低下は、上述の分解産物の蓄積に起因するものと推定されたので、 ^{14}C トリクロロエチレンを用いて混合培養系との比較を行った。純粋培養系では、トリクロロエチレンの分解にともない、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、グリオキシル酸、COおよびCO₂の生成がみられた。一方、混合培養系では、トリクロロ酢酸は純粋培養系の場合の50%以下しか認められず、ジクロロ酢酸とグリオキシル酸はほとんど認められなかった。以上の結果から、混合培養系においては、メタン資化性菌以外の菌が、これらを分解していると推論された。混合培養系内の混在菌を検討したところ、2種類の菌株がトリクロロエチレン分解産物をさらに分解しており、そのうちの1株(DA 4株)は*Xanthobacter autotrophicus*と同定された。他の1株は*Pseudomonas*属細菌であることが明らかにされた。DA 4株の方がトリクロロエチレン分解産物に対する分解能力が強く、M株とDA 4株との混合系が有効であった。

続いて、M株におけるトリクロロエチレン分解のキーエンザイムであるメタンモノオキシゲナーゼの精製を試みた。M株の無細胞抽出液のメタンモノオキシゲナーゼ活性は、酸素の存在下で極めて不安定であったが、10mMのジチオスレイトールの添加により安定化された。本酵素はイオン交換クロマトグラフィーで3つの画分(I, II, III)に分画され、メタンモノオキシゲナーゼ活性は、I+II+IIIの場合に最大となり、II+IIIでは最大活性の10%以下で、それ以外の組合せでは認められなかった。したがって、本酵素は3つのコンポーネントからなるマルチコンポーネントエンザイムであると考えられた。II, IIIをイオン交換およびゲル濾過により電気泳動的に単一となるまで精製し、またIについても硫酸分画およびゲル濾過により部分精製を行った。

さらに、精製された各コンポーネントの役割を検討した。IIIは分子量39,000の単量体で、分子内にFeとFADを有し、フェリシアン化カリ、2, 6-ジクロロインドフェノールを還元できた。活性発現には、NADHが必須であり、NADPHでは活性は現れなかった。このことから、IIIはNADH依存性レダクターゼであることが明らかとなった。IIは分子量233,000で、3つのサブユニット(α , 55,000; β , 44,000; γ , 21,000)が各々2個ずつからなっており、分子内に非ヘム鉄を持っていた。これらの諸性質は、これまでに報告されているメタン資化性菌のメタンモノオキシゲナーゼ中のヒドロキシラーゼと酷似している。また、コンポーネントIIがヒドロキシラーゼコンポーネントの阻害剤であるアセチレンにより特異的に失活することを考え合わせると、IIはメタンモノオキシゲナーゼ中のヒドロキシラーゼであると結論される。Iはメタンモノオキシゲナーゼ活性発現に必須ではないが、これをII, IIIに添加することにより活性は11.2倍に上昇した。この活性化はFeSO₄添加の場合にも認められ、Iの活性化機能は鉄と関係があるものと思われる。Iは従来報告のあるメタンモノオキシゲナーゼ中の調節タンパク質とは分子量および生理的性質が著しく異なっており、新

しい型の調節タンパクであると考えられた。

以上、本研究において、トリクロロエチレンを効率よく好氣的に分解するメタン資化性菌を自然界から分離し、トリクロロエチレンの分解特性を明らかにした。さらに分解産物を同定することにより推定分解経路を提示し、分解のキーエンザイムであるメタンモノオキシナーゼを精製した後、その諸性質を明らかにした。

審 査 の 要 旨

本論文は、環境汚染物質として大きな社会問題となっているトリクロロエチレンの好氣的な微生物分解についての一連の研究をまとめたものである。まずトリクロロエチレン高分解能を持つ微生物を自然界から新たに検索し、目的に合致した混合微生物系を得ることに成功している。分解特性を調べた結果、従来報告されているものよりはるかに高濃度のトリクロロエチレンを比較的短期間に分解できることを認め、環境浄化への応用の可能性を示した。本混合微生物系から、トリクロロエチレン分解の中心的役割を果しているメタン資化性菌とその分解産物をさらに分解する細菌とをそれぞれ単離し、菌学的諸性質を明らかにした。さらにメタン資化性菌の純粋培養系と混合培養系を用いて、トリクロロエチレンの分解経路を検討し、分解産物を同定することにより推定経路を提示しえた。次に分解のキーエンザイムであるメタンモノオキシゲナーゼを精製して、その酵素の諸性質について調べた。その結果、本酵素がNADH依存性レダクターゼおよびヒドロキシラーゼからなることを明らかにし、また、その活性には新しい型の調節タンパクが関与していることを示唆した。

以上、本研究は、トリクロロエチレン分解菌の探索から酵素レベルでの検討まで系統的に進められ、トリクロロエチレンの分解特性と分解経路および分解に関与するメタンモノオキシナーゼについて多くの基礎的知見を加えている。また併せて、本微生物系の環境浄化への応用の可能性を示唆しており、本研究は、基礎・応用の両面から高く評価される。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。