

<講演>

DNA マイクロアレイを用いた PCE 汚染土壌・地下水のバイオレメディエーション事前診断

DNA microarray for detection of PCE-degraders in PCE contaminated subsurface

高見澤 一裕

岐阜大学応用生物科学部

Takamizawa Kazuhiro

Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

Abstract

The key to the successful application of bioremediation is how to detect microorganisms which are capable of degrading target chemicals at the contaminated sites. A novel DNA microarray which detects 22 kinds of PCE-degraders is developed.

Key Words: DNA microarray, PCE-degraders, Bioremediation

1. はじめに

最近、遺伝子診断、DNA チップ、DNA マイクロアレイ、PCR などの分子生物学で汎用される専門用語が新聞紙上やマスコミ報道で数多く見聞きするようになってきた。BSE 感染牛の診断などの食品安全性の管理と、特に、医療において遺伝子検査は不可欠な方法として定着しつつある。

DNA マイクロアレイは、DNA チップとも云われているが、ごく狭い範囲に目的 DNA 断片を高密度にプロットしたもの、あるいは、チップ上で合成したものを総称している。厳密な定義では、DNA チップは、アメリカのアフィメトリックス社が開発したコンピューター用のシリコンチップの製造に用いられる光リソグラフィを用いてシリコン基板上に直接 20-30 塩基のオリゴヌクレオチドを合成するものである。DNA マイクロアレイは、ガラスやシリコンなどの基板の上に数ナノリットルの DNA をピンインクジェットで高密度にスポットし、固定化する方法である。アメリカのスタンフォード大学のブラウン博士によって開発された方式である。

両者とも、狭い範囲に非常にたくさんの DNA をスポット出来るため、得られる情報量が非常に多く、しかも

検出原理はあらかじめ蛍光色素で標識してスポットした DNA にハイブリダイゼーションする DNA を蛍光スキャナーで検出するため、短時間に結果を得ることが出来る。

筆者は、テトラクロロエチレン (PCE) 分解菌を検出するための DNA マイクロアレイを開発した。その目的は、PCE 汚染サイトの浄化方法としてバイオレメディエーションが適応可能かどうかを事前に診断するためである。この方法の概略と応用例を紹介する。

2. PCE 汚染の現状と修復方法

環境省の 2000 年度の調査によると、地下水汚染総件数のうち 38%が PCE を中心とする有機塩素系化合物 (VOC) による汚染である。PCE やトリクロロエチレン (TCE) は過去において、各々年間 60,000 トン近く使用されてきた溶剤で、電子部品工場での IC チップの洗浄やドライクリーニング、塗装工場などで広範囲に利用された。それらの化学構造と環境基準を Fig. 1 に示す。

PCE 汚染サイトには通常、TCE とシス 1,2 ジクロロエチレン (cDCE) が検出される。比重の重い PCE は工場敷地内に漏出すると土壌深く浸透してゆく。そして、土壌は、通常、地表面下 50 センチ以下は空気のない状態 (嫌気性) であるため、嫌気性の PCE 分解菌の作用で非常にゆっくりと塩素原子 1 つずつ脱塩素化される。

*〒501-1113 岐阜市柳戸 1-1
TEL : 058-293-2906 FAX : 058-293-2906
E-mail : tak2003@cc.gifu-u.ac.jp

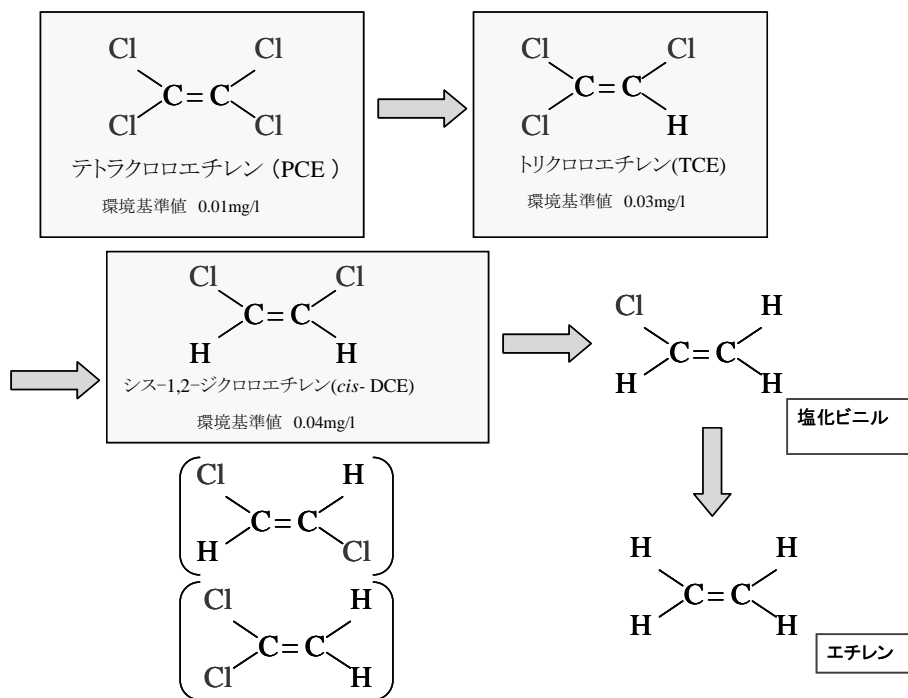


Fig. 1 PCE及び関連物質の化学構造と環境基準

すなわち、PCEはTCE、cDCEそして塩化ビニル (VC) を経て、エチレン、二酸化炭素、塩素イオンと分解が進む。PCEがエチレン、二酸化炭素、塩素イオンとなれば完全分解が達成することになる。これには、数十年を要すると考えられる。

ほとんどの場合は、TCEないしcDCEで分解は停止している。なお、PCEからTCE、cDCE、VCと脱塩素化が進むにつれて毒性が高くなることもPCE分解の特徴である。

PCE汚染（多くは、PCE、TCE、cDCEによる複合汚染）を修復する方法として、物理化学的方法と生物学的方法がある。物理化学的方法は、汚染の範囲が狭いことと比較的高濃度（たとえば、1 mg/l、環境基準の100倍以上）に適した方法で、生物学的方法は、広範囲に拡散ししかも汚染濃度が比較的希薄な場合（10 mg/l以下、環境基準の1000倍程度）に応用可能である。

現在、汚染修復方法は、二分化され、コストはかかるが短期間で修復する物理化学的方法と時間はかかるがコストの安い生物学的方法（バイオレメディエーション）が採用される場合が多い。

3. PCEの微生物分解

PCE分解は、好気性で行われることはまずあり得ない。好気性PCE分解菌に関する報告は1種類のみで、さら

に、各地のPCE汚染サイトでの化学分析の結果からもTCE、cDCE、VCが検出されるのみでPCEの好氣的分解産物と考えられる中間体は検出されていない。

PCEの嫌気性分解菌は約25種類が報告され（Table 1）、それらの一部は分解に関与するデハロゲナーゼとその遺伝子構造も明らかにされている。その他、メタン生成菌などにPCE脱塩素化能力が報告されているが、分解能力は微弱な上、最終産物はTCEである。

なお、TCEは好気性でも効率よく分解され、土壌中の細菌のうち30%程度はTCE分解能力を保有していると考えられている。cDCEやVCについても同様である。

Table 1 PCE分解菌の例

微生物名	最終産物
<i>Methanosarcina</i> sp	TCE
<i>Methanosaicina mazei</i>	TCE, cDCE
<i>Desulfomonile tiedje</i>	cDCE
<i>Desulfobacterium</i> sp. Y51	TCE
<i>Spomura ovata</i>	TCE
<i>Acetobacterium woodii</i>	cDCE
<i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	cDCE
<i>Sulfuropirillum multivorans</i>	cDCE
Strain TT4B	cDCE
Strain MS-1	cDCE
<i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1	cDCE
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	ethylene
<i>Clostridiumn bifermentans</i> DPH-1	cDCE

PCE 分解菌のなかで最も注目されている種が *Dehalococcoides ethenogenes* である。代表的な株が *Dehalococcoides ethenogenes* 195 であり、PCE を完全にエチレンまで分解するスーパーバクである。その他の多くの PCE 分解菌の最終分解産物は cDCE である。cDCE を完全分解する細菌は、*Dehalococcoides ethenogenes* 195 を除くと 2 株 (*Clostridium* sp. DC1 と *Clostridium* sp. KYT1) しか報告されていない。

PCE を完全分解するには、*Dehalococcoides ethenogenes* もしくは、PCE を cDCE に分解する細菌と cDCE を完全に脱塩素化する細菌の共同作業が必要である。

4. PCE 汚染修復のバイオレメディエーション

PCE は嫌気性微生物でしか分解されないため、バイオレメディエーションを行うには、汚染サイトを嫌気性雰囲気にする必要がある。これは、元々の嫌気状態を維持すれば良いことであるため、好気性バイオレメディエーションに比べれば容易でかつ消費エネルギーは少なくて済む。

通常は、汚染サイトの土壌ないし地下水を採取し、それを用いたトリータビリティ試験を数ヶ月行って、PCE 汚染の修復の可能性と適切な栄養源を選定する。栄養源は、各種 PCE 分解菌数を増やし活性化するために必要である。

このように、PCE 汚染修復のためにバイオレメディエーションの応用を考えた場合、その可能性検討のための予備試験に数ヶ月かかり、且つ、分解されない場合は他の方法を考えなくてはならないという困難さがある。本来は、PCE 分解菌の生息を確認してからトリータビリティ試験を行えば、その可能性判定は容易となる。このため、上記、*Dehalococcoides ethenogenes* の存在に注目して *Dehalococcoides ethenogenes* を検出して、事前判定する方法が考え出され、実用化している。この方法は、正当でかつ確実であるが、*Dehalococcoides ethenogenes* は必ずしも PCE 汚染サイトに生息しているとは限らない。PCE 汚染修復は、PCE を cDCE まで分解する細菌と cDCE を完全分解する細菌の共同作業によっても分解できる。そのためには、これら細菌を網羅的に検出する必要がある。そのため、我々は DNA マイクロアレイを用いた PCE 分解に関与する全細菌の網羅的検出方法を開発することにした。

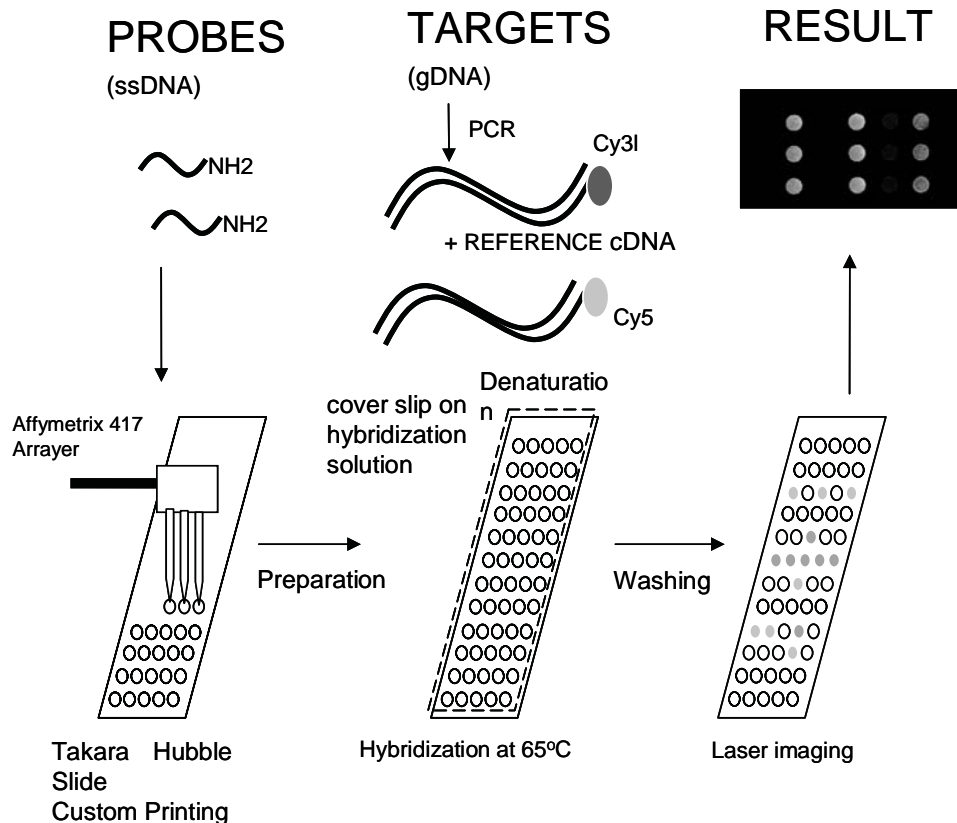


Fig. 2 DNAマイクロアレイの作成方法

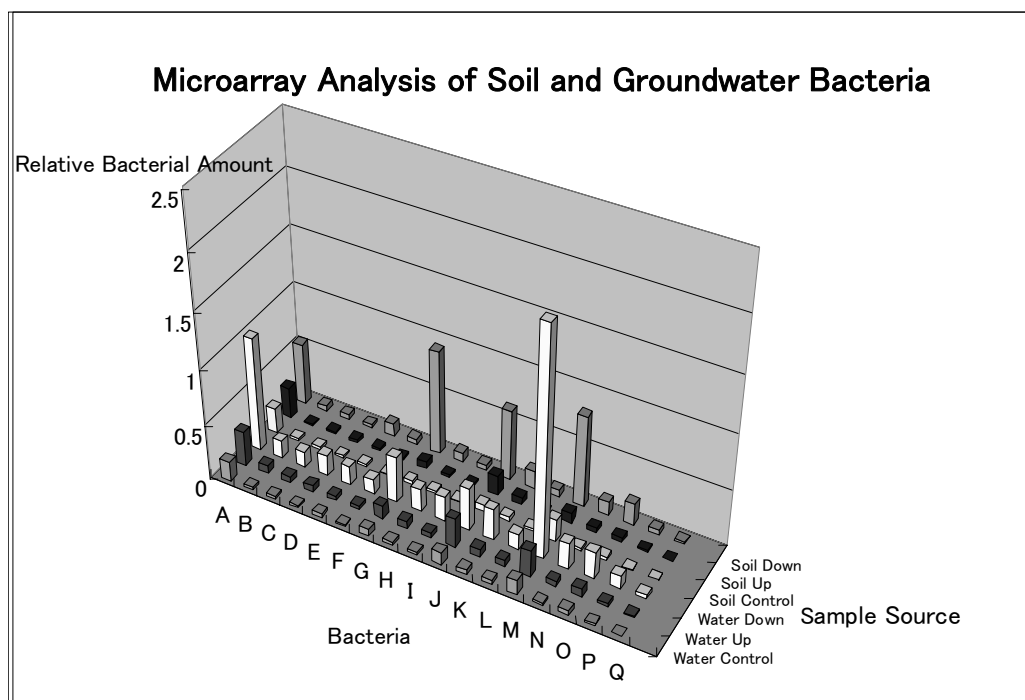


Fig. 3 PCE汚染サイトでのPCE分解菌の検出

5. PCE 分解菌検出用 DNA マイクロアレイ

PCE分解に関与する細菌25種類の16SrDNAとITS領域をターゲットとして細菌毎に5種類のプローブを*in silico*で設計し、作動確認を行った。

設計方針は、塩基長 40 mer、Tm 値 85-105°C、目的菌株以外の ITS 領域に相同性がないこと、G+C および A+T 塩基が 6 つ以上連続しないこと、ITS 領域の末端にプローブが位置しないこと、プローブ同士の塩基配列が出来るだけ無いこと、である。DNA マイクロアレイの作成方法を Fig. 2 に示す。

このアレイを使用して、実際の汚染サイトから PCE 分解菌を検出する。すなわち、土壌や地下水から DNA を抽出精製し、それらの DNA がスライドガラス上のプローブとハイブリダイズ（くっつく）すればそのシグナルから対象菌が存在することになる。

実際の汚染サイトで PCE 分解菌を検出した例を Fig. 3 に示す。

ここでは、PCE 汚染されていない対象地域、PCE 汚染されている土壌地下水サイトの上流側、そして栄養源を注入した後の下流側の土壌と地下水中の PCE 分解菌の存在とその量を相対濃度で表している。

A から Q は個々の PCE 分解菌を示している。対象サ

イトでは、A、J、M 菌しか存在していないが、上流側では、これらに加えて、B、G、H、J、N 菌が存在し、栄養源を注入することによってほとんどの PCE 分解に関与する細菌が増えていることがわかる。特に、地下水では顕著に増殖している。その結果、PCE 等の汚染レベルは環境基準以下になっている。

DNA マイクロアレイを使用すれば PCE 汚染サイトのバイオレメディエーション事前診断の強力な武器になる。アレイでの検出は、土壌・地下水試料からの DNA 抽出を含めて解析まで短時間（約 3 時間）で終了し、その後のトリータビリティ試験に要する時間が大幅に削減される。さらに、汚染サイトでの分解メカニズムとその後の微生物生態系復帰のモニターも行えることになる。

遺伝子検査はこれまで環境分野ではなじみが薄く、さらに、その効果がはっきりしなかった。遺伝子検査技術のほとんどすべては、特定の遺伝子を増幅することから始まっている。遺伝子増幅のために汎用されている方法が PCR(Polymerase Chain Reaction)である。この技術は、最近では、高等学校での授業や実験でも取り上げられるまでに一般化している。

今回は、我々が開発した PCE 分解菌検出用の DNA マイクロアレイを紹介したが、マイクロアレイをはじめ様々な遺伝子技術が環境分野に応用されることを期待する。