

東京大学大学院工学系研究科附属

水環境制御研究センター 教授

矢木 修身

「微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究」

## 1. 研究実施の概要

世界各地でトリクロロエチレン (TCE)、テトラクロロエチレン (PCE)、トリクロロエタン (TCA) および PCB 等の有機塩素化合物や水銀、6 価クロム等の重金属による土壌・地下水汚染が顕在化し大きな問題となっている。これらの汚染の浄化に、より安価かつ無害化処理技術である微生物を活用して汚染を修復するバイオレメディエーション技術の開発が期待されている。本研究では、有機塩素化合物や重金属の中で特に問題となっているトリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、PCB 及び水銀を対象に、これらの物質で汚染された土壌・地下水の修復をケーススタディとして取り上げ、バイオレメディエーション技術の実用化に際しブレークスルーすべき課題である浄化効果と安全性の確立を目指して研究を遂行した。このため以下の 5 課題、(1) 分解能強化微生物の開発、(2) 土壌中における微生物の挙動解析、(3) 微生物センサー機能を活用する有害物質モニタリング手法の開発、(4) 分子生態学的手法を用いる生態影響評価システムの開発、(5) 大型土壌・地下水シミュレータによるバイオレメディエーション技術の適応性の評価、を設定し、これらに関する基盤研究を実施した。課題が広範囲のため、研究課題を分担して遂行した。東京大学大学院・国立環境研究所 矢木グループは(1) 1) 2) 6)、(2) 1) 2) 3)、(4)、(5) 2) 3)を、九州大学大学院 古川グループは(1) 3) 4) 5)を、広島大学大学院 大竹グループは(3)を、国立水俣病総合研究センター 中村グループは(1) 6)を、荏原製作所宮グループは(4)、(5) 1) 2)、を遂行した。

5 課題に関する主要な成果を以下にまとめた。

### (1) 分解能強化微生物の開発

バイオレメディエーション技術を実施するためには、有用な微生物を開発をすることが重要である。TCE、PCE、TCA、PCB、及び水銀に関する分解微生物の分離・同定を行うとともに、分解特性、分解機構及び分解酵素の諸性質を調べるとともに、分解機能を向上させた。

#### 1) メタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M 株 (M 株) による TCE の浄化

TCE をよく分解するメタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M 株を用いるバイオレメディエーション技術の確立を本研究の大きな目標とした。このため M 株について詳細な研究を実施した。M 株は 50mg/l の TCE を分解できること、分解能は可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) に由来すること、また sMMO は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 2 個ずつのサブユニットからなるマルチコンポーネント酵素であることを明らかにした。ついで sMMO の遺伝子の全塩基配列を解読した。M 株の sMMO は全長が 6kb で、*mmoX*、*mmoY*、*mmoB*、*mmoZ*、*mmoC* 及び機能不明な *orfY* の遺伝子群で構成され、メタンの存在下で誘導され、メタノールでは誘導されないことが判明した。sMMO の発現は銅濃度に大きく影響を受け、銅濃度を低く保つことが重要であること、sMMO の mRNA 量は、TCE 分解活性と高い相関が認められたため、mRNA の含有量は、M 株の活性の良い指標になることが判明した。また sMMO 遺

伝子のクローニングを行い、大腸菌ではいずれのサブユニットタンパク質の生成が確認されたが、TCEの分解能を発現させることはできなかった。

## 2) TCA分解菌の分離・同定と諸性質

TCAおよびTCEを同時に分解できるエタン酸化細菌TA27株を土壤中より分離した。本菌は*Mycobacterium* sp.に属しており、高濃度のTCA(75mg/l)およびTCE(100mg/l)を分解できること、また種々のハロゲン化脂肪族炭化水素を分解できることから、複合汚染した汚染の浄化に有効な微生物であることが判明した。また、本菌の分解酵素はヒドロキシラーゼとリダクターゼから構成されていた。

## 3) TCE分解菌の分子育種

ビフェニル資化菌*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株はPCBを分解できるが、分解能は、ビフェニルジオキシゲナーゼに由来し、本酵素は鉄・硫黄タンパク(bphA1,bphA2)とフェレドキシン(bphA3)とフェレドキシン還元酵素(bphA4)の4つのサブユニットから構成されていた。一方、トルエン資化性菌の*Pseudomonas putida* Fl株のトルエンジオキシゲナーゼは、todC1, todC2, todB, todAから構成されていた。この両酵素のサブユニット遺伝子を相互に置換して種々のハイブリッドを構築した。この遺伝子を大腸菌及びKF707株の染色体に導入した。組換えKF707株は10ppmのTCEを6時間で完全分解できた。遺伝子のハイブリッド化は、新たな形質の発現に有効であることを明らかにした。

## 4) PCE分解菌の分離

PCE脱クロル化菌*Desulfitobacterium* sp. Y51を分離した。本菌から2種類のPCEデハロゲナーゼを精製し、酵素的性質を明らかにした。酵素I及びIIはそれぞれ、分子量60kDa及び55.4kDaであり、本菌とM株との共存によりPCEの完全分解が可能であることが判明した。

## 5) PCB分解菌の分子育種

PCB分解力の異なる二つの菌株、*P. pseudoalcaligenes* KF707株と*Burkholderia cepacia* LB400株に注目してPCB分解特性を詳細に検討した。KF707株とLB400株のbph遺伝子群の並びおよび塩基配列はきわめて類似していた。PCBの分解に関与する両株のビフェニルジオキシゲナーゼのサブユニット遺伝子をシャフリングしキメラ構造を構築したところ分解能の著しい増大が確認された。

## 6) 水銀化合物分解菌の分離・同定

水俣湾から分離したグラム陰性の水銀耐性菌104株のうち43株がメチル水銀の分解能を示した。これらの細菌は1mg/lのメチル水銀を分解し揮発除去する能力を有していた。微生物による有機水銀及び無機水銀の除去が可能であることが明らかとなった。また分解酵素の精製にも成功した。

## (2) 土壌中における微生物の挙動解析

### 1) M株の検出法の開発

TCEを好氣的に分解するメタン酸化菌 M株を環境浄化へ適用するためには、環境中での挙動を迅速に定量する必要がある。そこで M株の TCE 分解のキーエンザイムである MMO 遺伝子の一部を PCR で増幅することによる M株の検出を試みた。その結果、M株のみに特異性を有する最適プライマーの組み合わせを見いだした。検出感度を高めるための前処理、プライマー濃度、緩衝液組成、温度条件等について検討した結果、反応液当たり 1～5細胞までの検出が可能となった。M株を接種した土壌・地下水カラムの流出水試料中の M株を、従来の培養法及び今回開発した PCR 法で計数した結果、従来では、計数に 1ヶ月を要したものが、本法を用いることにより数時間で計数が可能となった。

### 2) 塩化第 2 水銀還元菌 *Pseudomonas putida* の検出法の開発

塩化第 2 水銀還元菌 *P.putida* PpY101/pSR134 の水銀耐性遺伝子 (mer オペロン) の一部を標的 DNA とし、菌体からの DNA の抽出を行わない直接 PCR 法で検出・定量する手法の検討を行った。最適検出条件の検討を行った結果、反応チューブ (50 $\mu$ l) 当たり 1～5細胞までの検出が可能となった。

### 3) 土壌中における微生物の生残性

土壌に添加した浄化微生物の生残、増殖に及ぼす土壌の性状および環境要因の影響を明らかにするため、*P.putida* の土壌中での生残性に及ぼす因子について検討した。微生物の生残・増殖には、土壌 pH、水分及び有機物含量が大きく影響することが判明した。

## (3) 微生物センサー機能を活用する有害物質のモニタリング手法の開発

バイオレメディエーションによる有害代謝生産物の生成の有無を明らかにするため、運動性を有する細菌のセンサー機能に着目し、迅速高感度毒性試験法の開発を試み、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein, GFP) により蛍光ラベルした *P.aeruginosa* を用いる化学物質に対する細菌の行動的応答を簡便に計測できる蛍光プレートリーダー法を開発した。本法は、TCE 及び TCE 分解生産物であるクロラール、トリクロロエタノール、トリクロロ酢酸等の毒性を短時間で測定できた。また開発した蛍光プレートリーダー法は 23 試料と多数の試料の有害性を同時に試験することができること、1ml の少量で有害性試験ができること、測定が自動化できること等の特徴を有し優れた有害性試験であると考えられた。

また *P.aeruginosa* のゲノム情報を基に遺伝学的解析を進め、アミノ酸、リン酸、O<sub>2</sub> のセンサー遺伝子の同定に成功した。*P.aeruginosa* の走行性遺伝子 cheR の変異株は TCE、クロロフォルム、2,4-D に対して応答しなくなったことから、これらの物質の感知は走化性トランスデューサーにより行われていることが示唆された。

#### (4) 分子生態学的手法を用いる生態系影響評価システムの開発

バイオレメディエーション技術の土壌生態系への影響を評価するため、微生物生態系に着目し、生態系の保全に関する微生物のポピュレーションダイナミクスによる生態系影響評価手法を開発した。メタン酸化細菌を対象とした場合、48 穴のマイクロプレートを用いる繰り返し 2 倍希釈法による土壌中の優先種を解析した。分離したメタン酸化細菌の優先種について 16SrRNA 遺伝子、及び膜結合型と可溶性メタンモノオキシゲナーゼの *pmoA*、*mmoX*、*mmoB* 遺伝子に特異的なプライマーで PCR 及び PCR 産物の DGGE 分析を行い、土壌中におけるメタン酸化細菌に関する優先種の生態的特性を把握することが可能となった。

また、培養法による各種の土壌微生物の計数法について、より簡便で再現性のある方法を開発した。好気性一般従属栄養細菌、大腸菌群、蛋白質分解細菌、糸状菌、放線菌、フェノール酸化性菌、メタノール酸化性細菌、亜硝酸酸化細菌、アンモニア酸化細菌、メタン酸化細菌の計数法を改良した。これらの方法を用いて TCE 汚染の土壌微生物数に与える影響評価を行った。好気性一般従属栄養細菌、蛋白質分解細菌、放線菌は TCE に対し影響を受けにくく、糸状菌、フェノール酸化性菌、メタノール酸化性菌、亜硝酸酸化細菌、アンモニア酸化細菌はより影響を受けやすい性質を有していた。さらに、M 株を土壌・地下水環境中に導入する際の環境影響評価を行い、 $10^7$  cells/ml の濃度では土壌・地下水生態系に及ぼす影響はほとんどないものと考えられた。

#### (5) 大型土壌・地下水シュミレータによるバイオレメディエーション技術の適応性の評価

##### 1) 不飽和土壌を対象とした M 株の浄化効果試験

TCE 汚染不飽和土壌の浄化方法として、M 株を汚染土壌中に直接注入して混練する手法をライシメータを用いて評価した。即ち、ローム土壌約 200L と水約 40L を、バックホー、ショベルおよびハンドミキサーを用いて土壌の塊が消えるまで良く混練し、更に TCE 飽和水約 0.5L を添加して素早く混合後、最後に M 株培養菌体濃縮液を乾燥重量あたり約 2.3g 分添加して素早く混練した。以上の混練作業を二回繰り返し、ライシメータ ( $0.6\text{m} \times 1.2\text{m} \times 0.6\text{m} = 0.4\text{m}^3$ ) に土壌の充填を行い、上部にはステンレス製のふたを載せ、空気の流通を最小限とし TCE の減少を調べた。なお、ブランク試験として M 株の代わりに等量の水を添加した系を作成し、対照試験系とした。ライシメータの中央部および周辺部の 2 点より採取した土壌を分析した結果、M 株を添加しない対照試験では試験期間中 TCE 濃度はほぼ一定に保たれた。これに対し、M 株を添加した試験区では急激な TCE の減少が認められ、25 時間後には検出限界以下のレベルに達し、M 株の有効性が確認された。

##### 2) 砂質土壌を用いた M 株の浄化効果試験

縦、横、高さ、 $1\text{m} \times 2\text{m} \times 1.5\text{m}$  からなるステンレス製の大型ライシメータを作成した。本ライシメータは、縦 1m の中央に壁があり、2 室に分かれている。これらに、川砂及び地下水を充填し、TCE 及び M 株の挙動さらに M 株の浄化効果について検討した。TCE の

挙動については、30cm/day の速度で通水し、TCE 濃度の変化を調べた。TCE は、30cm ごとの移動で 74～94%の減少が観察され、かなり土壌中に残留することが確認された。M 株は 30cm ごとの移動で、細胞数が 57～90%に減少した。1ml の川砂土壌は  $3.2 \times 10^6$  cells の M 株を吸着することが明らかとなった。ついで土壌・地下水を TCE 0.2mg/l で汚染した後、M 株を  $5 \times 10^7$  細胞/ml になるよう添加し、流速 0.063m/h の速度で地下水を循環したところ、12 時間後には、検出限界の 0.003mg/l 以下となった。またメタン、酸素、窒素、リンを含んだ地下水を通水することにより、地下水・土壌中で M 株は生存し続けることが確認された。1g の M 株は 0.1g の TCE を分解でき、TCE 汚染土壌・地下水の浄化に有効であることが判明した。

### 3) M 株の環境影響評価

M 株について、人への安全性に関する経口、経気道、経皮、静脈内、皮膚への毒性試験ならびに生態系影響に関する魚、ミジンコ、藻類、土壌生態系への影響を調べ、環境への影響はほとんどないものと考えられた。

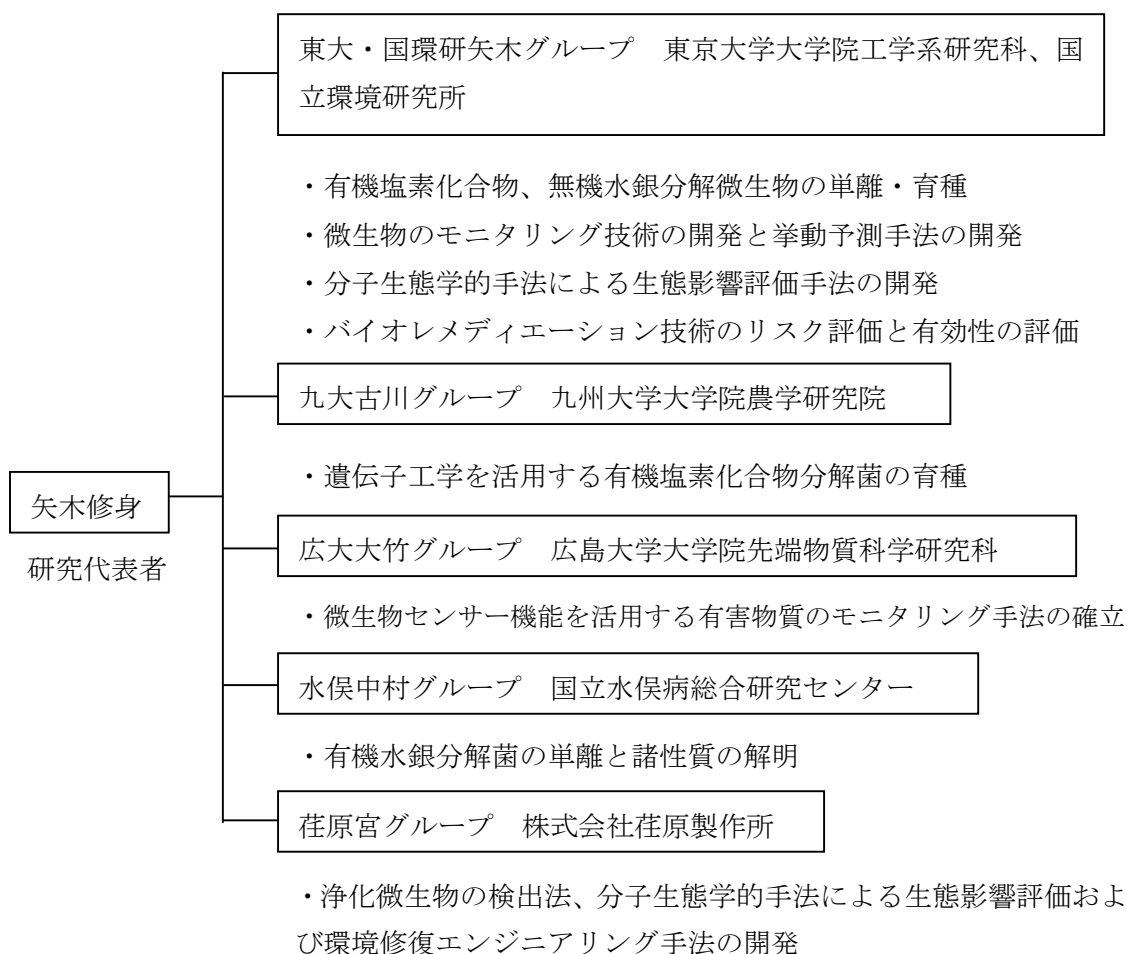
5 年間の研究において、M 株を用いて環境適用する際に必要なほとんどの基礎データを入手することができた。

## 2. 研究構想

世界各地でトリクロロエチレン (TCE)、テトラクロロエチレン (PCE) および PCB 等の有機塩素化合物や水銀、6 価クロム等の重金属による土壌・地下水汚染が顕在化し大きな問題となっている。我が国においても多くの場所で汚染が見い出されている。現在、汚染対策として、地下水の揚水・ばっ気や土壌ガスの真空抽出技術が用いられているが、有害物質を分解し無害化する技術でないこと、また低濃度の汚染の場合浄化効果が低いことから、より安価な技術の開発が求められている。また重金属の汚染対策として焼却や封じ込め処理が行われているが、多大なエネルギーを必要とすること、また重金属は無害化が困難なことから、資源としてリサイクルする技術の開発が求められている。このような背景から、より安価でかつ無害化処理技術である微生物を活用して汚染環境を修復するバイオレメディエーション技術の開発が期待されている。

バイオレメディエーション技術は、諸外国ではすでに油汚染の浄化対策として広く活用されている。油汚染の場合は、土壌に窒素、リン、空気を導入し、自然の浄化力を活性化する方法でバイオスティミュレーション (Biostimulation) 技術が採用されており、有効な技術として評価されている。しかしながら、有機塩素化合物や重金属の汚染には自然の浄化力では対応できず、浄化力の高い外来の微生物を導入するバイオオーグメンテーション (Bioaugmentation) 技術を採用する必要がある。しかしながらバイオオーグメンテーション技術は新技術であるため、実用化に際して重要なポイントとなる、技術の有効性と安全性に関する基盤研究がほとんどなされていない。本研究では、有機塩素化合物や重金属の中で問題となっているトリクロロエチレンや水銀等で汚染した土壌・地下水の修復をケーススタディとして取り上げ、バイオレメディエーション技術の実用化に際しブレークスルーすべき以下の 5 課題に関する基盤研究を行う。

### 3. 研究実施体制



### 4. ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 12 年 2 月 1 - 2 日	Tsukuba International Aquatic Environment Forum 2000	つくば国際会議場	200 人	
平成 12 年 7 月 9 - 13 日	Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology	京都国際会議場	500 人	
平成 13 年 9 月 11 - 12 日	International Symposium on New Aspects of Environmental Biotechnology to Clean Up Contaminated Soil and Groundwater	東京大学(山上会館)	150 人	



## 5. 主な研究成果

### (1) 論文発表

#### 東大・国環研矢木グループ

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
I. R. McDonald, H. Uchiyama, S. Kambe, O. Yagi, J. C. Murrell	The soluble methane monoxygenase gene cluster of the trichloroethylene- degrading, methanotroph <i>Methylocystis</i> sp. strain M	Appl. Environ. Microbiol.	63	1898-19 04	1997
T. Kurabayashi, K. Iwasaki, H. Uchiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, O. Yagi	Characteristics of <i>Escherichia</i> <i>coli</i> HB101 and <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> PpY101 harboring a recombinant plasmid with tandem insertion of the mercury resistance operon	Biosci. Biotechnol. Biochem.	61	1187-11 89	1997
H. Nishihara, H. Miwa, M. Watanabe, M. Nagashima, O. Yagi, Y. Takamura	Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of <i>Microcystis</i> cyanobacteria	Biosci. Biotechnol. Biochem.	61	1067-10 72	1997
O. Yagi, K. Iwasaki, A. Hashimoto	Bioremediation of polychlorinated compounds	Biotechnology for Water Use and Conservation		239-245	1997
H. Uchiyama, C. Kato, E. Kokufuta, O. Yagi	Quantitative colorimetric determination of trichloroethylene degradation activity and implications for environmental use	Environ. Technol.	18	1123-11 31	1997
O. Yagi, M. Nishimura	Environmental biotechnology, the Japan perspective	Biotechnology in the Sustainable Environment, Plenum Press		201-207	1997
H. Tanaka, T. Shinji, K. Sawada, Y. Monji, S. Seto, M. Yajima, O. Yagi	Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria	Water Research	31	1913-19 18	1997
矢木修身	米国におけるバイオレメデ ィエーションの現状	バイオサイエンスとインダ ストリー	55	30-33	1997
藤田正憲、矢木修身	「バイオレメディエーショ ンエンジニアリング-設計と 応用-」	(NTS 出版)		pp. 505	1997

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
O. Yagi, H. Uchiyama, K. Iwasaki	Bioremediation of soil and groundwater contaminated with volatile chlorinated compounds by a methane-utilizing bacterium	Bioremediation Technologies, Technomic Pub.	3	141-154	1998
Y. Okubo, O. Yagi	Current status of soil pollution and bioremediation in Japan	Bioremediation Technologies, Technomic Pub.	3	115-140	1998
Y. Shinohara, H. Uchiyama, O. Yagi, I. Kusakabe	Purification and characterization of component B of a soluble methane monooxygenase from <i>Methylocystis</i> sp. M	J. Ferment. Bioeng.	85	37-42	1998
矢木修身、岩崎一弘、内山裕夫、中村邦彦、田中秀夫	微生物を活用する水銀汚染土壌の浄化技術の開発	重点領域研究「人間地球系」研究報告書 BO14-E22		188-195	1998
富沢広喜、矢木修身	揮発性有機塩素化合物の水飽和土壌中における分解	雨水技術資料	28	13-19	1998
矢木修身、岩崎一弘	揮発性有機塩素化合物分解微生物	日本微生物生態学会誌	13	165-170	1998
O. Yagi, A. Hashimoto, K. Iwasaki, M. Nakajima	Aerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane by <i>Mycobacterium</i> spp. isolated from soil	Appl. Environ. Microbiol.	65	4693-4696	1999
S. Saeki, S. Mukai, K. Iwasaki, O. Yagi	Production of trichloroacetic acid, trichloroethanol and dichloroacetic acid from trichloroethylene degradation by <i>Methylocystis</i> sp. strain M	Biocatalysis and Biotransformation	17	347-357	1999
T. Ohashi, S. Imano, K. Iwasaki, O. Yagi	Biodegradation of spilled oil of Nakhodka accident in Japan, 1997	In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds, Battelle Press		233-238	1999
K. Kubota, M. Hashimoto, H. Gohda, K. Iwasaki, O. Yagi	Degradation of trichloroethylene in soil columns by <i>Methylocystis</i> sp. M	Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, Battelle Press		101-106	1999
S. Imano, T. Ohashi, K. Iwasaki, O. Yagi	Biodegradation of trichloroethylene by a propane-utilizing bacterium <i>Mycobacterium</i> sp. TCE28	Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, Battelle Press		95-100	1999

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
A. Hashimoto, K. Iwasaki, N. Nakasugi, O. Yagi	Degradation of trichloroethylene by <i>Mycobacterium</i> sp. TA27	Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, Battelle Press		89-94	1999
矢木修身、岩崎一弘	トリクロロエチレン汚染土壌のバイオ浄化	「おもしろい環境浄化のはなし」(日刊工業新聞社)		89-110	1999
矢木修身	有害有機物による土壌汚染とバイオリメディエーション 2-トリクロロエチレン汚染とリメディエーション技術	日本土壌肥科学雑誌	70	581-587	1999
矢木修身、岩崎一弘	バイオレメディエーション技術の現状と今後の課題	環境科学会誌	12	413-420	1999
矢木修身	土壌汚染の生物的修復	バイオサイエンスとインダストリー	57	234-238	1999
S. Okino, K. Iwasaki, O. Yagi, H. Tanaka	Development of a biological mercury removal-recovery system	Biotechnol. Lett.	22	783-788	2000
K. Iwasaki, O. Yagi, Y. Ishibashi, H. Seto	Survival and effect of genetically engineered pseudomonads in the soil environment	Environ. Sci.	13	483-489	2000
A. Hashimoto, K. Iwasaki, N. Nakasugi, M. Nakajima, O. Yagi	Degradation of trichloroethylene and related compounds by <i>Mycobacterium</i> spp. isolated from soil	Clean Products and Processes	2	167-173	2000
矢木修身	微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究	用水と廃水	42	340-345	2000
A. Hashimoto, K. Iwasaki, M. Nakajima, O. Yagi	Quantitative detection of trichloroethylene-degrading <i>Mycobacterium</i> sp. TA27 with a real-time PCR product detection system	Microb. Environ.	16	109-116	2001
K. Iwasaki, M. Nishizawa, H. Tanaka, O. Yagi	Isolation of a mercury-volatilizing bacterium and characteristics of its mercury removal	Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology		384-387	2001
K. Iwasaki, A. Hashimoto, O. Yagi, F. Keino, T. Hirata	Electroporation of trichloroethylene-degrading bacterium <i>Mycobacterium</i> sp. TA27	Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology		180-183	2001

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
S. Okino, K. Iwasaki, O. Yagi, H. Tanaka	Removal of mercuric chloride by immobilized cells of genetically engineered mercury-volatilizing bacteria	Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology		408-411	2001
T. Kikuchi, K. Iwasaki, O. Yagi, Y. Takamura, A. Ito, M. Nakajima	Determination of mRNA of methane monooxygenase in <i>Methylocystis</i> sp. M	Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology		214-217	2001
A. Hashimoto, K. Iwasaki, O. Yagi	Quantitative measurement of trichloroethylene-degrading <i>Mycobacterium</i> sp. TA27 using real time PCR product detection system	Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology		168-171	2001
K. Kubota, M. Hashimoto, H. Gohda, K. Iwasaki, O. Yagi	Behavior of <i>Methylocystis</i> sp. strain M in soil column	Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology		164-167	2001
岩崎一弘、橋本顯子	バイオオーグメンテーションに向けた環境浄化微生物の開発	月刊エコインダストリー	6(9)	5-15	2001
T. Kikuchi, K. Iwasaki, H. Nishihara, Y. Takamura, O. Yagi	Quantitative and specific detection of a trichloroethylene-degrading methanotroph, <i>Methylocystis</i> sp. strain M, by a most probable number-polymerase chain reaction method	Biosci. Biotechnol. Biochem.	65	2673-2681	2001
A. Hashimoto, K. Iwasaki, N. Nakasugi, M. Nakajima, O. Yagi	Degradation pathways of trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane by <i>Mycobacterium</i> sp. TA27	Biosci. Biotechnol. Biochem.	66	385-390	2002
S. Okino, K. Iwasaki, O. Yagi, H. Tanaka	Removal of mercuric chloride by genetically engineered mercury-volatilizing bacterium <i>Pseudomonas putida</i> PpY101/pSR134	Environ. Contamin. Toxicol.			印刷中

九大古川グループ

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
N. Kimura, A. Nishi, M. Goto, K. Furukawa	Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally	J. Bacteriol.	179	3936-3943	1997
古川謙介	芳香環ジオキシゲナーゼの機能改変と環境汚染物質分解への利用	ケミカル・エンジニアリング	42	360-366	1997
古川謙介	シュードモナス菌研究の最近の話題	日本農芸化学会誌	71	893	1997
古川謙介	環境汚染物質を効率よく分解するハイブリッドシュードモナス菌	日本農芸化学会誌	71	910-913	1997
M.-G. Min, Z. Kawabata, N. Ishii, R. Takata, K. Furukawa	Fate of a PCBs degrading recombinant <i>Pseudomonas putida</i> AC30 (pMFB2) and its effect on the densities of microbes in marine microcosms contaminated with PCBs	Intern. J. Envir. Studies.	55	271-285	1998
Z. Kawabata, M. -G. Min, N. Ishii, R. Takata, K. Furukawa	Factors affecting the survival of <i>Pseudomonas putida</i> bearing PCBs-degrading recombinant plasmid in marine microcosms contaminated with PCBs	Intern. J. Envir. Studies.	54	223-232	1998
T. Kumamaru, H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe, K. Furukawa	Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase	Nat. Biotechnol.	16	663-666	1998
K. Furukawa, A. Nishi, T. Watanabe, A. Suyama, N. Kimura	Engineering microorganisms capable of efficient degradation of chlorinated environmental pollutants	Rev. Toxicol.	2	179-187	1998
古川謙介	環境汚染物質分解微生物の育種	ケミカル・エンジニアリング		666-672	1998
徳永隆司、花嶋正孝、松藤康司、世良暢之、永淵義孝、北森成治、古川謙介	テトラクロロエチレン汚染土壌の生物処理実験	廃棄物学会論文誌	9	198-207	1998

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
K. Furukawa, J. Hirose, N. Kimura, A. Suyama	Development of bacterial strains for the efficient degradation of chlorinated environmental pollutants	Environmental Biotechnology Book Series, Kluwer Academic Publication			印刷中
K. Furukawa	Natural gene diversity and DNA shuffling	Evolution and Rational Redesign, Marcel Dekker Inc.			印刷中
M. Tsuda, H. -M. Tan, A. Nishi, K. Furukawa	Mobile catabolic genes in bacteria	J. Biosci. Bioeng.	87	401-410	1999
H. Suenaga, A. Nishi, T. Watanabe, M. Sakai, K. Furukawa	Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls	J. Biosci. Bioeng.	87	430-435	1999
古川謙介	PCBの処理	「おもしろい環境浄化のはなし」(日刊工業新聞社)		111-126	1999
古川謙介、陶山明子、李泰鎬	微生物による有機塩素化合物の分解	環境科学会誌	12	449-461	1999
K. Furukawa	Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants	Curr. Opin. Biotechnol.	11	244-249	2000
T. Watanabe, R. Inoue, N. Kimura, K. Furukawa	Versatile transcription of biphenyl catabolic <i>bph</i> operon in <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	J. Biol. Chem	275	31016-3 1023	2000
A. Nishi, K. Tominaga, K. Furukawa	A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in <i>Pseudomonas putida</i> KF715	J. Bacteriol.	182	1949-19 55	2000
古川謙介、陶山明子	難分解性有機ハロゲン化合物の微生物分解 PCB、ダイオキシンなどをいかに分解するか	化学と生物	38	390-397	2000
末永光、古川謙介	微生物によるPCBの分解	ファインケミカル	29	5-16	2000
A. Suyama, R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera, K. Furukawa	Isolation and characterization of <i>Desulfitobacterium</i> sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes	Biosci. Biotechnol. Biochem.	65	1474-14 81	2001

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
T. Maeda, Y. Takahashi, H. Suenaga, A. Suyama, M. Goto, K. Furukawa	Functional analyses of Bph-Tod hybrid dioxygenase, which exhibits high degradation activity toward trichloroethylene	J. Biol. Chem.	276	29833-2 9838	2001
H. Suenaga, M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, K. Furukawa	Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzene	J. Bacteriol.	183	5441-54 44	2001
西哲人、古川謙介	ビフェニル／サリチル酸代謝遺伝子群をコードする自己可動化因子 <i>bph-sal</i> エレメント	遺伝情報のダイナミズムとその分子機構		39-50	2001
金原和秀、古川謙介 古川謙介 古川謙介	微生物によるPCBの分解 芳香族炭化水素の分解 PCB	(リアライズ社) 農芸化学事典 「微生物利用の大展開」 (NTS出版)		51-60	2001 印刷中 印刷中
K. Furukawa, H. Suenaga, A. Nishi, T. Watanabe, M. Goto	Engineering biphenyl dioxygenases to acquire wide degradation capabilities of polychlorinated biphenyls (PCB) and aromatic hydrocarbons	Microbial Diversity in Asia, Technology and Prospects		159-176	2001
H. Suenaga, M. Goto, K. Furukawa	Emergence of multifunctional oxygenase activities by random priming recombination	J. Biol. Chem.	276	22500-2 2506	2001
K. Iohara, R. Iiyama, K. Nakamura, S. Silver, M. Sakai, M. Takeshita, K. Furukawa	The mer operon of a mercury-resistant <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> strain isolated from Minamata Bay, Japan	Appl. Microbiol. Biotechnol.	56	736-741	2001
T. Lee, T. Tokunaga, K. Furukawa	Efficient dechlorination of tetrachloroethylene in soil slurry by combined use of an anaerobic <i>Desulfitobacterium</i> sp. strain Y51 and iron powder	J. Biosci. Bioeng.			印刷中

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
K. Shindo, Y. Ohnishi, H.-K. Chun, H. Takahashi, M. Hayashi, A. Saito, K. Iguchi, K. Furukawa, S. Harayama, S. Horinouchi, N. Misawa	Oxygenation reactions of various three fused aromatic compounds using <i>Escherichia coli</i> and <i>Streptomyces lividans</i> transformants carrying several arene dioxygenase genes	Biosci. Biotechnol. Biochem.			印刷中
K. Furukawa	Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCB)	J. Gen. Appl. Microbiol.			印刷中

### 広大大竹グループ

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
K. Kusaka, K. Shibata, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake	Isolation and characterization of <i>Enterobacter cloacae</i> mutants which are defective in chemotaxis toward inorganic phosphate	J. Bacteriol.	179	6192-6195	1997
K. Taguchi, H. Fukutomi, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake	Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microbiology	143	3223-3229	1997
加藤純一、黒田章夫、大竹久夫	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> の走化性トランスデューサーとトランスデューサー様蛋白質ファミリー	日本農芸化学会誌	71	902-905	1997
H. Ohtake, J. Kato, A. Kuroda, H. Wu, T. Ikeda	Regulation of bacterial phosphate taxis and polyphosphate accumulation in response to phosphate starvation stress	J. Biosci.	23	491-499	1998
加藤純一、黒田章夫、大竹久夫	微生物分子育種と環境バイオテクノロジー	日本微生物生態学会誌	13	95-99	1998
J. Kato, T. Nakamura, A. Kuroda, H. Ohtake	Cloning and characterization of chemotaxis genes in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biosci. Biotechnol. Biochem.	63	155-161	1999



著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
H. Wu, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake	Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	J. Bacteriol.	182	3400-34 04	2000
J. Kato, C. Nagata, L. Yang, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake	Isolation and chracterization of the <i>Enterobacter cloacae cheR</i> mutant defective in phosphate taxis	Biosci. Biotechnol. Biochem.			印刷中

### 水俣中村グループ

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
K. Nakamura, I. Naruse, Y. Takizawa	A new mass screening method for methylmercury poisoning using mercury-volatilizing bacteria from Minamata Bay	Ecotoxicol. Envriion. Safety	44	100-104	1999
K. Nakamura, M. Hagimine, M. Sakai, K. Furukawa	Removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria	Biodegradation	10	443-447	1999
K. Nakamura, J. Aoki, K. Morishita, M. Yamamoto	Mercury volatilization by the most mercury-resistant bacteria from the seawater of Minamata Bay in various physiological conditions	Clean Products and Processes	2	174-178	2000
K. Nakamura, M. Iwahara, K. Furukawa	Screening of organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediments and seawater of Minamata Bay in Japan	Clean Products and Processes	3	104-107	2001

### 荏原宮グループ

著者	論文名	掲載誌	巻	ページ	発行年
T. Shimomura, F. Suda, H. Uchiyama, O. Yagi	Biodegradation of trichloroethylene by <i>Methylocystis</i> sp. strain M immobilized in gel beads in a fluidized-bed bioreactor	Water Res.	31	2383-23 86	1997

(2) 特許出願

1. 発明の名称：水銀汚染物の浄化法

発明者：岩崎一弘、矢木修身、内山裕夫（国立環境研究所）、田中秀夫（筑波大学）

出願番号：特願平 9-302007

公開番号：特開平 11-128904

特許番号：3227488

出願日：平成 9 年 11 月 4 日

概要：水銀汚染物を、水銀化合物還元酵素遺伝子群を導入した組換え微生物により浄化する方法であって、前記組換え微生物が *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134 であり、かつその系中にチオール化合物を共存させることを特徴とする水銀汚染物の浄化法。

2. 発明の名称：PCB および関連化合物を分解する酵素をコードする遺伝子

発明者：古川謙介、熊丸哲也（九州大学）

出願番号：特願平 10-297665

出願日：平成 10 年 8 月 27 日

概要：異種の PCB 分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子を DNA シャフリングにより組み換えることによって得られ、PCB および関連化合物を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしていることを特徴とするキメラ遺伝子。

3. 発明の名称：運動性を有する微生物を用いる有害物質の検出方法

発明者：大竹久夫（広島大学）

出願番号：特願平 11-354381

出願日：平成 11 年 12 月 14 日

概要：多くの細菌は、鞭毛モーターを回転運動させ水中を泳ぐ。鞭毛モーターの回転運動は、有害物質により極めて鋭敏かつ迅速に阻害され、その結果細菌の運動が停止する。有害物質により細菌が運動を停止する程度を蛍光測定により簡便に計測する手法を考案することにより、運動性細菌を用いて化学物質の毒性を迅速に試験する方法を発明した。

4. 発明の名称：新規なテトラクロロエチレン脱塩素化酵素遺伝子

発明者：古川謙介、陶山明子（九州大学）

出願番号：特願 2000-085825

出願日：平成 12 年 3 月 27 日

概要：テトラクロロエチレン（PCE）汚染土壌より分離した *Desulfitobacterium* 属 Y51 株は PCE を  $0.6 \mu\text{M}$  の低濃度から  $960 \mu\text{M}$  の高濃度にわたって *cis*-1,2-ジクロロエチレンへと完全に脱塩素化する。Y51 株から PCE 脱塩素化酵素を精製し、PCE 脱塩素化酵素遺伝子をク

ローニングし、塩基配列を決定した。本遺伝子は *Desulfitobacterium* 属からはじめて単離された脱塩素化酵素遺伝子であり、広範な濃度の PCE の迅速な脱塩素化を示す遺伝子である。

5. 発明の名称：微生物による有機塩素化合物汚染環境の浄化方法

発明者：矢木修身、岩崎一弘（国立環境研究所）、橋本顯子（科学技術振興事業団）

出願番号：特願 2000-115688

出願日：平成 12 年 4 月 17 日

概要：*Mycobacterium gilvum* AK 株または *Mycobacterium duvalii* OS 株を有機塩素化合物による汚染土壌または汚染水に散布することを特徴とする浄化手法。

6. 発明の名称：水銀汚染物の浄化法とそれに用いる微生物

発明者：中村邦彦（国立水俣病総合研究センター）

出願番号：特願 2001-295761

出願日：平成 13 年 9 月 27 日

概要：メチル水銀や2価の水銀イオンなどの水銀化合物に汚染した土壌に水銀化合物を水銀蒸気に変換できる海洋細菌を加え、土壌中の水銀化合物は、細菌の酵素により水銀蒸気に変換され除去される技術。

(3) 受賞、新聞報道等

1. 1997 年 4 月 8 日 毎日新聞

バイオレメディエーション 環境汚染除去に期待

2. 2001 年 10 月 22 日 日本経済新聞

土壌水銀 微生物で蒸気に 国環研、浄化技術を開発