

シュードモナス属細菌TM15株による 2, 4, 6-トリニトロトルエンの生分解に関する研究

前田憲成*, 門上希和夫***, 尾川博昭*†

*九州工業大学大学院 生命体工学研究科生体機能専攻 〒808-0196 北九州市若松区ひびきの2-4

†corresponding author: ogawahi@life.kyutech.ac.jp

**北九州市環境科学研究所アควア研究センター 〒804-0082 北九州市戸畑区新池1-2-1

2004年 2月10日 受付 2004年 3月30日 受理

要 旨

筆者らは、2, 4, 6-トリニトロトルエン（以後TNTと略記）が特徴的に検出されている北九州市の山田緑地の土壌を対象に、TNT生分解微生物のスクリーニングを行い、TNTを変換するシュードモナス属細菌TM15株を分離・同定した。この菌株は、他の分離菌株と比較して高効率にTNTを生分解する。またTNTは、TM15株によって2つのモノアミノジニトロトルエン体（2-アミノ-4, 6-ジニトロトルエン、4-アミノ-2, 6-ジニトロトルエン）、安息香酸、カテコールへと変換されることが判明した。さらに、TNTの芳香環に由来する吸光度（230～280nm）を追跡した結果、シュードモナス属細菌TM15株は最終的には芳香環を開裂していると考えられる。この菌株の持つ生分解性によって、TNTの突然変異性は解毒されていることが、変異原性試験法の1つである発光umuテストによって示唆された。

1. はじめに

第二次世界大戦をはじめとする活発な軍事活動によって、2, 4, 6-トリニトロトルエン（以後TNTと略記）は20世紀に莫大な量が製造されてきた。火薬の原料として知られているTNTは、爆薬の中でも高い毒性を有する化学物質の一つであり、肝臓障害やメトヘモグロビン血症などを引き起こすことが報告されている^{1) 2) 3)}。さらに、分子レベルの研究において強い遺伝毒性と染色体異常性があることが明らかにされ、残留性で突然変異性を有するTNTの生態系に及ぼす影響は、欧米を中心に深刻な問題となっている^{1) 4)}。

一方、北九州市の山田緑地では、1995年に前肢過剰ヤマアカガエルが発見され、その奇形が子孫に遺伝することが明らかにされた⁵⁾。同地ではTNTが比較的高濃度で検出されており、突然変異性を有するTNTまたはその変換産物などが、ヤマアカガエルの遺伝子に影響を与えて過剰肢ガエルを発生させた可能性が考えられる。

筆者らはTNTの生分解を追求するため、山田緑地のTNT汚染土壌からTNT分解能を有する微生物のスクリーニングを行い、高効率にTNTを変換するシュードモナス属細菌TM15株を分離・同定した⁶⁾。本論文では、TM15株のTNT変換経路および芳香環開裂について、さらに発光umuテストによりこの菌株がTNTの突然変異性を解毒することについて速報する。

2. 実験方法

2.1 TNTの生分解能

炭素源および窒素源としてTNT（100mgL⁻¹）と酢酸（10mM）を含んだ最少合成（M8緩衝液）培地にシュードモナス属細菌TM15株を接種して30℃で反応させた。一定時間毎にサンプリングしたTNT反応溶液は、遠心分離（5,000×g, 10分間）により菌体を除去した。その上清（15ml）に240μlの1M水酸化ナトリウム溶液を添加し、生じる最大吸収波長447nmの吸光度を測定することによりTNTを分析した。一方、上清におけるTNTの芳香環を追跡するために、230～280nmにおける吸光度を測定した。

2.2 TNT変換産物の同定

培養したシュードモナス属細菌TM15株を遠心分離で集菌した後、M8緩衝液で2回洗浄した。その菌体を100mgL⁻¹のTNT溶液（600ml）に混合し、15℃または30℃で振とう培養した。各時間に100mlずつサンプリングを行い、菌体を遠心分離によって除去した後、上清に塩化ナトリウム（5%）を添加し、pHを調製（pH2.0とpH7.0）して100mlのジエチルエーテルで3回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムにより脱水後、ロータリーエバポレーターで濃縮してガスクロマトグラフィ-質量分析用（GC・MS）の試料とした。他方、濃縮液に等量のN, O-ビス[トリメチルシリル]アセトアミド（TMS化剤）を添加し、60℃で30分間誘導体化を行った試料を同様に分析した。GC・MS測定による

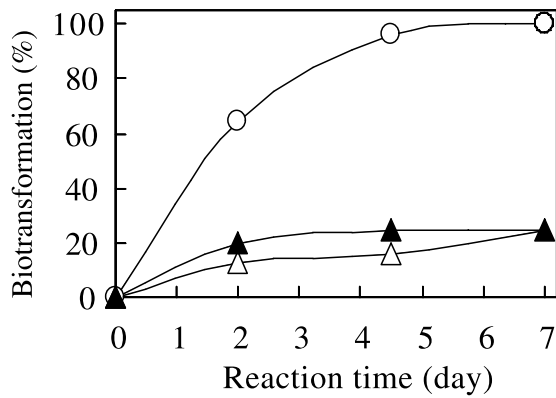


Fig. 1 Biotransformation of TNT by several isolating bacteria. The cells (about 10^6 cfum l^{-1}), *Pseudomonas* sp. strain TM15 (○) and non-identified bacteria (△,▲), were incubated with TNT (100mgL $^{-1}$) and acetate (10mM) at 30 °C.

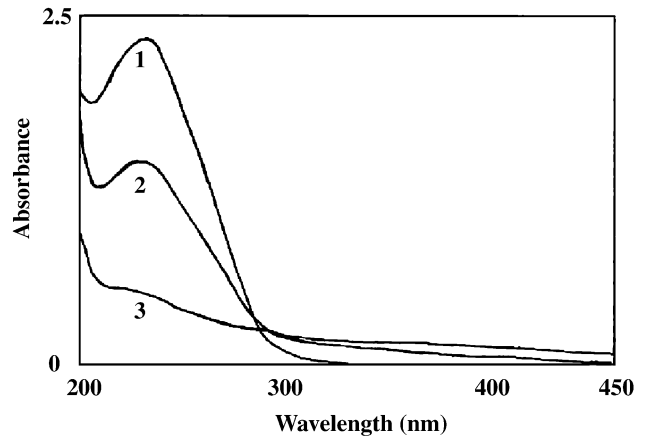


Fig. 2 Cleavage of TNT aromatic ring by *Pseudomonas* sp. strain TM15 (1: 0day, 2: 2day, 3: 7day). Aromatic ring from TNT was decreased along the development of time.

TNT変換産物は、試料と標準品の保持時間およびマススペクトルとの比較により同定した。

2.3 発光umuテスト

発光umuテストは、棚田らの方法⁷⁾を参考に行った。TM15株をTNT (100mgL $^{-1}$)と酢酸 (1mM)を含有した反応溶液に接種し、30°Cで反応を開始した。一定時間毎にサンプリングを行い、遠心分離によって菌体を除去した後、さらにメンブレンフィルター (0.45 μm)でろ過した液をumuテストの試料とした。96穴マイクロタイタープレートの1ウェルに各時間の試料 (1~200 μl)を加え、次にDNA損傷を受けるとSOS遺伝子の一つであるumuC遺伝子が発現し、発光する性質を持つ*Salmonella thphimurium* TL210株 (OD:0.4)を各ウェルに50 μlずつ接種した。30分から5時間まで反応させた各サンプルの発光量は、最大発光値を示す時間で1ウェル当たり1秒の積算値を測定し、4ウェルの平均値を求めた。

3. 結果および考察

3.1 TM15株のTNT生分解能

山田緑地のTNT汚染土壌から分離したシュードモナス属細菌TM15株は、16SリボソームRNA遺伝子の相同性解析およびAPI 20NEなどによる生化学的性状から、*Pseudomonas olevorans*の近縁に位置する菌株であった。この菌株はFig. 1に示すように、他の分離菌株と比較して高効率にTNTを変換することがわかった。さらに、TNTの芳香環を追跡したところ (Fig. 2)、TNTは最終的には芳香環を開裂していると考えられる。

3.2 TNT生分解経路の解明

TNTを生分解するシュードモナス属細菌TM15株のTNT変換経路を明らかにするため、GC・MSによりTNT変換産物の同定を行った。Fig. 3に示すように、TNTはTM15株によって、モノアミノジニトロトルエン体である2-アミノ-4,6-ジニトロトルエンおよび4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン、さらに安息香酸、カテコールへと変換されることが判

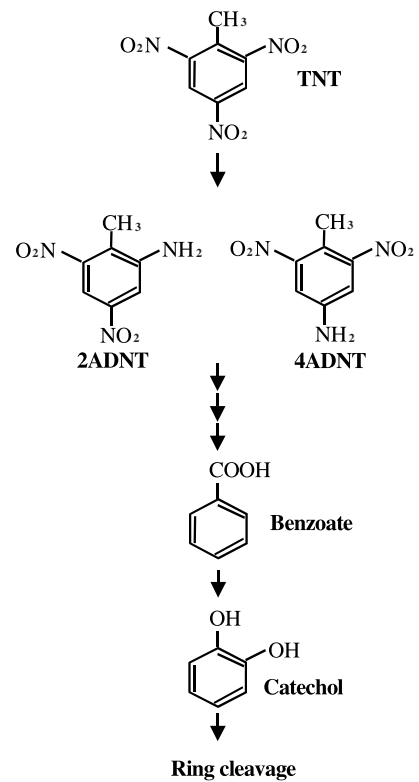


Fig. 3 Products resulting from TNT metabolism by *Pseudomonas* sp. strain TM15. Chemicals shown were identified by GC・MS analysis. 2ADNT and 4ADNT showed the compounds of 2-amino-4,6-dinitrotoluene and 4-amino-2,6-dinitrotoluene, respectively.

明した。一般的な芳香族化合物の生分解の知見から、カテコールはさらに開環していることが考えられるが、この見解はFig. 2の結果からも示唆される。

3.3 TNTの解毒

TM15株をTNT反応溶液に接種し、各時間にサンプリングした試料について発光umuテストを行った。その結果、TNTの突然変異性は、分解率と相関して経時変化とともに減少している (Fig. 4)。このTNTの解毒については、再

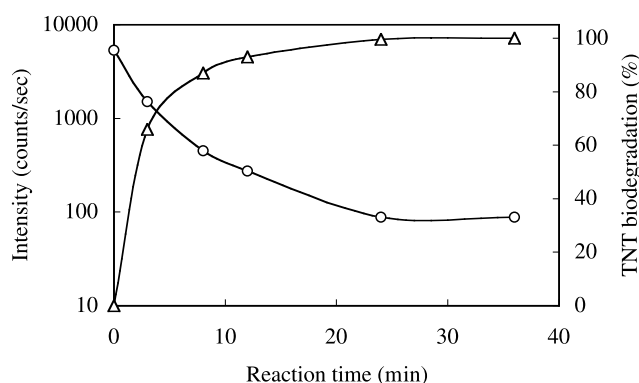


Fig. 4 The mutagenicity from TNT was decreased by *Pseudomonas* sp. strain TM15. The bioluminescent bacterium was mixed with each test sample harvested at the indicated time point (○), then the mixture was subjected to the bioluminescent assay. TNT biodegradation rate (△) was calculated from disappearance of TNT.

実験ならびに別のシステムによってさらに証明を行っている段階であるが、TM15株がTNTの突然変異性を消滅しているという非常に興味深い結果が得られた。

シュードモナス属細菌TM15株のTNTの生分解および解毒する能力は、TNT汚染土壤のみならずTNT廃棄処理過程にも適用できると考えられる。現在、TNTの処理は主に焼却であり、土壤汚染を例に挙げれば開削・運搬・焼却費用などが高価になることや、その焼却により温暖化ガスである二酸化炭素や窒素酸化物 (NO_x) の放出、さらに焼却灰は有害廃棄物として最終処理しなければならないという問題がある^{8) 9)}。それらの問題点に筆者らの研究が活用されることを期待している。

謝辞

本研究を行うに当たり、発光umuテストにおいてご協力をいただきました北九州市環境科学研究所の棚田京子氏、ならびにTNTを提供していただきました中国化薬(株)に深謝します。

文献

- 1) J. Hawari, S. Beaudet, A. Halasz, S. Thiboutot, and G. Ampleman, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 605 (2000).
- 2) W. Z. Whong, and G. S. Edwards, *Mutat. Res.*, 136, 209 (1984).
- 3) P. G. Rieger, V. Sinnwell, A. Preuss, W. Franke, and H. J. Knackmuss, *J. Bacteriol.*, 181, 1189 (1999).
- 4) E. Tan, C. H. Ho, W. H. Griest, and R. L. Tyndall, *J. Toxicol. EnvironHealth.* 36, 165 (1992).
- 5) 柏木昭彦, 「山田緑地管理委員会「カエル専門委員会」報告書」, pp.67-84 (2002), 北九州市.
- 6) 前田憲成, 梁明, 大住幸秀, 草野好司, 門上希和夫, 尾川博昭, *環境化学*, 13, 695 (2003).
- 7) 棚田京子, 後藤純雄, 門上希和夫, 平井正名, 今枝孝夫, 鈴木學, *環境化学*, 11, 841 (2001).
- 8) N. Hannink, S. J. Rosser, C. E. French, A. Basran, J. A. Murray, S. Nicklin, and N. C. Bruce, *Nat. Biotechnol.*, 19, 1168 (2001).
- 9) A. Esteve-Nunez, A. Caballero, and J. L. Ramos, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 335 (2001).

Study on biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain TM15

Toshinari Maeda*, Kiwao Kadokami***, and Hiroaki I. Ogawa*

We isolated and identified a pseudomonad strain named as *Pseudomonas* sp. strain TM15 from soils in Yamada Green Zone, Kitakyushu City where 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) specifically has been detected. This strain can efficiently biotransform TNT in comparison with other isolating bacteria. TNT was converted to two kinds of mono-amino-dinitrotoluene, 2-amino-4, 6-dinitrotoluene and 4-amino-2, 6-dinitrotoluene, further to benzoate and catechol. Based on the extinction of the absorbance derived from aromatic ring (260~280nm), this bacterium was finally expected to cleavage the ring of TNT. The results of umu test using the bioluminescent bacterium showed that the genotoxicity from TNT was eliminated by *Pseudomonas* sp. strain TM15.

*Department of Biological Functions and Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0196, JAPAN

**Aqua Research Center, Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences, 1-2-1 Shin-ike, Tobata-ku, Kitakyushu 804-0082, JAPAN