特集 バイオテクノロジーと水処理技術

水処理におけるニューバイオテクノロジー研究開発の現況

——遺伝子工学の水処理への応用——

Present aspects for the Research Developments of New Biotechnology
in Water and waste Treatment

橋 本 奨*

結 言

一昨年度から用廃水処理へのバイオテクノロジー活用
の気運が高まり、民間活力導入ということで、昨年度
から建設省では「バイオフォーカスWT計画」や通産
省では「アクアルネッサンス計画」という国レベル
の官産学の研究活動が始動されるようになり、今年は
2年目を迎え、誠に喜ばしいことである。

これまで、筆者橋本と藤田¹⁾は、「分子育種技術の
廃水処理への応用—遺伝子工学からの視点—」という
テーマで、水処理における研究開発の動向を紹介した
ことがある。ここでは、水処理におけるバイオテクノ
ロジー、特に遺伝子工学の活用について筆者の目にと
まったその後の研究開発の現況を紹介する。

1. バイオテクノロジーとは^{2, 3)}

バイオテクノロジーとは、用語そのものから、また
より広くとらえると、「生物工学」や“微生物工学”あ
るいは“生物や微生物の利用技術”のことで、生物や
微生物またはそれらの一部の機能を、図-1に示したよ
うに、制御あるいは利用することにより、われわれの

生活を豊かにし、また健康の維持増進をはかる技術で、
われわれのまわりの環境の生態系バランスを目標とせ
ねばならないことはいうまでもない。これまで下・排
水の処理では、都市や地域の環境、とくに水環境の生
態系バランスの維持、保全のため、古くから活性汚泥
法や生物膜汚床法、嫌気消化法、酸化池法等、多種多
様の生物（細菌、原生動物、後生動物等）の混合培養
系を用いて処理されてきたので、古い形のバイオテクノ
ロジー（生物工学）は、極めて効果的に活用されてきた
ということである。しかし、最近の微生物利用工業では、
図-2で示したように、遺伝子組み換え、細胞の融合や接合、
また酵素や微生物の固定化技術の応用が飛躍的に進展し、
その成果があまりにも華やかに宣伝されたため、現在の
技術が即ニューバイオテクノロジーとみられているもの
である。また、この技術の利用は、図示したように、遺
伝子の情報伝達に関する基礎研究から創造されたもので
あるから、ここで扱う生物種はすべて図-3のようにして、
特殊機能をもつ高性能変異株を分離してから、この単
一純粋微生物細胞を使用することになるので、下・排
水の生物処理におけるような食う食われるの複雑な食
物連鎖の生態系を構成する混合培養系とは、著しく趣

図-1 バイオテクノロジーと生態バランス

*大阪大学工学部環境工学科教授
Susumu HASHIMOTO

図-2 バイオテクノロジーの基本概念

図-3 高性能変異株の分離操作

を異にしているものである。従って、この新しいバイオテクノロジーは、これまで水処理分野へ活用されたことは全くなく、これの活用は遺伝子組み換えや細胞融合、接合等の分子育種技術を駆使して、水処理微生物の機能の改良により、処理機能を飛躍的に増大させようとする、これまでになかった画期的な試みなのである。

2. 水処理とニューバイオテクノロジー^{2, 3)}

現在の水処理技術は、稀薄な汚染水を安価、迅速、大量に処理しようとする条件を満足させるためには、将来共に微生物を主体として利用せねばならないということは誰しも異論のないところである。それというのも、微生物は、①単位生体当りの汚染物の分解或は摂取速度が大きい。②比増殖速度が著しく大きい。③自動触媒的に増殖する。④微生物は無限に存在する。等の他の生物に比べて有利な点が多いからである。

従って、遺伝子工学技術の水処理技術への応用とは主として有用微生物の育種ととらえることができる。ここで、育種の目的として、次のようなものがあげられる。

1. 微生物当りの酵素生産（分解速度）を増大させる。
2. 増殖速度を増大させる（悪環境下でも増殖する）。
3. 多機能性微生物を作る。
4. 毒物耐性微生物を作る。
5. 凝集・沈降性（分離性）をよくする。

等である。

即ち、従来の活性汚泥等の水処理微生物群が、個々に持っていた多くの機能を、一種類でできるだけ多くもった微生物を育種することを目的とする。

ここで、下水道や下・排水の生物処理に役立つ特殊な機能をもつ微生物として、①フロック形成細菌、②

生物膜付着促進細菌、③バイオポリマー生産菌、④難分解性物質分解菌、⑤硝化菌、⑥脱窒細菌、⑦リン蓄積細菌、⑧重金属リーチング細菌（重金属含有汚泥からの重金属溶出に働き、汚泥の有効利用に役立つ）、⑨重金属蓄積細菌、⑩悪臭分解細菌、⑪毒物分解細菌、⑫低pH、低温度、低酸素、低有機物濃度の各有機物分解細菌、⑬嫌気性有機物分解酸生成細菌、⑭メタン生成菌、⑮光合成細菌、⑯藻類や原生動物——等、種々の微生物を考えることができる。現に、難分解生物質であるフェノール分解菌やポリビニルアルコール分解菌等は、実用化されている。自然界には、PCBやBHC、DDT、ABSなどその他多くの難分解性といわれる物質を分解する細菌があり、すでにかなり以前からこれら一部の細菌は純粋分離され、下・排水の処理に活用しようとする研究が進められ、現に利用されている。これら微生物株は、極めて貴重な遺伝情報をもつ微生物資源で、ニューバイオテクノロジーを用いると、各種方面に活用でき、現在は微生物銀行もつくられている時代なのである。

3. 水処理生物とニューバイオテクノロジー^{2, 3)}

生態学の多様性原理によれば、生態系における種の多様性の価値はその系の安定性の増加にあり、系の環境適応の可能性はそこにいる生物種が多ければ多いほど、適応のポテンシャルは大きくなるといわれる。上水や下水、排水の生物処理では、その系は多種多様の生物種からなる自然生態系であるから、新しいバイオテクノロジーで用いる単一純粋系よりもその系の安定性は極めて高いものである。単一純粋系の特殊な機能を強力にもつ特定細菌を分離し、図-4のようにして育種し、上、下・排水や汚泥の処理に活用しようとする場合には、それが複雑な食物連鎖をもつ自然生態系に

図-4 下・排水・汚泥処理におけるバイオテクノロジーの活用

図-5 形質転換法による育種モデル

近い水処理生物の系の中でどのように機能するかは、現在のところ不明のことが極めて多い。従ってこの解明は、ニューバイオテクノロジーの水処理技術への活用のために極めて重要な研究課題になるはずである。

一般に、好気環境の好気生物処理では、有機物、細菌、原生動物の間の食う食われるの働きで、また、嫌気環境の嫌気生物処理では、拮抗や共生状態下の多くの細菌による有機物分解からの生成有機酸のガス化の働きで、それぞれ浄化処理が機能するもので、特に前者では、原生動物による細菌捕食が重要な鍵を担っているものである。従って、たとえ特殊の機能を強力にもつ細菌を分離して活性汚泥や嫌気消化汚泥等にこれを加えて活用、企図しても、この細菌の増殖速度と原生動物の増殖速度或は拮抗細菌等の増殖速度をうまく調和させない限り、うまく作動しないものである。一般に特殊機能をもつ細菌の増殖速度は極めて遅い。こ

の細菌の特殊機能を担うプラスミド(染色体外因子)遺伝子を、新しいバイオテクノロジーの遺伝子組み換え(図-5)と細胞融合(図-6)や接合(図-7)等の技術を用いて増殖速度の速い処理活用細菌の細胞内に入れ込んで、種々な特殊な機能をもつ細菌を育種して、生物処理系の中で原生動物或は拮抗細菌等の増殖速度とうまく調和させて浄化処理に活用することは、将来性と可能性のある課題である。また、特殊な機能をもつ細菌を原生動物の捕食や他の細菌や微生物の拮抗から守るために、この細菌を、新しいバイオテクノロジーの固定化技術(図-8、図-9)を用いて固定化材内に閉じ込め、これを生物処理系の中で特殊な機能を働かせることも十分可能なことである。

これまで微生物の固定化材として、ポリアクリルアミド、 κ -カラギーナン、アルギン酸カルシウム、光硬化性樹脂等が用いられ、微生物工業では、実用化されているが、水処

図-6 細胞融合法による育種モデル

注) 現在のところ、グラム陽性菌でのみ成功している。

図-7 接合法による育種モデル

理に使うには今のところあまりにも高価で、また、一部アクリルアミドのように微生物に障害を与えるものもあるので、安価で強固な、また微生物に対して毒性の少ない他の固定化材の検索が望まれる。筆者らは、PVA（ポリビニルアルコール）と硼酸を用いて、安価かつ強固で、毒性もほとんどなく、長期にわたって使用に耐えるPVA-硼酸法^{2, 3)}による固定化材を開発し、現在その実用化試験を行っている。

4. 水処理のための遺伝子工学研究開発の現況

これまで、Chakrabarty等の研究^{1, 4)}などで代表されるように、育種微生物の環境浄化または水処理への応用では、あくまで研究の本筋はもう少し基礎的な面にあり、それらの研究成果が水処理分野へ応用可能ではないかということで発展してきたといえる。従って作られた微生物は必ずしも現在の水処理技術にマッチしたものとは言えない。もちろん、このようにして得られた育種微生物に合わせた水処理技術が開発されるかも知れないが……。水処理技術にマッチした微生物とは、現在の所、①フロック形成能、②生物膜付着促進能、③広範囲pH、低温、低酸素、低有機物濃度などの悪環境耐性性能等の性質を有し、かつ難分解性物質分解能などの他の多くの機能を併せ持った微生物と言えるのではなかろうか。

以上の点を考慮すれば、微生物育種の受容菌としてフロック形成菌がクローズアップされる。これに、他の機能を持たせることができれば、理想的な水処理微生物へ一歩近づいたと言える。しかし、この方面での研究は極めて少なく、多胡ら⁵⁾の研究があるのみで

ある。この研究とは逆に、フロック形成の一要因になると考えられるアルギン酸（バイオポリマー）生産遺伝子を操作した例が報告されている⁶⁾。これを利用すれば、例えば難分解性物質分解菌にフロック形成能を持たせることも可能である。

難分解性物質分解菌の遺伝子またはプラスミドに関する研究は、近年その数を増してきた。3-クロロ安息香酸、4-クロロ安息香酸、3, 5-ジクロロ安息香酸、2, 4-ジクロロビフェニルなどの有機ハロゲン化合物の分解系プラスミドについては、外村、川崎⁷⁾が詳しく報告している。報告されたプラスミドの分子量は一般に大きく50 Mdal（メガダルトン）程度で、伝達性のあるものが多い。また焼却の可否で問題となっているポリ塩化ビフェニル（PCB）分解プラスミドも通産省微生物工業技術研究所により発見された。

一方、矢野らのグループ^{8, 9)}は、アルキルベンゼン類分解系プラスミドに関する一連の研究を通じ、メチルベンゼン（トルエン）及びエチルベンゼン分解プラスミドを見つけ、さらにn-デシルベンゼンなどの分解菌についても現在検討されつつある。

水銀耐性については、Robinson & Tuovinen¹⁰⁾は、図-10のモデルを提案し、水銀耐性菌は酵素的に $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$ とし、 Hg^{2+} イオンに耐性を作ると共に、 Hg^0 を系から揮散させることを示した。一方、Chakrabarty¹¹⁾も、水銀耐性プラスミドについて報告している。その他のCd、Znなどの有害重金属イオンを無害化したり、蓄積したりする細菌は、自然界には多数分布している。

Shoda et al¹³⁾は、自然界より燐蓄積細菌Arthrobacter globiformis PAB-6を分離し、平石ら¹³⁾は、

図-8 固定化法の分類と模式図

光合成細菌Rhodopseudomonas (Rhodobacter と名前を替えた) sphaeroidesが高濃度の磷を蓄積することを報告した。しかし、その遺伝的性質については不明である。

今井¹⁴⁾は、バクテリアリーチングの中心をなす鉄酸化細菌のプラスミドについて解説し、発見されたプラスミドが亜硫酸耐性に関与していることを示唆すると共に、これらのプラスミドを利用して組換えDNA用ベクターの開発が可能であることを予想している。しかし、プラスミドの役割についてはほとんど不明であり、やっと研究が始まった所と言える。ただRawlings & Woods¹⁵⁾

は、遺伝子操作への1つの試みとして Thiobacillus ferrooxidansのプラスミドを制限酵素まで切ってpBR 325にクローニングし、これをE.coli間で接合伝達させ、成功している。

硝化、脱窒細菌、悪臭分解菌などに関する報告は極めて多いが、その遺伝的解析はこれからである。

光合成細菌は、污水处理や水素生産などに用いられているが、遺伝的性質についての研究はこれからである。この一例として、梶原¹⁶⁾は、水素生産株の育種を目的とし、Rhodopseudomonas と Sphaeroides の二株の細胞融合を行い、成功している。

図-9 固定化微生物の利用

図-10 プラミド R 100 に支配された水銀還元酵素による Hg^{2+} イオンの還元と水銀耐性メカニズム

各種機能を持った遺伝子が受容菌中に落ち着いた場合、次のステップとしてこれら遺伝子の機能強化即ち、酵素の多量生産が考えられる。これには、lac UY5 プロモーターなどのように、遺伝子の読み取り頻度を上げる方法¹⁷⁾が広く行われている。

最後に、自然的遺伝子改良の例として、Chakrabarty¹⁸⁾が提唱したplasmid-assisted molecular breeding (プラスミド支援分子育種法)を以下に示す。その方法は、これまで述べてきたことから理解されるように、自然界ではプラスミド上の遺伝子の組み換えが頻繁に行われ、これに遺伝子の変異、進化が加わって、全く新しい機能をもったプラスミドが出現してくる現象に着目して、これを積極的に実験室でおし進めることにより、より強力な分解菌を短期間に育成しようとするものである。

この方法の実例として、Chakrabarty は、2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸 (2, 4, 5-T) 分解菌を次のようにして得ている。化学薬品廃棄場の土壌試料に、CAM, SAL, TOL, pAC21, pAC25 などのプラスミド保有菌を加え、ケモスタットを用いて、最初はそれぞれのプラスミドの基質と少量の 2, 4, 5-T を炭素源とし、その後、次第に 2, 4, 5-T の濃度を上げてゆき、約 6 ヶ月後には完全に炭素源を 2, 4, 5-T に

置き換えて培養したところ、2, 4, 5-T を単一の炭素源として生育する強力な分解菌が得られた。この株は 1 週間で 1.5 mg/ml の 2, 4, 5-T を 90% 以上分解した。対照として、土壌試料だけを同じように培養したものからは、このような分解菌は出てこなかった。2, 4, 5-T は除草剤として使われているが、非常に難分解性で、完全分解する菌株はまだ自然界から分離されていなかった。この方法は単に分解菌の育種法としてだけでなく、種々の有用細菌の分子育種法として、今後広く利用されるように思われる。

結 語

現在、遺伝子工学、つまり微生物の接合から形質転換までの遺伝子移動による分子育種技術を用いて、目的とする微生物を計画的に作りだすことが可能になっている。水処理におけるニューバイオテクノロジーの意義と価値を概説しながら、最近の目につく水処理のための遺伝子工学研究開発の現況を述べた。新しいバイオテクノロジーの水処理技術への活用のための基礎研究の課題は山積みの状態で、従って水処理分野のより多くの研究者が今後この分野へ参入されることを念じるとともにこの分野の活発な討議と発展を期待して本稿を終えたい。

文 献

- 1) 橋本奨：藤田正憲：分子育種技術の廃水処理への応用—遺伝子工学からの視点—，水処理技術，Vol.24, No.9, 13～29 (1983).
- 2) 橋本奨：バイオテクノロジーと下水道，建設月報，No.432, 6月号，61～68 (1985).
橋本奨：バイオテクノロジーとは——下水生物処理からの視点——，月刊下水道，Vol. 8, No. 8, 2～8 (1985).
- 3) 橋本奨：下廃水処理におけるバイオテクノロジーの概観と展望，用水と廃水，Vol. 27, No.11, 3～13 (1985).
- 4) Chakrabarty, A. M., Chou, G., Gunsalus, I. C.: Genetic Regulation of Octane Dissimilation in *Pseudomonas*, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., Vol. 70(4), p.1137～1140 (1973).
- 5) Tago, Y., Oishi, K., Yano, K., Aida, K.: "Transfer of TOL Plasmid to a Floc-Forming Bacterium, *Pseudomonas* sp. No.12", 4th Int Symp. on Genetic of Industrial Microorganisms, June 6-11, Kyoto (1982).
- 6) Goldberg, J. B., Ohman, D. E.: "Cloning and Expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a Gene Involved in the Production of Alginate", J. Bact., Vol. 158, pp. 1115～1121 (1984).
- 7) 外村，川崎：“細菌による有機ハロゲン化合物の分解とプラスミド”，蛋白質，核酸，酵素 Vol. 29, pp. 111～126 (1984).
- 8) 金光，西，矢野：“*Pseudomonas* 属における新プラスミドの検索：アルキルベンゼン類分解系プラスミドの単離”昭和59年度日農化大会，予講集，p. 172 (1984).
- 9) 西，福田，矢野：“汚染物質分解細菌の質的改良：多資性 *Pseudomonas* の分離とそのプラスミド”，昭和59年度日農化大会，予講集，p. 172 (1984).
- 10) Robinson, J. B., Tuovinen, O. H.: "Mechanisms of Microbial Resistance and Detoxification of Mercury and Organomercury Compounds: Physiological, Biochemical and Genetic Analyses", Microbiological Reviews, Vol. 48, pp. 95～124 (1984).
- 11) Chakrabarty, A. M.: "Plasmids in *Pseudomonas*", Ann. Rev. Genet, Vol. 10, pp. 7～30 (1976).
- 12) Shoda, M., Ohsumi, T., Udaka, S.: "Screening for High Phosphate Accumulating Bacteria", Agr. Biol. Chem., Vol. 44(2), pp. 319～324 (1980).
- 13) Hiraishi, A., Kitamura, H.: J. Ferment. Technol., Vol. 62, p. 293～296 (1984).
- 14) 今井：“バイオハイドロメタラーゼの展望”，BIO INDUSTRY, Vol. 2 (9), pp. 709～716 (1985).
- 15) Rawlings, D. E. & Woods, D. R.: "Mobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* Plasmids among *E. coli* Strains", Appl. Environment. Microbiol., Vol. 49, pp. 1323～1325 (1985).
- 16) 梶谷，中島，民谷，軽部：“光合成細菌の細胞融合”，昭和60年度醗酵工学大会講演要旨集，p. 24 (1985).
- 17) 岡田，根来，木下：“非天然物質ナイロンオリゴマー分解系酵素とその遺伝情報”，蛋白質，核酸，酵素，Vol. 27, pp. 451～465 (1982).
- 18) Kellogg, S. T., Chatterjee D. K., Chakrabarty, A. M.: "Plasmid-Assisted Molecular Breeding: New Technique for Enhanced Biodegradation of Persistent Toxic Chemicals", Science, Vol. 214, pp. 1133～1135 (1981).