

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12237

研究課題名(和文) マルチコピープラスミド含有ジオバクターによる有機塩素嫌気分解リアクターの開発

研究課題名(英文) Anaerobic reactor to degrade organic chloride by using Geobacter sp.

研究代表者

吉田 奈央子 (YOSHIDA, NAOKO)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10432220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は1000ppmの1,2-DCAを5日間で副産物を生じることなしにエチレンに無毒化するジオバクターAY株について、簡便にバイオマスを得る培養リアクターの確立を目指した。実験の結果、フェッドバッチ培養で最も短期間且つ簡便に菌体量を確保することができた。接種細胞濃度 $3E+9$ cells/Lで培養開始した場合、 $7E+11$ cells/Lの細胞密度を3-4日間の培養期間で得られた。速度解析試験の結果、AY株の1,2-DCA脱ハロゲン化はミカエリスメンテンの非可逆基質阻害モデル式で近似でき、本モデルより求めた各定数を用いて脱塩素化ならびにバイオマス増殖量を妥当に計算できることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have isolated Geobacter sp. AY which detoxify 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) to ethylene. In the kinetic analysis, strain AY showed the much higher dechlorination rate than yet-reported dehalorespiration reported so far. For example $1E+8$ cells/mL of cell density. In this study, a fed-batch cultivation using 10L-scale fermentor was performed to get more biomass of the strain AY for the application in bioaugmentation. As the result, $4.9 E+12$ cells were obtained within 3-4 days from the initial cell density at $3E+9$ cells/L. The kinetics of 1,2-DCA dechlorination by the strain was well fitted with Michaelis-Menten equation with irreversible substrate inhibition model. By using the parameters estimated based on the model, i.e. K_s , K_{iu} , V_{max} , the changes of 1,2-DCA and ethylene in the fed-batch reactor were calculated and showed similar values with the actual experimental data. These results suggest the model and estimated parameters appropriately expressed the phenomenon in the reactor.

研究分野：環境微生物学

キーワード：脱ハロゲン化呼吸 バイオレメディエーション ジオバクター

1. 研究開始当初の背景

脱塩素化呼吸細菌は、有機塩素を呼吸基質（人間でいうところの酸素）として還元的に脱塩素化することから、有機ハロゲン汚染環境浄化の生物触媒として期待されている。これまで脱塩素化細菌の活性化のために有機物を補填するバイオスティミュレーションを中心に国内外で浄化実績が伸びる一方、浄化微生物を現場に補填するバイオオーグメンテーション事業は、社会的ニーズに反し実用化が進んでいない。また、有機塩素廃水処理においても、微生物が難培養性で分解に長時間を費やすため、曝気で活性炭吸着し燃焼廃棄、低濃度化した廃水が別途処理されている。我々は脱塩素化呼吸細菌の中、知りうる限り最も高濃度（1,000ppm）な1,2-ジクロロエタン（1,2-DCA）存在下で生育し、わずか7時間で副産物を生じることなしにエチレンに無毒化するジオバクターAY株を分離獲得した。本株の高い活性は新たなオーグメンテーション材料として有効であり、且つ脱塩素化細菌として廃水処理の滞留時間に耐える。

2. 研究の目的

1,2-DCA 汚染土壌・地下水のバイオオーグメンテーションならびに省コストな廃水処理技術を実現することを目指し、AY株を接種した10Lスケールリアクターを構築するとともに、菌体濃縮限界、プラスミド安定性、機能遺伝子のコピー数、転写コピー数、および発現タンパク質を変数とした分解予測モデリングを行う。

3. 研究の方法

(1) ジャーファーマンターにおけるバイオマス回収試験

第一に、10Lスケールジャーファーマンターを用いてAY株のバッチ培養を行う。培地は炭酸緩衝液にミネラル塩と電子供与体として酢酸ナトリウム、電子受容体として10mM 1,2-DCAを補填したものをを用いる。培養は28℃で、ゆるやかに攪拌して行う。培養過程

において、培養物中の1,2-DCA濃度はファーマンター気相のヘッドスペースガスのGC分析により測定するとともに、ファーマンター内部の培養液について核酸蛍光染色細胞の直接顕鏡法により菌体濃度を計測した。

(2) ファーマンターにおける1,2-DCA脱ハロゲン化ならびに微生物バイオマス濃度の変遷モデリング

AY株の12DCA脱塩素化速度は、12DCAの初期濃度によって非線形的に変化することから、メカエリスメンテンモデルを適用する(*Environ. Sci. Technol.* **47**: 195-205, 2005)。特に高濃度の1,2-DCA存在下で既報の微生物が脱塩素化活性を失うことから、単純非可逆モデルと併せて非可逆基質阻害モデルを適用した脱塩素化反応速度式のフィッティングを行い、各定数を求めることとした(*J. Biochem* **80**: 547-555, 1976)。その後、どちらのモデルと実測値に近いかが相関係数から比較し、より近いモデルを採用することとした。さらに、この反応速度式を積分することで、ファーマンターにおける12DCA濃度の時間的変化を計算し実測値と比較し、反応定数またはモデルの整合性を評価した。この際、計算に要する菌体濃度は、求められたエチレン濃度の増加分に増殖収率を乗じて求めた。

4. 研究成果

(1) ジャーファーマンターにおけるバイオマス回収試験

本研究は、1000ppmのジクロロエタンを5日間で副産物を生じることなしにエチレンに無毒化するジオバクターAY株について、バイオオーグメンテーション利用を想定し、簡便にバイオマスを得る培養技術の確立を目指した。実験の結果、ジャーファーマンターを用いてバッチ培養で十分量培養を行った後1,2-DCAおよび酢酸のみを追加補填するフェッドバッチ培養を行う方法で、最も短期間で簡便に菌体量を確保することができることを示した。この際、培養容器内のpHが脱ハロゲン化により下がるため、7以下になった場合に水酸化

ナトリウム溶液を自動的に添加する運転条件で培養を行った。培養を繰り返し行った結果、接種細胞濃度 3×10^9 L で培養開始した場合で、最大で 7×10^{11} cells/L の細胞密度、バイオマス量として 4.9×10^{12} cells を 3 - 4日の培養期間で得られることが示された。

(2)ファーメンターにおける 1,2-DCA 脱ハロゲン化ならびに微生物バイオマス濃度の変遷モデリング

続いて、AY 株の休止菌体を用い、 $1 \mu\text{M}$ 50mM の 1,2-DCA 濃度における脱ハロゲン化速度を測定した結果をミカエリスメンテンの単純非可逆モデルおよび非可逆基質阻害モデル式にフィッティングしたところ、非可逆基質阻害モデル式においてより高い相関係数を得た。これより、非可逆基質阻害モデル式における親和定数 K_s 、阻害係数 K_{iu} 、最大速度 V_{max} を最小二乗法により求め、さらに、増殖培養実験から増殖収率 Y 、死滅係数 K_d をバッチ培養時の細胞密度の推移から算出した。以上の実験によち求めた各定数を用いファーメンターにおける 1,2-DCA、エチレン、遊離 Cl_2 ならびにバイオマス増殖量の理論値の時間的变化を算出し、実測値と比較した結果、エチレン、遊離濃度、細胞密度ともに、実測値と計算値がおよそ似た値を示した。これより、算出されたパラメータとモデル式により系内のバイオマス増殖が妥当に表現されることが示された。

(3) 1,2-DCA 脱塩素化細菌 AY 株の高分解活性機構の解明

続いて、AY 株が高分解活性を示す機構について調べた。具体的に 3 つの可能性を想定した。第一に、AY 株がジオバクター属の脱ハロゲン化呼吸細菌のみから構成される系統クレードに位置することに着目し、このクレードの微生物が特に脱栄男原価呼吸活性が高いのではないかと考えた。そこで、同属同種の系統学的

に最も近い SZ 株の脱塩素化速度について調べたところ、AY 株は SZ 株に比べて著しく高い脱塩素化速度を示し、この高分解活性がジオバクターの脱ハロゲン化細菌クレードの特徴ではないことが示された。続いて、既報の 1,2-DCA 脱塩素化細菌が電子供与体として水素を用いることから、AY が酢酸を用いることができる点が有利に働く可能性を考えた。しかし、水素を用いた脱ハロゲン化試験においても同等の脱ハロゲン化速度が示さず田。株のゲノム配列を決定した結果、AY の 1,2-DCA 脱塩素化酵素遺伝子は染色体ゲノムではなくトランスポゾン由来と思われる環状 DNA 上に存在し、且つ転写誘導にかかわる遺伝子が欠落していることが示された。染色体ゲノム上に存在するタンパク質合成に必須の RNA ポリメラーゼ遺伝子 ($rpoB$) および脱塩素化酵素遺伝子 ($dcaA$) を標的とした定量 PCR、定量 RT-PCR の結果、1 細胞あたりに 10 コピーを有すること、さらに $rpoB$ の約 890 倍の mRNA を転写することが示された。さらに AY 株と SZ 株のタンパク質抽出液の SDS-PAGE ならびに SDS-PAGE バンドの質量分析の結果、AY 株は DCA 脱塩素化酵素を SZ 株の 5 倍以上発現していることが示された。これより、AY 株は 10 コピーの環状 DNA 上に存在する脱塩素化遺伝子が恒常的に転写・発現することで既報の脱塩素化細菌に比べて著しく高い脱塩素化活性を示すことが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Mohamed Ismael, Naoko Yoshida, Arata Katayama (under review) Identification of multiple dehalogenase genes involved in tetrachloroethene-to-ethene dechlorination in a

Dehalococoides-dominated enriched culture. Biomed Research International

- (2) 吉田奈央子、片山新太 (2017) 嫌気性菌の大量培養と浄化期間の予測 環境技術 46 : 83-89

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 吉田奈央子、Mohamed Ismael, Ummi Afifah Binti Abdullah, 朝日教智、広瀬侑、片山新太 フェルメンターを用いた脱塩素化細菌の培養および細胞増殖シミュレーション 第 21 回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 2015 年 6 月 18 日、九州大学、福岡市
- (2) Naoko Yoshida, Mamoru Oshikim Lisa Nonaka, Yuu Hirose, Kiyotoshi Asahi, Arata Katayama Unprecedented high dechlorination activity by reductive dehalogenase extensively expressed from a large plasmid of Geobacter sp. AY 2016/8/21-2016/8/26, Montreal, Canada, oral presentation
- (3) Naoko Yoshida, Mamoru Oshikim Lisa Nonaka, Yuu Hirose, Kiyotoshi Asahi, Arata Katayama Unprecedented high dechlorination activity caused by multi-copy reproduction of a reductive dehalogenase coding gene in Geobacter sp. AY The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology 2016/9/30-2016/10/2, Center for Condensed Matter Sciences, National Taiwan University

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 吉田奈央子 21 勝「有機塩素化合物の還元的脱ハロゲン化呼吸細菌の研究と浄化利用の動向」難培養微生物研究の最新技術 III 微生物の生き様に迫り課題解決へ CMC 出版

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田奈央子 (NAOKO YOSHIDA)
名古屋工業大学 大学院 工学研究科 社会工学専攻・准教授
研究者番号 : 10432220

(2) 研究分担者

片山新太 (ARATA KATAYAMA)
名古屋大学 未来材料システム研究所・教授
研究者番号 : 60185808

押木守 (MAMORU OSHIKI)

長岡工業高等専門学校 環境都市工学科・准教授

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()