

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01900

研究課題名(和文) プロテオーム解析による有機ハロゲン呼吸細菌の網羅的機能タイピング

研究課題名(英文) Functional typing of reductive dehalogenase in dehalorespiring bacteria

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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では地下水浄化利用に耐える*D. mccarty* NIT01株を分離した。本株は最大4mMのTCEを脱塩素化し増殖可能でありゲノム上に19の脱ハロゲン化酵素(Rdh)遺伝子を有した。本株は簡便に大量培養可能であり、また、既知のRdh(Vcr)の他、未同定の複数のRdhが関与することで高い脱塩素化活性を示す。一方、既報株に比べて突出した1,2-DCA脱塩素化速度を示す*Geobacter* sp. AY株が高い脱塩素化活性をもつ最大の要因は、脱塩素化酵素自体の活性が高いというよりも、Rdh遺伝子が恒常的に*rpoB*の6.6倍転写されるために発現量が多い点にある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は、高い脱塩素化活性をもつ2つの脱ハロゲン化呼吸細菌、*Dehalococcoides* *mccartyi* NIT01および*Geobacter* sp. AYの活性の高さが、複数の脱塩素化酵素の関与、またはrdh遺伝子の恒常的・活発な転写に起因することを示した点にある。社会的意義は、簡便に培養できる微生物が大学の成果有体物として得られ、本株を利用したバイオオーグメンテーションがバイオレメディエーション指針の適合確認を得たことにある。本株は今後民間企業にひろく浄化に利用されることが期待できる。また、本研究で確立したrdhの抽出・精製技術は、地球化学的なハロゲンの循環把握に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：This study newly isolated the *D. mccarty* NIT01, which is applicable for bio-augmentation of groundwater contaminated with chloroethene. The strain is capable of dechlorinating up to 4 mM TCE and has 19 dehalogenase (Rdh)-genes in the genome. The strain can be easily cultivated in large quantities and has high Rdh activity due to the involvement of multiple Rdhs, including known Rdh(Vcr) and unidentified Rdh. On the other hand, *Geobacter* sp. AY which has a prominent 1,2-DCA dechlorination rate among known DCA dechlorinators. The strain AY has a single copy of rdh in the genome, although the rdh (AY-dcaA) is constitutively transcribed 6.6 times that of *rpoB*. The AY-DcaA was expressed much, but the 1,2DCA dichlorination rate was relatively lower than that observed in known dechlorinators. Based on the above, the superior transcription and expression of rdh attributed the high dichlorination activity of 1,2-DCA by the strain AY.

研究分野：環境微生物学

キーワード：バイオレメディエーション 還元的脱塩素化 *Dehalococcoides*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱ハロゲン化呼吸細菌は、有機ハロゲンを呼吸の電子受容体基質（人間でいうところの酸素）として還元的に脱ハロゲン化することから、有機ハロゲン汚染環境浄化のための生物触媒として期待されている。現在のところ、脱ハロゲン化細菌のエネルギー源となる有機物を汚染現場に補填するバイオスティミュレーションが欧米を中心に実施されており、国内でも浄化実績があがりつつある。浄化を担う脱ハロゲン化微生物の培養が難しく純粋大量培養が技術的に困難なため、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。

2. 研究の目的

本研究は、有機ハロゲン汚染環境浄化のための生物触媒として期待される脱ハロゲン化呼吸細菌について、バイオオーグメンテーション利用に耐える新たな株の分離、浄化利用のための特性評価を行うとともに、大量培養方法を確立し、新規脱ハロゲン化酵素 (Rdh) の有機ハロゲン基質の特定に取り組んだ。これより、汚染地下水の生物学的浄化を安価・安全に進めるための基礎知見を得た。上記研究項目の中でも Rdh の基質となる有機ハロゲンの特定に最も注力した。これは、有機ハロゲン循環ならびに地下水生態系への影響評価を行う上で重要である一方基礎知見が不足しており、オーグメンテーション時に自然環境への人為攪乱を行う上で、「脱ハロゲン化呼吸細菌を地下水に補填して問題ないか」という問いに応えるためである。また、これまでに得た既報に比べて著しく速い *Geobacter* sp. AY 株が何故脱ハロゲン化活性を既報に比べて高く示すことができるか、その細胞内機構の解明に取り組んだ

3. 研究の方法

(1) 新規脱ハロゲン化呼吸細菌の分離・特性評価

これまでに得た脱ハロゲン化呼吸細菌の高度集積物について引き続き純化培養を行った。純化分離は、各有機ハロゲンと水素および酢酸を補填したミネラルアガー培地を用いたアガーシェイク培養または限界希釈培養によって行い、ゲノム全長配列の決定の他、浄化実施の際に求められる生理学的特性を明らかにした。

(2) 脱ハロゲン化呼吸細菌の大量培養・増殖シミュレーション

脱ハロゲン化呼吸細菌は、12 L 容積のビア樽またはガラス容器を用いて培養した。塩素化合物濃度をガスクロマトグラフィー (GC) により決定し、培養液中の塩化物イオン濃度は、イオンクロマトグラフィー (IC) により測定した。細胞密度は、核酸結合性の蛍光色素で染色後、培養物の希釈溶液をメンブレンにろ過し、捕捉された細胞数を計数することで決定した。また、休止菌体を用いて、異なる CE 濃度における脱塩素化速度を測定しミカエリスメンテンモデルに基づく反応速度定数を求め、細胞増殖率を考慮して細胞増殖の予測計算を行った。増殖収率は、脱塩素化により生じた塩化物イオン濃度あたりの細胞密度変化の線形近似によって算出した。

(3) 新規脱ハロゲン化酵素の有機ハロゲン基質の特定

(2) で確立した大量培養方法に基づき回収したバイオマスについて Rdh を抽出・精製した。Rdh は、超音波破碎後に非破碎細胞を除去した後、膜画分を超遠心により抽出し界面活性剤で溶解後に陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製する方法を用いた。フラクションコレクターで分取した試料について有機ハロゲンならびに methyl viologen を添加し、in vitro 活性試験を行い、精製度を SDS-PAGE で確認した。

(4) 既報に比べて著しく速い分離株の脱ハロゲン化酵素の高発現機構の解明

既報に比べ著しい脱ハロゲン化呼吸活性を有する *Geobacter* sp. AY 株に着目し、AY 株が高い脱ハロゲン化活性を示す細胞内分子機構を解明した。具体的には、AY 株の細胞としての脱塩素化反応速度定数の決定、ゲノムの再解読、さらに AY 株の RdhA のゲノム中のコピー数、転写量、発現量を決定した。さらに抽出・精製した Rdh について脱塩素化反応速度を決定した。

4. 研究成果

(1) 新規脱ハロゲン化呼吸細菌の分離・特性評価

これまでに得た塩素化エチレン脱塩素化集積物から限界希釈培養を繰り返した結果、RFLP パターンで *Dehalococcoides* 以外のバンドが確認されない培養物が得られ、アンプリコン解析の結果では 99.4%、99.5% が *Dehalococcoides* のリードであった。この2つの試料で検出されたマイナ

ーリードは試料間で重複しないことから培養物由来でなく実験操作時に汚染した微生物DNA由来のリードと考え、純粋分離されたと結論し、NIT01株と名付けた。本株はpH6.5 - 8.0で脱塩素化が可能で、至適pHは7.3 - 7.6, 至適塩濃度として0.3% (電気伝導度では6.2 mS/m), 酸素濃度0.5%以下では失活し、20~32 で脱塩素化が可能であり、至適温度は25-30 であった。全ゲノム解析結果の結果、病原性ならびに病原性に関わる遺伝子に関して調査を行った結果、病原性に関わる遺伝子は見つからなかった。本株については民間企業と共同で、土壌・地下水の浄化事業計画の「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合確認を経済産業省および環境省より受け、複数のメディアに報道紹介された。

(2) 脱ハロゲン化呼吸細菌の大量培養・増殖シミュレーション

特に NIT01 株についてステンレス製ビア樽ならびにガラス瓶で培養を繰り返し検討した結果、ステンレス製ビア樽では 15 回試行し 6 回で脱塩素化が完了するが、9 回で脱塩素化が中断した。一方ガラス瓶培養では 4 回試行した全てで脱塩素化が完了したことから、NIT01 株を純粋培養物で培養する際、ステンレスが何かしら阻害するため、ガラス瓶での培養が望ましいことが示された。1L の接種源から培養 13 日で細胞密度 6.5×10^{10} cells/L の培養液 7.2 L が得られた。これは、例えば、初期接種密度として 10^7 cells/L を補填する場合、本ビア樽を用いて 1 バッチの培養で間隙率 30 % の土壌の地下水 240 m³ の浄化必要量を培養可能であると試算できる。増殖収率は 3.6×10^7 cells/ μ mol、脱塩素化反応速度は既報で観察された値の範囲内であった。

(3) 新規脱ハロゲン化酵素の有機ハロゲン基質の特定

Geobacter sp. AY 株の 1,2-DCA 脱塩素化酵素 (AY-Dca) 抽出について、ビーズビーター法と超音波破砕法を試みた結果、超音波破砕法において、より脱塩素化活性が高い粗酵素抽出液を得た。さらに、5 種の界面活性剤を用いた粗酵素抽出を試みた結果、特に digitonin、CHAPS、ならびに n-octyl- β -glucoside を用いた粗酵素抽出液で脱塩素化活性が高い結果が得られた。アニオン交換クロマトグラフィー分取した結果、SDS-PAGE でシングルバンドが検出される程度に精製され、この Rdh を AY-Dca と名付けた。AY-Dca の至適 DCA 濃度は 5mM と非常に高く、至適温度は 30 , 至適 pH は 8 であった。精製された酵素の脱塩素化速度は、細胞の脱塩素化速度が既報に比べて著しく高いとは異なり、既報に比べて低く最大で塩化物イオンの生成速度として 15 μ mol/min/mg-protein であった。しかし、この実験値は今後の実験操作の熟練・最適化により増加されることが十分に見込めるものである。

さらに、*D. mccarty* NIT01 株について塩素化エチレンの脱塩素化酵素の抽出を行った。抽出は AY 株と同様に行ったが、AY 株に比べ得られるバイオマスが小さく、抽出・精製の過程におけるロスが生じ、SDS-PAGE でシングルバンドまで精製するには至らなかった。しかしながら、興味深いことに分子量ろ過フラクションによって各塩素化エチレンに対する脱塩素化速度が異なる、さらにはアニオン交換クロマトグラフィーで複数の非連続の分取液から脱塩素化活性のピークが得られたことから、既報の TCE \rightarrow ETH までを行う Rdh(Vcr) の他、VC や DCE を脱塩素化する未同定の脱塩素化酵素が反応に関与することが示唆された。これは NIT01 株の分離源となった YN3 コンソーシアで検出された 18 つの RdhA の転写解析の結果示された複数の脱塩素化酵素の転写誘導の結果と一致する。

(4) 既報に比べて著しく速い分離株の脱ハロゲン化酵素の高発現機構の解明

既報株に比べて突出した 1,2-DCA 脱塩素化速度を示 *Geobacter* sp. AY 株について、研究をすすめた結果、これまでにゲノム上の遺伝子はトランスポゾン上に存在しコピー数は 1 であり、恒常的に rpoB の 6.6 倍程度転写され、Ay-Dca の発現量が多いことが示された。また、先に述べたように AY-Dca は至適 DCA 濃度が 5mM と非常に高い一方、最大速度は既報に比べて低く観察された。この酵素の脱塩素化速度試験は再試が操作の熟練・再現がさらに求められる状況ではあるものの、これまでの結果を踏まえると、AY 株の突出した高濃度 DCA に対する耐性は酵素および細胞の特性であり、DCA 脱塩素化速度の突出した速さは、酵素自体というよりも恒常的に転写され発現量が多いことが要因であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mohamed Ismaeil, Naoko Yoshida, Arata Katayama	4. 巻 56
2. 論文標題 Bacteroides sedimenti sp. nov., isolated from a chloroethenes-dechlorinating consortium enriched from river sediment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Microbiology	6. 最初と最後の頁 619-627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12275-018-8187-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ismaeil Mohamed, Yoshida Naoko, Katayama Arata	4. 巻 2017
2. 論文標題 Identification of Multiple Dehalogenase Genes Involved in Tetrachloroethene-to-Ethene Dechlorination in a Dehalococcoides-Dominated Enrichment Culture	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1155/2017/9191086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 日下部俊弥, 吉田奈央子
2. 発表標題 ミカエリス・メンテン式を用いた脱ハロゲン化呼吸細菌の培養シミュレーション
3. 学会等名 第24回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田奈央子, Mohamed Ismael, 日下部俊弥, 片山新太
2. 発表標題 新規Dehalococcoides 属細菌の分離の試み
3. 学会等名 第24回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Ismaeil, N Yoshida, A Katayama
2. 発表標題 Bacteroides sediment i sp. nov., a novel species of the genus Bacteroides which enhances the dechlorination of cis-chloroethene by Dehalococcoides
3. 学会等名 10th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Yoshida
2. 発表標題 Isolation and cultivation of dehalorespiring bacteria for bio-augmentation of aquifer contaminated with organohalides
3. 学会等名 4th International Conference on Environmental Pollution and Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N Nakahara, E Tasumi, N Yoshida, M Nobu, H Tamaki, T Yamaguchi, K Takai, H Imachi
2. 発表標題 Discovery of an Anaerolineae bacterium capable of reductive dehalogenation of organohalogen compounds
3. 学会等名 10th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Yoshida
2. 発表標題 Dehalorespiring bacteria: from isolation to augmentation
3. 学会等名 5th International Conference on Environmental Pollution and Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	押木 守 (Oshiki Mamoru) (90540865)	長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授 (53101)	
研究 分担者	野中 里佐 (Monaka Lisa) (70363265)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	