

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：50101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05197

研究課題名(和文) 難分解性含塩素有機リン化合物を高効率で分解可能な無機リン酸制御解除細菌株の創出

研究課題名(英文) Construction of bacterial strains capable of degrading persistent chlorinated organophosphorous compounds with high efficiency

研究代表者

阿部 勝正 (Abe, Katsumasa)

函館工業高等専門学校・物質環境工学科・准教授

研究者番号：40509551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：環境汚染物質である tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) は難分解性であり種々の毒性を有することからヒトを含む生物に与える影響が懸念されている。本研究では TCEP 分解酵素を生産可能な新しい高機能 TCEP 分解大腸菌を構築した。本高機能分解菌を用いて TCEP の分解について解析したところ、過去に報告されている野生株 (Sphingobium sp. TCM1) よりも約 8 倍早く分解可能であること、また、高濃度 TCEP の存在下においても効率的に TCEP を分解できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難分解性環境汚染物質である tris(2-chloroethyl) phosphate の微生物分解システムの開発が望まれているが、現在の TCEP 分解菌の分解速度は非常に遅い(低濃度でも 4 日)。本研究で構築された高機能 TCEP 分解菌は上記と同じ低濃度の TCEP であれば 8 時間程度で、その 10 倍濃度の TCEP であっても 2 日以内に分解可能であることを示した。本研究成果は TCEP 汚染環境の修復などの環境技術開発、および、難分解性環境汚染物質の微生物分解メカニズムの解明において重要な知見であり、その社会的意義や学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The persistent chlorinated organophosphate triester, tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP), has been widely used as a flame retardant and a plasticizer. Recently, toxicity of TCEP has been reported and thus raises concern about its harmful effect on organisms including human. In this study, I constructed a novel recombinant *E. coli* capable of degrading TCEP. The recombinant *E. coli* degraded TCEP about eight times faster than the wild-type strain, and was also found to efficiently degrade high concentrations of TCEP.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境浄化 有機リン化合物 組換え大腸菌 バイオレメディエーション 微生物分解

1. 研究開始当初の背景

Tris(2-chloroethyl) phosphate (図1, 以下 TCEP) などの含塩素有機リン酸トリエステル類は、建築材料・電気用品・衣類・カーペット・カーテンなどに添加される難燃剤・可塑剤として世界各地で用いられており、河川・湖沼・埋立処分場やハウスダストを含む様々な場所で検出されている。これらはメダカや金魚などの魚類に対し、農薬マラチオンと同等の急性毒性を示し、さらには、催奇形性や変異原性なども報告されている。当該

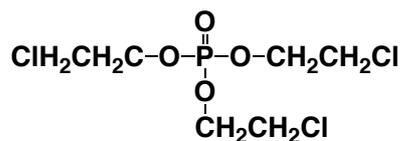


図1. Tris(2-chloroethyl) phosphate の構造

化合物が問題とされるのは、その毒性だけではなくその難分解性にもあり、下記に示す当研究室で単離された菌株以外、これら化合物の分解可能な微生物は報告されていない。

研究代表者はこれまで、種々の含塩素有機リン酸トリエステル生物分解システム構築を目的として、野外試料からのスクリーニングにより TCEP 等の分解活性を示す *Sphingobium* sp. TCM1 の単離に成功している^①。本菌の当該化合物に対する分解メカニズムは詳細に明らかにされてきており^{②-④}、今後は本菌を用いた高効率な含塩素有機リン酸トリエステル類微生物分解システムの構築が望まれるが、その技術開発を困難にしている問題が2点存在する。一つ目は、菌体培養培地中の TCEP の完全分解に要する時間が長すぎる(約4日)、二つ目は分解環境中に無機リン酸が存在する場合、菌体は分解酵素を生産と言うことである。実環境中での本菌を使用した場合、その環境中には実に多種多様の微生物が存在するため、分解に時間を要する TCM1 株が他の微生物に淘汰される可能性があり、本技術を実用化するためにはより高機能な TCEP 分解菌の創出が必須である。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで TCEP 分解菌 *Sphingobium* sp. TCM1 を単離し、その分解メカニズムについて詳細に解析してきた。それら研究において、TCM1 株による TCEP 分解には多大な時間を要すること、さらにその分解酵素は無機リン酸制限下でしか生産されないなど、実環境での使用を困難にする問題を有していることが明らかになった。本研究では研究代表者がこれまで同定に成功した TCEP 分解酵素群を大腸菌で構成的に高生産させることで、無機リン酸の有無にかかわらず高機能を発揮する含塩素有機リン化合物分解菌を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 含塩素有機リン化合物分解する組換え大腸菌の創出

個々の遺伝子発現ベクターは構築済みであるが、それらは全てアンピシリン耐性であることから、大腸菌に共導入することが出来ない。そこで、二つの遺伝子を同時に発現可能な pETDuet-1 を用いハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素 (HAD)、ホスホジエステラーゼ (PDE) 遺伝子発現用ベクターを構築した。ベクターの構築は PCR と in fusion クローニング法を用い、宿主として用いる大腸菌 BL21 (DE3) には熱ショック法を用いて導入した。

(2) 無機リン酸制御を受けない酵素生産調節因子の選抜

大腸菌のゲノム DNA 配列は既に明らかにされている。そこで、ゲノムデータベースより構成的発現遺伝子 (ハウスキープ遺伝子) としてよく知られている、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子のプロモーターを相同性解析によって同定した。同定したプロモーター領域遺伝子を受託により合成し、各合成遺伝子を pET ベクター中の T7 プロモーター領域と置き換えるように挿入した。目的ベクターの構築は上記方法と同様に in fusion クローニング法で行う。

(3) TCEP 分解酵素発現大腸菌を用いた TCEP 分解挙動の解析

タンパク質発現宿主として広範な実験に用いられている大腸菌 BL21 (DE3) を HAD・PDE 共発現プラスミドで形質転換し、アンピシリン含有 LB 液体培地で前培養を行った。前培養後の菌体を集菌・洗浄し、O.D. 600 値が 0.005 になるように 100 ml Medium A-C1^① + Amp + 20 μM TCEP (必要に応じて yeast extract も添加) に植菌して振盪培養した。培養開始時及び培養開始後 12 時間ごとに培養液を回収し、生育を分光光度計で (O.D. 600) また、酢酸エチルで抽出した培養液中の 2-CE 濃度をガスクロマトグラフィー質量分析計で解析した。

4. 研究成果

(1) 含塩素有機リン化合物分解する組換え大腸菌の創出

全バクテリアが PDE の関連酵素を有していることから HAD のみを発現させることで TCEP の完全分解が可能になるのではと考え、HAD 発現大腸菌休止菌体を用いた TCEP 分解について解析を

行った。しかし、HAD のみの発現では TCEP を完全に分解できないことが明らかとなり、HAD に続く分解を担う PDE を共発現させた場合の分解挙動について再度検討することとした。pET-Duet ベクターを用いて HAD と PDE 共発現系を構築し、大腸菌中で両酵素とも活性型酵素として発現可能であることを明らかにした。得られた HAD, PDE 共発現大腸菌を用いて、MediumA-C1 培地中の TCEP 分解挙動について解析したところ、本菌は TCM1 株を用いた分解より 12 倍早い 8 時間程度で 20 μM の TCEP を完全分解できること、また、50 μM 以下の TCEP であれば誘導剤である IPTG 添加なしで完全分解可能であることが明らかになった (図 2)。100 μM 以上の高い TCEP 濃度の場合に関しては培養液への IPTG 添加が必須ではあるが、72 時間で TCEP を完全分解しており、本菌は高濃度の TCEP 分解にも対応可能であることが示された。

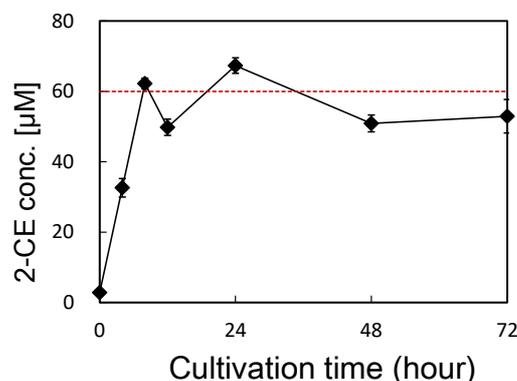


図 2. HAD, PDE 共発現大腸菌の 20 μM TCEP の分解挙動。赤い破線は、20 μM TCEP を完全分解した際に得られる 2-CE 生成濃度の理論収量を示す。

(2) TCEP 分解酵素 HAD, PDE の構成的共発現大腸菌の構築と TCEP 分解挙動の解析

構築された HAD, PDE 共発現大腸菌の改良として、強力かつ構成的に発現している遺伝子のプロモーターを使用することで、発現誘導因子が存在しない環境下においても、効率的かつ安定的に TCEP を分解することが可能か検討した。強力かつ構成的に発現している遺伝子のプロモーターとして、*gapdh* 遺伝子のプロモーター (*Pgap*) に注目し、*Pgap* を介した構成的 HAD, PDE 共発現大腸菌を構築した。構築した組換え大腸菌による TCEP 分解挙動を解析したところ、発現誘導物質を必要とせず濃度 100 μM の TCEP を完全分解できることが明らかとなり、過去に構築された HAD, PDE 共発現大腸菌よりも効率的な TCEP 分解大腸菌の構築に成功したものと考えた。しかしながら、高濃度 200 μM TCEP は完全分解できず、TCEP 分解代謝産物の急激な増加が本組換え大腸菌による TCEP 分解に影響を与えていることが考えられた。そこで、分解代謝産物の 1 つである無機リン酸 (Pi) が TCEP 分解に影響を与えるか解析したところ、 Pi の過剰存在下では TCEP 分解量が低下しており、 Pi が TCEP 分解酵素 (PDE) を阻害していることが示唆された。また、本組換え大腸菌による TCEP 分解系に栄養源を添加することで、菌体量が増加し、本研究の最終目標分解濃度であった高濃度 200 μM TCEP についても安定的かつ迅速に完全分解できることも明らかになった。

(3) コドンを最適化した構成的 HAD, PDE 共発現大腸菌による TCEP 分解挙動の解析

続いて、TCM1 株由来の *pde*, *had* 遺伝子のコドンを大腸菌に最適化し、これを導入した構成的な最適化 HAD, PDE 共発現大腸菌を構築することで、TCEP 分解の更なる効率化が可能であるか実験を行った。実験の結果、コドンを最適化した *pde*, *had* 遺伝子を発現させることで TCEP 分解活性がおおよそ 20% 増加していることが明らかになった。また、この組換え大腸菌による TCEP 分解挙動を解析したところ、最適化前の組換え大腸菌と比較して、20 μM TCEP の分解に要する時間が短縮され、高濃度 200 μM TCEP についても短期間でほぼ完全に分解できることが明らかになった。以上の結果から、今回構築したコドン最適化構成的 HAD, PDE 共発現大腸菌を分解系に使用し、栄養源を添加することで、更に効率的な高濃度 TCEP 分解が期待できると考えられる。

<引用文献>

- ① Takahashi, S., Satake, I., Konuma, I., Kawashima, K., Kawasaki, M., Mori, S., Morino, J., Mori, J., Xu, H., Abe, K., Yamada, R. and Kera, Y. Isolation and identification of persistent chlorinated organophosphorus flame retardants-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5292-5296, 2010
- ② Abe, K., Yoshida, Y., Suzuki, Y., Mori, J., Doi, Y., Takahashi, S. and Kera, Y. Haloalkylphosphorus hydrolases purified from *Sphingomonas* sp. strain TDK1 and *Sphingobium* sp. strain TCM1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 5866-5873, 2014
- ③ Abe, K., Mukai, N., Morooka, Y., Makino, T., Oshima, K., Takahashi, S., Kera, Y. An atypical phosphodiesterase capable of degrading haloalkyl phosphate diesters from *Sphingobium* sp. strain TCM1. *Sci. Rep.*, 7, 2842 2017
- ④ Takahashi, S., Katanuma, H., Abe, K., Kera, Y. Identification of alkaline phosphatase genes for utilizing a flame retardant, tris(2-chloroethyl) phosphate, in *Sphingobium* sp. strain TCM1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 2153-2162, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi S, Morooka Y, Kumakura T, Abe K, Kera Y.	4. 巻 104
2. 論文標題 Enzymatic characterization and regulation of gene expression of PhoK alkaline phosphatase in <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 1125-1134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-10291-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩見健史, 阿部勝正, 高橋祥司, 解良芳夫
2. 発表標題 <i>Sphingobium</i> sp. TCM1株の代謝改変による tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate の完全無毒化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸真之, 篠原輝, 阿部勝正, 高橋祥司, 解良芳夫
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いたリン酸トリス（2-クロロエチル）分解
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部勝正, 高橋祥司, 解良芳夫
2. 発表標題 難分解性含塩素有機リン化合物を分解する新規ホスホトリエステラーゼ
3. 学会等名 第12回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部勝正, 篠原輝, 高橋祥司, 解良芳夫
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いた高効率リン酸トリス(2-クロロエチル)分解
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 勝正, 田中 成美, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 変異型ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素の大腸菌発現系の構築と諸特性解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今野 聖矢, 今井 俊宏, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素中のシグナル様ペプチドの機能解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 勝正, 今野 聖矢, 今井 俊宏, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 有機リン加水分解酵素中に見いだされた新奇シグナル様配列の機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 誠之, 牧野 剛, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 Sphingobium sp. TCM1株ホスホジエステラーゼの発現と精製
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Kawaguchi, Takeshi Makino, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
2. 発表標題 Expression and Purification of Phosphodiesterase from Sphingobium sp. strain TCM1
3. 学会等名 The 7th International GIGAKU Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiya Konno, Toshihiro Imai, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
2. 発表標題 Investigation of the Role of Signal-like Sequence of Organophosphorus Hydrolase from Sphingobium sp. TCM1
3. 学会等名 The 7th International GIGAKU Conference
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------