

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19881

研究課題名(和文)嫌気的自然環境で起こる有機汚染物質の脱塩素化反応を好気条件下で実現させる

研究課題名(英文)Challenge to dechlorinate polychlorinated biphenyls under aerobic conditions with an engineered reductive dehalogenase

研究代表者

高塚 由美子(Takatsuka, Yumiko)

京都大学・エネルギー理工学研究所・特定准教授

研究者番号：70570810

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)の微生物浄化技術への活用が望まれる「嫌気下での還元的脱塩素化反応」を「好気下で実現する」世界初の革新的な生物触媒の創出を目的に、偏性嫌気性細菌のPCBs脱塩素化酵素を発現する遺伝子組換え細菌株を作製した。また、脱塩素反応の至適条件調査のために作製した、汚染原位置地下水にPCBsを添加した嫌気的モデルにおいて、PCBs濃度の顕著な減衰と2種類の脱塩素化細菌の存在を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「高塩素型PCBsを好気的条件下で脱塩素化する新機能酵素の創出」は極めて挑戦的であり、国際的なPCBs浄化に喫緊な需要ある技術である。活性を示した遺伝子組換えPCBs脱塩素酵素の報告はまだ無く、本研究課題で作製した組換え酵素の反応を最適化し、さらに大気下で還元的脱塩素化を実現する新機能酵素を創生できれば、酸化的ビフェニル分解酵素群との併活用により、これまでにない効果的な手法で生物浄化技術にパラダイムシフトを起こすと期待できる。

研究成果の概要(英文):The reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in an anaerobic environment is desired to be applied to bioremediation techniques. In an attempt to create an innovative biocatalyst that "dechlorinates PCBs under aerobic conditions," we have constructed a recombinant bacterial strain that expresses PCBs dehalogenase of a strictly anaerobic bacterium, Dehalococcoides. In addition, in an anaerobic model in which PCBs were added to groundwater collected from the PCBs-contaminated site, which was prepared to investigate the optimum conditions for the reductive dechlorination, a remarkable decrease in PCBs concentration and the presence of two anaerobic PCBs-dechlorinating bacteria were shown.

研究分野：応用微生物学、微生物生化学

キーワード：ポリ塩化ビフェニル 還元的脱塩素化酵素 遺伝子組換え細菌 ビタミンB12 Dehalococcoides

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs)」は難分解性かつ高残留性の環境汚染物質であり、塩素数とその置換位置が異なる多様な同族体と異性体群から成る。産業的に広く使用されていたものの、カネミ油症事件に代表される深刻な生体影響が明らかとなり、現在では PCBs の廃絶は持続可能な社会形成に「極めて喫緊な課題」として国際的に認識され、世界中に数多く存在する汚染土壌や河川などの有効な浄化技術の創出が希求されている。

微生物を利用した環境浄化に絞ると、自然界での PCBs 分解現象としては「好気下での酸化的ビフェニル環開裂」と「嫌気下での還元的脱塩素化」の存在が明らかにされている。1980 年代には既に好気性細菌のビフェニル分解酵素群遺伝子の知見が報告されているのに対し、還元的脱塩素化を行う偏性嫌気性細菌の PCBs 特異的な脱塩素化酵素 (PCBs 脱塩素酵素) は 2014 年になって初めて同定された (Wang ら, *PNAS*, 2014, 文献 1)。この脱塩素酵素はビタミン B₁₂ を補酵素とし、1 価のコバルトが活性種となって基質を還元し脱塩素化すると推定され、特に酵素分子中の 2 つの鉄-硫黄クラスターを介したコバルト再生に高い還元力が必要となるため、大気下では酵素活性を維持できず、反応には嫌気的環境が必要とされる。

一方で、2015 年に Shimakoshi らにより、励起電子の還元力が高い酸化チタンと結合したビタミン B₁₂ 触媒が合成され、反応特異性は酵素に大きく劣るものの、大気下で有機塩素化合物の脱塩素化に成功した例が報告された (Shimakoshi & Hisaeda, *Angew Chem Int Ed*, 2015, 文献 2)。

そこで我々は、「偏性嫌気性細菌の PCBs 脱塩素酵素でも、好気下で 1 価コバルトを安定的に再生する特性を付与できれば、好気環境での還元的脱塩素化反応を実現できる」との構想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、「高塩素置換型 PCBs の還元的脱塩素化を大気下で実現させる、世界初の革新的な生物触媒の創出」を目的とした。

我々はこれまで、好気性細菌の酸化的ビフェニル分解経路を利用した PCBs 無害化研究に取り組み、PCBs 異性体の分解特性が異なる細菌株の取得とその複合化、並びに遺伝子工学的手法による酵素機能強化等で分解性向上に成果を上げてきた。しかし高塩素化 PCBs、とりわけオルト、メタ、パラ位全てが塩素置換された異性体は、先の方法では分解できない。そのため、自然環境で還元的脱塩素化に寄与する偏性嫌気性細菌の PCBs 脱塩素酵素の併活用が必須と考えていた。

PCBs 脱塩素酵素の機能発揮には酸素濃度 <1 ppm という厳しい条件が要求されるため、実用的利用は困難と考えられてきた。しかし、もし大気下で高塩素化 PCBs を還元的脱塩素化できる新機能酵素を創生できれば、酸化的ビフェニル分解酵素群との同時作用も可能とし、高効率かつ容易な手法として生物浄化技術にパラダイムシフトを起こすと期待できる。

本研究課題の実現は、PCBs 脱塩素酵素反応には嫌気的雰囲気が必要であるというこれまでの常識概念を覆すだけでなく、嫌気条件が必要な種々の還元的化学反応にも応用可能な新しい普遍的知見を与え得る。

3. 研究の方法

(1) PCBs 脱塩素酵素を発現する遺伝子組換え細菌の作製、および脱塩素酵素活性測定

PCBs 脱塩素酵素は、2014 年に偏性嫌気性の *Dehalococcoides* 属細菌において 3 種類の遺伝子が同定された (Wang ら, 文献 1)。しかし、精製酵素の詳細や結晶構造、組換え酵素などの報告はまだ無い。そこで、PCBs 脱塩素酵素に 1 価コバルトを安定再生する特性付与を目標に、まず本酵素を発現する遺伝子組換え細菌の作製を試みた。

Wang らによる公開ゲノム情報を参考に *Dehalococcoides* 属細菌の PCBs 脱塩素酵素を 2 種類選抜し (PcbA1 および PcbA5)、人工遺伝子 (ファスマック社) を作製した。この時、他の脱塩素酵素における知見 (例えば文献 3) から、酵素活性に必須と推測した細胞膜結合アンカータンパク質 (名称を PcbB1 および PcbB5 とした) を共発現するよう人工遺伝子を設計した。2 種類の人工遺伝子それぞれについて、大腸菌発現用ベクター、あるいは市販ベクターを基に独自に作製した発現用ベクターに組み込み、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で発現誘導可能な「PCBs 脱塩素酵素-細胞膜結合アンカータンパク質」共発現プラスミドを作製した。

大腸菌、およびビタミン B₁₂ 高生産性の大腸菌近縁細菌を宿主として作製したプラスミドを導入し、IPTG により組換えタンパク質を発現誘導した後に菌体を回収して、SDS-PAGE による発現タンパク質の確認と、PCBs 脱塩素活性測定に供した。

PCBs 脱塩素活性測定には、5 塩素化 PCBs を約 50% 含む PCBs 標準品のカネクロール KC-500 (ジーエルサイエンス社) を 15 mg/L の濃度で用い、電子供与体には Ti(III)-クエン酸で還元した 20 mM のメチルピオロゲンを用いた (文献 1、4 を参考)。反応は N₂ または N₂/H₂ (96/4%) ガスで

置換したグローブボックス (UNICO 社製) 内で、温度 30 °C で 24~40 時間行った。酵素反応終了後、溶液中の PCBs を有機溶媒で抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS、モデル 7890A/5975C、アジレント・テクノロジー社) あるいは GC/ECD により分析したクロマトデータから、含有異性体比率の変化を解析した。

(2) PCBs 汚染原位置地下水中の脱塩素化細菌の調査、および原水に添加した PCBs の経時変化
細菌による PCBs 脱塩素酵素反応の至適条件について、文献のみからでは不足する詳細情報を得るため、国内の PCBs 汚染原位置から採取した地下水を用いた調査を実施した。

PCBs 脱塩素化細菌としては *Dehalococcoides* 属の他、*Dehalobacter* 属や *Desulfitobacterium* 属が知られる。そこでまず、汚染区域にある 3 本の揚水井 (井戸 No.1~No.3) から微量な砂礫を含む地下水を採取し、これらの PCBs 脱塩素化細菌が棲息するかについて、表 1 に示した 16S リボソーム RNA 遺伝子増幅用のプライマーを用いた PCR により解析した。さらに、遺伝子の検出により棲息が示唆された試料水については、文献 5~7 を参考に、テトラクロロエチレン (PCE) を脱塩素基質とし、乳酸やグルコース等を電子供与体や炭素源として添加した集積培養を試みた。

表 1. 細菌遺伝子の検出に使用したプライマー配列一覧

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列	増幅遺伝子の推定鎖長
細菌の 16S rRNA	Bact-8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1,500 bp
	Bact-1492R	5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'	
<i>Dehalococcoides</i> 属 16S rRNA 特異的領域	DHC-793F	5'-GGGAGTATCGACCCTCTCTG-3'	200 bp
	DHC-946R	5'-CGTTYCCCTTCRGTTCAC-3'	
<i>Dehalobacter</i> 属 16S rRNA 特異的領域	Dre-441F	5'-GTTAGGGAAGAAGCGCATCTGT-3'	230 bp
	Dre-645R	5'-CCTCTCCTGTCTCAAGCCATA-3'	
<i>Desulfitobacterium</i> 属 16S rRNA 特異的領域	Dsb-406F	5'-GTACGACGAAGGCCTTCGGGT-3'	220 bp
	Dsb-619R	5'-CCAGGGTTGAGCCCTAGGT-3'	

また、採取した試料水あるいは集積培養液に、炭素原や電子供与体とともにカネクロール KC-500 を 20 mg/L となるように添加し、定期的に電子供与体等を追加添加しながら、経時的に PCBs の分析および PCR による脱塩素化細菌の検出を行い、嫌気条件下での PCBs 濃度と含有異性体比率、および菌叢の経時変化を解析した。

4. 研究成果

(1) PCBs 脱塩素酵素を発現する遺伝子組換え細菌の作製

PCBs 脱塩素酵素として Wang らにより同定された *Dehalococcoides* 属細菌の 3 種類の酵素については、精製酵素の諸性質や組換え酵素の報告はまだ無い。本研究課題で我々は、3 種類の酵素のうち 2 種類 (PcbA1 および PcbA5) について、酵素活性に必須と推測した細胞膜結合アンカータンパク質 (PcbB1 および PcbB5) との共発現系を構築した。

大腸菌を宿主に試みた当初の結果では、2 種類とも組換え酵素タンパク質の発現は確認できたものの、脱塩素活性は検出できなかった。そこで宿主に、ビタミン B₁₂ 高生産性で好気嫌気の両条件下で生育可能な大腸菌近縁細菌 (A 株とする) を検討した。本菌株が数種類の抗生物質に自然耐性を示したためプラスミド選択マーカー遺伝子を変更し、*lac* プロモーター制御下の発現系を再構築したが、嫌気・好気条件下いずれでも組換え酵素の発現を確認できなかった。そこで、*tac* プロモーター制御下の新たな発現ベクターを構築して A 株に導入した結果、2 種類のうち 1 種類について目的タンパク質の発現を確認できた (図 1)。

本遺伝子組換え菌株を用いて組換え酵素による PCBs 脱塩素活性を検出するため、好気および嫌気下での異なる発現条件や種々の反応条件について検討中である。

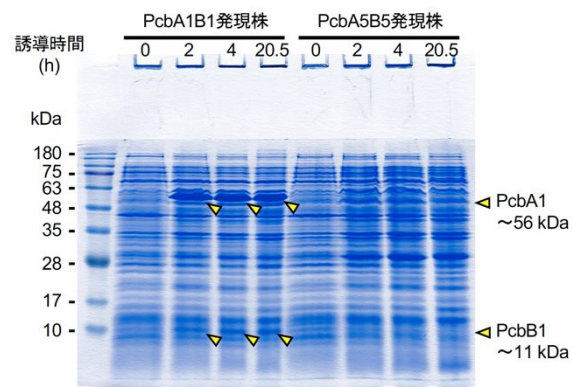


図1. 作製した組換え細菌株によるPCBs脱塩素酵素および細胞膜結合アンカータンパク質の発現

(2) PCBs 汚染原位置地下水中の脱塩素化細菌の調査、および原水に添加した PCBs の経時変化

作製した遺伝子組換え細菌株による PCBs 脱塩素酵素活性の検出・測定過程において、脱塩素化細菌による酵素反応の至適条件について、文献のみからでは不足する、より詳細な情報が必要と考えた。そこで、国内の PCBs 汚染原位置から採取した地下水を用いて、試料水中に存在する PCBs 脱塩素化細菌を調べるとともに、PCBs を意図的に添加した嫌氣的雰囲気下のモデルを作製し、PCBs 濃度および含有異性体比率の経時変化を解析した。

汚染区域の 3 本の揚水井 (井戸 No.1~No.3) の採水試料原水には、16S リボソーム RNA 遺伝子解析から、*Dehalococcoides* 属が No.1 の井戸に、*Dehalobacter* 属と *Desulfitobacterium* 属が

No.1~No.3 の全ての井戸に棲息すると推測された。さらに採水試料を用いた集積培養においては、*Dehalobacter* 属と *Desulfitobacterium* 属の増殖を確認した。特に *Desulfitobacterium* 属については、培養液を数回に渡って植え継いでも安定した増殖が見られ、採択した培養条件で継代培養が可能であることが確認できた。

原水または集積培養液に電子供与体等と共に PCBs を意図的に添加した試験からは、原水に添加したカネクロール KC-500 の濃度が、28 週以降に顕著に減衰することを確認した(図 2)。この時、試験液中には継続して *Dehalobacter* 属と *Desulfitobacterium* 属が検出され、脱塩素反応が単純なもので無く、水酸化反応を伴う複雑な過程を経る可能性も推測された。

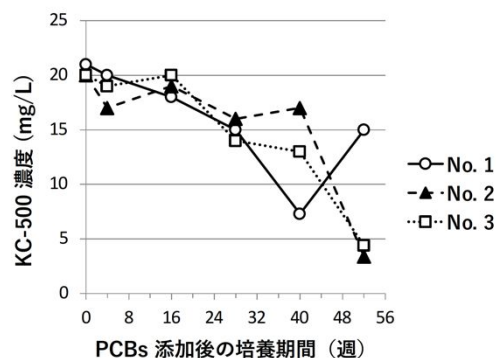


図2. 原水に添加したPCBs濃度の経時変化

『高塩素型 PCBs を好氣的条件下で脱塩素化する新機能酵素の創出』は極めて挑戦的であり、国際的な PCBs 浄化に喫緊な需要ある技術である。今回、大気下で安定な金属結合ビタミン B₁₂ 触媒の特性付与を目指し、遺伝子組換え型 PCBs 脱塩素酵素の発現細菌株の作製には成功したものの、まだ誰もなし得ない PCBs 脱塩素酵素の人為的な反応達成において試行錯誤の連続であった。惜しくも時間切れとなったが、本研究期間終了後も引き続き諦めずに、PCBs 水酸化と連鎖的脱塩素反応の可能性も含め、組換え酵素反応の最適化と新機能酵素の創生に取り組んでいく。

< 参考文献 >

1. S. Wang et al., Genomic characterization of three unique *Dehalococcoides* that respire on persistent polychlorinated biphenyls. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 12103-12108 (2014).
2. H. Shimakoshi and Y. Hisaeda, Oxygen-controlled catalysis by vitamin B₁₂-TiO₂: formation of esters and amides from trichlorinated organic compounds by photoirradiation. *Angew Chem Int Ed*, **54**, 15439-15443 (2015).
3. K. Chen et al., Molecular characterization of the enzymes involved in the degradation of a brominated aromatic herbicide. *Mol Microbiol*, **89**, 1121-1139 (2013).
4. A.J.B. Zehnder and K. Wuhrmann, Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science*, **194**, 1165-1166 (1976).
5. J.R. Cole et al., Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 3536-3542 (1994).
6. F.E. Löffler et al., Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 3809-3813 (1996).
7. E.A. Wolin et al., Formation of methane by bacterial extracts. *J Biol Chem*, **238**, 2882-2886 (1963).

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 Tomijiro Hara and Yumiko Takatsuka	4. 巻 -
2. 論文標題 Aerobic polychlorinated biphenyl-degrading bacteria isolated from the Tohoku region of Japan are not regionally endemic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Microbiology (査読中)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yumiko Takatsuka, Tomijiro Hara
2. 発表標題 Recombinant bacterial catalysts are cooperatively capable of polychlorinated biphenyls degradation
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高塚 由美子、原 富次郎、平野 竜行
2. 発表標題 ポリ塩化ビフェニル類汚染地区に棲息する嫌気性微生物に関する調査
3. 学会等名 第70回 (平成30年) 日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

講演：高塚 由美子、微生物と酵素 - 小さな働き者 -、第24回 京都大学エネルギー理工学研究所 公開講演会、京都府宇治市、2019年5月12日
 講演：原 富次郎、微生物が生み出す小さなエネルギーの社会利用 - 五月雨を集めてはやし最上川 -、第36回 京都大学宇治キャンパス産学交流会、オンライン開催、2020年9月1日

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	原 富次郎 (Hara Tomijiro) (70616193)	京都大学・エネルギー理工学研究所・特定教授 (14301)	

	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
研究協力者	森井 孝 (Morii Takashi) (90222348)	京都大学・エネルギー理工学研究所・教授 (14301)	2018年度
研究協力者	中田 栄司 (Nakata Eiji) (70467827)	京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授 (14301)	2018年度

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		
米国	コロンビア大学ラモント・ドハーティール地球観測所		
シンガポール	シンガポール国立大学		