

自己評価報告書

平成23年3月31日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20310039

研究課題名（和文） 含塩素有機リン酸トリエステル類の微生物分解に必須な新規分解酵素とその遺伝子の解明

研究課題名（英文） Research on novel degradation enzymes and genes essential to microbial degradation of persistent chlorinated organophosphorus triesters.

研究代表者

解良 芳夫（KERA YOSHIO）

研究者番号：00137168

研究分野：環境生物化学

科研費の分科・細目：環境学 ・ 環境技術・環境材料

キーワード：難分解性有害物、含塩素有機リン酸トリエステル類、新規分解微生物、新規分解酵素（トリエステラーゼ）、遺伝子クローニング、遺伝子発現、遺伝子破壊株、

1. 研究計画の概要

Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (以下 TDCPP) や Tris(2-chloroethyl) phosphate (以下 TCEP) などの塩素を含む有機リン酸トリエステル類は、難分解性で蓄積性があり、種々の毒性を有する。我々が世界で初めて単離に成功した含塩素有機リン酸トリエステル類の分解菌 *Sphingomonas* sp. TDK1 と *Sphingobium* sp. TCM1 に存在する新規分解酵素を単離・精製し、その特徴を明らかにするとともに当該酵素遺伝子を取得し、解析を行うことが本研究の目的である。

2. 研究の進捗状況

TDK1株及びTCM1株の無細胞抽出液から、各種クロマトグラフィーを用いてTDCPP分解酵素及びTCEP分解酵素を均一に単離・精製した。各々の酵素は分子質量が約59.6kDaと約58.4kDaの単量体の酵素であること、両酵素は3つのエステル結合のうち一つのエステル結合だけを加水分解する新規トリエステラーゼであること、両酵素は亜鉛を含む金属酵素であることを明らかにした。また、至適pH、至適温度、基質特異性、キネティックパラメーターなども明らかにした。

TDK1株の TDCPP 初発分解酵素であるホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニングを行った。更に、TCM1株の TCEP 初発分解酵素であるホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニングも行い、遺伝子全長の塩基配列を決定した。TDK1株とTCM1株のホスホトリエステラーゼの遺伝子は互いに極めて高い相同性を示したが、既存のホスホトリエステラーゼとの相同性は著しく低かった。

TDK1株及びTCM1株から単離・精製した新規トリエステラーゼの分子量をMALDI-TOF MS

による精密質量分析により決定した結果、天然の酵素は切断を含む翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

サザンブロット解析により、TDK1株やTCM1株には本酵素遺伝子は1コピーしか存在しないことが明らかにされた。

TDK1株及びTCM1株からクローニングした当該遺伝子を大腸菌に導入して形質転換体を得た。誘導発現を行った形質転換体の無細胞抽出液には、本酵素活性が検出されたことから、当該遺伝子は本酵素遺伝子であることが示唆された。

また、TDK1株及びTCM1株の当該遺伝子破壊株を得た。各々の遺伝子破壊株ではTDCPPやTCEPの分解活性が消失し、TDCPPやTCEPを唯一のリン源とする培地での生育は認められず、当該遺伝子は本酵素遺伝子であることが示唆された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

TDCPP分解酵素及びTCEP分解酵素の単離・精製と酵素学的特徴解析、当該酵素遺伝子の単離・同定、当該遺伝子の大腸菌での発現、当該遺伝子破壊株の取得など、ほぼ計画通り、研究が進んでいるため。

4. 今後の研究の推進方策

当該遺伝子プロモーター領域の特定、転写及び翻訳開始点の推定、切断を含む翻訳後修飾の解析、TDK1株及びTCM1株における当該酵素発現誘導機構の解析などについて研究を進める予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 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(15), 5292-5296, 2010. 査読有り.
- ② Takahashi, S., Kawashima, K., Kawasaki, M., Kamito, J., Endo, Y., Akatsu, K., Horino, S., Yamada, R. and Kera, Y.: Enrichment and characterization of chlorinated organophosphate esters-degrading mixed bacterial cultures. J. Biosci. Bioeng., 106(1), 27-32, 2008. 査読有り.

[学会発表] (計22件)

- ① 山田裕里恵・川上和延・鈴木雄斗・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate 分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌における発現. 第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド(神戸市).
- ② 高橋祐樹・間島亮介・吉田知史・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株 有機リン酸加水分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌における発現. 第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド(神戸市).
- ③ Kazunobu Kawakami, Yurie Yamada, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera: Properties of a novel phosphotriesterase from *Sphingomonas* sp. strain TDK1. 17th Asian Symposium on Ecotechnology, 2010年11月12日, Unazuki International Hall "Selene" (黒部市).
- ④ Ryosuke Majima, Yuki Takahashi, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera: Purification and characterization of an organophosphorus hydrolase from *Sphingobium* sp. strain TCM1. 17th Asian Symposium on Ecotechnology, 2010年11月12日, Unazuki International

- Hall "Selene" (黒部市).
- ⑤ 阿部勝正・高橋祐樹・山田裕里恵・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株 新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニング. 第62回日本生物工学会大会、2010年10月29日、ワールドコンベンションセンター・サミット(宮崎市)
 - ⑥ 阿部勝正・鈴木雄斗・山田裕里恵・高橋祥司・解良芳夫: ハロアルキル基含有有機リン酸トリエステルを分解する新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニング. 日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月28日、東京大学駒場Iキャンパス(東京都)
 - ⑦ 阿部勝正・森 淳一・鈴木雄斗・山田裕里恵・高橋祥司・解良芳夫: ハロアルキル基含有有機リン酸トリエステルを分解する新規ホスホトリエステラーゼの機能解析. 第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド(神戸市).
 - ⑧ 鈴木雄斗・山田裕里恵・森 淳一・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate 分解酵素の諸特性解析. 第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市).
 - ⑨ 吉田知史・高橋祐樹・土井由佳・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate 分解酵素の諸特性解析. 第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市).
 - ⑩ 阿部勝正・土居由佳・吉田知史・高橋祥司・解良芳夫: 含塩素有機リン酸トリエステル分解菌の単離とその初発分解酵素の解析. 日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、マリンメッセ福岡(福岡市).
 - ⑪ 森 淳一・鈴木雄斗・盛野 淳・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate 分解酵素の誘導発現と精製. 第61回日本生物工学会大会、2008年9月28日、東北学院大学土樋キャンパス(仙台市).
 - ⑫ 土居由佳・吉田知史・森 慎吾・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株 tris(2-chloroethyl)phosphate 分解酵素の精製と特性解析. 第61回日本生物工学会大会、2008年9月28日、東北学院大学土樋キャンパス(仙台市).