

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：54701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340065

研究課題名(和文)生物機能を利用した液相・気相中ホルムアルデヒドの分解除去技術の開発

研究課題名(英文)Development of technology for degradation of formaldehyde in liquid and gas phases using micro-organism

研究代表者

米光 裕 (YONEMITSU, Hiroshi)

和歌山工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：20290778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：Methylobacterium sp. FD1株からホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子を単離した。この遺伝子を導入した大腸菌の休止菌体は高濃度FA (2.0%)を分解し、ギ酸とメタノールを等モル生成した。またその凍結乾燥菌体も高濃度FAを分解した。一方、布固定化FD1株バイオリアクターを用いて0.1%ホルムアルデヒド含有模擬排水の連続処理を行った結果、FAのほとんどが分解された。また、アルギン酸カルシウム固定化FD1株は気相中のFAを分解した。以上の結果より、FD1株およびFD1株FAジスムターゼ遺伝子組換え大腸菌は液相および気相中のFAを分解する有用な材料になるとわかった。

研究成果の概要(英文)：In present study, the formaldehyde dismutase gene (1,203 bp) was cloned from the genomic DNA of Methylobacterium sp. FD1. The resting Escherichia coli DE3 cells that were transformed with the FD1 formaldehyde dismutase gene degraded high concentrations of formaldehyde (2.0%) and produced formic acid and methanol that were molar equivalents of one-half of the degraded formaldehyde. The lyophilized cells of the recombinant E. coli also degraded high concentrations of formaldehyde. Formaldehyde (0.1%) was almost degraded in cloth-immobilized FD1 cell-bioreactor on the continuous operation. Alginate calcium immobilized FD1 cells degraded formaldehyde in gas phase. From the above results, Methylobacterium sp. FD1 cells and E. coli transformed with FD1 formaldehyde dismutase gene are good candidates for agents to degrade formaldehyde in liquid and gas phase.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Formaldehyde degradation, Methylobacterium sp. FD1 formaldehyde dismutase gene cloning recombinant E. coli immobilized cells

## 1. 研究開始当初の背景

ホルムアルデヒド (FA) は、世界で年間約 800 万 t (日本 120 万 t) と大量に生産されている。その主な用途はフェノール系・尿素系・メラミン系樹脂原料、界面活性剤、防腐剤等々で、様々な分野で使用されている。これらの工場からは上限約 10,000 ppm の FA 含有排水が生じる (Zoutberg, 1997)。また、新建材等に含まれる樹脂や防腐剤から空气中に FA が放出される。FA は「劇物」に指定され、低濃度曝露で眼、気道に強い刺激を与え、シックハウス症候群として問題となっている。また高濃度曝露あるいは大量経口投与で、気道や肺の出血、変性、肝および腎の充血、壊死等を起こす。さらに発がん性も指摘されている。「水生生物保全に係わる水質目標」(環境省 2008) では、淡水域における FA の目標値案は 1 ppm 以下で、厳しい水質基準が設定されている。シックハウス対策のための「建築基準法」(2003) では、室内の FA 濃度を 0.08 ppm 以下に保つこととしている。FA 排水の現在の処理法としては、酸化法(金属触媒、次亜塩素酸ナトリウム、オゾンなど)、焼却法(焼却炉)、吸着法(活性炭など)、活性汚泥法(微生物)などが知られている。酸化法や焼却法は、分解能は高いが危険な薬品の使用やエネルギーがかかるため高価となる。吸着法は吸着後の FA 分解が問題となる。活性汚泥法は中でも最も安全で安価な方法とされるが、FA の毒性のため、水で十分に希釈してからでないと適用できない。一方、空气中の FA の除去には、吸着法(活性炭など)が主流であるが、吸着後の FA 分解が問題となる。そこで、FA を効率よく分解する微生物があれば、その菌体や FA 分解酵素により、安全・安価で効率的な FA 含有廃水処理技術や空气中 FA 分解処理技術に応用できると考えた。既に、FA 分解菌の分離とそれによる FA 分解に関する研究が数多く報告されており、環境分野等で関心度が高い。比較的高濃度の FA 分解例として、*Pseudomonas alcaligenes* が 2,000 ppm (Doronina, 1997) を、*P. pseudoalcaligenes* が 5,920 ppm を分解した (Mirdanadi, 2005) 報告がある。また、*Methylobacterium radiotolerans* SB0202 株は、8,000 ppm を 80% 分解した (渡辺ら、特願 2005-511001)。一方、FA 分解酵素については、酸化還元酵素の一種である FA デヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.46) が複数の微生物より、また FA ジスムターゼ (不均化酵素) (EC 1.2.99.4) が唯一 *P. putida* より発見され、機能解析、遺伝子解析がなされているが、FA 分解への応用の報告は知られていない。我々は、生物機能を利用した液相・気相中のホルムアルデヒド (FA) 分解処理技術の開発を目指し、既に FA 分解菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株を分離している。さらに、FD1 株菌体は高濃度 FA (約 30,000 ppm) を高効率で分解する (同時に菌は死滅すること、FD1 株は FA を分解しメタノールとギ酸をそれぞれ

等量生成すること、FD1 株乾燥菌体が補酵素等の添加無しに FA を効率よく分解すること等を明らかにし、FD-1 株の FA 分解酵素が酸化還元酵素の一種である FA ジスムターゼと示唆された。これらの結果より、FA 分解酵素自身または、それを含む乾燥菌体を利用した FA 分解技術の開発が可能と考えられる。しかし、FD1 株は増殖速度が遅く、酵素や乾燥菌体生産には向かない。そこで、FD1 株から FA 分解酵素遺伝子を単離し、大腸菌で発現すれば、FA 分解酵素やそれを含む乾燥菌体の生産が容易になり、それらを利用した FA 分解方法の開発が可能と考えた。そこで、本研究では、FD1 株の FA 分解酵素遺伝子の単離と大腸菌での発現による酵素生産、FA 分解酵素の特性解析、および FA 分解酵素を利用した液相・気相中 FA 分解処理技術の開発を計画した。

## 2. 研究の目的

*Methylobacterium* sp. FD1 株から FA 分解酵素を精製し、新規 FA 分解酵素遺伝子を単離する。次に、FA 分解酵素遺伝子を大腸菌に導入した遺伝子組換え大腸菌を用いた液相中の高濃度 FA を試みる。また、精製した FA 分解酵素の特性 (反応速度論的解析、至適条件等) を調べる。一方、固定化 FD1 株菌体を用いた液相中および気相中 FA の分解を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) *Methylobacterium* sp. FD1 株からの FA ジスムターゼの精製と nanoLS-MS/MS 分析

FD1 株菌体から超音波破砕器を用いてタンパク質を抽出した。この抽出液中の FA ジスムターゼを硫酸アンモニウム沈殿させ、さらに活性画分を疎水性カラム (HiPrep™ Phenyl FF column, 1.6 × 10 cm) (GE Healthcare) を装着した中圧液体クロマトグラフィーにかけた。移動相は最初 1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 7) を 100 mL 流した後、硫酸アンモニウム濃度を直線的に能動勾配をかけながら 0 M になるまで 305 mL 流した。流速は 2 mL/min で 3 mL づつ分画した。FA ジスムターゼ活性画分は SDS-PAGE にかけるタンパク質を分離した。分離したタンパク質は nanoLS-MS/MS 分析および Mascot 検索にかけた。nanoLS-MS/MS 分析および Mascot 検索は (株) 日本プロテオミクスにて行った。

(2) FD1 株からの FA ジスムターゼ遺伝子の単離

nanoLS-MS/MS 分析で得られた FD1 株 FA ジスムターゼの部分アミノ酸配列から設計した DNA プライマーを用いて PCR 法により FD1 株ゲノム DNA から FA ジスムターゼ遺伝子の一部 (中流域断片) を増幅した。増幅した DNA 断片の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて TAIL-PCR 法により FD1 株ゲノム DNA から FA ジスムターゼ遺伝子の一部 (上流域断片および下流域断片) を増幅した。これら 3 つの断片の塩基配列をジデオキシ法に

より決定し、配列をつなぎ合わせて、FA ジス  
ムターゼ遺伝子の ORF を推定した。この塩基  
配列より、FD1 株 FA ジスムターゼ遺伝子の全  
長鎖を FD1 株ゲノム DNA より PCR により増幅  
した。

(3) FA ジスムターゼ遺伝子組換え大腸菌による  
液相中の FA 分解

FA ジスムターゼ遺伝子 (全長鎖) を pUC19  
の Lac プロモーターの下流に連結した。得られ  
た組換えプラスミドを大腸菌 DE3 株にエレクト  
ロポレーション法により導入した。この遺  
伝子組換え大腸菌の休止菌体および乾燥菌  
体を用いて 0.33 M (1.0%) および 0.67 M  
(2.0%) FA の分解を行った。

(4) FD1 株の FA ジスムターゼの機能解析

FA ジスムターゼの特性として反応速度論  
的解析、至適温度および至適 pH を調べた。  
反応は 30、pH7 にて行った。

(5) 固定化 FD1 菌体を用いた液相中および気  
相中 FA の分解

FD1 株菌体の固定化法は、液相中の FA 分解  
に対しては、担持体として布等を用いた。こ  
の布固定化 FD1 株菌体を装着したバイオリ  
アクターを用いて、0.1%FA 含有模擬排水の連続  
分解処理を行った。また、気相中 FA 分解に  
対しては、担持体としてアルギン酸カルシウム  
を用いた。このアルギン酸カルシウム固定  
化 FD1 株凍結乾燥菌体を入れたガラス瓶に FA  
を適量入れて、放置した。固定化物はメチ  
ルレッドを加えてあり、気相中 FA を分解す  
ると生じたギ酸により赤色に変化する。

(6) 分析方法

FA: アセチルアセトン法に従った。

ギ酸: イオン交換カラム (Shim-pack SCR-102  
H) を装着した高速液体クロマトグラフィー  
(Shimadzu LC-10AT-VP) を用いた。移動相  
は 5 mM p-トルエンスルホン酸、流速は 0.8  
mL/min、カラム温度は 45 とした。検出は電  
気伝導度検出器を用いた。

メタノール: DB-WAX キャピラリーカラム (GL  
Science) を装着したガスクロマトグラフィー  
(Shimadzu GC-14B) を用いた。キャリア  
ガスはヘリウムを使用し、カラム温度は、初  
期温度 50 で 5 分間保持後、20 /min の昇  
温速度で 250 まで上昇させ、5 分間保持し  
た。注入温度および検出温度は 250 とし、  
検出は水素炎イオン化型検出器を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) *Methylobacterium* sp. FD1 株からの FA ジ  
スムターゼの精製と FA ジスムターゼ遺伝子  
の単離

FA 分解菌 *Metylobacterium* sp. FD1 株から  
タンパク質を抽出し、硫酸アンモニウム沈殿  
した結果、硫酸アンモニウム濃度が 50%飽和、  
60%飽和および 70%飽和のとき、比較的高い  
FA ジスムターゼ活性を示した。この活性画分  
を疎水性クロマトグラフィーにかけたところ、  
フラクション番号 71~93 に比較的高い

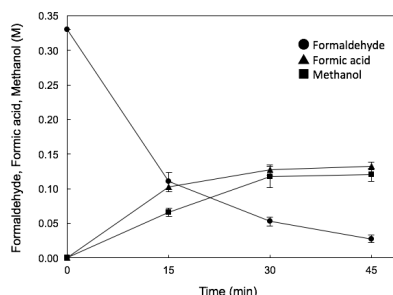


Fig. 1. Degradation of formaldehyde and production of formic acid and methanol by resting *E. coli* DE3 cells transformed with the FD1 formaldehyde dismutase gene

FA ジスムターゼ活性が得られた。この活性画  
分を SDS-PAGE にかき、得られたバンドを  
nanoLC-MS/MS 分析した。その結果、分離した  
43 kDa のバンドからのペプチド断片の  
Mascot 検索したところ、*Cupriavidus* sp.  
SK-3 の全ゲノム解析から推定されたアルデ  
ヒドジスムターゼ (accession no.  
WP\_051648669) と検出された。次に、この検  
出されたペプチド断片のアミノ酸配列より  
設計した DNA プライマーを用いて、FD1 株ゲ  
ノム DNA を鋳型として PCR したところ、アル  
デヒドジスムターゼ遺伝子の一部と思われる  
DNA 断片 (遺伝子の中流域断片) が得られ  
た。さらに、この中流域断片の塩基配列をも  
とに設計したプライマーを用いて FD1 株ゲ  
ノム DNA を鋳型に TAIL-PCR により FA ジスム  
ターゼ遺伝子の一部 (上流域断片および下流域  
断片) と思われる DNA 断片を増幅した。これ  
ら上流域断片、中流域断片および下流域断片  
の塩基配列をつなぎ合わせて、FA ジスム  
ターゼ遺伝子の ORF (1203 bp) を推定した。さら  
に、推定の FA ジスムターゼ遺伝子 (全長鎖)  
を FD1 株ゲノム DNA を鋳型に PCR により増幅  
した。この遺伝子を pUC19 ベクターの lac プ  
ロモーターの下流に連結し、大腸菌 DE3 株に  
導入した。この組換え大腸菌は、FA を分解し、  
メタノールとギ酸を等モル生成した (Fig. 1)。  
以上の結果よりクローニングした遺伝子は  
FA ジスムターゼをコードすることが明らか  
となった。FA ジスムターゼ遺伝子は、今まで  
に *P. putida* からしか単離されておらず、今  
回の FD1 株 FA ジスムターゼ遺伝子は *P. putida*  
以外では初めてである。FD1 株 FA ジスム  
ターゼ遺伝子から推定された FA ジスムターゼの  
アミノ酸配列から、その酵素の分子量は  
42,877.32、pI は 6.56 と計算された。また、  
FD1 株 FA ジスムターゼのアミノ酸配列は、既  
知 *P. putida* F61 株の FA ジスムターゼのア  
ミノ酸配列と 60% の相同性を示した。FD1 株  
FA ジスムターゼのアミノ酸配列には NAD(H)  
結合残基および Zn 結合残基が BLAST 検索に  
より検出され、この酵素がニコチノプロテイン  
と示唆された。

(2) FD1 株 FA ジスムターゼ遺伝子により形質  
転換した大腸菌の休止菌体および凍結乾燥  
菌体による FA 分解

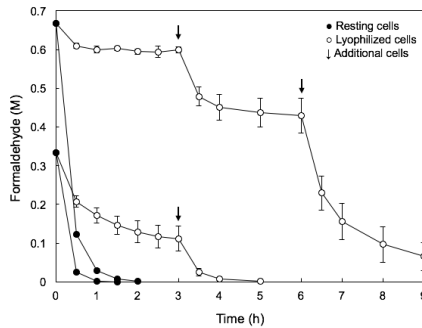


Fig. 2 Degradation of formaldehyde by resting and lyophilized *E. coli* DE3 cells transformed with the formaldehyde dismutase gene of *Methylobacterium* sp. FD1

FD1株FAジスムターゼ遺伝子で形質転換した大腸菌DE3株の休止菌体(OD<sub>660</sub>=0.1)は0.33 M (1.0%) FAを1時間で、また0.67 M (2.0%) FAを1.5時間で、それぞれほぼ完全に分解した(Fig. 2)。また、その凍結乾燥菌体は0.33 M (1.0%) FAの30%を3時間で、また0.67 M (2.0%)の10%を3時間でそれぞれ分解した。これらの反応液に凍結乾燥菌体を追加したところ、いずれも残存したFAのほとんどを分解した(Fig. 2)。これらの結果より、FD1株FAジスムターゼ遺伝子で形質転換した大腸菌の休止菌体および凍結乾燥菌体はFA分解剤として有用であるとわかった。

(3) FD1株FAジスムターゼの反応速度論的解析と至適温度およびpH

FD1株から部分精製したFAジスムターゼの反応速度論的解析を行ったところ、FAジスムターゼ反応はMichaelis-Menten式に従い、そのK<sub>m</sub>値は123 mMと決定された(Fig. 3)。また、FAジスムターゼ活性の至適温度は25~30、至適pHは6.0付近とわかった(Fig. 4)。

(4) 固定化FD1株菌体による液相中および気相中のFA分解

液相中のFA分解について、FA株菌体を担持体である布に固定化し、この固定化FD1株菌体を装着したバイオリアクターを用いて、0.1%FA含有模擬排水を連続処理した。その結果、滞留時間が約24時間で、FAがほぼ完全に分解された。これより、布固定化FD1株菌体バイオリアクターがFA含有排水の処理に有用であると示唆された。今後、実用化に向けてより詳細な条件検討を行う必要がある。一方、気相中のFA分解については、実用化を考慮した時に生菌体は使用しづらいことから凍結乾燥菌体をアルギン酸カルシウムゲルで固定化し、気相中のFA分解を試みた。その結果、50 ppm以上のFA雰囲気下に2日間置いた固定化乾燥菌体は赤色に変化したため、気相中のFAは固定化物に溶解して分解されたと示唆された。また、固定化物中の水分にはメタノールとギ酸が検出され、FAジスムターゼによるFA分解とわかった。しかし、予備的な結果であるため、実用化に向けてより詳細な条件検討が必要である。またメタノールおよびギ酸の残留が課題として残っており、その除去方法の検討も必要である。

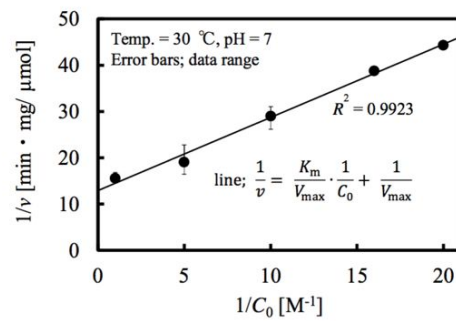


Fig. 3 Lineweaver-Burk plot

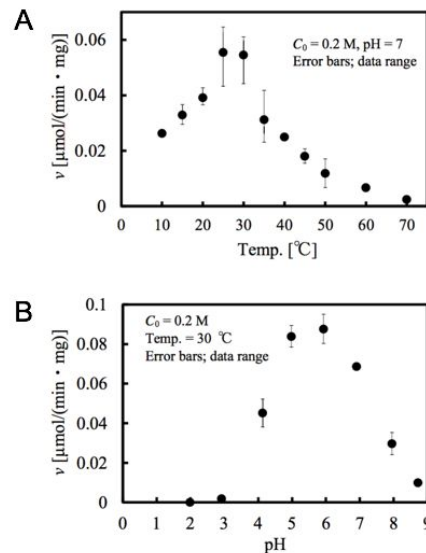


Fig. 4 Effects of temperature and pH on the FD1 formaldehyde dismutase activity  
A: temperature, B: pH

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- (1) Hiroshi Yonemitsu, Emi Shiozaki, Fumina Hitotsuda, Noboru Kishimoto, Yoshiharu Okuno, Kazuki Nakagawa and Koji Hori, Biodegradation of high concentrations of formaldehyde by lyophilized cells of *Methylobacterium* sp. FD1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 80, 2264-2270 (2016).
- (2) Hiroshi Yonemitsu and Yuta Kikuchi, Cloning and expression of a novel formaldehyde dismutase gene from *Methylobacterium* sp. FD1 in *Escherichia coli*. (submitted)

[学会発表](計3件)

- (1) 米光裕, 菊池悠太, 瀬田寛之, 蔵富大智, 岸本昇, 奥野祥治, *Methylobacterium* sp. FD1株のホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子の単離と大腸菌での発現, 日本農芸化学会2016年大会講演要旨集(Web)A4001

(2016).

- (2) 瀬田寛之, 米光裕, 岸本昇, 奥野祥治, 遺伝子組換え大腸菌によるホルムアルデヒド分解, 第18回化学工学会学生発表会(福岡大会)研究発表講演要旨集 p129 (2016).

- (3) 西井太郎, 岸本昇, 米光裕, *M. fujisawaense* FD-1株由来ホルムアルデヒド分解酵素の反応速度論的検討, 第19回化学工学会学生発表会(豊中大会)研究発表講演要旨集 p166 (2017).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米光 裕 (YONEMITSU Hiroshi)  
和歌山工業高等専門学校・物質工学科・教授  
研究者番号: 20290778

### (2) 研究分担者

岸本 昇 (KISHIMOTO Noboru)  
和歌山工業高等専門学校・物質工学科・教授  
研究者番号: 50280433

### (3) 研究分担者

奥野祥治 (OKUNO Yoshiharu)  
和歌山工業高等専門学校・物質工学科・准教授  
研究者番号: 60458073