

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310055

研究課題名(和文) 含塩素有機リン酸トリエステル類分解菌における分解経路とその調節機構の解明

研究課題名(英文) Research on degradation pathway and regulation mechanism of degradation of persistent organophosphorus triesters in the triesters-degrading bacteria.

研究代表者

解良 芳夫 (Kera, Yoshio)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00137168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)： 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蓄積性があり、種々の毒性を有する。

本研究では、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分解菌 *Sphingobium* sp. TCM1 株に存在する初発分解酵素ハロアルキルリン酸加水分解酵素 (TCM-HAD) の発現調節機構と分解経路下流酵素についてタンパク質レベル、遺伝子レベルで解析した。

研究成果の概要(英文)： The chlorinated organophosphorus compounds tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) and tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) are persistent and widespread contaminants in various environments. Many studies have shown several toxic effects of the compounds. We have isolated novel bacteria degrading trihaloalkyl phosphates, *Sphingobium* sp. strain TCM1 and *Sphingomonas* sp. strain TDK1, and purified and characterized phosphotriesterases, catalyzing the first step of TCEP and TDCPP degradation, from strain TCM1 and TDK1, respectively. We designated those enzymes as haloalkylphosphorus hydrolase (TCM-HAD and TDK-HAD). The corresponding genes of the enzymes have been cloned and analyzed.

In this study, we analyzed regulatory mechanism of gene expression of TCM-HAD and possible involvement of two enzymes, phosphodiesterase and phosphomonoesterase such as alkaline phosphatase, in the TCEP degradation.

研究分野：環境生物化学

キーワード：環境保全技術 難分解性有害物 含塩有機リン酸トリエステル 微生物分解 分解酵素 分解酵素遺伝子 遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

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、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、また、PCB 類の代用品として油圧液や潤滑剤などに、大量にかつ広汎に使用されており、様々な環境中で検出されている。これらは魚類に対して、農薬マラチオンなどと同様かそれ以上の急性毒性を示し、蓄積性もあり、催奇形性・変異原性なども報告されている。しかし、特に問題なのはその難分解性で、他の有機リン酸トリエステル類と異なり微生物分解が確認されておらず、これらの物質による環境汚染の進行が危惧されている。

我々は、2004 年度～2007 年度、及び 2008 年度～2011 年度に、日本学術振興会科学研究補助金基盤研究 (B) の助成を受け、野外試料のスクリーニングにより、TDCPP や TCEP に対して高い分解活性を有す含塩素有機リン酸トリエステル類分解菌 *Sphingomonas sp.* TDK1 株と *Sphingobium sp.* TCM1 株を世界で初めて見だし、単離に成功した。次いで、単離微生物を用いて TDCPP や TCEP の分解挙動と特性の解析、分解代謝産物の分析、各種有機リン酸トリエステル類に対する分解特異性などを調べてきた。

また、TDK1 株及び TCM1 株から初発分解酵素であるホスホトリエステラーゼを単離・精製し様々な酵素学的特徴解析を行った。更に、TDK1 株及び TCM1 株のホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニングを行い、その特徴解析を行った。その結果、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ホスホトリエステラーゼであること、TDK1 株と TCM1 株のホスホトリエステラーゼの遺伝子の塩基配列は互いに極めて高い同一性を示したが、既存のホスホトリエステラーゼとの同一性は著しく低く、両酵素は全く新しい酵素であることを明らかにし、各々を TDK-HAD 及び TCM-HAD と命名した。

2. 研究の目的

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分解菌 TDK1 株と TCM1 株に存在する初発分解酵素ハロアルキルリン酸加水分解酵素 (TDK-HAD 及び TCM-HAD) の発現調節機構と分解経路下流酵素をタンパク質レベル、遺伝子レベルで詳細に解析し、分解経路全体を明らかにする。これにより、当該エステル類の分解システムをより詳細に把握し、この分解システムを廃水処理や環境修復への応用、分解システムの強化などに必要な基礎を築くことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、主に以下の項目について研究を行った。試薬や具体的な実験方法・手順等は省略する。

- (1) HAD のペリプラズム間隙局在性に関する解析。
- (2) TDK1 株と TCM1 株のゲノム情報解析
- (3) HAD 遺伝子のプロモーター領域の取得と解析。
- (4) HAD の発現制御に関する因子の解析。
- (5) 分解経路の 2 番目に位置するホスホジエステラーゼ (PDE) の単離・精製と酵素学的特徴解析、及び遺伝子の推定。
- (6) 分解経路の最後 (3 番目) に位置するアルカリ性フォスファターゼ (ALP) の TCEP 分解過程への関与の解析。
- (7) 大腸菌で HAD の単離・精製と酵素学的特性解析。

4. 研究成果

(1) TDK-HAD 及び TCM-HAD 遺伝子の解析により、ペリプラズム間隙への移行シグナルと推定される配列が見いだされた。大腸菌を用いて、当該酵素遺伝子組換え体の局在性を解析した結果、当該酵素はサイトゾル画分とペリプラズム画分の両画分で検出された。

発現レベルを調節できる大腸菌発現系を新たに構築し、TDK-HAD 及び TCM-HAD の局在性について再度解析した結果、当該酵素の大部分はサイトゾル画分で検出された。従って、現段階では、HAD のペリプラズム間隙局在性に関する明確な実験結果は得られていない。今後、TDK1 株と TCM1 株を用いた、分画技術を開発する必要があると考えられる。

(2) TDK1 株と TCM1 株のドラフトゲノム配列情報を解析し、DDBJ/EMBL/GenBank databases に登録・公開した。それぞれの accession 番号は LXVY000000000 と LXVX000000000 である。詳細は、[雑誌論文] 1. Kera et al. (*in press*) を参照。

(3) TCM1 株のゲノムから HAD 遺伝子の推定プロモーター領域を取得し、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いた HAD 遺伝子のプロモーター解析用ベクターを作成した。また、レポーターアッセイから HAD 遺伝子上流 186 bp がプロモーターとして機能することを明らかにした。更に、当該遺伝子プロモーターの欠失解析により、遺伝子上流 -37 bp から -75 bp の間の 39 bp 領域がプロモーター活性および無機リン酸濃度に依存した発現制御に重要であることが示された。

(4) TDK-HAD 及び TCM-HAD は TDCPP や TCEP により特異的に誘導合成されるのではなく、むしろ無機リン酸の枯渇により誘導さ

れる可能性が示唆された。そこで、他の細菌で明かにされている Pho レギュロン制御系遺伝子群の塩基配列情報をもとに、TCM1 株の Pho レギュロン制御系遺伝子群の部分 DNA 断片を取得した。

また、TCM1 株のゲノム情報を明らかにし、無機リン酸濃度に応答して発現する遺伝子 (Phoレギュロン遺伝子) の発現制御に関わる遺伝子群 (*phoR*, *pstSCAB*, *phoU* と *phoB*) の遺伝情報を明らかにした。更に、HAD 遺伝子が Pho レギュロン遺伝子であることを明らかにするため、転写因子をコードする *phoB* 遺伝子の破壊ベクターを作成した。TCM1 株の Pho レギュロン転写因子である Pho B 遺伝子の大腸菌発現ベクターを構築した。今後、これらを用いて解析を行う予定である。

(5) TCM1 株からホスホジエステラーゼ (PDE) を単離・精製し、酵素学的諸特性を解析した結果、当該精製酵素標品は、HAD による TDCPP や TCEP の分解産物である各々のビス体を分解することが示され、TDCPP や TCEP などのハロアルキル有機リン酸トリエステル類の分解過程に関与できることが示された。また、当該精製酵素 (PDE) 標品は、cAMP や cGMP も基質とすることが示された。更に、PDE の N 末端アミノ酸配列解析を行い、既に得られている TCM1 株ドラフトゲノム配列との相同性解析を行った結果、本酵素と思われる遺伝子が推定された。

(6) TCM1 株のゲノム配列から4つの推定アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 遺伝子を見いだした。大腸菌での発現と各遺伝子破壊株の解析から、2つの ALP (*SbPhoA*, *SbphoX-11*) が TCEP 分解過程に関与することが示された。TCM1 株に於ける 2-chloroethyl phosphate の分解に関与すると示唆された2つの ALP 遺伝子のうち、*SbphoX-11* 遺伝子が主要な役割を果たしていることが示された。

(7) 大腸菌で発現させた HN タグ融合 HAD を可溶性画分から単離・精製して酵素学的特性を解析した結果、発現産物は TDK1 株及び TCM1 株から単離・精製された天然型 HAD と類似する特性を有することが示された。これにより、今後、HAD の活性・構造相関の解析や高機能化を目指した改変を行う際の比較対象となるデータが得られた。

5. 主な発表論文等

(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5件)

1. S. Takahashi, Y. Obana, S. Okada, K. Abe and Y. Kera: Complete detoxification of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate by mixed two bacteria, *Sphingobium* sp. strain TCM1

and *Arthrobacter* sp. strain PY1. *J. Biosci. Bioeng.*, 113, 79-83, 2012. 査読有り.
DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.08.020

2. S. Takahashi, K. Miura, K. Abe and Y. Kera: Complete detoxification of tris(2-chloroethyl) phosphate by two bacterial strains: *Sphingobium* sp. strain TCM1 and *Xanthobacter autotrophicus* strain GJ10. *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 306-311, 2012. 査読有り.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.04.010.
3. Y. Kera, S. Takahashi and K. Abe: Biodegradation of persistent chlorinated organophosphorus flame retardants by microorganisms newly isolated from soil- a short review. *Transactions on GIGAKU* 1(2012)01011/1-4. 査読有り.
4. K. Abe, S. Yoshida, Y. Suzuki, J. Mori, Y. Doi, S. Takahashi and Y. Kera: Haloalkylphosphorus hydrolases purified from *Sphingomonas* sp. strain TDK1 and *Sphingobium* sp. strain TCM1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(18), 5866-5873, 2014. 査読有り.
DOI:10.1128.AEM.01845-14.
5. Y. Kera, K. Abe, D. Kasai, M. Fukuda and S. Takahashi: Draft genome sequences of *Sphingobium* sp. strain TCM1 and *Sphingomonas* sp. strain TDK1, haloalkyl phosphate flame Retardant and plasticizer-degrading bacteria Genome Announcement, genomeA00668-16, in press.2016. 査読有り.

[学会発表](計28件)

1. 小林豊和・川上和延・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の機能解析. 第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場(神戸市)。
2. 樺澤貴宏・間島亮介・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株におけるハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の特徴解析. 第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場(神戸市)。

3. 恩田穰・佐竹育子・小沼功・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：難分解性難燃剤を分解する微生物の単離と特徴解析．日本農芸化学会 2012 年度関東支部大会、2012 年 10 月 27 日、新潟薬科大学（新潟市）。
4. 樺澤貴宏・間島亮介・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：*Sphingobium* sp. TCM1 株新規ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の特徴解析．日本農芸化学会 2012 年度関東支部大会、2012 年 10 月 27 日、新潟薬科大学（新潟市）。
5. 小林豊和・川上和延・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：*Sphingomonas* sp. TDK1 株におけるにおけるハロアルキリン酸加水分解酵素の機能解析．日本農芸化学会 2012 年度関東支部大会、2012 年 10 月 27 日、新潟薬科大学（新潟市）。
6. 阿部勝正・川上和延・高橋祥司・解良芳夫：*Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸加水分解酵素の生理機能解析．第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日福岡国際会議場（福岡市）。
7. 恩田 穰・三浦兼春・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：難分解性環境汚染物質リン酸トリス（2-クロロエチル）の微生物分解技術の開発．環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会、2013 年 5 月 30 日、北九州国際会議場（北九州市）。
8. Y. Onda, K. Miura, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Microbial detoxification of a persistent environmental contaminant, tris(2-chloroethyl) phosphate. The 2st international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2013), 2013 年 6 月 22 日, Nagaoka University of Technology (長岡市)。
9. 恩田 穰・三浦兼春・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：難分解性環境汚染物質リン酸トリス（2-クロロエチル）の微生物分解除去技術の開発．第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜（横浜市）。
10. 恩田 穰・間島亮介・樺澤貴宏・阿部勝正・高橋祥司・解良夫：*Sphingobium* sp. TCM1 株におけるホスホトリエステラーゼの発現制御機構の解析．第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 20 日、広島国際会議場（広島市）。
11. Y. Sakuraba, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Cloning of the gene for tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate-degrading enzyme from *Sphingomonas* sp. TDK1. The 3rd international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2014), 2014 年 6 月 21 日, Nagaoka University of Technology (長岡市)。
12. S.-J. Lee, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Cloning of the gene for tris(2-chloroethyl)phosphate-degrading enzyme from *Sphingobium* sp. TCM1. The 3rd international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2014), 2014 年 6 月 21 日, Nagaoka University of Technology (長岡市)。
13. H. Katanuma, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Identification and characterization of putative alkaline phosphatase gene of a persistent flame retardant-degrading bacterium. The 3rd international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2014), 2014 年 6 月 21 日, Nagaoka University of Technology (長岡市)。
14. 阿部勝正・小林豊和・櫻庭裕樹・高橋祥司・解良芳夫：*Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の分泌に関する検討．2014 年度日本生物工学会大会、2014 年 9 月 9 日、札幌コンベンションセンター（札幌市）。
15. 櫻庭裕樹・小林豊和・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：*Sphingomonas* sp. TDK1 株有機リン酸トリエステル加水分解酵素の局在解析．第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館（京都市）。
16. 李誠駿・樺澤貴宏・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：*Sphingobium* sp. TCM1 株ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の局在解析．第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館（京都市）。
17. 片沼拓士・阿部勝正・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推定アルカリホスファターゼ遺伝子の同定と解析．第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館（京都市）。
18. 片沼拓士・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫：難分解性難燃剤分解菌のアルカリホスファターゼの同定と特徴解析．2014

- 年環境微生物系学会合同大会、2014年10月22日、アクトシティー浜松（浜松）。
19. K. Abe, S. Takahashi, Y. Kera: Characterization of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingomonas* sp. strain TDK1. HUST - NUT Joint Symposium 2014, 2014年11月27日、Hanoi University of Science and Technology, (Hanoi, Vietnam)
 20. K. Miura, K. Kawakami, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Physiological role of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingomonas* sp. strain TDK1. The 4th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2015), 2015年6月20日、Nagaoka University of Technology, Nagaoka (長岡市)。
 21. M. Akimoto, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Identification and characterization of putative alkaline phosphatase genes of a persistent frame retardant-degrading Bacterium. The 4th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2015), 2015年6月20日、Nagaoka University of Technology, Nagaoka (長岡市)。
 22. Y. Nishigori, R. Majima, K. Abe, S. Takahashi and Y. Kera: Physiological role of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingobium* sp. Strain TCM1. The 4th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2015), 2015年6月20日、Nagaoka University of Technology, Nagaoka (長岡市)。
 23. 阿部勝正・鈴木雄斗・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株 含塩素有機リン酸トリエステル加水分解酵素遺伝子のクローニング .平成 27 年度日本生化学会関東支部例会 / 第 56 回新潟生化学懇話会、2015 年 6 月 20 日、新潟日報メディアシップ 6F (新潟市)。
 24. 阿部勝正・向井奈緒子・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株ホスホジエステラーゼの精製と特徴解析 . BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 11 月 1 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) (神戸市)。
 25. 三浦 克恵・阿部 勝正・高橋 祥司・解良
- 芳夫: 組換えハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素の諸特性解析 . BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 11 月 1 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) (神戸市)。
26. 西郡祐輝・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫: 組換え含塩素有機リン酸トリエステル加水分解酵素の精製と諸特性解析 . BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 11 月 1 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) (神戸市)。
 27. 秋元茉耶・恩田穰・高橋祥司・阿部勝正・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株におけるホスホトリエステラーゼの発現制御機構の解析 . BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 11 月 3 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) (神戸市)。
 28. 阿部勝正・向井奈緒子・牧野剛・高橋祥司・解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株ホスホジエステラーゼの特徴解析とクローニング .日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)。
- 〔図書〕(計 1 件)
1. S. Takahashi, K. Abe and Y. Kera: Microbial Degradation of Persistent Organophosphorus Flame Retardants. In: Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications (Ed., Petre, M.), pp. 91-122, ISBN 978-953-51-0972-3, InTechInTech, Rijeka (Croatia), 2013.
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等
該当なし
6. 研究組織
(1) 研究代表者
解良 芳夫 (KERA YOSHIO)
長岡技術科学大学・工学部・教授
研究者番号: 0 0 1 3 7 1 6 8

(2)研究分担者

高橋 祥司 (TAKAHASHI SHOUJI)
長岡技術科学大学・工学部・准教授
研究者番号：9 0 3 2 4 0 1 1

阿部 勝正 (ABE KATSUMASA)
長岡技術科学大学・工学部・助教
研究者番号：4 0 5 0 9 5 5 1

(3)連携研究者

該当無し