

平成30年6月24日現在

機関番号：31302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12239

研究課題名(和文)代謝工学を利用したトリクロロエチレン生育細菌の育種および分解処理

研究課題名(英文) Development of a genetically engineered microorganism able to grow on trichloroethene and its application to the treatment

研究代表者

中村 寛治 (Nakamura, Kanji)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：90382655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：好気的なトリクロロエチレン(TCE)の分解処理を目指して、TCEを炭素源として生育できる新しい組換え体の開発を試みた。フェノールヒドロキシラーゼ(PH)はTCEをグリオキシル酸経由で完全分解することから、PH遺伝子を基に、新しい組換え体を開発した。2種類のPH遺伝子を基に、ハイブリッドPH遺伝子を作成し、極めて効率的にTCEを分解できる組換え体を構築した。また、宿主にはグリオキシル酸を資化できるCupriavidus属細菌を利用した。その結果、本組換え体は極めて効率的にTCEを分解した。一方、TCE分解で最初に生ずるTCEエポキシドからの代謝過程で生ずる毒性のある物質の無毒化は成功しなかった。

研究成果の概要(英文)：Development of a genetically engineered microorganism (GEM) able to grow on trichloroethene (TCE) was carried out for cleanup a TCE contaminated site aerobically. Phenol hydroxylase (PH) is known to degrade TCE completely via glyoxylate. We tried to develop a new GEM that degrade TCE efficiently. After analyzing TCE degradability of PH genes, a new hybrid PH gene made from 2 different PH genes was developed to make a GEM that could degrade TCE efficiently. Also a Cupriavidus bacterium was used as a host of the gene, because that bacterium was able to use glyoxylate as a sole carbon source for growth. However, we did not succeeded in decreasing toxicity of TCE epoxide by introducing etnE that metabolize vinyl chloride (VC) epoxide.

研究分野：環境生物学

キーワード：トリクロロエチレン 分解処理 フェノールヒドロキシラーゼ グリオキシル酸

1. 研究開始当初の背景

トリクロロエチレン (TCE) は世界各地で地下水を広く汚染している環境汚染物質であり、発がん性の危険性があり、早期浄化が望まれている。1980年代は、主に、汚染地下水の揚水曝気処理によって処理が行われてきた。曝気した TCE は基本的には活性炭等によって吸着除去され、最終的に吸着された TCE は熱分解 (焼却) 処理されていた。しかしながら、揚水曝気処理は、多くの汚染サイトで 10 年を越えても浄化が終了しないケースが見受けられ、根本的な解決には程遠い処理法であった。

1990 年代になると、*Dehalococcoides* 属 (Dhc) 細菌が発見され、本細菌を利用した浄化技術が多くの汚染現場で適用されるようになった。Dhc 細菌は水素を電子供与体に、塩素化エチレンを電子受容体に利用するハロゲン呼吸を行う。汚染現場の土壤中に乳酸ナトリウム等の有機物を添加すると、一般嫌気性細菌の分解によって水素が発生する。この水素を利用して、Dhc 細菌による TCE 分解 (反応はジクロロエチレン ビニルクロライド エチレンと進む) が可能となるのである。本手法の適用によって、多くの汚染サイトが浄化された。

一方、アメリカ EPA 作成のガイドラインにもある通り、Dhc 細菌を利用できる汚染現場は、有機物添加によって嫌気条件を容易に整えることができる汚染現場に限られている。帯水層が浅い場合、大気からの酸素移行によって、地下水が好気条件となるため、Dhc 細菌の処理は期待できない。好気的な TCE の分解は、これまでコマタボリズム (共代謝) によって行われ、地下水へのメタン注入 (メタンモノオキシゲナーゼの誘導)、トルエンの注入 (トルエンオキシゲナーゼの誘導)、フェノールの注入 (フェノールヒドロキシラーゼの誘導) が汚染現場で試みられた。しかしながら、これらの手法によって完全な分解除去が行われたケースは実規模で存在しない。

2. 研究の目的

前述の通り TCE は地下水を汚染している有機塩素化合物であり、発がん性の危険性があるため、早期浄化が望まれている。分解処理に関しては、嫌気性の Dhc 細菌による処理が実用化されている。一方、汚染場所の帯水層 (地下水) が比較的浅く、酸素を多く含んでいる場合は、本嫌気手法を適用できない。そこで、本課題では、好気的な処理を可能にすべく、TCE で生育 (=分解) 可能な新規好気性細菌の育種 (=組換え体の開発) を検討する。具体的には TCE 分解能を有するフェノールヒドロキシラーゼ酵素の遺伝子を基に、TCE を唯一の炭素源に増殖できる新規微生物を代謝工学・遺伝子工学によって育種する。

3. 研究の方法

背景に記述した TCE 分解酵素の内、トルエンオキシゲナーゼとフェノールヒドロキシラーゼは TCE をグリオキシル酸経路で分解するものがあることが知られている (図-1 の左の代謝経路)。TCE から TCE エポキシドの変換には NADH が必要とされるが、グリオキシル酸の分解では、それ以上のエネルギーが得られ理論的には増殖基質となりうる。また、グリオキシル酸を唯一の炭素源として生育できる細菌は環境中に多く存在する。それゆえ、代謝経路を整え、TCE をグリオキシル酸経路で分解できれば、原理的に TCE を増殖基質として利用することが可能となる。本研究ではこの代謝経路での TCE 分解処理を可能にし、同時に代謝によって得られるエネルギーで増殖する新規微生物の育種を行い、分解処理が可能であることを実験により明らかにする。

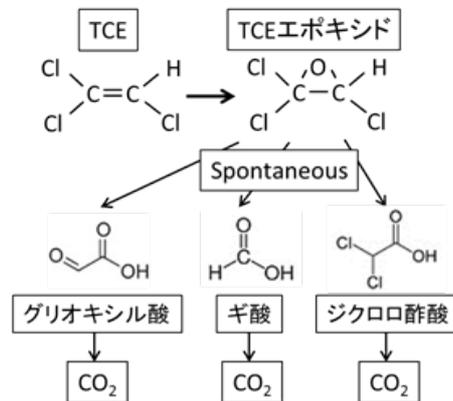


図-1 TCEの代謝経路

実験内容は、以下の通りとした。

- (1) グリオキシル酸資化細菌の単離及び評価
- (2) 高 TCE 分解能を有する分解酵素の開発
- (3) TCE 中間代謝物の毒性回避の検討

4. 研究成果

(1) グリオキシル酸資化細菌の単離

宮城県内を流れる、複数の河川水からグリオキシル酸を資化できる細菌の集積および単離を試み、比較的速くグリオキシル酸を分解できる細菌 3 株を取得した。1 株は *Comamonas* 属細菌で、残りの 2 株は *Hydrogenophaga* 属細菌であった。また、これまでにフェノール資化細菌で、フェノールヒドロキシラーゼ (PH) を保有し、既に TCE 分解能が確認されている *Cupriavidus* sp. KN1 株および TW2 株についても、グリオキシル酸資化能を評価した。評価項目は、グリオキシル酸 20mM を含む無機培地中での増殖速度、および最終細菌濃度とした。その結果、新たに単離した *Comamonas* 属細菌、*Cupriavidus* sp. KN1 株および TW2 株は、増殖速度、到達細菌濃度にほとんど差はなく、効率的にグリオキシル酸を資化できた。このこ

とから、既に TCE 分解能が確認されている、*Cupriavidus* sp. KN1 株あるいは TW2 株を宿主として利用できることが明らかとなった。

(2) 高 TCE 分解能を有する分解酵素の開発

TCE 分解によるグリオキシル酸の生産および分解でエネルギーを得るためには、TCE 分解の比活性の高い分解酵素を利用することが望ましい。そこで、これまでに単離した 6 株の *Cupriavidus* 属細菌（前述の KN1 株および TW2 株を含む）から PH 遺伝子を取得し、*Cupriavidus* sp. KN1- PH 株（KN1 株から PH 遺伝子を取り除いた株）を宿主として、その TCE 分解能を評価した（これら PH は、グリオキシル酸経路で TCE を完全分解することが、過去の研究成果から分かっている）。その結果、TCE 分解能が高い場合は、2 つのケースが存在することが分かった。一つは、PH 遺伝子の転写活性が高く、生産される PH 量が大きい場合、もう一つは、生産 PH 量は低いが、PH の TCE 分解比活性が高い場合であった。

（詳細は雑誌論文(1)を参照）

これらの結果を受けて、2 種類の PH 遺伝子（*Cupriavidus* sp. TW2 株および TOS2 株由来）の特徴を合わせ持つ、PH 生産量および比活性の両方が高い、ハイブリッド遺伝子の開発を試みた。作成した 8 種類のハイブリッド PH 遺伝子は、図-2 に示すとおりである。また、PH は、以下の図-3 に示す配置となっており、6 つの構成タンパクから成るマルチコンポーネントタイプの酵素である。

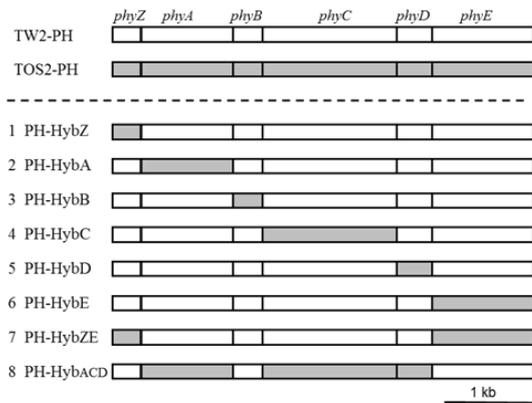


図-2 親株の PH 遺伝子および作製したハイブリッド PH 遺伝子の構成

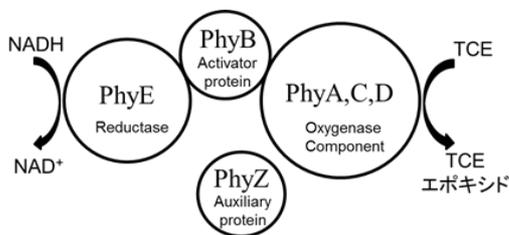


図-3 PH の構成タンパクの推定機能（PhyZ の結合位置は不明）

複数の組合せによる TCE 分解能の評価から、図-2 の 7 の TW2 株の *phyABCD* と TOS2 株の *phyZE* を組み合わせる（=PH-HybZE）ことによって、極めて高い TCE 分解能を有するハイブリッド遺伝子が構築できることが明らかとなった。

TCE 分解比活性を比較した結果は、図-4 に示すとおりである。バイアルピンをを用いた、酸素を含む閉鎖系で TCE 分解試験を行い、まず TCE 分解速度を求めた。また、PH 遺伝子群の下流に、緑色蛍光タンパク質の遺伝子を導入し、その発現量が PH 量に比例するとして、緑色蛍光タンパクの強度（図中の縦軸、FSU）当たりの TCE 分解速度で整理した。左の 2 つの白色の棒グラフは 2 株の親株の TCE 分解活性である。3 番目からのグレーの棒グラフの 7 番目の PH-HybZE が著しく TCE 分解活性が高いことが分かる。

（詳細は雑誌論文(2)を参照）

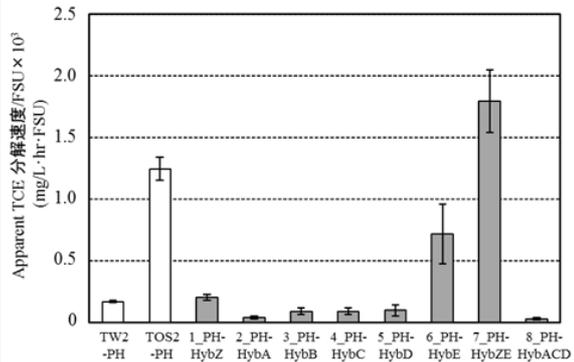


図-4 各 PH 遺伝子の TCE 分解活性

(3) TCE 中間代謝物の毒性回避の検討

最後に、TCE 中間代謝物の毒性回避を目的として、TCE と同様の骨格を有するビニルクロライド (VC) の VC エポキシドを代謝する、epoxyalkane:coenzyme M (CoM) transferase (EaCoMT) をコードする *etnE* 遺伝子を PH 遺伝子下流に導入した。*etnE* 遺伝子は、ATCC から入手した *Nocardioides* sp. Strain JS614 の抽出 DNA (BAA-499D-5) をテンプレートに、PCR により合成、取得した。

本 *etnE* 遺伝子を、前項のハイブリッド PH 遺伝子下流に導入して、その毒性回避効果を検討した。しかしながら、毒性は回避できず、ハイブリッド PH 遺伝子と *etnE* 遺伝子が共に染色体上組み込まれた *Cupriavidus* sp. KN1- PH 株は、TCE 分解中間代謝産物によって死滅した。

本研究を通して、PH 遺伝子の詳細な解析を基に、高い TCE 分解能を有するハイブリッド PH 遺伝子の構築に成功した。しかしながら、最終的な目標である、TCE 分解における中間代謝物の毒性の回避、は実現することができなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) 中村寛治, 渡辺健幸: 蛍光タンパク質をレポーターとしたフェノールヒドロキシラーゼの TCE 分解能評価, 土木学会論文集 G (環境), 査読あり, Vol. 72, pp. 275-283 (2016)

http://doi.org/10.2208/jscejer.72.III_275

(2) 中村寛治, 加藤俊明, 高橋光, 高橋京平, 盛尚樹: フェノールヒドロキシラーゼのハイブリッド化による高 TCE 分解能の発現, 土木学会論文集 G (環境), 査読あり, Vol. 73, pp. 195-202 (2017)

http://doi.org/10.2208/jscejer.73.III_195

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)前項の(1)は学会発表を伴う。
第 53 回 環境工学研究フォーラム, 北九州国際会議場, 2016 年 12 月 6 日~8 日

(2)前項の(2)は学会発表を伴う。
第 54 回 環境工学研究フォーラム 岐阜大学, 2017 年 11 月 17 日~19 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中村 寛治 (NAKAMURA, Kanji)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号: 90382655