

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02974

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システムの全容解明と強化

研究課題名(英文) Research on degradation systems of persistent chlorinated 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・工学研究科・教授

研究者番号：00137168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000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 株に存在する分解システムとその調節機構を詳細に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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 株に存在する分解システムとその調節機構を詳細に解析することは、学術的な貢献度が極めて高く、かつ独創的な点である。

また、得られた知見は、当該化合物を含む廃水の処理や汚染水域の環境保全・修復など、世界に先駆けた環境技術開発の基礎となるものであり、社会的な意義や貢献度も極めて大きい。

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. In this study, we analyzed the degradation systems of persistent chlorinated organophosphorus triesters in the triesters-degrading bacteria, the strain TCM1.

研究分野：環境生物化学

キーワード：環境技術 難分解性有害物 微生物分解 分解酵素 遺伝子 遺伝子発現調節

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (以下 TDCPP) (図1) 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

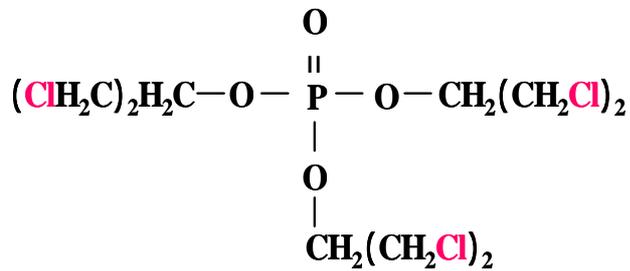


図1 . Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) の構造

されており、様々な環境中で検出されている。これらはメダカ、キンギョ、ニジマスなどの魚類に対して、農薬マラチオンなどと同等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・遅発性神経毒性も報告されている。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、我々が研究を開始した時には、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た。2011年5月の“nature news”には、“A burning issue”として乳幼児の衣類に代表される多くの“Baby products”に添加されているTDCPP等の難燃剤の毒性影響が取り上げられた。

我々は、これまで、2004年度～2007年度、2008年度～2011年度、2012年度～2015年度に、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る含塩素有機リン酸トリエステル類分解菌 *Sphingobium sp.* TCM1 と *Sphingomonas sp.* TDK1 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ホスホトリエステラーゼであるが、基質特異性は既報のホスホトリエステラーゼと著しく異なること、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、既報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、これらの酵素を Haloalkylphosphorus hydrolases (TDK-HAD と TCM-HAD)と命名した。

その後、活性が高いTCM-HADを有し、TDCPPやTCEPの分解能が高いTCM1株を用いて研究を進め、以下の成果をあげた。(1)TCM-HAD遺伝子のプロモーター領域の取得・解析し、リン酸濃度に応答して機能する転写調節因子結合領域(Pho box)を推定した。(2)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を行い、得られた酵素がTDCPPやTCEPの分解過程に關与する可能性を示した。(3)分解経路の最後(3番目)に位置すると考えられるアルカリホスファターゼ(ALP)に関して、4つの推定ALP遺伝子を見だし、その内2つのALPがTCEP分解過程に關与することを明らかにした。

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 *Sphingomonas sp.* TDK1 株と *Sphingobium sp.* TCM1 株に存在する初発分解酵素ホスホトリエステラーゼ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、分解システムの全容を明らかにする。また、分解システムの強化をはかり、当該化合物を含む廃水処理や環境保全・修復への応用技術の開発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については省略する。

- (1) PDE 遺伝子の異種細胞での発現
- (2) HAD 遺伝子プロモーターの発現調節機構の解析
- (3) 組換え PDE の精製
- (4) ALP 遺伝子の異種細胞での発現と発現産物の単離・精製・特徴解析
- (5) TCEP 分解酵素群の発現調節機構の解明
- (6) タグ融合 PDE の異種細胞での発現と精製
- (7) TCEP 分解酵素群の転写調節因子の解析
- (8) タグ融合 PDE の異種細胞での発現と精製
- (9) TCEP 分解酵素 (PDE) の強化に関する研究

4. 研究成果

(1) PDE 遺伝子の異種細胞での発現

TCM1 株ホスホジエステラーゼ (PDE) 遺伝子の大腸菌発現系を作成し、PDE の大量発現に成功した。可溶性画分における PDE 活性は、対照の大腸菌では検出されなかったが、組換え PDE を発現している大腸菌では $2.92 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であった。

(2) HAD 遺伝子プロモーターの発現調節機構の解析

TCM1 株の PhoB 遺伝子破壊株の作成に成功した。今後、PhoB 遺伝子破壊株の生育挙動および TCEP や TDCPP 分解への影響の解析を予定している。

TCM1 株 PhoB 遺伝子の大腸菌発現系を作成し、クロマトグラフィーを用いた精製により電気泳動的に単一の組換え PhoB の取得に成功した。また、精製した組換え TCM1 株 PhoB が自己リン酸化能を有していることを明らかにした。

(3) 組換え PDE の精製

組換え型 PDE の単離・精製を試みたが、精製途中で活性が失われた。今後、精製を簡便にするため、種々のタグ融合PDE発現系の構築を行う予定である。また、作成した TCM1 株の PDE 遺伝子破壊株は、TCEP を唯一のリン源とした培地では野生株と同等の生育を示したことから、PDEは TCEP 分解代謝において重要な役割を担っていないことが示された。

(4) ALP 遺伝子の異種細胞での発現と発現産物の単離・精製・特徴解析

TCM1 株の PhoK ALP を His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより単一にまで精製し、種々の酵素学的諸特性を明らかにした。

(5) TCEP 分解酵素群の発現調節機構の解明

PhoB 遺伝子破壊株、および Pst 遺伝子破壊株は、TCEP を唯一のリン源とした培地では、野

生株と同等の生育を示したことから、各々の遺伝子破壊は TCEP 分解代謝に大きな影響を与えないことが示された。

(6) タグ融合 PDE の異種細胞での発現と精製

大腸菌で大量発現させた His タグ融合 PDE の金属キレートカラムを用いた精製条件を検討した結果、精製で用いる全緩衝液中に ZnCl_2 を 50 μM 添加することで活性が大幅に回復することが明らかになった。また、本酵素が金属キレートカラムのみで高純度・高収量 (100 mL 培養から 7.9 mg) で簡便に精製できることも示された。

(7) TCEP 分解酵素群の転写調節因子の解析

TDCPP 分解代謝における Pho レギュロン転写因子 PhoB の重要性を探るため、phoB 遺伝子破壊株の TDCPP を唯一のリン源とした培地における生育を観察したところ、TCEP の場合と同様に、TDCPP を唯一のリン源とした生育に影響を与えなかった。したがって、分解代謝系酵素遺伝子の基底レベルでの発現もしくは PhoB に依存しない発現機構を有する他の分解酵素による分解代謝により生育が支持されたと考えられた。

(8) タグ融合 PDE の異種細胞での発現と精製

(6) では、His-tag を用いた大腸菌発現系を構築したが、今回は、PDE の補因子である 2 価金属に影響を及ぼさないとされる Strep タグを用いた発現系の構築を行った。Strep タグ融合 PDE の大腸菌中で大量発現には成功したが、その無細胞抽出物における活性は野生型の組換え酵素と比較し、著しく減少していた。培養時、菌体破碎に補因子である亜鉛を添加した場合の活性についても検討したが、活性は回復しなかった。

(9) TCEP 分解酵素の強化に関する研究

本酵素の構造的知見を得るため、過去に推定されている金属配位残基の中でも酸性アミノ酸残基に着目し、3 つの変異型 PDE 発現系を構築した。D68A 変異型 PDE は野生型 PDE と同程度の活性が確認され、金属配位に重要な役割を担っていないことが明らかになった。一方で E135A, D260A 変異型 PDE は活性が著しく低下し、本酵素の金属配位に重要な役割を担っていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abe, K., Mukai, N., Morooka, Y., Makino, T., Oshima, K., Takahashi, S. and Kera, Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 An atypical phosphodiesterase capable of degrading haloalkyl phosphate diesters from <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2 8 4 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-03142-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kera, Y., Abe, K., Kasai, D., Fukuda, M., Takahashi, S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Draft genome sequences of <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1 and <i>Sphingomonas</i> sp. strain TDK1, haloalkyl phosphate flame retardant and plasticizer-degrading bacteria.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genome Announcement	6. 最初と最後の頁 e00668-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00668-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi, S., Katanuma, H., Abe, K., Kera, Y.	4. 巻 101
2. 論文標題 Identification of alkaline phosphatase genes for utilizing a flame retardant, tris(2-chloroethyl) phosphate, in <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 2153-2162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-016-7991-9	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 -
1. 著者名 Takahashi S, Morooka Y, Kumakura T, Abe K, Kera Y.	4. 巻 104
2. 論文標題 Enzymatic characterization and regulation of gene expression of PhoK alkaline phosphatase in <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl Microbiol Biotechnol..	6. 最初と最後の頁 1125-1134.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10291-6.	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18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Seiya Konno, Toshihiro Imai, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
2. 発表標題 Investigation of the Role of Signal-like Sequence of Organophosphorus Hydrolase from <i>Sphingobium</i> sp. TCM1.
3. 学会等名 The 7th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Kawaguchi, Takeshi Makino, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
2. 発表標題 Expression and Purification of Phosphodiesterase from <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.
3. 学会等名 The 7th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今野 聖矢, 今井 俊宏, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素中のシグナル様ペプチドの機能解析.
3. 学会等名 第 70 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 勝正, 田中 成美, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 変異型ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素の大腸菌発現系の構築と諸特性解析.
3. 学会等名 第 70 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 誠之, 牧野 剛, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 Sphingobium sp. TCM1株ホスホジエステラーゼの発現と精製.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 勝正, 今野 聖矢, 今井 俊宏, 高橋 祥司, 解良 芳夫
2. 発表標題 有機リン加水分解酵素中に見いだされた新奇シグナル様配列の機能解析.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Morooka, Shouji Takahashi, Hiroshi Katanuma, Katsumasa Abe, Yoshio Kera
2. 発表標題 Enzymatic properties of PhoK alkaline phosphatase of Sphingobium sp. Strain TCM1.
3. 学会等名 The 6th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2017), (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Narumi Tanaka, Katsue Miura, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
2. 発表標題 Expression, affinity purification, and characterization of NH-tagged haloalkylphosphorus hydrolase.
3. 学会等名 The 6th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2017), (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaya Morinaga, Shouji Takahashi, Katsumasa Abe, Yoshio Kera
2. 発表標題 Functional analysis of a phosphodiesterase gene in the metabolism of an organophosphorus flame retardant in <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.
3. 学会等名 The 6th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2017), (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahito Kumakura, Shouji Takahashi, Maya Akimoto, Katsumasa Abe, Yoshio Kera
2. 発表標題 Regulation of phosphotriesterase gene expression in the organophosphorus flame retardant-degrading bacterium <i>Sphingobium</i> sp. strain TCM1.
3. 学会等名 The 6th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2017), (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中成美・三浦克恵・西郡祐輝・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫
2. 発表標題 変異型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.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年会 (第90回日本生化学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 諸岡由佳・片沼拓士・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫
2. 発表標題 <i>Sphingobium</i> sp. TCM1株 PhoKアルカリホスファターゼの酵素学的諸特性の解析.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年会 (第90回日本生化学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋祥司・諸岡由佳・佐伯菜里・片沼拓士・阿部勝正・解良芳夫
2. 発表標題 含塩素有機リン難燃剤分解菌 <i>Sphingobium</i> sp. TCM1 株の PhoK アルカリホスファターゼの機能解析.
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井俊宏・李 誠駿・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫
2. 発表標題 <i>Sphingobium</i> sp. TCM1 株有機リン酸加水分解酵素中のシグナル様ペプチドの機能解析.
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 茨木梨沙・櫻庭裕樹・阿部勝正・高橋祥司・解良芳夫
2. 発表標題 <i>Sphingomonads</i> が有する有機リン酸加水分解酵素の局在解析.
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Toshihiro Imai, Takahiro Kabasawa, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera
2. 発表標題 Study of the Localization of Haloalkylphosphorus Hydrolase from <i>Sphingobium</i> sp. Strain TCM1.
3. 学会等名 The 5th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Risa Ibaraki, Toyokazu Kobayashi, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
2. 発表標題 Study on the localization of Haloalkylphosphotriesterase from Sphingomonas sp. Strain TDK1.
3. 学会等名 The 5th international GIGAKU conference in Nagaoka (IGCN2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高橋祥司・片沼拓士・阿部勝正・解良芳夫
2. 発表標題 Sphingobium sp. TCM1株における有機リン難燃剤分解代謝に関与するアルカリホスファターゼ遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

該当なし。

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	阿部 勝正 (Abe Katsumasa) (40509551)	長岡技術科学大学・工学研究科・助教 (13102)	

