

平成21年 4月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007－2008
 課題番号：19510085
 研究課題名（和文） 分子生物学的微生物群集構造解析ツールを用いたテトラクロロエチレン汚染サイトの診断
 研究課題名（英文） The use of DNA techniques for identifying targeting microorganisms in contaminated subsurface
 研究代表者
 高見澤 一裕 （TAKAMIZAWA KAZUHIRO）
 岐阜大学・応用生物科学部・教授
 研究者番号：00159005

研究成果の概要：

テトラクロロエチレンおよび関連物質による土壌地下水汚染は、全体の汚染件数の約37%を占め、その汚染浄化が必要である。その方法として微生物学的浄化（バイオレメディエーション）が効率的で経済的な手段であるが、汚染サイトに分解微生物が存在している必要がある。そのため、分解微生物の網羅的検出方法（DNAマイクロアレイ法）を開発し、合わせて汚染サイトの微生物相を分子生物学的方法で解析した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術

1. 研究開始当初の背景

テトラクロロエチレン（PCE）、トリクロロエチレン（TCE）、シス-1,2-ジクロロエチレン（cDCE）による地下水・土壌汚染の箇所は日本全体の地下水・土壌汚染の約37%を占める（環境省2000年度）。各種の調査結果から推定されている日本国内の地下水・土壌汚染数は約44万箇所、単純に計算すると16万箇所がPCE、TCE、cDCEで汚染されているこ

とになる。この傾向は北アメリカやヨーロッパでも同じであり、そのため、PCE、TCE、cDCE汚染サイトの修復基礎研究や実際の修復事業が行われている。汚染されている区域が小規模の場合はたとえば、掘削—熱処理や吸引—吸着などの物理化学的方法で対処できる。しかし、汚染が広範囲に及んでいる場合は現位置でのバイオレメディエーションを行うことになる。

現位置バイオレメディエーションでは、汚染サイトに除去対象物質の分解菌が存在するか否かで方法が2種類に分かれ、常在菌として分解菌が存在すればその分解菌を増殖活性化させるために適切な栄養源を添加するバイオスティミュレーションを行うことになる。一方、存在しない場合は、あらたに分解菌を添加しその増殖と活性化を図るために添加する分解菌用の栄養源を加えるバイオオーギュメンテーションを行う。バイオオーギュメンテーションは、アメリカ合衆国やヨーロッパでは盛んに利用されているが、日本では、国の定める安全性指針に用いる微生物が満足しないと利用できず、また、行政や住民の微生物添加に対するアレルギーがあり、容易ではない。日本国内での汚染サイトの修復にはしばらくはバイオスティミュレーションに頼らざるを得ない。

実際に汚染サイトにバイオスティミュレーションを応用する際、通常は汚染サイトから土壌や地下水を少量採取して各種栄養源を添加して分解の可能性を調べるいわゆるトリータビリティ試験を行い、バイオスティミュレーションの適応可能性を検討する。すなわちトリータビリティ試験で分解が認められたら分解菌が存在していると判断し、バイオスティミュレーションを汚染修復方法として採用する。トリータビリティ試験は合理的な方法であるが、いくつかの問題点がある。それらは、①長期間かかること、②対象物質の分解性は確認できるが分解最終産物の同定や安全性の保証にはつながらないこと、③その間の微生物相の変遷は対象とせず、いわゆる病原微生物の増殖は把握できないことなどである。

2. 研究の目的

トリータビリティ試験の問題点として指摘した①と③の課題の解決を行う。バイオスティミュレーションの適応可能性試験として、トリータビリティ試験の前に PCE 分解菌の存在を確かめるべきである。これまでに開発してきた DNA マイクロアレイを強化し、これまでにアレイに搭載していない他の PCE 分解菌 (6 種類) や 1,1,1,トリクロロエタン分解菌の検出システムを構築した。このアレイでは、細菌の ITS 領域と 16SrDNA 領域をプローブとし、競合ハイブリダイゼーションにて擬陽性を排除する。定量化は LATE(Linear-After-The-Exponential)-PCR (Sanchez and Wangh, *et al* PNAS,2003)で行った。

PCE 分解菌を網羅的に検出することはきわめて大切であるが、PCE 分解に関与する同種のデハロゲナーゼをかなり多くの PCE 分解菌が保有することもだんだん明らかになってきている。そこで、*Sufospirillum*

multivorans の PCE デハロゲナーゼ遺伝子 *pceA*、*Dehalococcoides ethenogenes* 195 の *tceA* と *Clostridium bifermentans* DPH-1 が保有する *pceC* も搭載した。

課題③に関しては、修復前、修復中、そして修復後の優占微生物相を DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法と PCE 分解菌は DNA マイクロアレイを用いて追跡した。バイオスティミュレーションでは、DNA マイクロアレイによる事前調査に基づいて存在する PCE 分解菌のみを増殖活性化することが理想的である。そして、バイオスティミュレーションを実際のサイトに応用する場合は、行政と住民の合意が不可欠である。すなわち、栄養源を添加することによって病原菌が増殖することを人は懸念する。日和見感染症原因菌を含めた病原菌が増殖しないような栄養源の開発とその確認が大切である。ここでは、マイクロアレイによる事前調査で存在することがわかっている PCE 分解菌の増殖培地成分を添加し、修復中および修復後の土壌地下水の PCE 分解菌は DNA マイクロアレイで、優占微生物は DGGE 法で追跡し、PCE および関連物質の減少と関連付けて解析した。

3. 研究の方法

サブテーマ① PCE 分解菌検出用 DNA マイクロアレイの強化

これまでにマイクロアレイに搭載している PCE 等分解菌は、PCE 完全分解菌である *Dehalococcoides ethenogenes* 195 株、PCE を cDCE まで分解する *Desulfitobacterium frappieri*, *Desulfitobacterium hafniense*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Desulfitobacterium sp. strain* PCE1, *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, *Desulfuromonas chloroethenica*, *Dehalobacter restrictus*, *Sufospirillum multivorans*, *Desulfomicrobium orvegicum* と *Clostridium formicoaceticum*, PCE を TCE に脱塩素化する *Acetobacterium woodii*, *Acetobacterium woodii*, 好気性で cDCE を完全分解する *Rhodococcus sp. Sm-1*, *Rhodococcus rhodococcus*, *Xanthobacter flavus*, 好気性で VC を完全分解する *Mycobacterium L1* の 18 種類である。

これらの細菌の検出用プローブの設計には、ITS 領域を使用し、基本ルールとして、①40-mer で GC 50%、②センスプローブ、③レスヘアピン構造、④ミスマッチはセンター部分でミスマッチの数として 4 以下、⑤ NCBI-BLAST でヒットしないこと、⑥AT もしくは GC の連続は 6 塩基以下であることを作成して競合ハイブリダイゼーションを行うことで設計した。そして、定量化には

LATE-PCR を応用した。さらに、コスト低減を図るため、定性の確認は Nissinbo CarboStation-U スライドグラスを用いて UV 固定化で判断し、定量化の際のみ、プローブに修飾されたアミノ基が表面にコーティングされている活性エステルと共有結合することによってきれいなスポットが得られる TAKARA-Hubble スライドグラスを用いた。

以上の方法を用いて、PCE 分解菌のライブラリーを増強する。具体的には、PCE 分解菌で最終産物が cDCE である、*Clostridium bifermentans* DPH-1, *esulfitobacterium hafniense* Y51, cDCE の完全分解菌である *Clostridium sp.* KYT-1 と *Clostridium sp.* DC-1 である。

サブテーマ② PCE デハロゲナーゼ遺伝子検出用プローブの設計

DNA マイクロアレイ用のプローブ設計には、1) PRIMEROSE による TM と GC% のチェック、2) 表を用いる AAA, TTT, GGG, CCC、の繰り返し配列のチェック、3) LOCAL BLAST によるミスマッチの排除、4) mFold によるヘアピンチェックと Sequencher によるポジションチェックのステップで行ってきた。たとえば、500bpITS 領域から 3-5 種類のプローブを設計しようとするならば、まず、460 種類の 40-mer プローブの候補を選び、PRIMEROSE にて 150 種類に絞り、表から繰り返し配列を避けて 75 種類を候補とする。その後、BLAST でミスマッチを排除して 30 プローブに絞り、そして mFold と Sequencher で最後の 3-5 種類を選ぶことになり、設計するために必要な日数は 1 週間から 1 ヶ月必要である。また、設計者自身の判断にゆだねることが多いためミスもかなりあった。そこで、この時間の短縮とプローブ設計の精度を高めるために、申請者らは 1) から 5) のステップを包括するソフトウェアを開発した。これによって、100 遺伝子の検出プローブ設計 (500-2500 プローブ) に要する日数は 1-2 日ですむことになった。

サブテーマ③ PCE 汚染サイトの DGGE 法による微生物相解析

PCE 汚染サイト中の汚染されていない土壌をレファレンスとする。汚染のホットスポット、比較的汚染濃度の低い箇所、これら 3 箇所の地中 10m までの 1m ごとの土壌ないし地下水を試料とし、DGGE 法で微生物相解析を行う。プライマーとしてはユーバクテリア用のユニバーサルプライマーを用いる。DNA 抽出は、キット (MO-BIO 製) を用いる。PCE 関連物質の化学分析もあわせて行った。

4. 研究成果

PCE およびその関連物質分解菌の網羅的検出方法として DNA マイクロアレイを作製して実際の汚染サイトに適応した。検出対象細菌は、PCE を完全にエテンまで脱塩素化する *Dehalococcoides ethenogenes* 195 はじめ PCE 部分分解細菌 22 株と 2 種類の PCE デハロゲナーゼ遺伝子である。細菌検出用アレイは、ITS 領域を用いてプローブを設計した。ハイブリダイゼーションは競合ハイブリダイゼーションにて行い、必要に応じて LATE-PCR を応用した。検出限界は 10 コピーである。この DNA マイクロアレイを用いて PCE 汚染サイト 22 箇所、87 サンプルを分析した結果、*D. ethenogenes* 195 は 11 汚染サイト 18 サンプルから検出された。一番多く検出されたのは PCE を DCE に脱塩素化する *Clostridium formicoaceticum* で、13 汚染サイト 25 サンプルから検出された。

PCE 脱塩素化酵素遺伝子 *pceA* を検出する DNA マイクロアレイの作成を行った。*pceA* を検出するためのプローブの設計は、40mer と 30mer の 2 種類について行った。同じ塩基または、A-T、G-C が 5 つ以上連続しないこと、プローブが自己プライミングしないこと、目的外の微生物野と相同性を持たないこと、プローブ同士の配列が重複していないことなどの条件を設定し、非同相領域におけるミスマッチも考慮した。ターゲットの増幅には 1 本鎖 DNA を増幅できる LATE (linear After The Exponential)-PCR 法を用いた。DNA マイクロアレイでの検出限界試験を行った結果、検出限界値は 10,000 コピーであることが示された。シグナル強度は 40mer と 30mer のプローブで大差はなかった。*pceA* 遺伝子を用いた TCE1 株と Y51 株の識別は、プローブに対して 100% 相同性のあるリファレンス DNA を用いる競合ハイブリダイゼーションによって区別できた。さらに、対象の菌を混同した模擬土壌を用いて *pceA* 遺伝子の検出の作動確認を行った。その結果、検出限界はコピー数に換算して 600,000,000 コピーとなり、土壌中に含まれるフミン酸などの有機物などが遺伝子増幅を阻害していることやターゲット以外の生物由来の DNA の影響などが考えられ、遺伝子抽出におけるバイアスの解除の必要性が示された。

あるサイトでのバイオレメディエーション前後の DGGE 解析では、土壌地下水とも同じ傾向を示し、栄養源注入後 PCE 分解菌群は飛躍的に増加した。特に PCE を DCE に脱塩素化する *Sulfurospirillum multivorans*, *Desulfovibrio baculatus*, *Cl. formicoaceticum*, *Dehalobacter restrictus* の増加が著しかった。また、DGGE による汚染サイト微生物群集解析では特定の門に

属する微生物が栄養源注入で優占する傾向が見られた。

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 2件)

1) Fletcher, K. E., Ritalahti, K. M., Pennell, K. D., Takamizawa, K. and Löffler, F. E.:

Resolution of culture *Clostridium bifermentans* DPH-1 into two populations, a *Clostridium* sp. and tetrachloroethylene-dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* strain JH1.
査読あり

Applied and Environmental Microbiology, 74, 6141-6143, 2009

2) Chang, Y. C., Kikuchi, S., Kawauchi, N., Sato, T. and Takamizawa, K.:

Complete dechlorination of tetrachloroethylene by use of an anaerobic *Clostridium bifermentans* DPH-1 and zero-valent iron
査読あり

Environmental Technology, 29, 381-391, 2008

[学会発表] (計 5件)

1) 森山寛子、中村浩平、高見澤一裕 :

Clostridium sp. KYT-1 株と *cis*-1,2-DCE の反応について、
日本農芸化学会、2009年3月28日、福岡市国際会議場

2) Bowmik, A., Asahino, A., Shiraki, T., Nakamura, K. and Takamizawa, K. :

Dynamic behavior of bacteria in a PCE contaminated area during bioremediation. XXth Jubilee, International Scientific and Technical Conference Water Supply and Water Quality "Water 2008", June 16, 2008, Gniezno, Poland

3) Takamizawa, K. :

The use of DNA techniques in identifying target micro-organisms in soil and groundwater remediation. XXth Jubilee, International Scientific and Technical Conference Water Supply and Water Quality "Water 2008", June 15, 2008, Gniezno, Poland

4) 村田晃軌、河合哲志、中村浩平、鈴木徹、

高見澤一裕 :

Clostridium bifermentans DPH-1 株の PCE デハロゲナーゼ遺伝子の発現解析、
日本農芸化学会 2008年3月28日 名古屋大学

5) 高見澤一裕 :

バイオレメディエーションのための DNA マイクロアレイを用いたテトラクロロエチレン分解菌の網羅的検出
日本農芸化学会シンポジウム 2008年3月28日 名古屋大学

[その他]

高見澤は、2008年6月15日にポーランド土木衛生工学会から「アクアリナ特別賞」を授与された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見澤一裕 (TAKAMIZAWA KAZUHIRO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号 : 00159005

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし