

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710075

研究課題名（和文） 微生物によるアルキル系有機リン酸トリエステル分解の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Moleculae basis of alkyl phosphate triester degradation by microorganisms

研究代表者

阿部 勝正（ABE KATSUMASA）

長岡技術科学大学・工学部・助教

研究者番号：40509551

研究成果の概要（和文）：難分解性化学物質であるリン酸トリス（1,3-ジクロロ-2-プロピル）（TDCPP）は、繊維難燃剤等として広く利用されてきたが、環境中への蓄積や毒性が報告されている事から分解が求められている化合物である。本研究では TDCPP 分解菌 *Sphingomonas* sp. TDK1 株における TDCPP 分解について解析を行い、TDK1 株の TDCPP 分解酵素はこれまでに分解報告のない種々の有機リン化合物を分解する新規有機リン加水分解酵素であること、また、TDCPP 分解酵素の発現は外部に存在する無機リン酸濃度に依存する事など、その分解機構の詳細を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), a typical organophosphate triesters, has been used worldwide as flame-retardants, and thus resulting in its dispersion into natural environment. Since this compound is known to possess carcinogenicity, mutagenicity and neurotoxicity, persistence of TDCPP in natural environment has been concerned. In this study, I report the purification and characterization of TDCPP-degrading enzyme from *Sphingomonas* sp. TDK1 and its gene cloning and sequencing. The enzyme can degrade not only the trihaloalkyl phosphates but also aryl organophosphates. The enzyme was induced when environmental orthophosphate becomes limiting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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、環境汚染物質、有機リン化合物、加水分解酵素、発現機構、遺伝子クローニング

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸トリス（1,3-ジクロロ-2-プロピル）（TDCPP）、リン酸トリス（2-クロロエチル）、リン酸トリエチルなどのアルキル系有機リ

ン酸トリエステルはプラスチックの可塑剤やカーテンや衣類などの難燃材、また、潤滑剤や油圧剤として日本を含むアジア各地やヨーロッパ諸国で大量に使用されている。こ

れらアルキル系有機リン酸トリエステルは難分解性であり、さらに、催奇形性形成や発ガン性、環境ホルモン様作用など種々の毒性を示す事が知られている。近年、これら化合物の廃棄物処分場浸出水中への流入や土壌中への蓄積が環境汚染につながるとして問題視されており、これらアルキル系有機リン酸トリエステル分解菌の単離とその分解機構の早期解明が望まれている。

当研究室ですでに単離に成功している *Sphingomonas* sp. TDK1 は TDCPP や TCEP などの塩素を含むアルキル有機リン酸トリエステルを分解できる世界で唯一の菌である。これまで、パラチオンやパラオキソンなど、その構造上にアリル基を有している有機リン酸エステルの微生物分解に関する報告は数多くなされ、その分解機構の詳細もすでに明らかにされている。しかし、アルキル系有機リン酸トリエステルを優先的に分解する菌は、国内外通しても *Sphingomonas* sp. TDK1 のみであることから、本菌株はこれまでに多く報告されているアリル系有機リン酸エステル分解菌とは異なる新規な酵素を含む代謝経路を利用して、アルキル系有機リン酸トリエステル分解を成し遂げていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、アルキル系有機リン酸トリエステル分解を行う *Sphingomonas* sp. TDK1 のアルキル系有機リン酸トリエステル分解のメカニズムを分子レベルで解明することにより、TCEP や TDCPP 以外の他の種々のアルキル系有機リン酸トリエステル分解菌の単離やアルキル系有機リン酸トリエステルの生物分解システムの構築、及びその効率化の基盤を築くことを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) TDK1 株からの新規ホスホトリエステラーゼの精製

低濃度の TDCPP 存在下で培養された TDK1 株から、超音波破碎、硫酸アンモニウム分画、及び、疎水性相互作用カラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって本酵素の精製を行なった。精製酵素標品の純度は SDS-PAGE によって解析した。

(2) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼの諸特性解析

TDCPP 分解活性はガスクロマトグラフィーを用いて測定した TDCPP 分解量から算出した。分子質量はゲル濾過クロマトグラフィーと SDS-PAGE で解析し、N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列は全自動エドマン分解法によって解析した。

(3) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニング

内部アミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、TDK1 株全 DNA を鋳型とした PCR により本酵素の部分遺伝子断片を獲得したのち、インバース PCR 法を用いて TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼ全長遺伝子配列を明らかにした。

(4) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼの生理機能解析

本酵素遺伝子の内部にテトラサイクリン耐性遺伝子を挿入した遺伝子断片をオーバーラップ PCR 法で作製し、スクロース存在下で致死的に働く *sacB* 遺伝子を持つ pK18*mobsacB* に連結して、遺伝子破壊株作製用ベクターとした。構築したベクターを接合法により TDK1 株へ導入し、スクロース及びテトラサイクリンを含む培地を用いて、遺伝子株の選抜を行なった。遺伝子破壊はコロニー PCR およびサザンブロット解析で確認した。得られた遺伝子破壊株及び TDK1 株を TDCPP 等の各種有機リン化合物を唯一のリン源として含む培地で培養し、その生育特性を比較検討した。

(5) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼ誘導発現機構の解析

本酵素の発現を抑えた TDK1 株をリン源の種類や濃度の異なる培地で培養したときの TDCPP 分解活性を測定することで、TDK1 株における本酵素の発現条件を検討した。

## 4. 研究成果

(1) TDK1 株からの新規ホスホトリエステラーゼの精製と諸特性解析

TDCPP を唯一のリン源とした培地で培養した *Sphingomonas* sp. TDK1 株から各種カラムクロマトグラフィーを用いて TDCPP 分解酵素を単一タンパク質にまで精製した (図 1)。

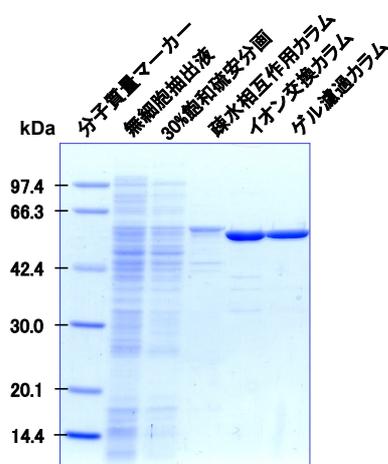


図 1 TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼの精製

TDCPP を基質とした場合の本酵素の  $K_m$  は  $81.0 \mu\text{M}$ ,  $V_{max}$  は  $5.16 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $K_{cat}$  は  $5.13 \text{s}^{-1}$  であり, 至適 pH は 8.0, 至適温度は  $35^\circ\text{C}$  であった. 本酵素活性は 2 価金属イオン存在下で増加したが, 金属キレート剤の添加による影響は認められなかった. ICP-MS を用いて酵素中の金属イオンを解析したところ, 酵素 1 分子あたり 1 つの  $\text{Zn}^{2+}$  を有している可能性が示された. 本酵素は TDCPP などのハロアルキル系有機リン酸トリエステルだけでなく, これまで精製酵素での分解報告のないリン酸トリフェニルなどのアリル系有機リン酸トリエステルも基質とするが明らかになった.

#### (2) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼの N 末端アミノ酸配列解析

本酵素の N 末端アミノ酸配列解析を行なったが解析不能であったことから, デブロッキング法を用いたさらなる解析を行なった. その結果, 本酵素の N 末端アミノ酸はピログルタミン酸残基であることが明らかになった. N 末端のピログルタミン酸は病原性細菌の非酵素タンパク質で「感染時の分解を防ぐために修飾している」との報告はあるものの, 非病原性菌であり, さらに, 酵素タンパク質としては初めての発見である.

また, このアミノ酸配列解析結果より, 本酵素が TDK1 株内でプロセッシングを受けている可能性が示唆されたことから, シグナルペプチドの推定を行なったところ, 本酵素は既知の有機リン酸加水分解酵素とは異なり, Sec 経路を経由してペリプラズムに移行している可能性が示唆された.

#### (3) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニング

遺伝子配列解析の結果より, 本酵素遺伝子は全長 1,722 bp で 574 アミノ酸からなるポリペプチドをコードすることが明らかになった. 推定アミノ酸配列から算出された分子質量は 61.9 kDa で, TDK1 株より精製された本酵素の分子質量 59.6 kDa とほぼ一致した. BLAST P プログラムや分子系統樹を用いて本酵素の解析を行ったところ, これまでに研究されている種々の有機リン加水分解酵素ファミリー (*oph*, *mpd*, *ophc2*, *ophb*, *opaA*) とは遠縁であり, *Burkholderia* sp. のフェニトロチオン加水分解酵素 (*fedA*) とは比較的近縁であることが明らかになった. しかしながら, FedA と本酵素は基質特異性, 細胞局在など諸特性は異なる点が多く存在し, 本酵素はこれまでにない新規の酵素であることが示唆された.

#### (4) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子大腸菌における発現

pET システムを用いて本酵素遺伝子を大腸菌で発現させ, 得られた形質転換体無細胞抽出液中の TDCPP 分解活性を解析した. 本酵素遺伝子を組込んだ形質転換体の上清でコントロールには見られない有意な活性が認められ, 本酵素発現系の構築が出来たことが確認された. 次に, 発現産物の SDS-PAGE 解析を行ったところ, 本酵素遺伝子を導入した系に特異的に存在するタンパク質が二つ確認された. これらのタンパク質の N 末端アミノ酸配列解析を行った結果, TDK1 株精製酵素標品と同様の分子質量タンパク質は, 天然型酵素と同様に N 末端から 88 残基切断されたものであることが明らかになった. また, 不溶性画分のみに確認された分子質量の大きいタンパク質は推定アミノ酸配列の N 末端部位と一致した. このことから, 全長タンパク質は不溶性で活性を示さず, 成熟タンパク質のみが活性を有すると考えられた.

#### (5) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼの生理的機能解析

本酵素遺伝子破壊株はコロニー PCR およびサザンブロット解析でその構築を確認した. TDK1 株と本酵素遺伝子破壊株は  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  下での生育には差がみられなかったのに対し, TDCPP 下においては本酵素遺伝子破壊株のみその生育が見られなくなった. このことから, 本酵素が TDK1 株内において TDCPP 代謝に関わる唯一の酵素であることが明らかとなった. また, TDCPP 以外の有機リン酸トリエステル化合物に対しても生育特性解析を行い, 本酵素がそれら化合物代謝へも関わることを示した.

#### (6) TDK1 株新規ホスホトリエステラーゼ誘導発現機構の解析

$20 \mu\text{M}$  TDCPP と  $20 \mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を唯一のリン源として誘導培養した菌体の無細胞抽出物間では TDCPP 分解活性に差は見られなかったが,  $1 \text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を唯一のリン源として誘導培養した場合のみ TDCPP 分解活性の低下が認められた. また, 培地中の無機リン酸濃度と休止菌体反応を用いた酵素活性の関係を検討したところ  $20 \mu\text{M}$  の無機リン酸存在下では本酵素の発現が抑制されること, 及び, リン酸の枯渇と同時に本酵素が誘導されることを示した. 本発現機構はアルカリホスファターゼの制御に類似しており, TDK1 株においてもリン源を獲得するために本酵素が存在しているものと考えられた.

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 3 件)

- ① Shouji Takahashi, Kaneharu Miura, Katsumasa Abe and Yoshio Kera. Complete detoxification of tris(2-chloroethyl) phosphate by two bacterial strains: *Sphingobium* sp. strain TCM1 and *Xanthobacter autotrophicus* strain GJ10. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 印刷中, 2012. DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.04.010
- ② Shouji Takahashi, Yuki Obana, Shohei Okada, Katsumasa Abe and Yoshio Kera: Complete detoxification of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate by mixed two bacteria, *Sphingobium* sp. strain TCM1 and *Arthrobacter* sp. strain PY1. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 113, 79-83, 2012. DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.08.020
- ③ Shouji Takahashi, Ikuko Satake, Isao Konuma, Koji Kawashima, Manami Kawasaki, Shingo Mori, Jun Morino, Junich Mori, Hongde Xu, Katsumasa Abe, Ryo-hei Yamada and Yoshio Kera: Isolation and identification of persistent chlorinated organophosphorus flame retardants-degrading bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 査読有, 76, 5292-5296, 2010. DOI:10.1128/AEM.00506-10

[学会発表] (計 18 件)

- ① Ryouzuke Majima, Takahiro Kabasawa, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera: Characterization of a haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingobium* sp. strain TCM1. The 1st international GIGAKU conference in Nagaoka, 2012年2月4日, Nagaoka University of Technology (長岡市).
- ② Kazunobu Kawakami, Toyokazu Kobayashi, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera: Properties of a haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingomonas* sp. strain TDK1. The 1st international GIGAKU conference in Nagaoka, 2012年2月4日, Nagaoka University of Technology (長岡市).
- ③ 川上 和延、小林 豊和、阿部 勝正、高橋 祥司、解良 芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株有機リン酸加水分解酵素遺伝子破壊株の構築と解析. 第29回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会、2010年11月22日、ハイブ長岡 (長岡市).
- ④ 川上和延、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 ハロアルキルリン

酸加水分解酵素遺伝子破壊株の構築. 第63回日本生物工学会大会、2011年9月28日、東京農工大学、小金井キャンパス (小金井市)

- ⑤ 高橋祥司、三浦兼晴、阿部勝正、解良芳夫: 難分解性難燃剤リン酸トリス (2-クロロエチル) の微生物分解による無害化の検討. 第63回日本生物工学会大会、2011年9月28日、東京農工大学、小金井キャンパス (小金井市)
- ⑥ 間島 亮介、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加水分解酵素遺伝子の機能解析. 第63回日本生物工学会大会、2011年9月28日、東京農工大学、小金井キャンパス (小金井市)
- ⑦ 阿部勝正、間島亮介、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 ハロアルキルリン酸加水分解酵素遺伝子破壊株の構築. 第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館 (京都市)
- ⑧ 高橋祐樹、間島亮介、吉田知史、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingobium* sp. TCM1 株 有機リン酸加水分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌における発現. 第83回日本生化学会大会、第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010)、2010年12月7日、神戸ポートアイランド (神戸市)
- ⑨ 山田裕里恵、川上和延、鈴木雄斗、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株 tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate 分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌における発現. 第83回日本生化学会大会、第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010)、2010年12月7日、神戸ポートアイランド (神戸市)
- ⑩ 三浦兼晴、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫: 微生物を用いた含塩素有機リン系難燃剤無害化処理の基礎的検討. 第28回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会、2010年11月25日、ハイブ長岡 (長岡市)
- ⑪ Kazunobu Kawakami, Yurie Yamada, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera: Properties of a novel phosphotriesterase from *Sphingomonas* sp. strain TDK1. 17th Asian Symposium on Ecotechnology, 2010年11月12日, Unazuki International Hall "Selene" (黒部市)
- ⑫ Ryouzuke Majima, Yuki Takahashi, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera: Purification and characterization of an organophosphorus hydrolase from *Sphingobium* sp. strain TCM1. 17th Asian Symposium on Ecotechnology, 2010年11月12日, Unazuki International Hall "Selene" (黒部市)

- ⑬ 阿部勝正、高橋祐樹、山田裕里恵、高橋祥司、解良芳夫： *Sphingobium* sp. TCM1 株新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニング。第62回日本生物工学会大会、2010年10月29日、ワールドコンベンションセンター、サミット（宮崎市）
- ⑭ 阿部勝正、鈴木雄斗、山田裕里恵、高橋祥司、解良芳夫：ハロアルキル基含有有機リン酸トリエステルを分解する新規ホスホトリエステラーゼ遺伝子のクローニング。日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月28日、東京大学駒場キャンパス（東京）
- ⑮ 阿部勝正、森淳一、鈴木雄斗、山田裕里恵、高橋祥司、解良芳夫：ハロアルキル基含有有機リン酸トリエステルを分解する新規ホスホトリエステラーゼの機能解析。第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド（神戸市）
- ⑯ 鈴木雄斗、山田裕里恵、森淳一、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫： *Sphingomonas* sp. TDK1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate 分解酵素の諸特性解析。第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)
- ⑰ 吉田知史、高橋祐樹、土井由佳、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫： *Sphingobium* sp. TCM1 株 tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate 分解酵素の諸特性解析。第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)
- ⑱ 高橋祥司、尾花友規、岡田庄平、阿部勝正、解良芳夫：難分解性難燃剤リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル)の微生物的無害化処理の検討。第61回日本生物工学会大会、2009年9月23日、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)

〔図書〕（計1件）

- ① Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera, Caister Academic Press, Norfolk, Microbial Bioremediation of Non-metals; Current Research (Ed., Koukkou, A. -I.), 2011, 45-54.

〔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

<http://envbio.nagaokaut.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 勝正 (ABE KATSUMASA)  
長岡技術科学大学・工学部・助教  
研究者番号：40509551

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当なし