

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710077

研究課題名(和文) 門レベルで異なる3つの細菌系統群で機能する脱ハロゲン呼吸活性化機構の解明

研究課題名(英文) Genomic and physiological characterization of dehalorespiring bacteria in three phyla

研究代表者

吉田 奈央子 (Yoshida, Naoko)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10432220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：土壌・地下汚染浄化微生物である脱ハロゲン化呼吸細菌について、進化系統学的に乖離独立した3属のゲノム解析および生理学的特性評価を行った。ジオバクターAY株には、既知微生物に優位な3つの生理学的性質が認められた。第一に、既知株の10倍の1,000ppm以上の有機ハロゲンを7日で無毒化でき、第二に副産物として二酸化炭素しか生じない、第三に、有毒な有機ハロゲンを添加せずとも活性ある細胞を大量培養できる。ゲノム解析の結果、この脱ハロゲン化を担う機能遺伝子クラスターが転写制御因子を欠いた状態でプラスミドに保持されており、有機ハロゲンの有無にかかわらず安定的に存在することが示された。

研究成果の概要(英文)：Dehalorespiring bacteria grow by respiration using organohalides as electron acceptors and reductively dehalogenate organohalides to less halogenated compounds. I have also enriched and isolated phylogenetically and functionally different dehalorespiring bacteria of the three phyla from various environmental samples. Among them, Geobacter sp. AY showed unprecedented high dechlorination activity that detoxify 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) of 1,000 ppm to ethene within a week. Geobacter sp. AY had following advantages to be applied in bioremediation; the high activity for high concentration of 1,2-DCA, culturability using only acetate as sole electron donor and carbon source, and the high activity in the culture grown without any organohalides. The genome analysis revealed the constitutive expression was probably resulted from a plasmid lacking of cAMP kinase transcriptional regulator transferred from obligate dehalorespiring Dehalobacter.

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：脱ハロゲン化呼吸細菌 バイオレメディエーション ジオバクター デハロバクター デハロココイデス

1. 研究開始当初の背景

脱ハロゲン化呼吸細菌は、有機ハロゲン呼吸基質（人間でいうところの酸素）として還元的に脱ハロゲン化することから、有機ハロゲン汚染環境浄化のための生物触媒として期待されている。現在のところ、脱ハロゲン化細菌のエネルギー源となる有機物を汚染現場に補填するバイオスティミュレーションを中心に、米国では2000年以降の累計で92件、本国では78件の浄化実績がある一方、浄化を担う脱ハロゲン化微生物の培養が難しく純粋大量培養が技術的に不可能なため、浄化微生物を現場に補填するバイオオーグメンテーション事業は、社会的ニーズに反し実用化が進んでいない。さらに、多塩素化ビフェニル(PCB)や臭素系難燃剤などの処分待機廃棄絶縁油に対して脱ハロゲン化微生物を発展的に利用した生分解処理技術が期待されているものの、数百を超える同族体が存在するようなPCBや臭素系難燃剤などの多環芳香族化合物に対する脱ハロゲン化活性は限定的であり生分解技術へと発展するには更なる技術革新が求められている。

2. 研究の目的

私は、塩素化エチレンや塩素化エタンといった脂肪族有機ハロゲン、PCBやダイオキシンを含む多様な芳香族有機ハロゲンを脱ハロゲン化する微生物として、進化系統的に乖離独立した3つの細菌属、クロコフレキシ門デハロコッコイデス属細菌、プロテオバクテリア門ジオバクター属細菌、およびファーミキューテス門デハロバクター属細菌を分離または2種微生物からなる共培養物として獲得してきた。本研究は、培養しても目視で増殖が確認できない極めて低い増殖収率のデハロコッコイデスやデハロバクターの多種多様な有機ハロゲンの脱ハロゲン化酵素遺伝子をジオバクターな

どの増殖効率のよい微生物をプラットフォームとして異種発現することを将来目標とし、門をまたがる3つの脱ハロゲン化呼吸細菌のゲノム配列解析および生理学的評価に基づき3属種間に共通する脱ハロゲン化代謝が安定的に機能する必要条件を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

デハロバクターFTH1株およびジオバクターAY株のゲノムデータに加え新たに代表的な脱ハロゲン化呼吸細菌である塩化ビニルをエチレンに脱ハロゲン化するデハロコッコイデス高度集積物KJ-VCのドラフトゲノム解析を行う。さらに、これらの微生物の生理学的特性評価ならびに比較ゲノム解析により、3門にわたる脱ハロゲン化呼吸細菌の脱ハロゲン化酵素が機能するための共通した必要条件を決定する。

4. 研究成果

第一に、デハロバクターFTH1株について、ドラフトゲノム解析を行った結果、少なくとも34の脱ハロゲン化酵素遺伝子を検出した。このうち、1遺伝子が類縁のデハロバクターの塩素化エタン脱塩素化酵素遺伝子に最類縁で98%のアミノ酸配列相同性を示し、33遺伝子がデスルフィトバクテリウム属細菌のクロロフェノール脱ハロゲン化酵素遺伝子等に最類縁で47-88%の相同性を示し、1つの系統クラスターを形成した。これまでファーミキューテス門細菌の脱ハロゲン化細菌では多くとも1ゲノムに8つまでしか検出されていなかったことからファーミキューテス門細菌の脱塩素化呼吸代謝は比較的最近になって獲得されたと考えられていたが、FTH1株の34という多数の脱塩素化酵素遺伝子数から、これまで考えられていたよりも古くに脱塩素化呼吸

代謝を獲得し、且つ独自に進化を遂げた事が示唆された。

さらに、ジオバクターAY株について、5kb程度の1gapを残したほぼ全長を決定し、3.9Mbpの染色体DNA配列および24kbpのプラスミド配列を得た。1,2-ジクロロエタン(12DCA)脱塩素化酵素遺伝子は、このプラスミドに存在していた。これまで、AY株の脱塩素化活性が非常に安定であること、付近にトランスポゾン遺伝子が存在していたこと、また最類縁のジオバクターSZ株のPCE脱塩素化酵素遺伝子がゲノム上に存在していたことからゲノム上に組み込まれていると考えてきた予想に反する結果であった。これより、改めてAY株による12DCA脱塩素化活性を調べた結果、既知の12DCA脱塩素化細菌について報告された10倍の1,000ppm以上の12DCAを、酢酸を唯一の電子供与体且つ炭素源として培養することで、7-10日でエチレンまで脱塩素化することが示された。さらに、酢酸およびフマル酸を用いた非脱塩素化呼吸条件で前培養した細胞に12DCAを添加しても、およそ3日で1,000ppmの12DCAをすべてエチレンに脱塩素化した。このことは、本プラスミドは、12DCA非存在下でもAY株中に非常に安定的に存在し、且つプラスミド中に存在する12DCA脱塩素化酵素も発現していることを示している。これより、本プラスミドおよびAY株を宿主として用いることにより、純粋培養が極めて難しく生育・分解速度が遅いデハロバクターおよびデハロココイデスの脱塩素化酵素遺伝子を異種発現できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Z Li, D Suzuki, C Zhang, N Yoshida, S Yang, A Katayama* (2013) Involvement of Dehalobacter strains in the anaerobic

dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol, Journal of Bioscience and Bioengineering, 116:602-609.

2. C Zhang, Z Li, D Suzuki, L Ye, N Yoshida, A Katayama* (2013) A humin-dependent Dehalobacter species is involved in reductive debromination of Tetrabromobisphenol A, Chemosphere, 92:1343-8.

3. N Yoshida*, L Ye, F Liu, L Zhiling, A Katayama (2012) Evaluation of biodegradable plastics as solid hydrogen donors for the reductive dechlorination of fthalide by Dehalobacter species, Bioresource Technology, 130: 478-485.

4. N Yoshida, H Iguchi, H Yurimoto, A Murakami, Y Sakai* (2014) Aquatic plant surface 1 as a niche for methanotrophs, Frontiers in microbiology, 5:30(9pages).

5. Z Li, D Suzuki, C Zhang, N Yoshida, S Yang, A Katayama* (2014) Anaerobic 4-chlorophenol mineralization in an enriched culture under iron-reducing conditions, Journal of Bioscience and Bioengineering, accepted

〔学会発表〕(計4件)

1. Naoko Yoshida (2013.11.1) Physiological and genomic differences of dehalorespiring bacteria in three different phyla, The 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, invited, National Central University, Taiwan

2. Naoko Yoshida (2013.4.23) Enrichment of new candidate PCB dechlorinator,

Dehalobacter sp. FTH1 and the physiological and genomic characterization. Jade Mountain Forum on Sustainable Environment, invited, National Cheng Kung University, Taiwan

3. 吉田 奈央子, 井町 寛之, 片山 新太, 由里本 博也, 阪井 康能(2012.12.4) 細菌によるハロゲン化メチルの代謝、第 216 回 生存圏シンポジウム 植物と微生物 大気中の C1 化合物を介した気候変動 (招待講演)
4. 吉田奈央子、Hauke Smidt、片山新太 (2012.6.25) 多様な芳香族塩素化合物を脱塩素化する Dehalobacter sp. FTH1 株の ドラフトゲノム解析に基づく脱ハロゲン化酵素遺伝子解析、環境 バイオテクノロジー学会 2013 年度大会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田奈央子 (名古屋工業大学)

研究者番号: 10432220