

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19310049

研究課題名（和文）異種微生物間共生系による効率的脱塩素化メカニズムの解析と応用

研究課題名（英文）Analyses and application of the mechanism for an efficient dechlorination by the bacterial symbiotic system.

研究代表者

二又 裕之 (FUTAMATA HIROYUKI)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：50335105

研究成果の概要（和文）：

土壌を接種源とする集積培養物 TUT2264 は、テトラクロロエテン（PCE）をジクロロエテン（DCEs）にまで脱塩素化する能力を発揮した。16S rRNA 遺伝子を標的とした群集構造解析では、“*Dehalococcoides*” と *Acidaminobacter* 属細菌の存在が確認された。また8種の RdhAs が見出され、転写レベルからも PCE およびトリクロロエテンの脱塩素化が確認された一方で、分解活性が見られない DCEs およびビニルクロライドによって転写が促進されていることが示された。クエン酸およびグルタミン酸が PCE の脱塩素化にとって有効な電子供与体となり得ることが示された。ヘッドスペース中の初期水素濃度（0% (v/v) と 80% (v/v)）が PCE 脱塩素化に及ぼす影響を解析した結果、水素生産細菌の *Acidaminobacter* 属細菌菌密度に差異は見られなかったが、“*Dehalococcoides*” においては 0%の方が約 100 倍高く、分解活性も 3 倍程高かった。以上の結果は、異属微生物間の水素伝達系を良好に制御することで効果的な脱塩素化が可能であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Soil-born enrichment culture TUT2264 exhibited the dechlorinating abilities of tetrachloroethene (PCE) to dichloroethenes (DCEs). Bacterial community analyses indicated that TUT2264 is consisted with “*Dehalococcoides*” and *Acidaminobacter* at least. Eight distinct RdhA genes were found in TUT2264 and the transcriptional analyses revealed that some RdhA genes are strongly enhanced with not only PCE and trichloroethene but also DCEs and vinyl chloride. It was found that citrate and glutamic acid are useful for electron donors to supply the hydrogen into TUT2264. Although the populations of *Acidaminobacter* were almost same under the different initial hydrogen concentrations (0% and 80%), the population of “*Dehalococcoides*” under 0% H₂ conditions was 100-holds higher than that under 80% H₂ conditions. Furthermore, PCE-dechlorination activity was also 3-fold higher than 80%. These results suggested that it enable to dechlorinate efficiently by regulate the interspecies hydrogen transfer.s

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	1,807,000

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、バイオレメディエーション、微生物の共生系

1. 研究開始当初の背景

難分解性で発癌性を有する塩素化合物による環境汚染の実態が明らかになるにつれ、汚染環境の修復が急務となっている。これら汚染の特徴は、極めて低濃度（約1 ppmからそれ以下）で広範囲（数キロ四方）に広がっている点にある。そのため、既存の物理化学的手法では浄化修復に限界がある。一方、微生物の活性を利用した浄化技術（バイオレメディエーション）は、低濃度でも対応でき、完全無害化かつ低コストであるといわれ、様々な汚染現場でその利活用が進められている。

しかし、本手法は現場に生息する「微生物」に依存するため、浄化修復が必ずしも成功するとは限らない。その原因は、微生物生態学的知見の未熟さにあると考えられる。則ち、汚染現場にどのような機能を持った微生物がどの程度生息しているのか？また、浄化能力を持った微生物を上手く活性化させるには、どうすればよいのか？に関する知見が不十分な状況にある。そのため、バイオレメディエーションの現場では、現場の状況に合わせた施工方法が行われることもなく、限られた知見と経験を基に実施しているのが実状である。

トリクロロエテン（TCE）と同様にテトラクロロエテン（PCE）は、土壌および地下水の代表的な有機塩素系の難分解性汚染物質である。TCEは有酸素あるいは無酸素条件下において生物学的分解を受けるが、PCEは無酸素条件下においてのみ分解（脱塩素化）される。かつて無酸素分解は有害なジクロロエテン類（DCEs）やビニルクロライド（VC）が蓄積するため、バイオレメディエーションには不向きと考えられた時期もあった。

しかし、“*Dehalococcoides ethenogenes* 195” と呼ばれる細菌が無酸素条件下でPCEをエテンにまで完全に無害化できることが報告¹⁾されて以来、この難培養性の細菌群は微生物学およびバイオレメディエーションにおいて注目され続けている。現在までに6菌株が分離されている。“*Dehalococcoides*”は既存の微生物とは一風変わった形態をしており、水素を電子供与体、塩化エテン類を電子受容体とする塩素呼吸によってエネルギーを獲得する非常にユニークかつ有益な微生物

である。

全ての“*Dehalococcoides*”細菌がPCEから無害のエテンまでを行える訳ではない。そのため、汚染現場に生息する微生物の分解能力を把握するためには、“*Dehalococcoides*”細菌の有無と同時にどの物質を基質とする分解酵素遺伝子がどの程度存在しているのかを把握する必要がある。現時点で、ゲノム解析等により60以上の異なる分解酵素遺伝子が見出されているが、機能が分かっているものは僅か4つのみである。

“*Dehalococcoides*”細菌の生態に関しては、汚染環境の修復に“*Dehalococcoides*”細菌が土着の細菌として寄与しているだろうとの報告⁴⁾が唯一で、ほとんど分かっていない。バイオレメディエーションと直結する生態学的問題点は、“*Dehalococcoides*”細菌に電子供与体である水素を供給している微生物が全く不明なことであるため、現場の持つ浄化能力を正當に評価することが困難な状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、土壌・地下水汚染の主要な汚染物質であるテトラクロロエテン（PCE）を対象物質とし、分解に寄与する微生物を生態学および分子レベルで解析し、バイオレメディエーション技術の向上を図ることを最終目的とする。

そこで、本研究室で多塩素化ダイオキシン脱塩素化集積物として継代培養している脱塩素化複合微生物培養物TUT2264を材料とし、TUT2264の塩素化エテン類に対する脱塩素化能、細菌群集構造、脱塩素化関連遺伝子の解析ならびにTUT2264内における“*Dehalococcoides*”と水素生産菌との間における種間水素伝達系に基づくPCE脱塩素化を分子レベルおよび生態学的に明らかにし、バイオレメディエーションの効率化を図れる知見を獲得することを目的とする。そこで、以下のことを明らかにする。

(1) TUT2264の塩素化エテン類に対する脱塩素化能、細菌群集構造および脱塩素化関連遺伝子の解析

(2) 電子供与体の違いが脱塩素化能に及ぼす影響の評価

(3) 種間水素伝達共生系の生態学的特徴を明らかにするため、水素無添加系および添加系を用いて、細菌群集の構造と機能（脱塩素化能および水素発生能）がどのように異なるのかを解析する。

3. 研究の方法

(1)

多塩素化ダイオキシン脱塩素化集積物として継代培養してきた TUT2264 の塩素化エテン類に対する脱塩素化能を把握するため、PCE を電子受容体とする培養系を設定し、経時的にガスクロマトグラフで測定した。

次に TUT2264 の細菌群集構造と脱塩素化関連遺伝子の解析を実施するため、DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子および RdhA 遺伝子を標的とした PCR を実施した。増幅された遺伝子断片をクローニングし、塩基配列を決定し系統学的解析を行った。

得られた RdhA 遺伝子情報を基に、TUT2264 の各 RdhA に特異的なプライマーを作成した。これらの遺伝子が、どの塩素化エテンの分解に寄与しているのかを調べるため、mRNA を抽出し逆転写定量リアルタイム PCR (RT-qPCR) を実施した。

(2)

電子供与体の違いが脱塩素化に及ぼす影響を調べるため、TUT2264 に異なる唯一の電子供与体（糖類 3 種、有機酸 4 種、アルコール類 2 種、アミノ酸 9 種を使用）を添加し、まず水素の発生量を比較した。その結果を基に、それぞれの電子供与体存在下での PCE 脱塩素化速度を比較した。

(3)

ヘッドスペース中の初期水素濃度を 0% (v/v) および 80% (v/v) として、PCE および TCE 脱塩素化速度を比較した。また、16S rRNA 遺伝子を標的とした real-time PCR 法により "Dehalococcoides" 細菌、水素生産細菌である *Acidaminobacter* 属細菌をモニタリングした。

4. 研究成果

(1)

多塩素化ダイオキシン脱塩素化集積物として継代培養してきた TUT2264 は、PCE を TCE に、さらに *trans*-1,2-dichloroethene (tDCE) および *cis*-1,2-dichloroethene (cDCE) にまで脱塩素化することが判明した。しかし、ビニルクロライド (VC) およびエテン (ETH) にまで脱塩素化できなかった (図 1)。

TUT2264 の脱塩素化能を更に把握するため細菌群集構造と脱塩素化遺伝子の解析を実施した。その結果、"Dehalococcoides" ならびに *Acidaminobacter* 属細菌が検出された。

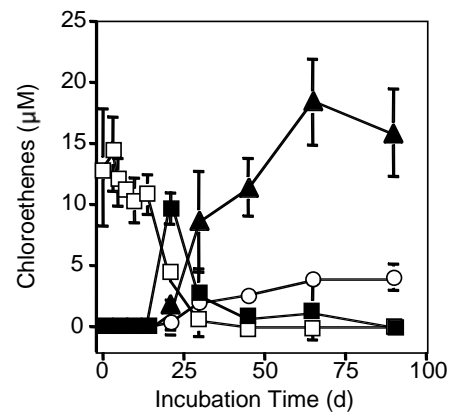


図 1. TUT2264 の PCE 脱塩素化
□: PCE、■: TCE、▲: tDCE、○: cDCE

また、RdhA 遺伝子の解析を実施したところ、8 種類の *rdhAs* が検出され、そのうち 5 つは新規遺伝子であった。これらがどの塩素化エテンの脱塩素化に関わっているのかを調べるため、転写レベルでの解析を行った (図 2)。

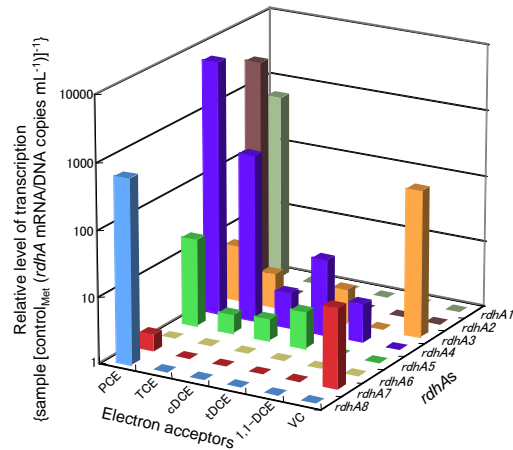


図 2. TUT2264 に含まれる RdhAs 遺伝子の塩素化エテン類に対する転写レベルでの応答

その結果、*rdhA6* 以外全てが PCE により転写レベルが増加し、特に *rdhA2*、*rdhA4* および *rdhA8* は 100 倍以上の増加を示した。一方で興味深いことに、脱塩素化能を示さなかった DCEs および VC に対しても複数の *rdhAs* において転写レベルの増加が確認された。このことは、培養条件がより適切化されれば、TUT2264 は PCE をエテンにまで完全無害化できる可能性を示している。これまで、ビタミン類の添加や PCE や TCE の追加等により、TUT2264 による PCE 完全無害化を図ってきたが、現時点ではまだ達成されていない。

(2)

脱塩素化には電子の供給が必要であり、これまでの培養系では電子供与体および栄養源としてクエン酸、酪酸および酢酸が添加されていた。TUT2264 を用いた PCE 脱塩素化にとって必要な電子供与体を把握するため、ま

ずPCE無添加系において各種電子供与体を添加し、どの程度の水素が発生するのかどうかを検討した(図3)。その結果、発生量は平均して $0.38 \pm 0.15\% \text{ mM}^{-1}$ であった。特に、乳酸、アラニンおよびグルタミンからの発生量が多く、それぞれ $0.58 \pm 0.10\% \text{ mM}^{-1}$ 、 $0.65 \pm 0.049\% \text{ mM}^{-1}$ および $0.47 \pm 0.12\% \text{ mM}^{-1}$ であった。

脱塩素化速度をアルギニン、グルタミン、エタノール、グルコースおよび対照サンプルと比較したところ、グルタミン酸およびグルコース添加系において約2倍のPCE脱塩素化活性を發揮した。このことから、適切な電子供与体を供給することにより、種間水素伝達が円滑に進行したものと推察された。

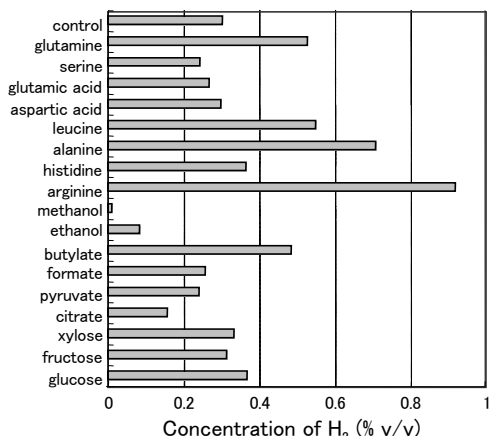


図3. 水素生産に及ぼす基質の影響

(3)

これまでの実験結果から、適切な基質と種間水素伝達系を利用できれば、効果的なPCE脱塩素化が図れることが示された。そこで、この種間水素伝達系に関する知見を得るため、ヘッドスペース中の初期水素ガス濃度を0% (v/v)および80% (v/v)条件下でPCE脱塩素化速度を測定した。その結果、初期水素ガス濃度0%系の方が80%の方よりも約3倍高いことが示された(図4)。

しかし、この結果は0%系および80%系で4回継代培養した結果である。そのため、脱塩素化能力の違いが集積に伴い細菌群集構造の差異あるいは菌密度の違いに依存している可能性がある。そこで、水素分圧が脱塩素化に影響を及ぼしているのかどうかを調べるため、0%系および80%系で集積した培養物を親培養物とし、そこからそれぞれ0%系および80%系を構築した(合計4つの系)。

その結果、集積過程における水素分圧に関わらず、0%系の方が80%系よりも高いPCEおよびTCE脱塩素化活性を示した。また、メタンガスの発生は80%系におい

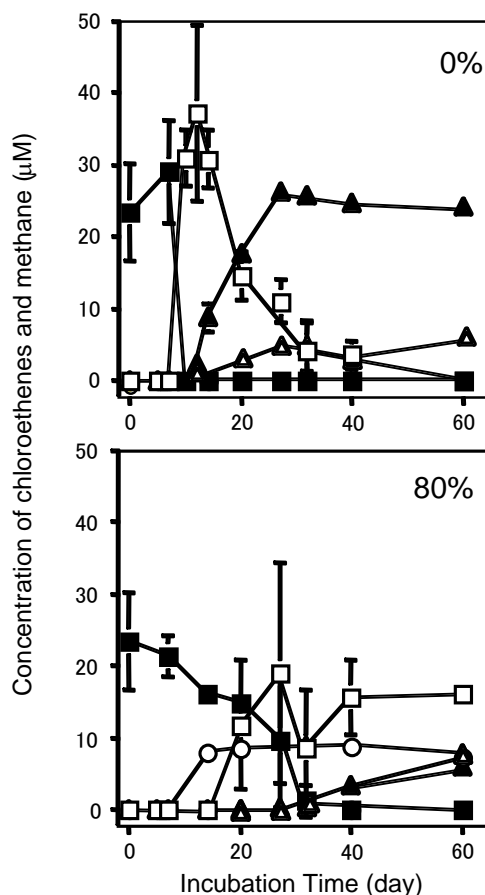


図4. PCE脱塩素化活性に及ぼす初期水素濃度の影響

■:PCE、□:TCE、▲:tDCE、△:cDCE、○:methane

でのみ観察され、0%系では観察されなかった。その要因を探るため、脱塩素化細菌”*Dehalococcoides*”および水素生成細菌*Acidaminobacter*属細菌について、16S rRNA遺伝子を標的としたreal-time PCR法によってモニタリングを実施した(図5)。その結果、*Acidaminobacter*属細菌は、水素分圧の違いに関わらずほぼ同じ傾向を示した。一方”*Dehalococcoides*”細菌数は0%系の方が80%系よりも約50倍から1000倍高いことが示された。これらの結果から、低水素分圧条件では効果的に水素が”*Dehalococcoides*”細菌に供給され、結果として塩素化エテン類を電子受容体とするエネルギー獲得機構を効率的に動かすことができたものと推察された。

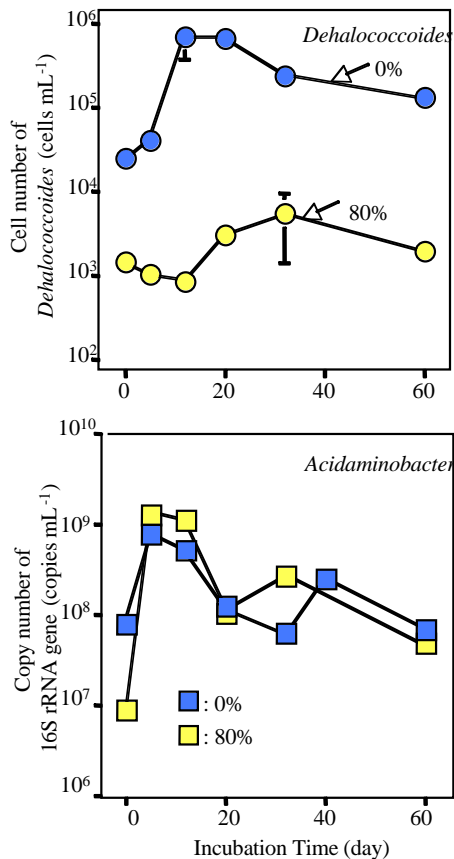


図5. 異なる初期水素濃度条件下における”*Dehalococcoides*”および*Acidaminobacter*属細菌のモニタリング

以上の結果から、種間水素伝達系に基づく異属微生物間の共生系は、低濃度の水素供給を可能とし、結果として”*Dehalococcoides*”とメタン生成細菌との水素を巡る競合阻害を回避し、効果的な脱塩素化を促進できることを示した。

低濃度水素条件下ではメタン生成古細菌群との水素を巡る競合に”*Dehalococcoides*”が打ち勝つことが示唆された。一方で、高濃度水素条件下で、なぜ脱塩素化活性が極端に低下するのかわからない。競合関係にあるメタン生成古細菌に関する知見を得るため、既存のプライマーを用いて遺伝子情報を得ることを試みたが増幅が確認されなかった。現在、ロールチューブ法により TUT2264 における構成微生物の分離を試みている。

また、水素分圧がヒドロゲナーゼの活性にどのような影響を及ぼしているのかを調べるため、まずは TUT2264 のヒドロゲナーゼ遺伝子群の解析を実施する。次に、分子生物学的解析手法を用いて、低濃度および高濃度水素分圧条件下で、発現している機能の差異を明らかにすることが、効果的な浄化技術の開

発に向けた今後の課題と考えられる。

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 4 件) 全て査読有り

- ① Narihiro, T., S. Kaiya, H. Futamata, and A. Hiraishi. 2010. Removal of polychlorinated dioxins by semi-aerobic fed-batch composting with biostimulation of “*Dehalococcoides*”. *J. Biosci. Biotechnol.* 109 (3):249-256.
- ② Futamata, H., S. Kaiya, M. Sugawara, and A. Hiraishi. 2009. Relationship between reductive- dehalogenase- homologous genes transcriptional level and dechlorinating activity in “*Dehalococcoides*” -containing tetrachloroethene-dechlorinating enrichment culture TUT2264. *Microbes and Environ.* 24:330-337.
- ③ Futamata, H. and A. Hiraishi. 2007. Biodiversity and ecophysiology of anaerobic dechlorinating microorganisms: implications for bioremediation. *Current Trend Microbiol.* 3:63-92.
- ④ Futamata, H., N. Yoshida, T. Kurogi, S. Kaiya and A. Hiraishi. 2007. Reductive dechlorination of chloroethenes by *Dehalococcoides*- containing cultures enriched from a polychlorinated- dioxin-contaminated microcosm. *The ISME J.* 1:471-479.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Hiroyuki Futamata Understanding of microbial ecosystem and its application. Pusan National University-Shizuoka University joint symposium and Graduate students forum for Promotion of the DDP. 2010年2月5日 静岡県浜松市
- ② ○上田紘也、山本脩二、飯倉智弘、二又裕之 “*Dehalococcoides*” 集積培養物 TUT2264 の塩化エチン類脱塩素化に及ぼす水素濃度の影響 日本微生物生態学会 2009年11月21日 広島県西条市、広島大学
- ③ 二又裕之 微生物生態系の潜在的浄化能力と相互作用 DNA組換え講演会 2009年11月19日 愛知県名古屋市 名城大学
- ④ 二又裕之 環境浄化とエネルギー生産複合微生物系の活性を如何にして最大限引き出すか テクノサロン浜松 2009年6月

8日 静岡県浜松市

- ⑤○Akemi Nose, Shinichi Kaiya, Takashi Kurogi, Hiroyuki Futamata and Akira Hiraishi Characterization of the dechlorinating enrichment culture TUT2264 with the different organohalides アジア・グリーンテック開発センター「アジア地域における炭素循環グリーンテクノロジー」The 1st international symposium on green technology for global carbon cycle in Asia 2009年3月23~24日 長岡技術科学大学
- ⑥○二又裕之、山崎亨友、平石明 Characterization of symbiotic dechlorinating consortium TUT2264 日本微生物生態学会 2007年9月 愛媛県松山市、愛媛大学.
- ⑦○Yukitomo Yamasaki, Hiroyuki Futamata, Mariko Sugawara, Akira Hiraishi Effects of different electron donors on hydrogen production in the dechlorinating consortium TUT2264 日本微生物生態学会 2007年9月15-18日 愛媛県松山市、愛媛大学

[図書] (計 1件)

- ①「生態恒常性工学」持続可能な未来社会のために、コロナ社 2008年 藤江幸一編 (分担「微生物機能を活用した汚染環境修復技術-微生物生態系の解明と活用に向けて-」 p163-166)

[その他]

ホームページ

<http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/~futamatalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二又 裕之 (Futamata Hiroyuki)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：50335105

(2) 研究分担者

平石 明 (Hiraishi Akira)

豊橋技術科学大学・エコロジー工学系・教授

(H21→H22：連携研究者)

研究者番号：40283486

(3) 連携研究者

平石 明 (Hiraishi Akira)

豊橋技術科学大学・エコロジー工学系・教授

研究者番号：40283486