

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651075

研究課題名(和文)脱塩素化集積物における代謝ネットワーク構造の解明とモデル系の構築

研究課題名(英文) Analysis of metabolic network in dechlorinating enrichment culture and construction of model system

研究代表者

二又 裕之 (FUTAMATA, Hiroyuki)

静岡大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50335105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：効率的なトリクロロエテン(TCE)脱塩素化を可能とする種間水素伝達系の特徴について解析した。非効率的TCE脱塩素化系では、脱塩素化条件下においてメタンの発生が確認された一方で、効率的TCE脱塩素化系では脱塩素化終了後からメタンの急激な発生が確認された。分子生物学的解析の結果、酢酸利用性メタン生成アーキアが脱塩素化と競合し、水素利用性メタン生成アーキアはDehalococcoidesと水素を巡る競合を生じないことが示唆された。効率的脱塩素化には、嫌氣的酢酸酸化細菌の活性が重要である。嫌気条件下で酢酸を分解するMoraxella osloensisに近縁の微生物の分離に成功した。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of hydrogen interspecies transfer which enables to dechlorinate trichloroethene (TCE) effectively was characterized. Methane production was observed during TCE-dechlorination in the non-effective dechlorinating culture, while methane was produced rapidly after TCE-dechlorination in the effective dechlorinating culture. Molecular techniques revealed that acetoclastic methanogens competed with Dechlorinator, on the other hand, hydrogenotrophic methanogens did not. These results suggested that the activity of anaerobic acetate oxidizing bacteria play a key role for efficient dechlorination. We succeeded to isolate anaerobic acetate oxidizing bacteria, closely related to Moraxella osloensis.

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：環境浄化 トリクロロエテン バイオレメディエーション 脱塩素化 Dehalococcoides Methanogen 競合

(1) 研究開始当初の背景

テトラクロロエテン (PCE) やトリクロロエテン (TCE) などのクロロエテン類は土壌および地下水の代表的な難分解性の有害汚染物質である。既に、これらの汚染浄化には "Dehalococcoides" 細菌群を活用したバイオレメディエーションが活用されている。しかし、還元的脱塩素化反応がエテンまでの完全無害化に至らず、*cis*-1,2-dichloroethene (cDCE)、*trans*-1,2-DCE (tDCE) あるいは vinyl chloride (VC) で止まる事例も多く報告されている<sup>1)</sup>。これらの問題を解決するには、汚染現場の持つ分解能力の評価あるいは効果的な脱塩素化を推進する微生物生態系の特徴を理解することが重要となる。しかし、これらの知見は非常に限られているのが現状である<sup>2), 3), 4), 5)</sup>。

効率的な脱塩素化を図る上で重要なことは、電子供与体から最終電子受容体であるクロロエテン類までの電子フローを滞り無く構築することにある。即ち、脱塩素化の種間水素伝達系に関わる微生物生態系を構築しその活性を発揮させることである。ここで無視できない微生物としてメタン生成アーキア (*Methanogens*) がある。*Methanogens* は "Dehalococcoides" と電子供与体である水素を巡る競合による脱塩素化の競合阻害を引き起こすため、methanogen の活性をできるだけ抑える方がよいとする報告や、*Methanogens* の生育阻害物質 BES の添加によって、"Dehalococcoides" の増殖と脱塩素化が抑制されること、その原因として脱塩素化酵素の補酵素であるコリノイドを *Methanogens* が供給している可能性も指摘されている。"Dehalococcoides" が未検出の培養物中において生じている脱塩素化 (共代謝としている) を担っているのは *Methanosarcina* sp. であるとする報告もあり<sup>6, 7)</sup>、不明瞭な状況となっている。

(2) 研究の目的

そこで本研究では、効率的な脱塩素化を可能とする微生物生態系構築を理解するため、継代培養過程で異なる分解特性を示した集積培養物の微生物群集構造を解析し、競合阻害の実態あるいはどのような微生物に着目すべきかに関する知見の取得を目的とした。

(3) 研究の方法

集積培養物の構築および脱塩素化能評価

本研究では、"Dehalococcoides" と近縁のクローンが検出された佐鳴湖 (静岡県浜松市) の底泥を接種源とし DHE2 培地<sup>8)</sup> に *cis*-1,2-dichloroethene (cDCE) を初期濃度約 10  $\mu\text{M}$  となる様添加し、継代培養を 3 回行った。その後、初期クロロエテンを TCE に変更し、継代培養により構築した集積培養物 LS-TCE を用いた。25  $^{\circ}\text{C}$  で静置培養し、適時ガスクロマトグラフによりヘッドスペース中のガスを分析した。また、培養液を採取し、

上清をフィルター濾過した後 HPLC によって有機酸を分析し、回収した菌体からは DNA を抽出し以下の解析に使用した。

微生物群集構造解析

優占微生物の群集構造を解析するため 16S rRNA 遺伝子の V3 領域を標的とした DGGE 解析を実施した。プライマー P2 および P3 (40 bp の GC クランプを含む) を用いて PCR 増幅した遺伝子断片を DGGE 解析した。また、バクテリアおよび *Methanogens* の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を実施した。バクテリアにはプライマーセット 27f/1525r<sup>9)</sup> を用い、*Methanogens* には、全アーキア、水素資化性 *Methanogens* および酢酸資化性 *Methanogens* の 16S rRNA 遺伝子を増幅するため、それぞれプライマーセット A20f/Arch958r<sup>10)</sup>、MMB282f/MMB832r および Mst702f/Mst862r<sup>11)</sup> を用いた。

"Dehalococcoides" 細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした Real-time PCR 解析を LightCycler FastStart DNA Master SYBR GREEN I kit (Roche Diagnostics) を用いて実施した。遠心分離により得られたペレットからフェノールおよびクロロホルムを用いて DNA を抽出精製した。特異的プライマーとして DHC793f および DHC946r を用いた<sup>12)</sup>。PCR は、95  $^{\circ}\text{C}$  で 15 秒間の変性、60  $^{\circ}\text{C}$  で 10 秒間のアニーリング、72  $^{\circ}\text{C}$  で 20 秒間の伸長反応後、シグナルを 81  $^{\circ}\text{C}$  で検出した<sup>8)</sup>。増幅されたコピー数は、LightCycler software v3.52 (Roche Diagnostics) を用いて解析された。

(4) 研究成果

脱塩素化特性

LS-TCE 初代 (cDCE を用いた継代培養 3 代目を親培養物とする) では、初期 TCE 濃度が約 120  $\mu\text{M}$  であったにも関わらず、エテンまでの完全脱塩素化に成功した。その間メタンは約 0.4 mM 生成された。完全な脱塩素化には約 130 日を要した (データ未表示)。LS-TCE 2 代目では 50% 植継を行い、初期 TCE 濃度を約 20  $\mu\text{M}$  とした。その結果、TCE、cDCE および VC をそれぞれ  $3.0 \pm 1.4 \mu\text{M day}^{-1}$ 、 $0.7 \pm 0.2 \mu\text{M day}^{-1}$  および  $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M day}^{-1}$  で脱塩素化し約 25 日で無害化した。この結果は、この集積培養物が極めて高い完全脱塩素化能力を有していることを示している。この間 "Dehalococcoides" は、約  $4 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$  から  $10^{11} \text{ cells mL}^{-1}$  にまで増加し、その後  $10^{10} \text{ cells mL}^{-1}$  まで減少した (図 1)。

また、メタンの発生が培養初期から観察された。全体の傾向として脱塩素化が終了するまでは約  $22 \pm 0.2 \mu\text{M day}^{-1}$  の発生速度で約  $0.5 \pm 0.06 \text{ mM}$  の発生量であった。しかし VC が完全にエテンに変換された後では、 $150 \pm 16 \mu\text{M day}^{-1}$  と加速し約  $3.4 \pm 0.2 \text{ mM}$  にまで蓄積した。

有機酸の変化を見ると、この培養系の電子供与体であるクエン酸が減少し、酢酸の蓄積が約 6 mM 蓄積した。脱塩素化と関連させると、TCE および cDCE の脱塩素化には、クエン酸由来の還元力が利用されていると考えられる。蓄積した酢酸は、脱塩素化が終了するまでほとんど変化無く、脱塩素化終了後のメタンの急激な増加とリンクして酢酸の急激な減少が観察された。

以上の結果から、継代 2 代目の LS-TCE においては、脱塩素化が生じている間は、*Methanogens* による "*Dehalococcoides*" 脱塩素化に対する競合阻害は非常に小さかったと判断された。また、培養後期における、酢酸の減少とメタンの発生がリンクしていたことから、酢酸資化性 *Methanogens* の関与が示唆された。

一方、2 代目 LS-TCE を 30% 植継いだ 3 代目 LS-TCE では、脱塩素化活性が大きく異なった。即ち、TCE および cDCE は速やかに脱塩素化されたものの、VC の脱塩素化速度は極めて遅く完全脱塩素化に至っていない。また、メタンの発生と蓄積した酢酸の減少はリンクしていたものの、メタンの発生時期が脱塩素化の時点から急激に増加した。一方で、"*Dehalococcoides*" は  $3 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> から  $4 \times 10^{11}$  cells mL<sup>-1</sup> へ増加していたこと (図 1) から、3 代目 LS-TCE における脱塩素化活性の低下は、"*Dehalococcoides*" の菌数減少によるものではなく活性の低下、すなわち *Methanogens* との水素を巡る競合阻害と考えられた。

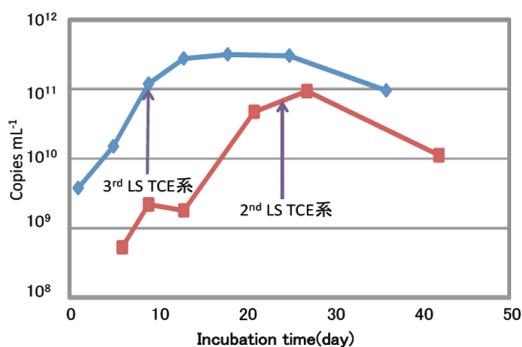


図 1. *Dehalococcoides* の菌密度変化

#### 微生物群集構造解析の解析

集積培養物 LS-TCE の 2 代目および 3 代目の脱塩素化活性の違いが何に起因するのかを調べるため、微生物群集構造の解析を行った。2 代目の培養 21 日目および 3 代目の培養 18 日目を試料とした。バクテリアを対象としたクローンライブラリーの結果、優占種の構成に大きな変化は見られなかった。両サンプルにおいて検出された "*Dehalococcoides*" のクローンは GT 株と 99% 以上の相同性を示した。

"*Dehalococcoides*" sp. GT 株は、TCE、cDCE、1,1-DCE および VC を共代謝に依らず脱塩素化し最終産物としてエテンを生成する

ことが知られている<sup>13)</sup>。Real-time PCR およびクローンライブラリーの結果から、2 代目および 3 代目において脱塩素化能を担っているのは "*Dehalococcoides*" sp. GT 株に近縁の細菌であると考えられる。

興味深いことに、*Methanogens* の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリーの結果、2 代目で優占化していたのは水素資化性メタン生成アーキアである *Methanocorpusculum labreanum* Z 株に近縁のクローン (相同性 100%) であった (約 82% を占めた)。*M. labreanum* Z 株は、CO<sub>2</sub> あるいは酢酸を炭素源としエネルギー源として H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub>、あるいは蟻酸を利用する<sup>14)</sup>。これらの特徴からも本株に近縁の微生物が継代培養 2 代目中に生息していたと推察される。しかし、3 代目で優占化していたのは酢酸資化性メタン生成アーキアの *Methanosaeta concilii* GP-6 株に近縁のクローンであった (79%)。 *Methanosaeta* 属アーキアは酢酸でのみ生育することが知られている。

2 代目におけるメタン生成は、脱塩素化が生じていた間は水素資化性メタン生成アーキアによるもので、それ以降の酢酸の減少を伴うメタンの発生には酢酸資化性メタン生成アーキアが関与していたことが示唆された。3 代目 LS-TCE は、2 代目 LS-TCE の培養 60 日目を接種源としているため、すでに酢酸資化性メタン生成アーキアが優占化したと考えられる。このことは、結果として早い時期からのメタン発生を招いたと推察される。

以上の結果から、全ての *Methanogens* が深刻な競合阻害を引き起こす訳でなく、少なくとも水素資化性メタン生成アーキアの *Methanocorpusculum labreanum* あるいは *Methanofollis liminatans* に近縁の *Methanogens* は "*Dehalococcoides*" の脱塩素化を強く阻害するものでないことが示された。LS-TCE における電子供与体は最初クエン酸であり、その次に酢酸にシフトする。脱塩素化が阻害された 3 代目では酢酸が速やかに消費され、2 代目では脱塩素化の間では酢酸は一期間を除いてほとんど変化しなかった。 "*Dehalococcoides*" および水素資化性メタン生成アーキアが直接酢酸を利用できないとするならば、嫌氣的に酢酸を酸化する細菌の存在とそれとの種間水素伝達による脱塩素化とメタン生成という電子フローが示唆される。その場合、最も重要なのは酢酸を巡る酢酸資化性メタン生成アーキアと嫌氣的酢酸酸化細菌との競合であり、嫌氣的酢酸酸化細菌が有利となった場合に効率的脱塩素化が可能になると考えられる。競合阻害の本質は、 "*Dehalococcoides*" と *Methanogens* との直接的なものではなく、嫌氣的酢酸酸化細菌と *Methanogens* の酢酸を巡る競合であることが示唆された。嫌氣的に微生物を分離後、70 余コロニーに関して調べた結果、*Moraxella osloensis* に近縁の酢酸を

嫌氣的に分解する微生物の取得に成功した。今後、嫌氣的酢酸酸化細菌をどのようにして選択的に活性化させるのか、あるいは酢酸資化性メタン生成アーキアを選択的に抑制できるのか、が効率的脱塩素化にとって極めて重要な課題になると考えられる。

#### (5) 総括

一連の継代培養物を用いて、脱塩素化活性の差異を微生物生態学的に解析した。その結果、これまで水素を巡る、“*Dehalococcoides*”と*Methanogens*の競合が脱塩素化活性に影響すると考えられてきたが、実は、嫌氣的酢酸酸化細菌と*Methanogens*の酢酸を巡る競合が重要であることが示唆された。加えて、“*Dehalococcoides*”と嫌氣的酢酸酸化細菌の種間水素伝達系をどのようにして構築するかが今後の重要な課題になるといえるだろう。本件に関して現在更なる研究を進展中である。

#### 参考文献等

1. Harper CR, Chessin R, Goldhaber S. 1996: Potential for human exposure. p81-108. In Frederick G, Derek H, Norman T, and Benjamin VD (ed), Toxicological profile for 1,2-dichloroethene. Agency for toxic substances and disease registry. Public Health Service, U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, USA.
2. Suyama A, Yamashita M, Yoshino S, Furukawa K. 2002: Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. J. Bacteriol. 184:3419-3425.
3. Magnuson JK, Romine MF, Burris DR, Kingsley MT. 2000: Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogens*; Sequence of *tceA* and substrate range characterization. 66:5141-5147.
4. Krajmalnik-Brown R, Holscher T, Thomson IN, Saunders FM, Ritalahti KM, Löffler FE. 2004: Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. Appl. Environ. Microbiol. 70:6347-6351.
5. Muller JA, Rosner BM, Abendroth G, Meshulam-Simon G, McCarty PL, Spormann AM. 2004: Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. 70:4880-4888.
6. Fathepure, BZ and Boyd SA. 1988: Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. FEMS Microbiol. Lett. 49:149-156.
7. Jablonski, PE and Ferry JG. 1992: Reductive dechlorination of trichloroethylene by the CO-reduced CO dehydrogenase enzyme complex from *Methanosarcina thermophila*. FEMS Microbiol. Lett. 96:55-60.
8. Futamata H, Yoshida N, Kurogi T, Kaiya S, Hiraishi A. 2007: Reductive dechlorination of chloroethenes by *Dehalococcoides*-containing cultures enriched from a polychlorinated-dioxin-contaminated microcosm. The ISME J. 1:471-479.
9. Weisburg, WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.
10. Jung S and Regan JM. 2011: Influence of external resistance on electrogenesis, methanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells. Appl. Environ. Microbiol. 77:564-571.
11. Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. 2005: Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol. Bioeng. 10:671-679.
12. Hiraishi A, Kaiya S, Miyakoda H, Maruyama T, Kato K, Futamata H. 2005: Estimation of “*Dehalococcoides*” populations in lake sediment contaminated with low levels of polychlorinated dioxins. Microbes Environ. 20:216-226.
13. Sung Y, Ritalahti KM, Apkarian RP, Löffler FE. 2006: Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. Appl. Environ. Microbiol. 72:1980-1987.
14. Anderson IJ, Sieprawska-Lupa M, Goltsman E, Lapidus A, Copeland A, Rio TGD, Tice H, et al. 2009: Complete genome sequence of *Methanocorpusculum labreanum* type strain Z. Standards in Genomic Sci 1:197-203.

#### (6) 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1件)

森岡啓幸、佐藤成晃、判治輝章、二又裕之 2012 塩素化エテン類脱塩素化集積物における微生物群集構造の解析と脱塩素化能力 CD-ROM (paper No. 107) 第18回地下水・土壌汚染とその防止対

策に関する研究集会【査読有】

〔学会発表〕(計7件)

Electronic flow for efficient reductive dechlorination of trichloroethene in an enrichment culture. Kenji Suzuki, Hiroyuki Morioka, Naruaki Sato, Teruaki Hanji, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata. UPM-Shizuoka University International colloquium 2014. 3<sup>rd</sup> March 2014. Malaysia (Universiti Putra Malaysia)

Electron flow for efficient reductive dechlorination of trichloroethene in enrichment culture. Hiroyuki Morioka, Naruaki Sato, Teruaki Hanji, Hiroya Ueda, Shuji Yamamoto, and Hiroyuki Futamata. WET2012 (Water and Environment Technology Conference in 2012) 2012. June. 30. Tokyo, Japan  
効果的脱塩素化を可能とする微生物生態系における種間水素伝達系の特性解明 鈴木健司、森岡啓幸、二又裕之 第44回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2013年11月2日 静岡大学(静岡県浜松市)

効果的脱塩素化を可能とする微生物群集構造における種間水素伝達 森岡啓幸、佐藤成晃、判治輝章、上田紘也、山本脩二、鷺坂智明、二又裕之 第64回日本生物工学会 2012年10月25日 兵庫県神戸市(神戸アイランド)

Construction of *ortho*-chlorinated toluene-dechlorinating enrichment culture. Tomoaki Sagisaka, Hiroyuki Morioka, Kenneth H. Nealson, Hiroyuki Futamata. 第28回日本微生物生態学会 2012年9月20日 愛知県豊橋市(豊橋技術科学大学)

Electron flow for efficient reductive dechlorination of trichloroethene in enrichment culture. Hiroyuki Morioka, Naruaki Sato, Teruaki Hanji, Hiroya Ueda, Shuji Yamamoto, and Hiroyuki Futamata. WET2012 (Water and Environment Technology Conference in 2012) 2012. June. 30. Tokyo (Tokyo University)

塩素化エテン類脱塩素化集積物における微生物群集構造の解析と脱塩素化能力 森岡啓幸、佐藤成晃、判治輝章、二又裕之 第18回土壌地下水浄化研究集会 2012年6月14日 埼玉県さいたま市

〔図書〕(計0件)

〔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://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/futamatalab/member/hiroyuki-futamata/>

(7) 研究組織

(1) 研究代表者

二又 裕之 (FUTAMATA Hiroyuki)

静岡大学・工学研究科・教授

研究者番号：50335105