

分子生物学的手法を併用した嫌気性テトラクロロエチレン脱塩素細菌の単離及び同定

水圏環境制御工学研究室 松井康哲
指導教官 大橋晶良, 原田秀樹

1. はじめに

テトラクロロエチレン (PCE) 等の有機塩素化合物は、地下水・土壌の代表的な汚染物質である。これらの物質は、ドライクリーニング産業や IC 産業での洗浄剤及び溶剤として使用されてきたが、人体への毒性や発癌性の疑いがされており現在では使用が制限されている。これらの物質は過去の曖昧な管理が理由で地下圏に多量に浸透しているケースが多い。また、これらの物質が環境中における生物分解を受けにくいことが分かっており、汚染サイトでは 20 年以上ほとんど自然浄化されないままであるという調査報告もある。そのような汚染の浄化策として、生物機能を利用した汚染修復技術であるバイオレメディエーションが確立されつつある。バイオレメディエーションの研究では、分解力を持つ生物の探索とそれらの生理情報の把握、また、生物の環境中における挙動を把握するモニタリング手法の開発などの基礎的知見を得ることが研究課題であり、PCE 分解微生物に関しては 10 年ほど前から研究が始まり、過去 5 年間で精力的に研究がされるようになった。それらの研究によれば、PCE は様々な微生物が混在した微生物コンソーシアと言う形では完全に無害化されるが、単独の微生物としては現在のところ PCE は嫌気性微生物のみにより分解され、分解株としては約 20 株が単離・同定されている。しかし、それらのほとんどの株は PCE を中間産物のジクロロエチレン (DCE) までは分解するが完全に無害化することはできなかつたと報告されている。しかしながら近年、単独で PCE の完全分解を可能とする微生物が初めて単離されたという報告があった (Maymo-Gatell *et al.*, 1997)。この微生物は水素を利用し PCE を無害なエチレンにまで分解する嫌気性細菌であるが、特殊な生育環境を要求するため培養困難と報告されており、産業利用への普及がなされていないのが現状である。したがって、PCE の完全分解機構の解明や微生物の管理法を確立してゆくには、脱塩素株の単離作業により、その実態を捉えることが必要とされるが、従来は、微生物の形質に大きく

依存した単離展開であったため、分解株の取得には極めて煩雑な作業を要することが問題点とされていた。一方、モニタリング技術として培養を介さず原位置で脱塩素株を特異的に検出する手法があるが、この手法で用いる PCE 脱塩素株用の DNA プローブの開発報告はまだほとんどなく、開発の必要性があると考えられる。

そこで本研究では、分子生物学的手法を従来の単離・培養法に組み合わせることで、脱塩素細菌の単離・同定を試みることで、単離株を検出するための DNA プローブの開発を行い検出を試みることを目的とした。本研究での取り組みの結果、分子情報を活用することで、PCE から *cis*-DCE までの分解力を持つ新規の脱塩素細菌を単離することに成功した。また分離株を含む脱塩素細菌 *Desulfitobacterium* 属を検出できる DNA プローブを開発した。一方、PCE 完全分解微生物に関しては、本研究では分離することはできなかったが、より集積の進んだ培養系を得ることができた。その集積系内には、未知の PCE 分解菌が存在していると示唆された。

2. 研究方法

2.1 分子生物学的手法による微生物集積コンソーシアの解析

本研究では小松らが培養に成功した PCE 分解嫌気性培養系 (以下、集積コンソーシア) を用いた (Komatsu *et al.*, 1997)。このコンソーシアは下水処理場の中温消化汚泥を起源としており、10 mg/L の PCE を 1 週間程度でほぼ完全に無害なエチレン・エタンまで転換することができる。コンソーシア内の微生物相の分子生物学的手法による解析では、FISH 法 (Fluorescence *in situ* hybridization) の適用と共に、コンソーシア内の細菌及び古細菌由来の 16S rRNA 遺伝子を標的とするクローンライブラリの作成を行った (Fig. 1)。FISH 法は Amann ら (Amann, 1995; Amann *et al.*, 1995) の方法に準拠した。最初に当法への試料の準備として、PCE 分解微生物コンソーシア内の菌体の固定を 4%パラホルムアルデヒド固定液

で行った。16S rRNA を標的とする DNA プローブは、細菌 (*Bacteria*) を特異的に検出する EUB338 プローブ、古細菌 (*Archaea*) を特異的に検出する ARC915 プローブを用いた。結果の観察には CCD カメラ付きの蛍光顕微鏡 (OLYMPUS FLUO VIEW BX50) を使用した。

クローンライブラリの作成では、まず集積培養液中の菌体由来の DNA をビーズビーター法で抽出し、16S rRNA を polymerase chain reaction 法 (PCR) で増幅させた。その増幅には *Bacteria* を標的とする二組のプライマーセット (EUB10F & UNIV1500R, EUB341F & UNIV1500R) 及び *Archaea* を標的とする一組のプライマーセット (ARC111F&UNIV1500R) を用いた。その後、PCR 増幅産物をクローニングに供した。そして、ランダムに選択した幾つかのクローン群について制限酵素 *Hae*III を用いた RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 解析を行った。最後に、各 RFLP パターンを代表するクローンについてその塩基配列を決定した。その結果は、BLAST search によってホモロジーサーチを行った。

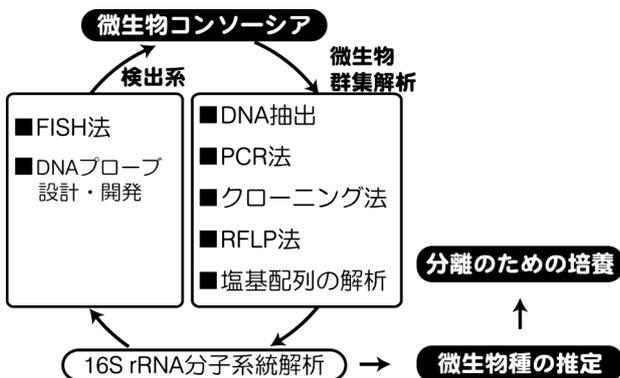


Fig.1 16S rRNA アプローチを介した微生物群集の解析概要図

2.2 PCE 脱塩素細菌分離の試み (1)

PCE 脱塩素細菌の分離は従来からの培養・分離法として知られるシリアルダイリューション法、ロールチューブ法、低温殺菌法を用いて試みた。培養の植種源は、前述の PCE 分解嫌気性培養系とし、培地は Widdle らの Widdle-W 培地 (Widdle & Pfening, 1981) を用いた。培養は 25 静置培養とした。基質は、先のクローン解析結果から推定された、脱塩素細菌として知られる *Desulfitobacterium* 属が利用する、ピルビン酸、エタノール、チオ硫酸、酵母抽出液等を組み合わせて用いた。

単離株の脱塩素能の調査は、PCE 等の塩化エチレン類をヘキサデカン溶液にて溶解したものを最終濃度で 100 μ M で添加し、その分解及び生成産物を調査することで評価した。塩化エチレン類の分析にはガスクロマトグラフィー (GC-FID) を用いた。

2.3 DNA プローブの開発と *Desulfitobacterium* 属細菌の検出

Desulfitobacterium に属する細菌を特異的に検出するための遺伝子プローブを設計するため、現在までにデータベース上に登録されている同属の細菌、クローン、本研究で単離した株由来の 16S rDNA 配列を全て収集した。それらの塩基配列の分子系統解析は、16S rDNA 配列のアライメントを ARB プログラムで行い、系統進化距離の推定を MEGA package (Kumer *et al.*, 1993) において近隣接合法 (Neighbour-joining method), (Saito & Nei, 1987) を用いて行い、系統樹を作成することによって行った。また、その系統樹のトポロジーの確かさは、1000 回のブートストラップ解析によって検証した (Felsenstein, 1985)。なお、系統樹作成の際の外群には *Bacillus subtilis* を用いた。

遺伝子プローブの設計は、*Desulfitobacterium* には特異的であり、他の微生物には非特異的な部位を検索することで行った。その際のプローブの長さは 15~22 mer 程度で設計した。遺伝子プローブの 2 次構造は、DNASIS-Mac v3.7 においてプローブの高次構造が適正かどうかをチェックした。設計した遺伝子プローブの信頼性は、Blast search 及び Ribosomal Database project へ設計塩基配列を送信し、データベース内の目的微生物との相同性から確認した。ミスマッチングについては 0~2 塩基までチェックした。設計した DNA プローブの適用性は *Desulfitobacterium* 純粋株に対する FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法により確認した。

2.4 PCE 脱塩素細菌分離の試み (2)

分離の標的はクローンライブラリ内で優占的に存在した *Dehalococcoides* sp. とした。培養の植種源は、小松らの PCE 分解嫌気性培養系とした。最初にこのコンソーシア内から *Dehalococcoides* の検出を目的として FISH 法を行った。FISH 法では 2001 年に山田が開発し

た Green non-sulfur bacteria (subdivision 1,2,3) を特異的に検出可能な GNSB936-Cy3 及び GNSB936M プローブを等モルで混合して用いた (山田, 2001)。

分離・培養手法は、主にシリアルダイリューション法、ロールチューブ法、抗生物質添加、必須基質添加 (前培養液由来の上澄み液等) を用いた。基質は主として水素 (0.5~1 atm), PCE (100~200 μM) 等の塩化エチレン類とした。脱塩素の調査は前述 (2.2) の方法に準じた。メタン及び水素の測定はガスクロマトグラフィー (GC-TCD) を用いた。

単離株の 16S rRNA 遺伝子の同定は、単離株から proteinase K によって直接 DNA を抽出し、マルチキャピラリー-DNA 解析システム CEQ2000 (BECKMAN COULTER 社) を用いて行った。

3. 結果及び考察

3.1 分子生物学的手法による微生物集積コンソーシアの解析

微生物コンソーシア内を位相差顕微鏡により観察した結果、コンソーシア内には未だ形態的にも多様な微生物が存在していることが分かった。そこでコンソーシアに *Bacteria*, *Archaea* に特異的な DNA プローブによる FISH 法を適用した結果、多種の形態を持つ細菌群と数種の形態を持つ古細菌を含むコンソーシアであることが判明した (Fig. 2)。

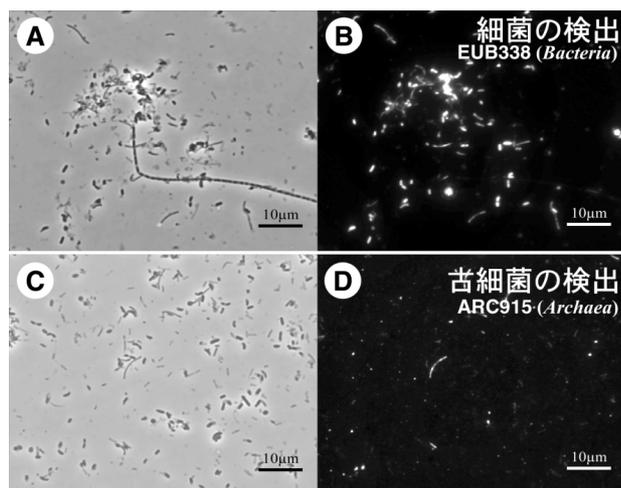


Fig. 2 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of anaerobic PCE degrading consortium using *Bacteria* targeted Cy3-labeled EUB338 probe (A & B), *Archaea* targeted Cy3-labeled ARC915 probe.

そこで、コンソーシア内の細菌群と古細菌群の解析を行うこととした。まず、コンソーシア内の微生物から抽出した DNA から細菌及び古細菌由来の 16S rDNA を PCR で増幅後、それらのクローンライブラリを作成した。

クローンライブラリ内からランダムに 20 以上のクローンを選択し、それらを RFLP 法によりパターン化し解析した結果、*Bacteria* では 10 以上の異なるパターンが出現した。一方、*Archaea* のクローンライブラリの RFLP 解析では、*Bacteria* と比較して、RFLP 解析による切断断片のパターン数が少なく、ランダムに選択したクローンの中で高頻度で検出されたクローンはクローンライブラリ内の半数以上を占めていた。そこでクローンライブラリ内において比較的優占度の高いクローン群の 16S rRNA の塩基配列を解析した。その結果、*Bacteria* の場合、*Dehalococcoides* sp., *Dehalobacter* 属, *Desulfitobacterium* 属など脱塩素株として知られる株と高い相同性を示す (95~99%の相同性) クローンが多数出現した (Table 1)。一方、*Archaea* の場合、ライブラリ内で高い優占度を示したクローンの 16S rDNA が *Methanospirillum* sp. や *Methanosaeta concillii* などのメタン生成古細菌として知られる古細菌と高い相同性を示すクローングループが幾つか存在することが判明した (Table 2)。

Table 1 Result of Bacterial clone library (PCR primer: EUB341F & UNIV1500R).

RFLP No.#	closest phylogenetic relatives of clones	%similarity to closest relative	dominancy in the clone library	
			number of clones	rate (%)
1	<i>Dehalococcoides</i> sp.	99	9	31
2	<i>Dehalobacter restrictus</i>	96	5	17
3	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	95	3	10
4	<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	98	3	10
5	uncultured bacterium SJA-136	91	2	7
6	uncultured bacterium SJA-28	92	1	3
7	<i>Canocytophaga cynodegmi</i>	92	1	3
8	<i>Tessaracoccus bendigoniensis</i>	94	1	3
9	<i>Spirochete</i> sp.	86	1	3
10	<i>Clostridium virde</i>	97	1	3
11	<i>Clostridium sticklandii</i>	97	1	3
12	<i>Succiniclasticum ruminis</i>	89	1	3
			29	

Table 2 Result of Archaeal clone library (PCE primer: ARC111F & UNIV1500R).

RFLP No.#	closest phylogenetic relatives of clones	%similarity to closest relative	dominancy in the clone library	
			number of clones	rate (%)
1	<i>Methanospirillum</i> sp.	99	25	57
2	<i>Methanospirillum hungatei</i>	96	9	21
3	<i>Methanosacta concillii</i>	95	4	9
4	<i>Methanosacta concillii</i>	98	2	5
5	<i>Methanomethylovorans</i>	91	1	2
6	<i>Methanosacta concillii</i>	92	1	2
7	<i>Methanosacta concillii</i>	92	1	2
8	<i>Methanospirillum hungatei</i>	94	1	2
			44	

3.2 PCE 脱塩素細菌分離の試み (1)

集積コンソーシア内の、クローンライブラリ法等に基づく分子系統解析情報によれば、集積コンソーシア内にはこれまでに脱塩素細菌として知られている微生物と分子系統的に近い微生物が複数種存在していると示唆された。そこでまず、比較的高頻度で検出された *Desulfitobacterium* に属すると思われる細菌の分離を試みた。最初にエタノール等の各種電子供与体及びチオ硫酸を電子受容体として、集積コンソーシアを植種源とする嫌気希釈培養と嫌気コロニー培養を試みた。その結果、数種の微生物を単離したが、それらは遺伝的に標的とする微生物ではなく、脱塩素能を調査したが脱塩素は行わなかった。その後、ピルビン酸等を電供与体及びチオ硫酸を電子受容体として分離を試みたところ、標的微生物と形態が類似する微生物を含むシンプル系となった。そこで低温殺菌法を適用した結果、標的微生物と考えられる複数の微生物の単離に至った (Fig. 3)。それらの株の 16S rRNA 遺伝子を用いて分子系統解析を行ったところ、*Desulfitobacterium* 属に属す新規の細菌であることが明らかとなった (Fig. 4)。また脱塩素試験では、これらの株が PCE を DCE まで脱塩素を行うことが可能であると示された。

新規の *Desulfitobacterium* 属細菌の分離に成功 !!

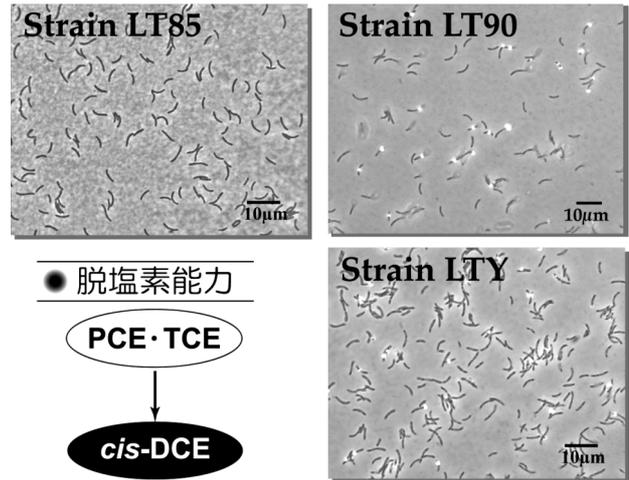
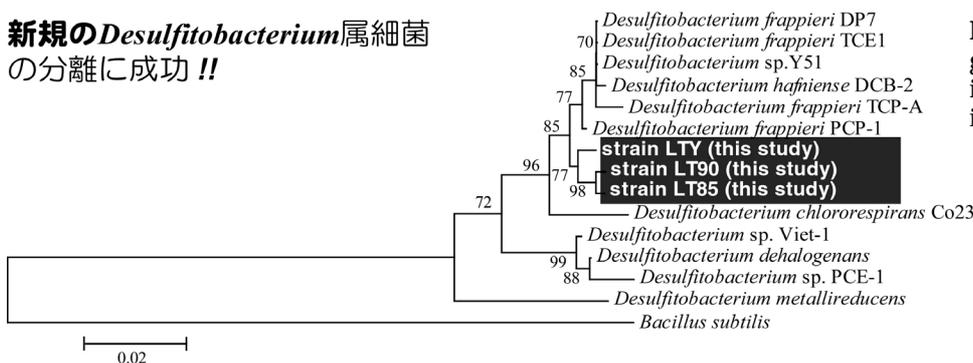


Fig. 3 PCE degrading bacteria isolated in this study growing on lactate/ thiosulfate and (Yeast extract).

3.3 *Desulfitobacterium* 属細菌を特異検出する DNA プロブの開発

収集した 16S rDNA を ARB プログラムを用いて多重アライメントを行い、*Desulfitobacterium* 属細菌及び本研究での分離株 3 株を含む細菌に対して特異的な 15 ~ 22 mer 程度の長さからなる部位を検索したが特異的部位が少ないために検索は非常に難航した。しかしながら、混合塩基を含むという条件で 18 塩基からなるプロブの設計を行った。次に、この配列を各種核酸塩基配列データベースに送信し、塩基配列の特異性を検査した。その結果、当塩基配列は、*Desulfitobacterium* 属及び本研究での単離株 3 株を含む細菌に対して特異であることが示された。尚、この部位と 1 塩基ミスマッチする微生物はなく、2 塩基ミスマッチでは数株存在した。以上の過程で設計したプロブを DFB439 プロブ (5'-TRCCGTTCCGTCCCTGAAR-3') と命名した。

Fig.4 Phylogenetic tree of genus *Desulfitobacterium* includes isolated strains in this study.

開発した DFB439 プローブは FISH 法において、用意した全ての目的株を検出可能であることを立証できた。また、当 DNA プローブを用いて嫌気性 PCE 分解微生物コンソーシア内の *Desulfitobacterium* 属細菌の検出を試みた結果、コンソーシア内から実際に *Desulfitobacterium* 属細菌を検出することが可能であった (Fig. 5)。

DFB 439 probe (This study)

5'-TRCCGTTCCGTCCTGAAR-3'

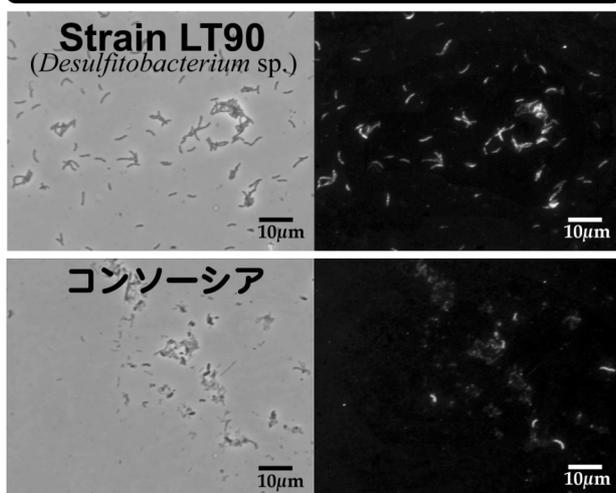
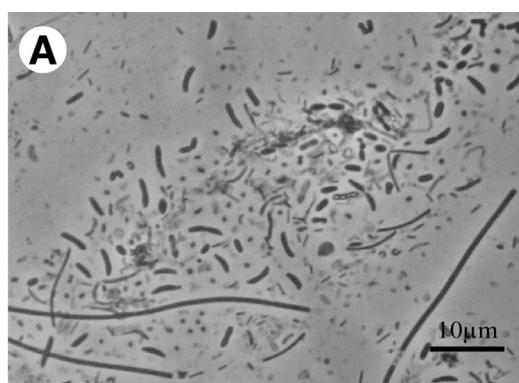


Fig. 5 Results of Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to detect *Desulfitobacterium* spp. with Cy3-labeled DFB439 probe (developed in this study).

3.4 PCE 脱塩素細菌分離の試み (2)

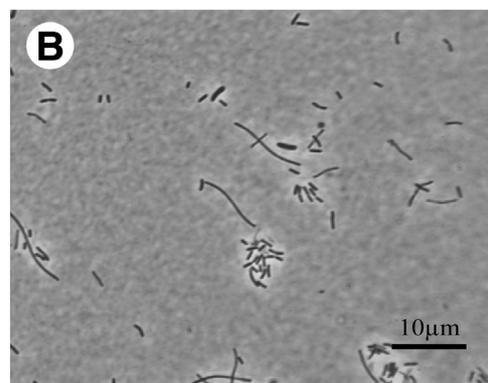
分子生物学的手法による嫌気性微生物コンソーシア内の解析の結果から、コンソーシア内で比較的多く存在する脱塩素細菌と示唆された *Dehalococcoides* sp. とされる微生物の単離を試みた。まず培養の前に *Dehalococcoides* sp. の検出を FISH 法によって試みたが検出することができなかった。このことから、*Dehalococcoides* sp. とは別の新規の脱塩素微生物が存在している可能性があるとし唆された。しかしながら、分離を目的とした培養では、クローニングの結果を仰ぎ、文献等から *Dehalococcoides* sp. の培養法を参考にして培養を試みた。その培養では、最初に水素を電子供与体及び PCE を電子受容体として試験培養を試みた。その結果、同基質条件で PCE をエチレンまで無害化する能力を損なわない培養系を得ることができ、その培養系を植種源とす

るコロニー培養を幾度か展開したところ、メタン生成古細菌が常に生息する、より集積の進んだ、無害化能力を持つ培養系を得ることができた (Fig.6)。その培養系から水素資化性メタン生成古細菌の単離は可能であったが、その古細菌は脱塩素を示さなかったことから、他の微生物が脱塩素を担っているものと思われた。しかし、現在のところは脱塩素株の単離には至っていない。過去の文献によれば脱塩素細菌の生育には水素分圧が関わるとい報告もあるため、水素資化性メタン生成古細菌が脱塩素株の生育に深く関与している可能性があるとし唆された。



PCE → ethene & ethane

Ethanol (10 mM), PCE (100 µM),
Yeast extract (0.01%)



PCE → ethene

Hydrogen (0.5 atm), PCE (100 µM)

Fig. 6 Phase contrast micrographs of original anaerobic PCE degrading enrichment culture (A), and more purified degrading consortium growing on hydrogen and PCE fed medium (B).

4. まとめ

本研究では、代表的な地下水汚染物質であるテトラクロロエチレンを分解する嫌気性微生物の単離・同定及び検出を試みることを目的として研究に取り組んだ。その結果、分子生物情報を活用することで、数株の PCE から *cis*-DCE まで分解する新規の脱塩素細菌を単離することに成功した。また、これら分離株を含む脱塩素細菌 *Desulfitobacterium* 属を検出できる DNA プローブを開発した。一方、PCE 完全分解微生物に関しては、本研究では分離することはできなかったが、より集積の進んだ培養系を得ることができた。この集積系内には、今までに知られていない PCE 分解菌が存在していることが示唆された。

参考文献

- Amann, R. I. (1995).** *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes. In Akkermans, A.D. L. and van Elsas, J. D. (ed.), *In Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, London, **p1-15**.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.***59**, 143-169.
- Komatsu, T., Shinmyo, J., Momonoi, K. (1997).** Reductive transformation of tetrachloroethylene to ethylene and ethane by anaerobic filter. *Wat. sci. Tech.***36**: 125-132.
- Fleishman, J. (1985).** Confidence limits of phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* . **39**: 783-791
- Kumar.S., K.Tomura and M. Nei .(1993).** *MEGA : Molecular evolutionary genetics analysis* , version 1.0 ; The pennsylvania state university , university park.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y-T., Gossett, J. M. and Zinder, S. H. (1997).** Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**: 1568-1571.
- Saito, N. and M. Nei. (1987).** The neighbor-joining method : a new method for constructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* **4** ; 406-425
- Widdel.F, and N. Prenning. (1981).** Studies on dissimilatory sulfate reducing bacteria that decompose fatty acids I. Isolation of new sulfate reducing bacteria enriched with acetate from saline environment. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch.*

Microbiol. **129**:395-400

山田剛史 (2001)."嫌気性廃水処理系に多数存在する新規繊維状細菌の多様性と生態". 長岡技術科学大学大学院工学研究科修士論文.

