

論文

バイオレメディエーションに向けた 遺伝子解析による VOC 分解菌のプロファイリング

秋山 恭子^{*1)} 紋川 亮^{*1), *2)}

Profiling of Reductively VOC Bacteria by Gene Analysis for Bioremediation

Kyoko Akiyama^{*1)}, Akira Monkawa^{*1), *2)}

It is well known that tetrachloroethylene (PCE) and trichloroethylene (TCE) are organic pollutants in soil and are used in various fields including the manufacture of semiconductors, metallic instrument processing, and in dry cleaning as cleaning agents or solvents. Bioremediation is an attractive method in the technological field of the cleanup of polluted environments based on natural processes. The detection of microbes by molecular biology is important to understand the effect of bioremediation and its influence on the ecosystem. Real-time PCR is a powerful tool for bioremediation to detect and enumerate the target bacteria that are directly related to the degradation of contaminants. The 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene and dehalogenase (RDase) genes provide fingerprinting of bacterial cells. We demonstrated that dechlorinated anaerobic bacteria such as *Dehalococcoides* sp. were detected by the Real-time PCR approach targeting 16S rRNA genes and three *Dehalococcoides* reductive dehalogenase (RDase) genes with assigned function (i.e., *tceA*, *verA*, and *bvcA*).

キーワード：揮発性有機化合物，バイオレメディエーション，遺伝子解析，リアルタイム PCR

Keywords：VOC (Volatile Organic Compound), Bioremediation , Gene analysis , Real-time PCR.

1. はじめに

2003年の土壌汚染対策法の施行により，有害物質使用特定施設の使用廃止時や土壌汚染による健康被害が生ずるおそれがあると都道府県等が認める土地においては，土地汚染状況の調査報告が義務付けられている。このような背景から，近年，土壌浄化法による浄化措置がより一層求められている。土壌汚染物質としては，揮発性有機化合物（VOC：Volatile Organic Compound）に分類されるテトラクロロエチレン（PCE）やトリクロロエチレン（TCE），ジクロロエチレン（DCEs）などの塩素系化合物が挙げられる。これら塩素系 VOC は難分解性で比重が水より重いため，容易に土壌へ浸透し帯水層に到達し，地下水へと汚染を広げる。PCE や TCE は，ドライクリーニングや金属，機械，電子産業の洗浄剤，化学産業の溶媒に使用され，企業規模に関わらず，様々な業種が汚染源になる可能性が指摘されている。

VOC 浄化方法として，物理的処理方法（掘削除去方法，土壌ガス吸引法等），化学的処理方法（ホットソイル法，鉄

粉混合法等）等の処置がなされている。しかしこれらの方法はコストが高く，作業フィールドも大きいため，大規模企業での導入に限られる。また汚染が低濃度になるにつれ，コスト，処理時間に見合った浄化効果が得られなくなる問題がある。そこで，注目されているのがバイオレメディエーション法である（栄養剤を投入し汚染物質分解菌の活性を促進する方法を，特にバイオスティミュレーション法と呼ぶ）。一般的に浄化に 2~3 年を要するものの，安価でエネルギー投入量が小さく，小規模企業での導入が可能な VOC 浄化法としても期待されている。この工法には分解菌が現場に存在していることが必須であり，且つ分解菌の菌相変動を追跡することで，栄養剤の適切な投入が可能になる。

VOC 分解菌として，PCE 脱ハロゲン化嫌気性菌の *Dehalococcoides ethenogenes* 195⁽¹⁾ や硫酸還元菌の *Desulfitobacterium frappieri* 等が知られている。表 1 に示した通り，VOC 分解菌は脱ハロゲン化により PCE を TCE，DCEs，塩化ビニル（VC），エチレンへと段階的に分解する⁽²⁾。だが，難培養性である VOC 分解菌の有無を，培養し，同定調査することは難しい。そこで，本研究では，VOC 分解菌として最もよく知られている *Dehalococcoides* 属菌の

*1) 地域結集事業推進部

*2) ライフサイエンスグループ

表1. 分解菌による VOC の脱ハロゲン化反応

分解に関する菌	分解経路					嫌気性 or 好気性
	PCE CCl ₂ =CCl ₂	TCE CCl ₂ =CHCl	DCEs CHCl=CHCl	VC CH ₂ =CHCl	エチレン CH ₂ =CH ₂	
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	→					嫌気性
<i>Dehalococcoides</i> sp. FL2		→				嫌気性
<i>Dehalococcoides</i> sp. VS			→			嫌気性
<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1			→			嫌気性
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	→					嫌気性
<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	→					嫌気性
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> TCE1	→					嫌気性
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	→					嫌気性
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	→					嫌気性
<i>Acetobacterium woodii</i>	→					好気性
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>			→			好気性
<i>Xanthobacter flavus</i>			→			好気性
<i>Mycobacterium aurum</i> L1				→		好気性

存在を、分子生物学的手法を用いて確認することを目的とした。本研究においては、*Dehalococcoides* 属菌が普遍的に保有している 16SrRNA 遺伝子と、表 2 に示す VOC 分解酵素遺伝子⁽³⁾のうち 3 種 (*tceA*, *vcrA*, *bvcA*) についてリアルタイム PCR (Polymerase Chain Reaction) 法で解析し、VOC 汚染土壌において VOC 分解能を有する *Dehalococcoides* 属菌の有無を調査した。

2. 遺伝子解析の実験方法

2.1 DNA の抽出 地域結集プログラムの浄化試験で利用している K 市の汚染場所 A, B 2 地点で採取された土壌から ISOIL (NIPPON GENE 社製) を用い、以下のように DNA を抽出した。用いた土壌試料を表 3 に示す。

0.5 g の土壌サンプルを 2 ml の滅菌チューブに入れ、950 μl の Lysis Solution HE と 50 μl の Lysis Solution 20S を添加し、転倒混和にて十分に混合した。その後、65 °C で 1 時間保持した後、遠心分離 (15,000 rpm, 1 分間, 室温) した。上精 600 μl を新しい滅菌チューブに移し、400 μl の精製溶液を添加し、十分に混合した。さらに 600 μl のクロロホルムを添加し、15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、遠心 (15,000 rpm, 15 分間, 室温) によりタンパク質と DNA を分離させた。タンパク質の中間層が混ざらないよう、DNA が存在する水層 800 μl を新しい滅菌チューブに移動した。水層に 800 μl の DNA 沈澱溶液を添加し、十分に混合した後、遠心 (15,000 rpm, 25 分間, 4 °C) した。上精を捨て、1 ml の洗浄溶液を加えて転倒混和し、遠心 (15,000 rpm, 25 分間, 4 °C) により DNA を沈殿させた。上精を捨て、1 ml の 70 % エタノールと 2 μl のエタチンメイトを加えてボルテックスミキサーにて攪拌した後、遠心 (15,000 rpm, 25 分間, 4 °C) により DNA を精製した。上精を捨て、風乾した

後、50 μl の TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、DNA 溶液を得た。

表 2. VOC 分解段階と VOC 分解酵素遺伝子の対応

PCE →	TCE →	DCEs →	VC →	エチレン
<i>pceA</i>	<i>tceA</i>	<i>tceA</i> <i>vcrA</i>	<i>tceA</i> <i>bvcA</i>	

表 3. 土壌試料

土壌試料 No.	土壌地点と採取深度	土の状態
1	A GL-1.8 ~ -1.9 m	黒く水分が少ない
2	A GL-3.8 ~ -3.9 m	明るい茶色の粘土質で、砂粒が観察される
3	A GL-5.9 ~ -6.0 m	灰茶色で水分が少なく固い
4	B GL-1.8 ~ -1.9 m	黒く水分が少ない
5	B GL-3.8 ~ -3.9 m	明るい黄土色の粘土質で、砂粒が観察される
6	B GL-5.8 ~ -5.9 m	明るい灰茶色で水分が少なく固い

表4. プライマーおよびプローブの配列

プライマーおよびプローブ名		配列 (5' 3')	検出目的遺伝子名 (accession no.)
Dhc16S	For	GGTAATACGTAGGGAAGCAAGCG	<i>Dehalococcoides</i> sp. 16SrRNA gene (CP000027)
	Rev	CCGGTTAAGCCGGGAAATT	
	Probe	FAM-ACATCCAACCTTGAAAGACCACCTACGCTCACT-TAMRA	
tceA	For	ATCCAGATTATGACCTGGTGAA	<i>tceA</i> gene (AF228507)
	Rev	GCGGCATATATTAGGGCATCTT	
	Probe	FAM-TGGGCTATGGCGACCGCAGG-TAMRA	
vcrA	For	CTCGGCTACCGAACGGATT	<i>vcrA</i> gene (AY322364)
	Rev	GGGCAGGAGGATTGACACAT	
	Probe	FAM-CGCACTGGTTATGGCAACCACTC-TAMRA	
bvcA	For	GGTGCCGCGACTTCAGTT	<i>bvcA</i> gene (AY563562)
	Rev	TCGGCACTAGCAGCAGAAATT	
	Probe	FAM-TGCCGAATTTTCACGACTTGATGAAG-TAMRA	

(For : Forward Primer , Rev : Revers Primer)

2.2 アルタイム PCR 法 抽出した各 DNA 溶液をリアルタイム PCR (7500 fast Real - time system / Applied Biosystems 社製) に供するため、PCR 反応溶液を調製した。プライマー終濃度 500 nM、プローブ終濃度 100 nM、DNA 溶液 2 μ l を Taqman fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製) にて調製し、総量を 20 μ l とした。*16SrRNA*、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* を検出するために用いたプライマー、およびプローブセットを表 4 に示す⁽⁴⁾。リアルタイム PCR 測定は、同一試料において 3 回繰り返した。またネガティブコントロールにヒトの cDNA を用いた。PCR の反応条件は 1 ステージ目が 60 秒、1 分、2 ステージ目が 95 秒、3 分、3 ステージ目の 1 ステップ目が 95 秒、10 秒、2 ステップ目が 61.5 秒、30 秒、4 ステージ目を 60 秒、1 分に設定し、3 ステージ目を 40 サイクル繰り返すことで目的の遺伝子を増幅させた⁽⁵⁾。

3. 実験結果と考察

3.1 遺伝子抽出方法の検討 土壌試料から遺伝子を抽出する方法として、本研究では、ISOIL キットを用いた。この抽出法では、界面活性剤存在下、加熱抽出法にて細胞壁膜を溶かすとともに、核酸を分解する酵素類を変性させ DNA を抽出する。ビーズビート法のように物理的な力を加えることなく土壌中の DNA を抽出するため、高分子の DNA が得られる。ただし、強固な細胞壁を持つ微生物などは破碎されない可能性があるが、本実験ではターゲットとなる遺伝子が高分子量のため、この抽出法を選択した。

本実験で抽出した DNA 量について、0.5 g の土壌から 7 ~ 60 μ g/ml の濃度で得られた。得られた DNA 量は生物の存在量に反映される。各土壌試料での DNA 抽出量は試料 No. 1 が最も多く、No. 1 > 6 > 3 > 4 > 5 > 2 の順になっており、採取した土壌によって存在する生物量の違いが明らかになった。

3.2 アルタイム PCR による分析結果 リアルタイム PCR 法は PCR 増幅産物をモニタリングするため、指数関数的増幅域で遺伝子の正確な定量ができる方法である。よって、SNPs (1 塩基多型) タイピングや遺伝子組み換え食品の検査、ウイルスや病原菌の検出、導入遺伝子のコピー数の解析など様々な用途に応用されている。遺伝子発現解析のような定量解析は、リアルタイム PCR の得意とするところであるが、検出感度に優れるため、目的の遺伝子、つまり目的の生物の有無を判断する解析にもその威力を発揮する。

今回測定に用いた汚染土壌 6 試料における 4 遺伝子 (*16SrRNA*、*tceA*、*vcrA*、*bvcA*) の検出結果を表 5 に示した。

表5. 各遺伝子の発現

土壌試料 No.	1	2	3	4	5	6
遺伝子名						
<i>16SrRNA</i>		-	-	-		
<i>tceA</i>	-	-	-	-	-	-
<i>vcrA</i>	-	-	-	-	-	-
<i>bvcA</i>		-	-	-		

(- : 不検出, - : 3 反復中すべて検出)

16SrRNA 遺伝子は、*Dehalococcoides* 属菌由来の遺伝子である。*16SrRNA* 遺伝子は、試料 No. 1, 5, 6 から検出され、*Dehalococcoides* 属菌の存在が確認された。一方 *tceA*、*vcrA*、*bvcA* の 3 種の遺伝子は、*Dehalococcoides* 属菌の中でも、VOC 分解能力を有するものに存在する VOC 分解酵素遺伝子で、VOC を嫌気的環境下で脱ハロゲンのに分解するために欠か

せない遺伝子である。分析の結果、TCE を DCEs に分解する *tceA* と DCEs を VC に分解する *vcrA* の VOC 分解酵素遺伝子は確認されなかったが、VC をエチレンに分解する *bvcA* が試料 No. 1, 5, 6 から検出された。

VOC 完全分解菌として知られる *D. ethenogenes* 195 は、*tceA* 酵素遺伝子を保有するが、今回 *tceA* 酵素遺伝子は検出されなかった。本結果は、*D. ethenogenes* 195, および TCE を DCEs に分解できる菌が存在していないことを示唆している。また、*vcrA* 酵素遺伝子は、例えば VOC 分解菌である *Dehalococcoides* sp. VS などに存在するが、本遺伝子も今回測定した試料からは検出することができなかった。本結果は、DCEs を VC に分解できる菌が存在していないことを示している。一方、*bvcA* 酵素遺伝子は、例えば *Dehalococcoides* sp. BAV1 などに存在する。本測定の結果、*bvcA* 酵素遺伝子が検出され、VC をエチレンに分解する *Dehalococcoides* 属菌が存在していることが明らかになった。

以上の結果から、リアルタイム PCR 分析により、土壤試料の *Dehalococcoides* 属細菌の検出に成功するとともに、その VOC 分解能の有無を検出することに成功した。本 VOC 汚染土壤は *Dehalococcoides* 属菌の中でも VC をエチレンに分解できる菌が存在しているが、PCE, TCE, DCEs の 3 種類の VOC を分解できる菌が存在していないことが明らかになった。この結果は、本汚染サイトにおいて、もともと存在していた PCE, TCE, DCEs がすでに VC まで分解し、浄化ステージが VC をエチレンに分解する最終段階に位置していることが示唆される。リアルタイム PCR 法による VOC 分解菌の検出法は、ガスクロマトグラフィー法による土壤サンプル中の VOC 濃度検出と併用することにより、土壤浄化の進捗状況を詳しく把握することが可能となる。

今後は、増幅された遺伝子を塩基配列解析（シーケンス解析）することにより、VOC 分解菌の特定を進める予定である。塩基配列決定により、新たな VOC 分解菌の発見につながることを期待される。また、PCR-DGGE 法を用いて網羅的に VOC 汚染土壤の菌群を解析し、VOC 分解に良好な菌群を解析することが可能になる。VOC 分解菌として知られている菌だけでなく、VOC 分解菌を活性化する菌の挙動も解析することで、VOC 分解をより促進させることが期待できる。

4. まとめ

リアルタイム PCR を利用した遺伝子解析は VOC 汚染土壤分解菌のプロファイリングに有効であった。今後、この遺伝子評価方法と土壤ガス分析法を組み合わせることによって、新規バイオレメディエーション技術を構築する際のツールとして利用できると期待される。

（平成 21 年 7 月 8 日受付、平成 21 年 8 月 21 日再受付）

文 献

- (1) Maymo-Gatell, X., Y. T. Chien, J. M. Gossett, and S. H. Zinder et.al. : " Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethane ", Science, Vol. 307, No.105, pp.1568-1571 (1997)
- (2) 伊藤善孝, 鈴木圭一, 安藤卓也, 梨本一男, 丹羽和裕, 島田和哉 : 「 土壤・地下水浄化有用微生物の検出技術とバイオレメディエーション 」, Matsushita Technical Journal, Vol. 53, No. 1, pp.16-21 (2007)
- (3) 埴原盛, 草場周作, 養王田正文, 西村実 : 「 クロロエテン類を対象とした原位置バイオレメディエーションにおける *Dehalococcoides* 属細菌の挙動解析 」, 地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究会講演集 (CD-ROM), 14th, ROMBUNNO, S4-15 (2008)
- (4) Patrick K, H. Lee, Tamzen W. Macbeth, Kent S. Sorenson, Jr., Rula A. Deeb, and Alvarez-Cohen. : " Quantifying genes and transcripts to assess the in situ physiology of "*Dehalococcoides*" spp. in a trichloroethene - contaminated groundwater site ", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, No.9, pp.2728-2739 (2008)
- (5) Sebastian Behrens, Mohammad F. Azizian, Paul J. McMurdie, Andrew Sabalowsky, Mark E. Dolan, Lew Semprini, and Alfred M. Spormann, : " Monitoring abundance and expression of "*Dehalococcoides*" species chloroethene-reductive dehalogenases in a flow column" , Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, No. 18, pp.5695-5703 (2008)