

Dehalococcoides mccartyi NIT01 株の塩素化エチレン脱塩素化酵素の特定

名古屋工業大学 学生会員 ○浅井 柁樹 正会員 吉田 奈央子

1. 緒言

Dehalococcoides 属細菌は地下水汚染物質である塩素化エチレン(以下 CE)を無害なエチレンまで還元的に脱塩素化する細菌である。本研究室で分離した *D. mccartyi* NIT01 株は高い CE 分解能を示しており、*Dehalococcoides* 属細菌の分離株単独の浄化事業として初めて微生物によるバイオレメディエーション利用指針の適合確認をうけ、本年、民間企業による実証試験が実施されている(図 1)。しかし、NIT01 株が何故高い CE 分解能を示すか、その機構は不明である。本研究では NIT01 株ゲノム上に在る 19 種の還元的脱塩素化酵素遺伝子(以下 *rdhA*)から発現されると推定される還元的脱塩素化酵素(以下 RdhA)を細胞から抽出し、どの RdhA が CE 脱塩素化に関与するかを特定することを目指した。

2. 実験方法

2.1 NIT01 株からの RdhA の抽出

RdhA は細胞の内膜上に存在することから、細胞を破碎し(step1)、細胞膜を分離後(step2)、界面活性剤 DDM で可溶化する(step3)ことで抽出した(図 2)。細胞は超音波ホモジナイザーを用いて破碎し、超音波破碎液を超遠心分離して膜画分を分離回収した。膜画分を懸濁後に DDM を加え、膜画分タンパクを抽出した。

2.2 RdhA の分離

膜画分タンパク抽出液を分子ふるいフィルターを用いて脱塩・濃縮後(step4)、陰イオン交換クロマトグラフィー(以下 AEX)で分離した(step5)。AEX は負に帯電しているタンパク質をアニオン交換樹脂カラムに吸着させることでイオン化傾向の異なるタンパクを分離できる。カラム内塩化物イオン(以下 Cl^-)濃度を 0.0~1.0 M へと増加し膜画分タンパク質を分離した。AEX 分離液はフラクションコレクターで回収した。

2.3 RdhA の *cis*-DCE 脱塩素化試験

メチルビオロゲンを電子供与体として RdhA の *cis*-ジクロロエチレン(以下 *cis*-DCE)脱塩素化活性を測定した(step6)。活性測定溶液のヘッドスペースのガスを GC 分析することで、塩化ビニル(以下 VC)およびエチレン濃度を算出した。脱塩素化活性[U]は 1 分間に *cis*-

DCE から生成された VC およびエチレンの濃度を合算した遊離 Cl^- 生成速度[$\mu\text{mol}/\text{min}$]とした。

2.4 RdhA の検出・同定

Cis-DCE 脱塩素化活性がある AEX 分離液を SDS-PAGE で電気泳動した(step7)。SDS-PAGE で分離したバンド中のタンパク質をトリプシン処理後に LC-MS/MS 分析し、アミノ酸配列を特定した(step8)。特定したアミノ酸配列と NIT01 株のゲノム情報から CE 脱塩素化に関与する RdhA の特定を行った。

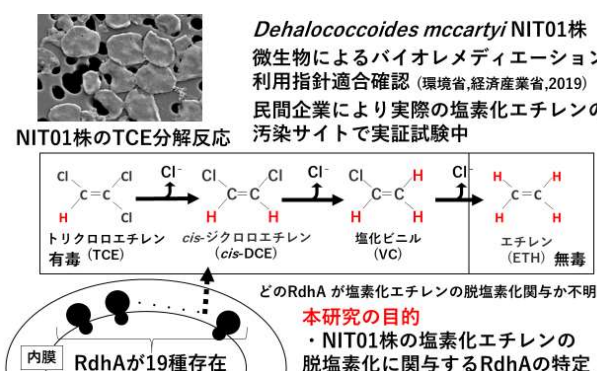


図 1 研究目的の概要

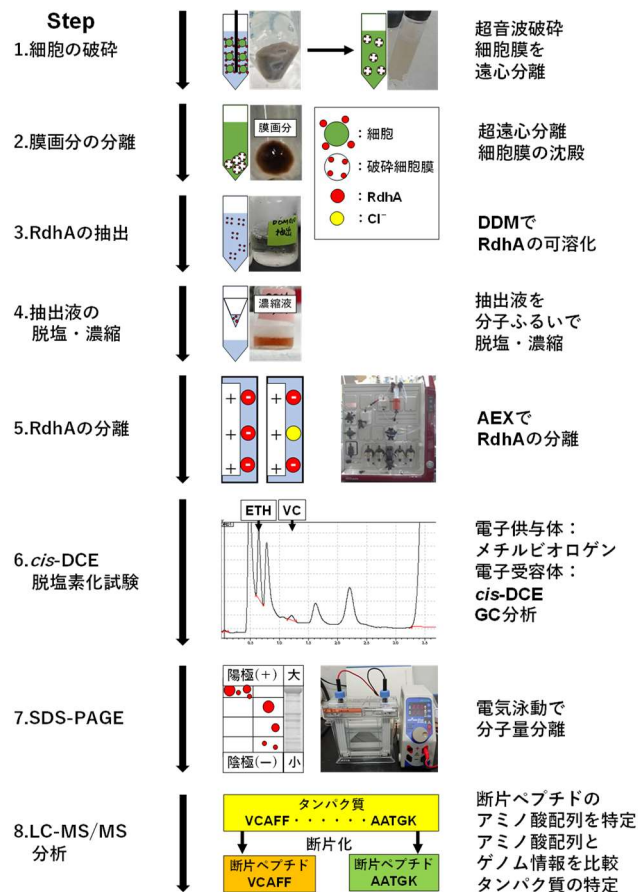


図 2 実験の流れ

3. 結果および考察

3.1 RdhA の脱塩素化活性回収率

本研究では合計 4 回の抽出実験を行った. Step1~4 の抽出過程における *cis*-DCE の脱塩素化活性回収率を表 1 に示す. 活性回収率は超音波破碎液全量における脱塩素化活性[U]を 100%とした. 膜画分分離で 30%, 可溶化で 10%まで減少し, 脱塩・濃縮で 0.4%に著しく減少した.

3.2 RdhA の脱塩素化活性の濃縮率

Step1~4 の抽出過程における *cis*-DCE の脱塩素化活性濃縮率を表 1 に示す. 活性濃縮率は超音波破碎液全量に含まれるタンパク質 1mg 当たりの脱塩素化活性[U/mg]を 100%とした. 膜画分分離で 120%, 可溶化で 100%となった. 抽出過程でタンパク質中の RdhA の割合が大きくなるため, 値は増加するはずが増加しなかった. これは失活が活性濃縮よりも大きいためと考えられる.

3.3 RdhA の AEX 分離

AEX での分離結果を示す(図 3A). Cl⁻濃度が 120, 140, 440, 500, 800, 840 mM で溶出されたフラクション F1~F6 で脱塩素化活性が検出された. F1~F3 で *cis*-DCE はエチレンまで脱塩素化し, F4~F6 では VC まで脱塩素化した(図 3B). AEX 分離に用いた脱塩・濃縮後液全量における脱塩素化活性[U]を 100%とすると分離後の各 AEX 分離液の合計の活性回収率は 0.19%まで減少し, AEX 分離の過程においても活性が大きく減少した.

3.4 RdhA の検出・同定

F1~F6 の AEX 分離液を SDS-PAGE した結果 F2, F3, F4 でバンドが検出され(図 4A), いくつかのバンドを切り出し LC-MS/MS 分析した. RdhA の分子量である約 50kDa 相当のバンド c, e において複数の RdhA が検出された. CE 脱塩素化に関与することが示されている VcrA¹ と高い類似性を示す RdhA7 が相対的に多い一方, CE 脱塩素化が報告されていない RdhA5, 6, 15, 17, 19 が検出された. これより NIT01 株が CE 脱塩素化培養時に複数の RdhA を発現していることが示された. さらに 100kDa 相当のバンド a, d において H₂ 脱水素酵素のサブユニット酵素とともに RdhA が検出されており, NIT01 株の RdhA が H₂ 脱水素酵素とともに複合体²を形成することが示された.

表 1 脱塩素化活性回収率および濃縮率

	Step1[%]	Step2[%]	Step3[%]	Step4[%]
活性回収率	100	29±7.5	9.3±6.2	0.41±0.49
活性濃縮率	100	120±110	100±100	-

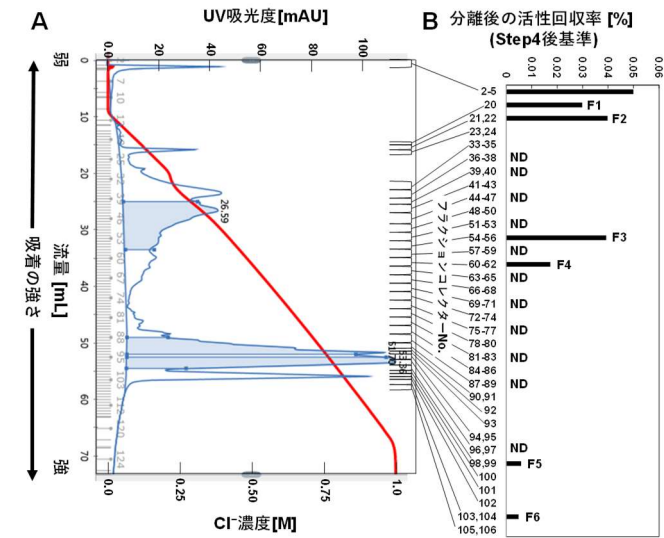


図 3 分離結果 (A: AEX 分離結果, B: 各フラクション活性回収率)

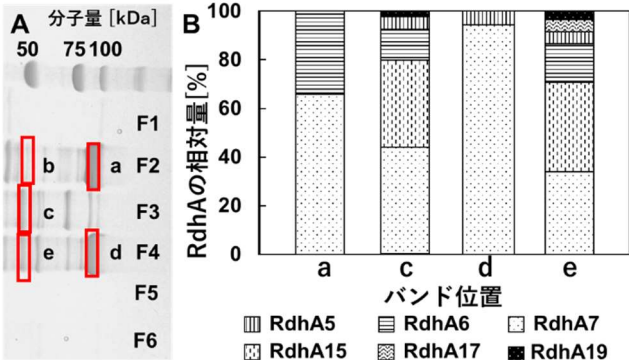


図 4 LC-MS/MS 分析結果 (A: SDS-PAGE の結果, B: 各バンドにおける RdhA の相対量)

4. 結論

NIT01 株では 19 種の RdhA のうち, RdhA5, 6, 7, 15, 17, 19 の 6 種が発現していることが示唆された. これより NIT01 株は複数の RdhA が CE 分解に関与するため, CE 分解能が高いことが考えられる. しかし, RdhA を単一に分離できていないため, CE 脱塩素化に関与する RdhA の特定はまだできていない.

5. 参考文献

¹Müller et al.(2004). Applied and Environmental Microbiology 70:4880
²Seidel et al.(2018). Frontiers in Microbiology 9:1130