

VII-20 土壤汚染現場由来の TCE 還元デハロゲナーゼの多様性とその定量検出

東北学院大学 正会員 ○中村 寛治
栗田工業（株） 石田 浩昭
栗田工業（株） 水本 正浩

1. はじめに

テトラクロロエチレン（PCE）やトリクロロエチレン（TCE）の塩素化エチレンは長期にわたってドライクリーニングの溶剤や金属の洗浄剤として使用されてきたが、それらの物質は貯蔵タンク等から漏出し、日本各地で土壌、地下水を汚染している。PCE、TCE は、発ガン性や肝機能障害を誘発する可能性が指摘されており、早急な処理が望まれている。一方、PCE、TCE は嫌気性条件下で微生物の作用により、シスジクロロエチレン（c-DCE）、ビニルクロライド（VC）を経て、無害なエチレンやエタンに還元分解されることが知られている。本反応において PCE あるいは TCE から c-DCE までは土壌汚染現場に存在する様々な細菌によって速やかに行われる。しかしながら、c-DCE からエチレンまでの反応は、*Dehalococcoides* 属細菌が生息しない場合は速やかに進まない。つまり、*Dehalococcoides* 属細菌の存在が汚染現場の PCE や TCE の完全な脱塩素化の鍵を握っているといっても過言ではない。我々はこれまでに、国内の TCE 汚染サイトに存在する *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA の取得、解析を行い、Real-Time PCR による高感度検出法を確立した。*Dehalococcoides* 属細菌による土壌浄化法は既に実用化され、複数の浄化実績があるが、本検出法は、*Dehalococcoides* 属細菌による土壌浄化において有効なプロセス管理手法として現場で利用されている¹⁾。

本研究では、解析対象を TCE 還元デハロゲナーゼ（TCE、c-DCE、VC 分解能を有する）をコードしている遺伝子 *tceA* に基づき、国内の汚染サイト由来の *tceA* を複数取得し、その多様性を解析する。また、解析結果から *tceA* を標的とした Real-Time PCR による定量検出法の確立を試みた。

2. 実験材料および方法

tceA を取得したのは、汚染サイトの土壌を種に回分培養を行っていた Vial A および Vial B、連続分解試験を行っていた Reactor A、汚染サイト地下水の Field A 由来の 4 種類のサンプルからである。これら 4 種類のサンプルは、それぞれ異なる汚染サイト由来である。対象サンプルから抽出した DNA をテンプレートに *tceA* 全域を含む DNA 断片の PCR 増幅を行った。プライマーは *tceA* 上流域に存在する *orf1* および *tceA* 下流域に存在する *tceB* の塩基配列を利用し、次の通りデザインした。Upper プライマーは 5'-TAACCTTCTAAAACATC CTG-3'、Lower プライマーは 5'-GCACCACCCATAATAATCTA-3'とした。PCR 反応は、Pre-heating-94℃、2 分に続き、第 1 段階-94℃、20 秒、第 2 段階-53℃、30 秒、第 3 段階-72℃、3 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension-72℃、7 分を行った。本反応には、アプライドバイオシステムズ製 GeneAmp PCR System 2400 を利用した。増幅 DNA を基に *tceA* の塩基配列決定を行った。この 4 種類とデータベース上の *tceA* 塩基配列を比較し、塩基配列が同じ部分を利用して Real-Time PCR 用のプライマーを次の通りデザインした。Upper プライマーは 5'-GGGTGACCACGCTAATAAAG-3'、Lower プライマーは 5'-CATTCATGGTTCGCA TAGAG-3'とした。本プライマーペアによって、*tceA* の前方部分の約 300 bp の増幅が可能となる。また、Real-Time PCR にはロッシュ社製の LightCycler を利用し、ハイブリダイゼーションプローブ（以下 Hyb-Probe）法を用いたため、増幅部分の塩基配列を利用して次の Hyb-Probe をデザインして利用した。Hyb-Probe は 2 つ必要であり、1 つは 5'-GGAAGATGCCCTAATATATGCCGCC-3'で、3'末端は FITC でラベルし、もう一つは 5'-CGAATGGCTCACATAATTGCTGGGA-3'で 5'末端は LCRed640 でラベルし 3'末端はリン酸化した。PCR のための DNA ポリメラーゼには宝酒造製の Ex Taq HS を使用した。

3. 実験結果および考察

4 種類のサンプルから、4 種類の *tceA* を取得した。塩基配列はそれぞれ異なったため、これらのアミノ酸

配列 (*tceA*) をこれまでにアメリカで報告されている *Dehalococcoides ethenogenes* 195 株 と 4 種類の集積培養体 (*Dehalococcoides* sp.FL2, *Bacterium* YK-TCE1, *Bacterium* PM-VC1, *Bacterium* RC-VC2) の合計 5 種類の *tceA* と比較するため、Clustal X により系統解析を行い、図-1 に示す系統樹を作成した。アメリカでこれまでに報告されている *tceA* は左上部に位置し、今回取得した国内由来の 4 種類の *tceA* とは離れていることが分かる。それゆえ、国内にはアメリカとは異なる *tceA* を持った *Dehalococcoides* 属細菌が分布していることが推測される。これまでに、国内の汚染サイトに存在する *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA の解析を行っているが、国内には 1 つのタイプの 16S rDNA が優占的に存在していることが明らかになっている¹⁾。これは、アメリカでは 3 つのタイプの 16S rDNA が存在するという現状とは異なっている。今回、*tceA* 遺伝子の解析においても、日本国内で得られたものと、アメリカで得られたものとが異なっていることから、両地域に存在する *Dehalococcoides* 属細菌は系統的には異なっている可能性が高い。しかしながら、これらの差が、分解能にどのような影響を与えているかは分かっておらず、今後の研究課題である。

次に、図-1 に示した全ての *tceA* のコンセンサ配列部分を利用してデザインした PCR プライマーおよび Hyb-Probe により定量検出法の確立を行った。Real-Time PCR による測定の実験条件の検討を行い、図-2 に示す条件で、*tceA* を特異的に検出できることが明らかとなった。本条件で *tceA* スタンダードの濃度を $10^1 \sim 10^6$ copies/PCR-tube に変化させて測定した場合の、*tceA* 濃度と PCR のサイクル数 (蛍光強度が一定のレベルに達した点、Crossing Point でのサイクル数) との関係を図-3 に示す。*tceA* の上昇に伴って Crossing Point でのサイクル数は減少し、設定した条件で良好な検量関係が得られることが明らかとなった。

また、本条件で、複数の汚染現場地下水中の *tceA* の測定を行ったところ、どの現場の地下水由来のサンプルを利用しても *tceA* が特異的に測定できることが明らかとなった。今後は、本検出法を利用して、処理の進行に伴って、*tceA* 遺伝子の地下水中の濃度がどのように変化していくかをモニタリングし、新たな管理手法として活用していきたい。

参考文献

- 1) 中村寛治ら, 地下水中の塩素化エチレン分解菌の検出, EICA, Vol.9, No.1, pp.21-15 (2004)

本研究は、NEDO プロジェクト「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」の一環として実施したものである。

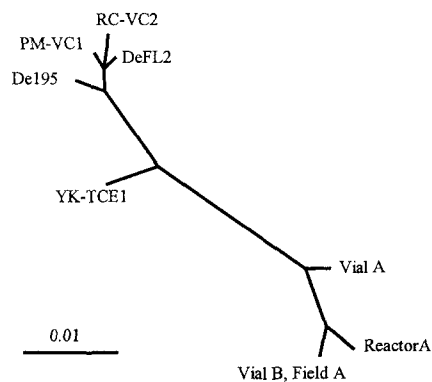


図-1 *tceA* の系統解析結果

Pre (Type: Denature)					
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F2/1			
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode	
1	95	120	20	None	

Main (Type: Quantification)					
Cycles = 50		Fluorescence Display Mode = F2/1			
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode	
1	95	0	20	None	
2	60	15	20	Single	
3	72	20	2	None	

Melt (Type: Melting Curves)					
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F2/1			
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode	
1	95	0	20	None	
2	50	10	20	None	
3	85	0	0.2	Continuous	

Cooling (Type: None)					
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F2/1			
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode	
1	40	30	20	None	

図-2 Hyb-Probe法の検出条件

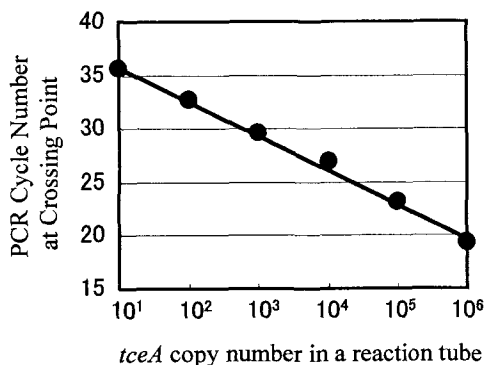


図-3 Hyb-Probe法による*tceA*の検出結果