

塩素化エチレン浄化現場からのビニルクロライドリダクターゼ遺伝子 *bvcA* 及び *bvcB* の取得・解析

東北学院大学 正 会 員 ○奥山 加代子
東北学院大学 正 会 員 中村 寛治

1. 背景および目的

塩素化エチレンのテトラクロロエチレン (PCE) トリクロロエチレン (TCE) は洗浄剤・溶剤として優れており、長期にわたってドライクリーニングの染み抜きや金属・機械等の脱脂洗浄剤に使用されてきた。しかし、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・地下水汚染を引き起こしている。PCE, TCE は、発がん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。

PCE, TCE は嫌気性条件化で微生物の作用により 1,2-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 (ETH) に脱塩素化されることが知られている。この反応で、PCE あるいは TCE から c-DCE までの脱塩素化反応は土壌中に生息する一般的な微生物によって比較的早い速度で行われるが、c-DCE から ETH までの反応は極めて遅く、土壌中に c-DCE や VC が残存してしまうことがある。

近年の研究によって、c-DCE から ETH までの反応が *Dehalococcoides* 属細菌によって行われることが明らかになった。つまり、PCE, TCE の完全な脱塩素化には *Dehalococcoides* 属細菌の存在が重要である。

Dehalococcoides 属細菌が持つ c-DCE 以降の分解に係わる遺伝子として、*tceA*, *vcrA*, *bvcA* が知られている。本研究では、この内の *bvcA* に焦点を当てる。*bvcA* の塩基配列はこれまでにアメリカの 1 例しか報告¹⁾ されておらず、さらに、*bvcA* に付随するアンカー遺伝子 *bvcB* の塩基配列は途中までしか決定されていない。本研究では国内の浄化現場地下水から *bvcA* および *bvcB* 遺伝子の PCR による取得、解析を行う。

2. 実験材料および方法

サンプルは別々の浄化現場の地下水から抽出した 6 つの DNA サンプルを用いた。使用した 6 つのサンプルの浄化現場名と各浄化現場の所在地を表-1 に示す。

2-1 PCR による *bvcAB* 遺伝子の増幅と塩基配列の決定

bvcA の上流および *bvcB* の下流の DNA をインバース PCR により取得、解析し、得られた *bvcA* の上流部分から Upper Primer: GGA TGA CAT TCG GGA GA, *bvcB* の下流部分から Lower Primer: AAG GGC ATT TTT AAT AGA AC を設計した。設計したプライマーペアと標的領域の位置関係を図-1 に示す。プライマーはソフトウ

表-1 浄化現場名と所在地

	浄化現場名	所在地
1	A-site	東北地方
2	B-site	関東地方
3	C-site	近畿地方
4	D-site	関東地方
5	E-site	関東地方
6	F-site	九州地方

エア OLIGO を利用し設計した。このプライマーペアを使用し *bvcA* および *bvcB* の PCR 増幅反応を行った。反応条件は前反応：94 -1 分に続き、第 1 段階：94 -20 秒、第 2 段階：58 -30 秒、第 3 段階：72 -2 分を 30 サイクル繰り返し、後反応：72 -7 分で行った。PCR 増幅によって得られた *bvcA* および *bvcB* を含む断片の塩基配列を決定した。DNA の伸長反応には BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ製) を用い、塩基配列の決定には ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ製) を使用した。

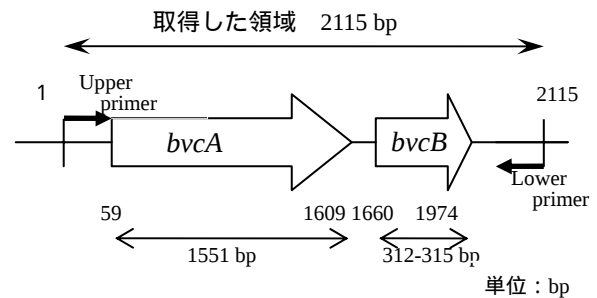


図-1 PCR により取得した領域

2-2 クローン取得による塩基配列の決定

PCR 増幅産物の中には 2 種類の遺伝子が混在するものがあり、2-1 の方法では塩基配列が決定できないサンプルがあった。これらのサンプルの複数種の遺伝子塩基配列を決定するために PCR 産物をクローン化し、その後、塩基配列決定を行った。

正確性が高い Prime Star DNA Polymerase (タカラバイオ製) を用い PCR 増幅反応を行った。反応条件は前反応：94 -1 分に続き、第 1 段階：98 -10 秒、第 2 段階：59 -15 秒、第 3 段階：72 -2 分を 30 サイクル繰り返した。PCR 増幅により得られた *bvcA* および *bvcB* を含む断片を、末端に dT を付加する性質を持つ *Ex Taq* DNA

Polymerase（タカラバイオ製）で処理し，dT を付加した．dT を付加した断片で TA クローニングを行い，単一で，かつ正確な DNA を取得し，塩基配列の決定を行った．

3．実験結果および考察

前述のプライマーペアを利用し，6ヶ所の浄化現場中，A，B，D，E-site の4ヶ所で *bvcA* および *bvcB* 遺伝子を取得した．C，F-site の現場サンプルからは *bvcA* および *bvcB* 遺伝子は増幅されなかった．増幅された4ヶ所のうち，A-site および E-site には2種類の遺伝子が混在したため，全体として6つの塩基配列データが得られた．（A-site，E-site で得られた2種類の塩基配列データをそれぞれ A-site.1，A-site.2，E-site.1，E-site.2 として区別した．）

これらの *bvcA* 遺伝子のサイズは1551 bp といずれも同じ大きさであり，*bvcB* 遺伝子のサイズは312 bp あるいは315 bp であった．6つのデータを *bvcA* と *bvcB* に分けてそれぞれ系統解析を行った．解析にはソフトウェア ClustalX を用いた．

bvcA 遺伝子解析には，得られた6つのデータにアメリカ由来の1種類の *bvcA* 塩基配列データ（Accession Number AY563562）を加え，系統解析を行った．系統樹を図-2 に，アメリカ由来の遺伝子との相同性を表-2 に示す．

この結果，E-site.1 と A-site.2，E-site.2 と B-site が全く同じであり，7つの塩基配列データは5種類に分類された．アメリカ由来の *bvcA* と比較すると，A-site.1，D-site は相同性が高く，極めて似ているが，他の4つはアメリカのものとは異なることが明らかとなった．

また，*bvcB* については，公開されているデータが存在しないので，今回得た6つのデータのみで系統解析を行った．系統樹を図-3 に示す．最大で，3ヶ所の塩基配列が異なっていた．これまでに報告されている TCE 分解遺伝子の *tceA* および *tceB* 遺伝子では分解能を有する *tceA* には多様性があるが，アンカー遺伝子 *tceB* は全く同じ塩基配列を有している．一方，本研究のアンカー遺伝子 *bvcB* にはある程度の多様性が見られた．

4．結論

- 1) 今回調査した6ヶ所の浄化現場の内，4ヶ所で *bvcAB* が検出されたことから，*bvcAB* を保有する *Dehalococcoides* 属細菌は浄化に必須ではないが，重要な役割を果たしていると思われる．
- 2) 国内の浄化現場の *bvcA* および *bvcB* には多様性があり，現場によって存在する種類が異なる場合が多く，また既にアメリカで報告されている *bvcA* とは差が見られる．

- 3) 1ヶ所の浄化現場で2種類の *bvcAB* が混在することがあり，これらの現場では同じ種類の *Dehalococcoides* 属細菌が分解反応で競合していると考えられる．

今後は浄化現場からの *bvcAB* の取得・解析を続け，本遺伝子の特徴，多様性を把握すると共に，国内の *bvcA* および *bvcB* の塩基配列の中のコンセンサスシーケンス部分を明確にし，本遺伝子の浄化現場での挙動を解析するため，Real-Time PCR 検出技術の開発を行っていく．

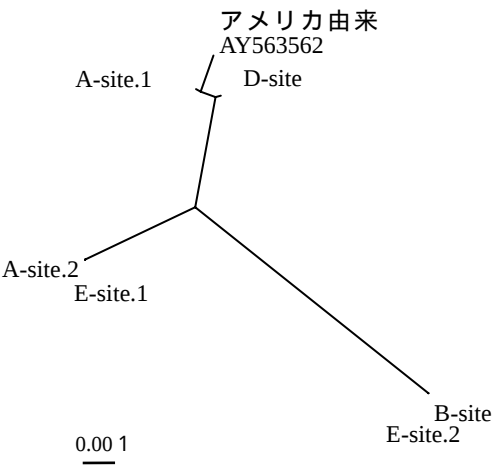


図-2 *bvcA* 遺伝子の系統解析結果

表-2 アメリカ由来の *bvcA* 遺伝子との相同性

浄化現場名	相同性
A-site.1	0.999
D-site	0.998
A-site.2 および E-site.1	0.991
B-site および E-site.2	0.986

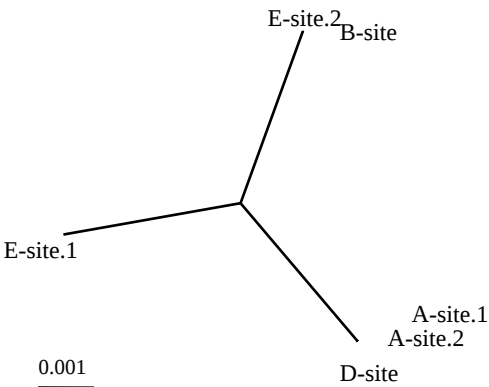


図-3 *bvcB* 遺伝子の系統解析結果

参考文献

1) Krajmalnik-Brown, R.*et.al.* ; Appl. Environ. Microbiol., Vol.70, p.6347-6351, 2004