

(15) TCE還元デハロゲナーゼ遺伝子の取得・解析 および定量PCRによる浄化現場での検出

中村 寛治^{1*}・水本 正浩²・上野 俊洋²・石田 浩昭²

¹東北学院大学工学部環境建設工学科 (〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1)

²栗田工業株式会社 (〒160-8383 東京都新宿区西新宿3-4-7)

* E-mail: knaka@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

*Dehalococcoides*属細菌のトリクロロエチレン (TCE) 還元デハロゲナーゼをコードする遺伝子 *tceA* は塩素化エチレンであるTCEおよび1,2-シスジクロロエチレン (c-DCE) の脱塩素化に関与しており、TCE汚染現場の浄化で重要な役割を果たしている遺伝子と推測される。複数の塩素化エチレン汚染現場の地下水から、PCRにより*tceA*を増幅、その塩基配列を決定し、これまでアメリカで報告されている5種類の*tceA*と比較解析を行った。その結果、本研究で解析された*tceA*はアメリカで報告されている*tceA*とは系統的に異なっていることが明らかとなった。全ての*tceA*塩基配列を比較し、コンセンサスシーケンス部分を利用して*tceA*検出用のプライマーペアおよびハイブリダイゼーションプローブを設計、定量的 real-time PCR (qPCR) による検出条件を検討した。確立した検出法によりTCE浄化現場の地下水中の*tceA*濃度変化を調査した結果、c-DCEの分解に伴って*tceA*濃度が上昇し、*tceA*を有する*Dehalococcoides*属細菌が浄化現場でc-DCEの脱塩素化に関与していることが明らかとなった。また、浄化期間中、1ヶ所の観測井戸で定期的に*tceA*を取得し、その塩基配列を解析した結果、*tceA*の塩基配列は一定であった。

Key Words : bioremediation, chlorinated ethene, trichloroethene, *Dehalococcoides*, reductive dehalogenase

1. はじめに

塩素化エチレン類であるテトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) はそれぞれ長期にわたってドライクリーニングの溶剤や金属の洗淨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、地下水汚染を引き起こしている。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。PCE は嫌気条件下でしか分解反応が進まないが、TCE は好気、嫌気の両条件下で分解反応が進むことが知られている。本研究では、近年実用化が進められている嫌気分解に焦点を当てる。

PCE, TCE は嫌気性条件下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、還元分解されることが 1985 年に報告されている¹⁾。その後、一種類の細菌 *Dehalococcoides ethenogenes* 195 株によって PCE の完全な脱塩素化が進み、電子供与体として水素が、電子受容体として塩素化エチレン類が利用されることが示された²⁾。また、*D. ethenogenes* 195 株は PCE 還元デハロゲナーゼ (PCE-RDase) および TCE 還

元デハロゲナーゼ (TCE-RDase) を保有し、前者には PCE を脱塩素化する能力が、後者には TCE, c-DCE, VC を脱塩素化する能力がある (VC は脱塩素化されるが反応は他に比べて 2 オーダー低い) ことが明らかとなっている³⁾。

実際の浄化では PCE や TCE の分解促進のために電子供与体の水素が直接利用されることは少なく、有機物が注入され、その嫌気分解において発生する水素が利用されている。この時、PCE あるいは TCE から c-DCE までの脱塩素化反応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ほとんど進まない⁴⁾。つまり、*Dehalococcoides* 属細菌の存在が、汚染現場の PCE や TCE の完全な脱塩素化には極めて重要となる。我々もこれまでに、国内の TCE 汚染サイトには *Dehalococcoides* 属細菌が生息し、本細菌の 16S rDNA が検出されない条件下では、c-DCE 以降の脱塩素化が進まないことを確認した⁵⁾。また、国内に存在する *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA の取得、解析を行い、あるタイプの 16S rDNA が優占的に存在することを明らかにすると共に、定量的 real-time PCR (qPCR) による高感度検

出法を確立し、本検出法が土壌浄化において有効なプロセス管理手法として利用できることを示した⁵⁾。

しかしながら、*Dehalococcoides* 属細菌の中には *D. ethenogenes* CBDB1 株⁶⁾のように塩素化エチレン分解能を示さないものもあるが、本菌株の 16S rDNA の塩基配列は、上記の国内で検出される 16S rDNA と極めて相溶性が高い⁵⁾。つまり、さらに詳細で正確な解析を進めていくには、対象を機能遺伝子である塩素化エチレン分解遺伝子、特に実浄化で律速段階となりうる c-DCE 以降の分解に係わる遺伝子に広げていく必要がある。c-DCE 以降の分解に係わる遺伝子としては、前述した *D. ethenogenes* 195 株の TCE-RDase である TceA をコードしている遺伝子 *tceA*⁷⁾、*Dehalococcoides* sp. VS 株の VC 還元デハロゲナーゼ (VC-RDase) である VcrA をコードしている遺伝子 *vcrA* が報告されている⁸⁾。VcrA は TCE、c-DCE、VC を分解できるが TCE 分解能は他に比べて著しく低い。VC の脱塩素化に係わる遺伝子としては *bvcA* も報告されているが⁹⁾、酵素による分解の実験は行われていない。

本研究では上記の 3 種類の分解遺伝子の中で、最初に発見された *tceA* を研究対象とした。アメリカ由来の *tceA* に関しては上記の *D. ethenogenes* 195 株の *tceA* に関する報告、および Genbank に登録されている 4 種類の *tceA* がある。Jhonson らはこれら 5 種類の *tceA* 塩基配列を利用してプライマーおよびプローブを設計し、*tceA* の mRNA を対象に qPCR を行っている¹⁰⁾。また、本プライマー、プローブを利用して Ritalahti らは現場サンプル中の *tceA* を qPCR により検出している¹¹⁾。

この様にアメリカでは *tceA* に関する研究が進められているが、国内由来の *tceA* に関する報告例はない。前述のように、国内に生息する *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA には特徴があり、*tceA* に関しても調査が必要である。そこで、国内に生息する *Dehalococcoides* 属細菌の有する *tceA* の解析を行うため、国内の汚染現場由来の複数の *tceA* を取得し、多様性を解析した。さらに本研究での *tceA* 解析結果および前述のアメリカで報告されている *tceA* を基に、*tceA* を標的とした qPCR による検出法を確立し、浄化現場における検出を行った。

2. 実験方法および材料

(1) DNA の抽出法

地下水サンプルからの DNA の抽出は基本的には Zhou らの方法¹²⁾に従い、これに Bead Beater 処理を補足した方法で、既報の論文¹³⁾の通りである。培養液中あるいは地下水中の細菌はフィルター上に捕捉した上で Bead Beater 処理を行った。抽出した DNA は最終的に TE (10 mM Tris-HCl[pH 8.0], 1 mM EDTA) に溶解した。その後、不純物を取り除くため MicroSpin-S300HR (GE ヘルスケアバイオサイエンス製) で精製を行った。

(2) *tceA* 遺伝子の取得、塩基配列の決定、系統解析

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、既にその塩基配列が報告されている *D. ethenogenes* 195 株の *orf1*, *tceA*, *tceB* のデータ (Accession No. AF228507) を利用して設計した。Upper Primer の TAXf1 を *orf1* の領域内で設計し、Lower primer の TAXr1 を *tceB* の領域内で設計した (表-1)。これらのプライマーは、ソフトウェア OLIGO (Molecular Biology Insights, Inc. 製) により設計した。PCR 反応は、Pre-heating; 94°C, 2 分 に続き、第 1 段階; 94°C, 20 秒、第 2 段階; 53°C, 30 秒、第 3 段階; 72°C, 3 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension; 72°C, 7 分を行った。本反応には Ex Taq DNA polymerase (タカラバイオ製) および GeneAmp PCR System 2400 (アプライドバイオシステムズ製) を利用した。PCR 増幅によって得られた *tceA* を含む断片は、プライマーウォーキングによって両方向から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) を使い、塩基配列決定には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ製) を使用した。塩基配列を決定した *tceA* はソフトウェア ClustalX によって系統解析を行った。

(3) *tceA* 遺伝子の定量検出

プライマーは *tceA* 内部の塩基配列を利用して、OLIGO により 3 種類のプライマーペア TA168f/TA582r, TA276f/TA710r, TA637f/TA925r (表-1) を設計した。これらのプライマーを利用して、TCE 汚染現場由来の複数のサンプルを対象に PCR を行い、標的の DNA 部分のみが合成されるか否かを検討した。PCR の条件は前述の構成と同じとしたが、第 2 段階のアニーリング温度はプライマー毎に最適化し、第 3 段階の時間は 1 kb/min の割合で設定した。後述の実験結果より、検討した 3 種類の中で TA168f/TA582r のプライマーペアを選択し qPCR 装

表-1 実験に使用したプライマーおよびプローブ

プライマー/ プローブ	塩基配列 (5' to 3')	<i>tceA</i> 中の位置 ¹⁾
TAXf1	TAACCTTCTAAACATCCTG	—
TAXr1	GCACCACCCATAATAATCTA	—
TA168f	GGGTGACCAACGCTAATAAAG	168-187
TA582r	CATTTCATGGTTCGCATAGAG	582-601
TA276f	TTGGAACAACCAAGGAGCATAC	276-297
TA710r	ACGGAAGAAGCCCCGAAGTAGC	710-731
TA637f	ATCAAAACCAACCACTACCC	637-656
TA925r	ATCTTATCATCACCRCCAAA (R=A:G)	925-944
TA489L ²⁾	GGAAGATGCCCTAATATATGCCGCC	489-513
TA515R ³⁾	CGAATGGCTCACATAATTGCTGGGA	515-539

¹⁾ *tceA* 遺伝子の開始を 1 とした場合の位置

²⁾ 3'末端はFITCでラベル

³⁾ 5'末端はLCRed640でラベルし3'末端はリン酸化

置の LightCycler (ロッシュダイアグノスティック製) によりハイブリダイゼーションプローブ法で検出したが、その際 2 種類のハイブリダイゼーションプローブ、TA489L (3'末端は FITC で標識), および TA515R (5'末端は LCRed640 で標識し 3'末端はリン酸化)を使用した (表-1)。これらのプローブは(株)日本遺伝子研究所に合成依頼した。

LightCycler によるハイブリダイゼーションプローブ法の運転条件は製品のマニュアルに従い検討し、以下のように設定した。初期変性; 95℃, 2 分, 温度変化 20℃/秒 (これは設定温度への変化速度を表す) に続き, PCR 増幅は第 1 段階; 95℃, 0 秒, 温度変化 20℃/秒, 第 2 段階; 60℃, 15 秒, 温度変化 20℃/秒, 第 3 段階; 72℃, 20 秒, 温度変化 2℃/秒を 45 サイクル繰り返した。引き続き, 融解曲線分析は, 第 1 段階; 95℃, 0 秒, 温度変化 20℃/秒, 第 2 段階; 50℃, 10 秒, 温度変化 20℃/秒, 第 3 段階; 85℃, 0 秒, 温度変化 0.2℃/秒で行い, 最終的には 40℃で反応終了とした。

反応液の全容量は 20 μ L とし, サンプル 1 μ L に対して 0.5 U の *Ex Taq* DNA polymerase, 添付 Buffer ($MgCl_2$ 含まず) 2 μ L および 10 pmol のプライマーペア, 4 pmol の 2 種類のハイブリダイゼーションプローブを使用した。その他, dNTP 200 μ M, DMSO 5% (v/v), $MgCl_2$ 3 mM, BSA 250 μ g/mL の濃度になるように添加した。スタンダードには, プラスミド pKNA80¹³⁾ に, TAXfl/TAXrI を利用した PCR 増幅により得られた *tceA* を含む DNA 断片 (後述する表-2 の No.11, Accession No. AB274955) をクローン化し, 利用した。また, スタンダードは直鎖状の DNA とするため, pKNA80 のマルチクローニングサイトの上下流域を対象に設計したプライマーペア KNA80f/KNA80r¹⁴⁾ を使ってクローン化した DNA 部分のみを PCR 増幅して使用した。サンプルの測定値は 2 回測定の平均値である。

(4) 塩素化エチレンの分析

TCE, c-DCE, VC はガスクロマトグラフ (GC-17A, 島津製作所) を用い FID で検出した。カラムには DB-624 (0.025 mmID $\times$ 30 m, 膜厚 1.4 μ m) を用い, カラム温度は 45℃から昇温させた。検出下限値は TCE, c-DCE, VC でそれぞれ 5, 10, 2 μ g/L であった。

3. 実験結果

(1) *tceA* 遺伝子の取得および系統解析

プライマーペア TAXfl/TAXrI (表-1) を利用して, 8 ヶ所の TCE 汚染現場 (主な原因汚染物質が TCE) から 11 個の *tceA* 遺伝子を PCR により取得した (表-2)。対象汚染現場は A から H までの 8 ヶ所である。*tceA* 取得は汚染現場の土壌, 地下水をバイアルビンに入れて行った適用試験時 (適用試験の方法は文献 15 を参照) あるいは現場での浄化時の

表-2 取得された *tceA* の汚染現場リストおよび解析結果の Accession Number

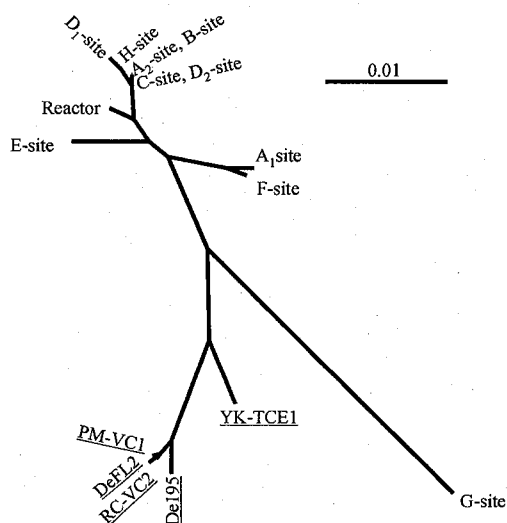
No	現場名	所在地	<i>tceA</i> 取得時期	Accession Number
1	A ₁ -site	近畿地方	浄化処理時 ¹⁾	AB274945
2	A ₂ -site	近畿地方	浄化処理時	AB274946
3	B-site	近畿地方	適用試験時 ²⁾	AB274947
4	C-site	近畿地方	浄化処理時	AB274948
5	D ₁ -site	近畿地方	浄化処理時	AB274949
6	D ₂ -site	近畿地方	浄化処理時	AB274950
7	E-site	近畿地方	適用試験時	AB274951
8	F-site	中国地方	浄化処理時	AB274952
9	G-site	中部地方	適用試験時	AB274953
10	H-site	アメリカ カリフォルニア州	浄化処理時	AB274954
11	Reactor	—	—	AB274955

A₁とA₂, D₁とD₂はそれぞれ同じ浄化現場の異なる地点

また, 11のみが連続処理リアクター由来

¹⁾ 現場浄化時に *tceA* を取得

²⁾ バイアルビンに汚染土壌・地下水を入れて行った適用試験時に *tceA* を取得



De195 (*Dehalococcoides ethenogenes* str.195 由来, Accession No. AF228507)
DeFL2 (*Dehalococcoides* sp. FL2 由来, Accession No. AY165309)
YK-TCE1 (Bacterium YK-TCE1 由来, Accession No. AY165310)
PM-VC1 (Bacterium PM-VC1 由来, Accession No. AY165311)
RC-VC2 (Bacterium RC-VC2 由来, Accession No. AY165312)

図-1 *tceA* 遺伝子の系統解析結果

いずれかで行った。A-site および D-site, 2 ヶ所の現場では現場内の異なる地点 (A₁, A₂ および D₁, D₂) から, それぞれ 2 種類の *tceA* が得られた。また, 既報の流動床リアクターでは, 嫌気微生物のグラニュール中の *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA を解析したが¹⁶⁾, 同じサンプルから *tceA* を取得, 解析したものが, 表-2 の No.11 の Reactor の結果である。本流動床リアクターには複数の汚染土壌の他, 複数の嫌気汚泥も植種されたため, 由来は特定できない。

これらの *tceA* 遺伝子のサイズは G-site の *tceA* を除いて全て 1665 bp であり, G-site の *tceA* は 1623

bp であった。本実験で解析した 11 個の *tceA* 塩基配列データとこれまでに報告されているアメリカ由来の 5 種類の *tceA* 塩基配列データを使って ClustalX による系統解析を行った。結果を図-1 に示す（アメリカ由来の 5 種類の *tceA* データは図中アンダーラインを引き、図の下に由来および Accession No. を示してある）。この結果、A₂-site と B-site、および C-site と D₂-site は *tceA* の塩基配列が全く同じであり、11 個の *tceA* は 9 種類に分類された。また、本実験で得られた *tceA* は既に報告されているアメリカ由来の 5 種類の *tceA* と系統的には離れていることが明らかになった。

(2) qPCR による検出条件の検討

前項で得られた 9 種類の *tceA* 塩基配列データおよび既にアメリカで報告されている 5 種類の *tceA* 塩基配列データ、合計 14 種類のデータを基に 3 種類の *tceA* 検出用プライマー TA168f/TA582r、TA276f/TA710r、TA637f/TA925r（表-1）を設計して検出の検討を行った。これらの検出用プライマーは全 14 種類の *tceA* を比較し、14 種類で塩基配列が同じであるコンセンサスシーケンスの部分を利用した（TA925r のみ 1 ヶ所混合塩基を利用している）。

まず、異なる 6 ヶ所（B-site[近畿地方]および新たなサイト I-site[北陸地方]、J-site[北陸地方]、K-site[東海地方]、L-site[関東地方]、M-site[近畿地方]）の TCE 汚染現場由来の土壌・地下水に栄養塩（リン酸アンモニウム）を加えて TCE の完全な脱塩素化を確認した。次にこれら 6 種類のサンプル 2 mL からそれぞれ DNA を抽出、本 DNA をテンプレートに上記 3 種類のプライマーペアで PCR を行った。その結果、TA168f/TA582r では予想される大きさの DNA 断片のみが合成されたが、TA276f/TA710r では 6 サンプル中 4 サンプルで、TA637f/TA925r では 6 サンプル中 2 サンプルで、予想される大きさの DNA 断片以外の DNA の合成が確認された（データ示さず）。TA168f/TA582r で合成された 6 ヶ所のサイト由来の DNA 断片の塩基配列を決定したところ、全て B-site 由来の *tceA* 塩基配列と完全に一致した。

以上の結果から、qPCR 用プライマーペアには TA168f/582r を適用することとし、加えてハイブリダイゼーションプローブ TA489L と TA515R（表-1）を設計した。次に qPCR による検出条件を検討し、2 の (3) に示した運転条件を得た。本運転条件で *tceA* のスタンダードを測定した結果を図-2 に示す。蛍光強度が一定以上となり検出されるサイクル数と *tceA* 濃度の対数との間には良好な検量関係があり、設定した運転条件で *tceA* が正確に定量検出できることが分かった。また、定量検出下限値は 10 copies/PCR-tube であった。

(3) 浄化現場での検出および遺伝子型の推移

前項で設定した検出方法によって、TCE 浄化現場地下水中の *tceA* 遺伝子の検出を行った。本現場は表-2 中の A-site で、有機酸を主体とする炭素源と

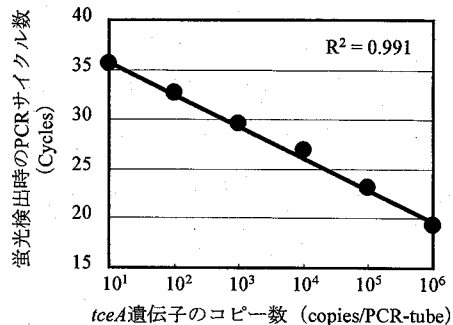


図-2 qPCR による *tceA* スタンダードの検出

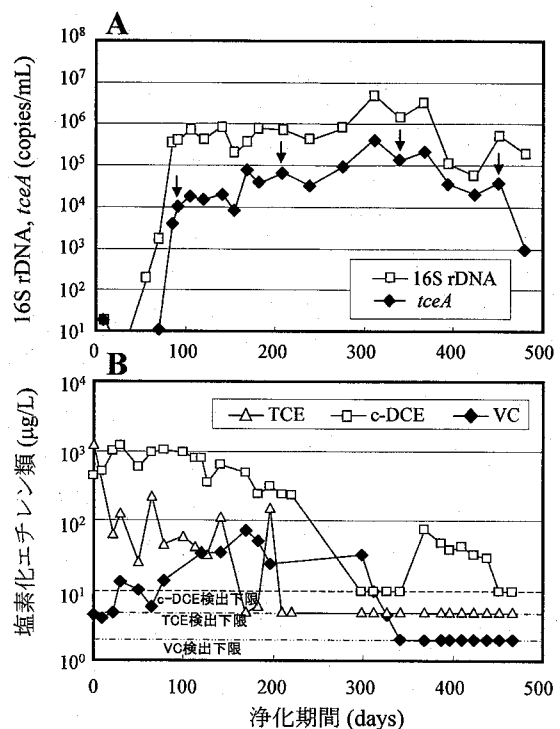


図-3 浄化現場地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA、*tceA* および塩素化エチレン類の推移 (A の矢印↓は *tceA* が取得、解析された時点)

リン酸アンモニウムを含む栄養塩を間欠的に注入し、バイオスティミュレーション（土着細菌の利用）による浄化を行った。その結果、約 500 日で浄化を完了した。本現場の 1 本の観測井戸（観測井 1）での *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA の濃度変化は既に報告している⁹⁾。ここでは、加えてその観測井戸での *tceA* 濃度変化と塩素化エチレン類の詳細な濃度変化を示す。塩素化エチレン類は浄化開始直後から TCE が低下、100 日後に c-DCE の低下が観察された。16S rDNA と *tceA* の増加は c-DCE の低下とほぼ連動している。また、VC は浄化開始時には約 10 μg/L であったが、200 日後には 90 μg/L 程度まで上昇し、その後低下した。16S rDNA と *tceA* を比較すると、

表-3 *tceA* 遺伝子型の推移

井戸名	<i>tceA</i> 遺伝子型の推移
観測井 1	浄化期間を通して <i>tceA</i> -A ₁ 型
観測井 2	浄化期間を通して <i>tceA</i> -A ₂ 型
観測井 3	浄化期間を通して <i>tceA</i> -A ₁ 型
観測井 4	浄化中に <i>tceA</i> -A ₂ 型から <i>tceA</i> -A ₁ 型に変化

tceA の値は常に 1 オーダー程度低い値を示し、*tceA* を保有する *Dehalococcoides* 属細菌の存在割合はそれほど高くないことが明らかとなった。

浄化期間中、図-3 の A の矢印で示す 92, 210, 340, 452 日目で qPCR で増幅された DNA の塩基配列を決定すると共に、抽出 DNA サンプルから TXAfl/TXArl を利用して *tceA* 全体を含む DNA を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、qPCR で増幅された DNA の塩基配列は TXAfl/TXArl で増幅された DNA の対応する部分と完全に一致した。4 回の塩基配列解析は *tceA* を含む取得 DNA 全体で同一であり、*tceA* の種類は表-2 の A₁-site (A₁ は観測井 1 で取得された) で取得された *tceA* (以下、*tceA*-A₁ 型) に対応した。

A-site では観測井 1 の他、観測井 2, 3, 4 の合計 4 本のお互いに離れた地点の井戸で同様に定期的に qPCR 増幅 DNA の解析および TXAfl/TXArl による増幅 DNA を取得、解析を行った。全てのケースで、qPCR で増幅された DNA の塩基配列は TXAfl/TXArl による増幅 DNA の対応する部分と完全に一致した。観察された遺伝子の種類は、*tceA*-A₁ 型に加えて表-2 の A₂-site (観測井 2) で取得された *tceA* (以下、*tceA*-A₂ 型) で、合計 2 種類であった。表-3 にこれら 2 種類の *tceA* の推移結果を示す。観測井 1 と 3 では全期間 *tceA*-A₁ 型が確認された。観測井 2 では全期間 *tceA*-A₂ 型が確認された。一方、観測井 4 では浄化期間中に *tceA*-A₂ 型から *tceA*-A₁ 型に変化した。

4. 考察

本研究では国内 7 ケ所、アメリカ 1 ケ所の TCE 汚染現場から 10 個の *tceA* 遺伝子を、加えて、流動床リアクターからも *tceA* を取得し、合計 11 個の *tceA* 塩基配列を決定、系統解析を行った。その結果、9 種類の *tceA* が得られ、TCE 汚染現場には多様な *tceA* 遺伝子が存在、つまり多様な *tceA* 保有 *Dehalococcoides* 属細菌が生息することが明らかとなった。これまでの 16S rDNA 塩基配列による解析では国内で取得された *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA はほとんど同一 (1 ケ所の塩基のみが A か G で異なる) で、*Dehalococcoides* 属細菌は種類が限られていると考えていた⁹⁾。しかしながら、*tceA* の多様性が示すとおり、国内には株レベルでは異なる *Dehalococcoides* 属細菌が生息している現状が明らかとなった。

本研究で解析された *tceA* は図-1 の系統樹に示す

とおり、G-site 由来の *tceA* を除いて、系統樹の上部に集まっている。本グループ中には今回解析されたアメリカ由来の *tceA* も入っているが、これまでアメリカで報告されている *tceA* とは系統的には離れており、国内の *tceA* 保有 *Dehalococcoides* 属細菌の種類は、多くのアメリカ由来のものとは異なっていることが明らかとなった。さらに、G-site 由来の *tceA* は図中の上部、下部の 2 つのグループとは全く離れた新しい遺伝子であった。本遺伝子は *D. ethenogenes* 195 株の *tceA* と比較すると、350~420 番目の塩基の範囲で大きな欠損があるのが特徴である。

図-1 に示す全ての *tceA* を比較解析して、コンセンサスシーケンス部分から 3 組の検出用プライマーペアを設計し、現場サンプルでの確認を行ったが、標的 DNA 部分の特異的な PCR 増幅が観察されたのは 1 組 (TA168f/TA582r) のみであった。このように検出用プライマーペアの設計には異なる現場由来の複数サンプルによる確認が必要である。本プライマーペアおよびその増幅 DNA 部分から設計したハイブリダイゼーションプローブを利用して、図-2 に示す良好な検量関係が得られた。さらに、先に Jhonson らによって報告され¹⁰⁾、Ritalahti らが現場サンプル中の *tceA* 検出に利用している¹¹⁾プライマー、プローブの塩基配列と本研究で新たに取得、解析した *tceA* の塩基配列を比較した結果、G-site 由来の *tceA* を検出する際、フォワードプライマーで 1 ケ所 (23mer の 5'側から 5 番目)、プローブで 1 ケ所 (20mer の 5'側から 6 番目) にミスマッチが生ずることが分かった。

図-3 の A に示すように、本研究で設計したプライマーペアおよびハイブリダイゼーションプローブを利用して A-site の地下水中の *tceA* の挙動を把握することが可能となった。地下水中での *tceA* の変化は 16S rDNA の変化とほぼ連動している。また、これらの遺伝子の急激な増加 (処理開始後、約 100 日) は、c-DCE 濃度の低下開始時期と一致しており、*tceA* 保有細菌を含む *Dehalococcoides* 属細菌の群集全体が c-DCE の分解に重要な役割を果たしていることが分かった。

また、前述のように複数の汚染現場から多様な *tceA* 保有細菌が確認されたが、同様の手法で A-site 浄化現場で定期的に *tceA* を取得した場合の変化についても調査した。その結果、表-3 に示すように浄化処理期間中 2 種類の *tceA* が確認された。またその際、qPCR による増幅部分との一致も確認した。この様に qPCR との対応が確認できても TXAfl/TXArl で全ての *tceA* を捉えているとは言えないが、少なくとも本プライマーペアで PCR 増幅し、解析した *tceA* は限られた種類となり、浄化中ある程度安定していることが示された。

さらに、図-3 の結果が示すように、*tceA* の値は 16S rDNA と比較して、およそ 1 オーダー低い値である。*D. ethenogenes* 195 株のゲノム解析の結果 (Accession No. NC_002936) では *tceA* も 16S

rDNA も染色体上に 1 コピーしか存在しないことから, *tceA* の 16S rDNA に対する割合は, 全体の *Dehalococcoides* 属細菌に占める *tceA* 保有 *Dehalococcoides* 属細菌の割合を表していると考えられ, 平均して約 1 割程度である. このことから, c-DCE の分解で主要な役割を果たしている *Dehalococcoides* 属細菌は他の分解遺伝子を有していると推測される.

TCE-RDase である TceA は c-DCE 分解能は高いものの VC 分解能は低い³⁾. 一方, VC-RDase である VcrA は c-DCE と VC に対して高い分解能を持っており, *vcrA* 遺伝子を持つ *Dehalococcoides* 属細菌がより重要な役割を果たしていることも考えられる. それゆえ, 今後は, qPCR 解析対象の分解遺伝子をさらに広げ, バイオスティミュレーションによる浄化現場での詳細な *Dehalococcoides* 属細菌の解析を進めて行く.

Dehalococcoides 属細菌が存在しない汚染現場では, バイオオーグメンテーションによる外来の *Dehalococcoides* 属細菌の注入が必要になると考えられる. qPCR による詳細な解析の結果は, バイオオーグメンテーションにおいてどのような分解遺伝子を保有する *Dehalococcoides* 属細菌を注入するのが効果的であるかを判断する上で重要なデータになると考えられる.

*本研究は, 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (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」および平成 17 年度科学研究費基盤研究 A の助成を受けて実施したものである.

参考文献

- 1) Vogel, T. M., and P. L. McCarty: Biotransformation of Tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.49, pp.1080-1083, 1985.
- 2) Maymo-Gatell, X., Y. T. Chien, J. M. Gossett, and S. H. Zinder: Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene, *Science*, Vol.276, pp.1568-1571, 1997.
- 3) Magnuson, J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder, and D. R. Burris: Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.64, pp.1270-1275, 1998.
- 4) Hendrickson, E. R., J. A. Payne, R. M. Young, M. G. Starr, M. P. Perry, S. Fahnestock, D. E. Ellis, and R. C. Ebersole: Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.68, pp.485-495, 2002.
- 5) 中村寛治, 上野俊洋, 石田浩昭: 地下水中の塩素化エチレン分解細菌の検出, 環境システム計測制御学会誌, Vol.9, pp.21-25, 2004.
- 6) Adrian, L., Szwedzyk, U., Wecke, J. and Gorisch, H.: Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes, *Nature*, Vol.408, pp.580-583, 2000.
- 7) Magnuson, J. K., M. F. Romine, D. R. Burris, and M. T. Kingsley: Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.66, pp.5141-5147, 2000.
- 8) Müller, J. A., B. M. Rosner, G. von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P. L. McCarty, and A. M. Spormann: Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.70, pp.4880-4888, 2004.
- 9) Krajmalnik-Brown, R., T. Hölscher, I. N. Thomson, F. M. Saunders, K. M. Ritalahti, and F. E. Löffler: Genetic Identification of a Putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. Strain BAV1, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.70, pp.6347-6351, 2004.
- 10) Jhonson, D. R., P. K. Lee, V. F. Holmes, and L. Alvarez-Cohen: An internal reference technique for accurately quantifying specific mRNAs by real-time PCR with application to the *tceA* reductive dehalogenase gene, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.71, pp.3866-3871, 2005.
- 11) Ritalahti, K. M., B. K. Amos, Y. Sung, Q. Wu, S. S. Koenigsberg, and F. E. Löffler: Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, pp. 2765-2774, 2006.
- 12) Zhou, J.-Z., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje: DNA recovery from soil of diverse composition, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, pp.316-322, 1996.
- 13) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭: フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析, 環境工学研究論文集, Vol.36, pp.1-10, 1999.
- 14) 中村寛治, 石田浩昭, 飯泉太郎, 渋谷勝利, 岡村和夫: トリクロロエチレン汚染現場に注入されたフェノール養化細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1 株の PCR による定量検出, 環境工学研究論文集, Vol.37, pp.267-278, 2000.
- 15) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治: 塩素化エチレン分解に関与する *Dehalococcoides* 属細菌の解析, 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 第 8 回講演集, pp.361-362, 2002.
- 16) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治: テトラクロロエチレンを分解する微生物群の集積培養および土壌カラムにおけるテトラクロロエチレンの分解, 環境工学研究論文集, Vol.38, pp.163-174, 2001.

(2006. 5. 26 受付)

Cloning and analysis of trichloroethene reductive dehalogenase gene
and its detection by quantitative real-time PCR

Kanji NAKAMURA ¹, Masahiro MIZUMOTO ², Toshihiro UENO ²
and Hiroaki ISHIDA ²

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku Gakuin University

²Kurita Water Industries Ltd.

Dehalococcoides bacteria dehalogenate chlorinated ethenes such as trichloroethene (TCE), cis-dichloroethene(c-DCE), and vinyl chloride (VC). TCE reductive dehalogenase gene (*tceA*), is known to be responsible for mainly TCE and c-DCE dehalogenation. We obtained several *tceAs* by PCR from TCE-contaminated sites in Japan. After DNA sequences of *tceAs* were determined, phylogenetic analysis was conducted. The genes of *tceA* obtained in Japan were phylogenetically different from those reported in USA. All *tceAs* were compared each other and consensus regions were used to design primer pairs and hybridization probes to detect *tceA* by quantitative real-time PCR (qPCR). The developed method successfully detected *tceA* in a field where we conducted biostimulation for TCE removal. The increase of *tceA* concentration in groundwater was well correspond to the decrease of c-DCE. A certain type of *tceA* was observed at a monitoring well during a whole treatment period.