

## (31) ビニルクロライドリダクターゼ遺伝子の 取得・解析および浄化現場での検出

中村 寛治<sup>1\*</sup>・荒 聡美<sup>1,2</sup>・水本 正浩<sup>3</sup>・上野 俊洋<sup>3</sup>・石田 浩昭<sup>3</sup>

<sup>1</sup>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)

<sup>2</sup>株式会社クリタス (〒171-0022 東京都豊島区南池袋1-11-22) 現在

<sup>3</sup>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

国内7ヶ所のトリクロロエチレン (TCE) 浄化現場地下水から抽出したDNAを基に、*Dehalococcoides*属細菌のビニルクロライドリダクターゼをコードする *vcrA*, *bvcA* 遺伝子のクローンを複数取得した。全クローンのDNA塩基配列を決定した上で、データベース上のこれら遺伝子も含めて系統解析を行った。*vcrA*, *bvcA*は系統的に最も離れている遺伝子の相同性が、それぞれ98.5%, 98.6%であった。各遺伝子の共通配列を利用して設計したプライマーを使って定量 PCR による *vcrA*, *bvcA* の検出方法を確立した。本手法により地下水中の両遺伝子濃度を再現性良く測定できた。また、*vcrA*, *bvcA* および TCE 分解能をコードする *tceA* 遺伝子の存在比を調査した結果、*vcrA* を保有する細菌が分解に主要な役割を果たしていることが推察された。

**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, 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。*D. ethenogenes* 195 株は PCE 還元デハロゲナーゼ (PCE-RDase) をコードする *pceA* および TCE 還元デハロゲナーゼ (TCE-RDase) をコードする *tceA* を保有する。*PceA* は PCE を脱塩素化する能力が、*TceA* は TCE, c-DCE, VC を脱塩素化する能力がある (VC 分解反応は他に比べて 2 オーダー低い) ことが明らかとなっている<sup>3)</sup>。

*D. ethenogenes* 195 株に続いて、VC リダクターゼ (VC-RDase) をコードする *vcrA* を保有する *Dehalococcoides* sp. VS 株が発見された。*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<sup>4)</sup>。また、異なる VC-RDase の遺伝子 *bvcA* を保有する *Dehalococcoides* sp. BAV1 株が発見され、VC 分解に関与することが示されたが<sup>5)</sup>、酵素レベルの実験は行われておらず、他の塩素化エチレン類の分解性は明確ではない。さらには *vcrA* を持ち、強力な TCE 分解能 (遺伝子は特定されていない) も保有する *Dehalococcoides* sp. GT 株も分離された<sup>6)</sup>。これら 3 株と先の 195 株はゲノムの解析が終了し、NCBI 上にそのデータが公開されている (Accession No.: 195 株=CP000027, VS 株=CP001827, BAV1 株=CP000688, GT 株=CP001924)。*D. ethenogenes* 195 株は最も早くゲノム解析が終了し、17 種類の還元デハロゲナーゼ (RDH) と思われる遺伝子が確認されている<sup>7)</sup>。この様に、*Dehalococcoides* 属細菌はゲノム解析による詳細な研究がなされている。

一方、実浄化において PCE や TCE の完全な脱塩素化には *Dehalococcoides* 属細菌の存在が不可欠であることが、海外、国内の研究例からも示されている<sup>8, 9)</sup>。*Dehalococcoides* 属細菌が保有する数ある

RDH 遺伝子の中で塩素化エチレンの完全分解に特に重要な役割を果たしているものとして、先の *iceA*, *vcrA* および *bvcA* が挙げられる。ゲノム解析が完了している菌株では、これら3種類の遺伝子の何れかの保有が確認されているが、2種類以上の同時保有は確認されていない。さらに、ゲノム解析のデータでは *Dehalococcoides* 属細菌の16S rRNA 遺伝子数は全て1コピーとなっている。それゆえ、全ての *Dehalococcoides* 属細菌が1コピーの16S rRNA 遺伝子数を持っていると仮定すれば、16S rRNA 遺伝子を定量 PCR (qPCR) で検出することによって *Dehalococcoides* 属細菌全体の数を把握できることになる。さらに、*iceA*, *vcrA*, *bvcA* 遺伝子がそれぞれ別の種類の細菌に保有されていると仮定すれば、個々の遺伝子の定量を行うことによって、浄化現場で実際に機能している遺伝子を知ることができる。また、16S rRNA 遺伝数と上記3種類の遺伝子数の合計を比較することによって、これら3種類の遺伝子以外に重要な役割を果たしている遺伝子の存在の可能性を調査することも可能となる。このような研究は、Ritalahti らによって行われ、上記の3種類の RDH 遺伝子以外の存在が示唆されている<sup>10)</sup>。しかしながら、Lee らが1ヶ所の浄化現場で同様の解析を行ったところ、上記3種類の RDH 遺伝子が主要な遺伝子として検出されている<sup>11)</sup>。また、汚染現場の地質的性質とこれら遺伝子との関連の解析も近年行われている<sup>12)</sup>。

本研究では日本国内の複数の浄化現場で同様の解析を行い、実浄化において機能する主要 RDH 遺伝子の把握を行う。我々はこれまでに、*iceA* を標的とした qPCR のため、複数の *iceA* を取得、解析し、プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを設計、浄化現場での *iceA* のモニタリングを行った<sup>13)</sup>。ここでは、同様に複数の浄化現場から *vcrA* および *bvcA* を取得、その塩基配列を決定し、系統解析を行う。NCBI に登録されている完全な *vcrA* は先の2種類の *Dehalococcoides* sp. VS 株、GT 株ともう1種類 (Accession No. AB268344) のみであり、*bvrA* に至っては完全なデータは *Dehalococcoides* sp. BAV1 株由来のデータのみである。それゆえ、本研究で得られる複数の塩基配列データから、その多様性を知ることができる。また、共通配列部分からプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを設計、qPCR による定量検出に利用する。

## 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 の抽出は既報の論文<sup>14)</sup>の通りである。現場地下水 100mL をろ過し、細菌をフィルター (孔径 0.2  $\mu$ m, MILLIPORE 製, GTBP2500) 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) *vcrA*・*bvcA* 遺伝子の取得・解析

対象サンプルから抽出した DNA をテンプレートに *vcrA* およびその下流の *vcrB* 全域を含む DNA 断片の PCR 増幅を行った。設計 (NCBI: CP001827 を利用)、使用したプライマーは、表-1 に示す *vcrXf1* および *vcrXr1* である。これらのプライマーは、ソフトウェア OLIGO 6 (Molecular Biology Insights, Inc. 製) により設計した (以下、全てのプライマー、プローブは Oligo 6 により設計)。PCR 反応は、Pre-heating; 94°C, 1 分に続き、第1段階; 94°C, 20 秒、第2段階; 50°C, 15 秒、第3段階; 72°C, 2.5 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 PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ製) を使用、PCR Thermal Cycler TP600 (タカラバイオ製) で PCR 反応を行った。PCR 増幅によって得られた *vcrA* を含む断片は、プライマーウォーキング法によって両方向から塩基配列を決定した。PCR 産物が複数の遺伝子を含む場合は、dA 付加反応を行った後<sup>15)</sup>、プラスミド pKNA90XT<sup>16)</sup> を利用してクローン化した後、塩基配列の決定を行った。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、塩基配列決定には 3130 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 *vcrA* は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にて Clustal W による系統解析を行い、Tree View にて系統樹を作成した。

*bvcA* およびその下流の *bvcB* 全域を含む DNA 断片の取得には表-1 に示す *bvcXf1* および *bvcXr1* のプライマーペアを設計 (NCBI: CP000688 を利用)、利用した。PCR 反応の条件は、上記の *vcrA* の場合の第2段階のアニーリング温度を 52°C に変更し、第3段階の伸長反応の時間を2分に変更した。その他の条件は同じである。

### (3) *Dehalococcoides* 属細菌保有遺伝子の定量検出

対象遺伝子の定量検出のための qPCR には Real-Time PCR 装置 LightCycler 2.0 (ロ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。検出に使用したプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブは表-1 に示すとおりであり、これらは既存のデータおよび本研究で得られた VC-RDase 遺伝子 (後述する図-1 の全ての遺伝子) の塩基配列データから設計した。

*vcrA* の検出には、プライマーペアとして *vcrA683f* と *vcrA1057r* を、ハイブリダイゼーションプローブとして蛍光標識した *vcrA797L* および *vcrA830R* を使用した (表-1)。また、*bcrA* 検出には *bvcA949f*, *bvcA1225r*, *bvcA1061L*, *bvcA1086R* を使用した (表-1)。ハイブリダイゼーションプローブは (株) 日本遺伝子研究所に合成依頼した。

qPCR 反応の全容量は 20  $\mu$ L とし、サンプル 2  $\mu$ L に対して 0.5 U の Ex Taq Hot Start Ver. DNA

表-1 本研究で使用したプライマーおよびプローブ

| オリゴヌクレオチド                 | 塩基配列 (5' → 3')                            | 長さ<br>(bases) | オリゴヌクレオチド<br>の位置 | 文献        |     |
|---------------------------|-------------------------------------------|---------------|------------------|-----------|-----|
| (vcrAB 増幅用プライマー)          |                                           |               |                  |           |     |
| vcrXfl                    | GAC TCT CCC TGA AAC AAT GG                | 20            |                  | 本研究       |     |
| vcrXrl                    | GCG ACT TAC TAC CTT ATC TA                | 20            |                  | 本研究       |     |
| (vcrA 検出用プライマー)           |                                           |               |                  |           |     |
| vcrA683f                  | ATA AGA AAG CTC AGC CGA TG                | 20            | vcrA 中の位置*       | 本研究       |     |
| vcrA1057r                 | CAC CTT GCC CGT CAA A                     | 16            |                  | 1072-1057 | 本研究 |
| (vcrA 検出用ハイブリダイゼーションプローブ) |                                           |               |                  |           |     |
| vcrA797L**                | ACT TTA AGG AAG CGG ATT ATA GCT ACT ACA A | 31            | 797-827          | 本研究       |     |
| vcrA830R***               | ATG CAG AGT GGG TTA TTC CAA CAA AGT G     | 28            | 830-857          | 本研究       |     |
| (bvcAB 増幅用プライマー)          |                                           |               |                  |           |     |
| bvcXfl                    | GGA TGA CAT TCG GGA GA                    | 17            |                  | 本研究       |     |
| bvcXrl                    | AAG GGC ATT TTT AAT AGA AC                | 20            |                  | 本研究       |     |
| (bvcA 検出用プライマー)           |                                           |               |                  |           |     |
| bvcA949f                  | GCT TCA AGT ATG ATT GCC TA                | 20            | bvcA 中の位置*       | 本研究       |     |
| bvcA1225r                 | TAC AAA TGC CAC ACG TTT C                 | 19            |                  | 1243-1225 | 本研究 |
| (bvcA 検出用ハイブリダイゼーションプローブ) |                                           |               |                  |           |     |
| bvcA1061L**               | CTG GTG GTG CTT TTG GAG TTA TG            | 20            | 1061-1083        | 本研究       |     |
| bvcA1086R***              | TGG TCT TTC CGA ACA AGG TCG TG            | 20            | 1086-1108        | 本研究       |     |

\*遺伝子の開始点を1とした場合, \*\*3'末端はFITC標識,

\*\*\*5'末端はLC Red 640標識, 3'末端はリン酸化

polymerase (タカラバイオ製), 添付 Buffer (MgCl<sub>2</sub> 含まず) 2 μL および Upper プライマー (vcrA683f, bvcA949f) 4 pmol, Lower プライマー (vcrA1057r, bvcA1225r) 10 pmol, 2 種類のハイブリダイゼーションプローブそれぞれ 4 pmol を使用した。その他, dNTP 200 μM, MgCl<sub>2</sub> (vcrA; 4 mM, bvcA; 2 mM), BSA 250 μg/mL の濃度になるように添加した。スタンダードには, クローン化された vcrA および bvcA を含む (後述する表-2 のクローン C-v2; Accession No. AB586005, およびクローン D-b1; Accession No. AB586015) 組換え pKNA90XT を利用した。また, スタンダードを直鎖状の DNA とするため, 各クローンが挿入された pKNA90XT をテンプレートに vcrXfl/vcrXrl および bvcXfl/bvcXrl で再び PCR 増幅し, その増幅 DNA を利用した。各サンプルの qPCR 測定は 3 回行い, 平均値および標準偏差を算出した。

*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子および *iceA* 遺伝子の反応液組成は, 過去の報文<sup>17, 13)</sup> に従ったが, DMSO は無添加とし, Upper プライマーの濃度は 4 pmol に変更した。

LightCycler 2.0 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, vcrA に関しては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; 58℃, 15 秒, 温度変化 20℃/秒, 第 3 段階; 72℃, 15 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; 48℃, 15 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。bvcA に関しては, PCR 増幅の第 2 段階の温度を 55℃に, 第 3 段階の時間を 12 秒に, また, 融解曲線分析の第 2 段階は 45℃に変更し, その他の条件は同じとした。16S rRNA 遺伝子および *iceA* 遺伝子に関する運転条件は過去の報文<sup>17, 13)</sup> に従った。

### 3. 実験結果

#### (1) vcrA・bvcA 遺伝子の取得および系統解析

プライマーペア vcrXfl/vcrXrl および bvcXfl/bvcXrl (表-1) を利用して, 7 ケ所 (A~G-site) の TCE 浄化現場 (主な原因汚染物質が TCE) 地下水から vcrA および bvcA クローンを PCR により取得, その塩基配列を決定し, Accession No. を取得した (表-2)。浄化現場では, 浄化開始から 16S rRNA 遺伝子のモニタリングを行っており, 浄化現場地下水中の濃度が 10<sup>5</sup> copies/mL 以上になった時点で, 遺伝子の取得を行った (F-site のみ 8×10<sup>4</sup> copies/mL を越えた時点)。vcrA クローンは全てのサイトで得られ, 合計 10 クローンを取得, 解析した。これらのクローンは PCR 増幅された DNA の長さおよび vcrA と判断した領域の長さも同じであった。一方, bvcA クローンは 2 ケ所の現場, C-site, G-site では取得できなかったが, 合計 8 クローンを取得, 解析した。これらについても, PCR 増幅長および bvcA と判断した領域の長さは同一であった。これら全ての取得 vcrA, bvcA は既に報告されている遺伝子とも同じ長さである。

得られたクローンの決定塩基配列を基に行った vcrA に関する系統解析より作製した系統樹を図-1A に, 同様に bvcA の系統樹を図-1B に示す。系統的に最も離れている vcrA は VS 株と GT 株・E-v1 のも

表-2 取得vcrAおよびbvcA遺伝子の解析結果

| No | 現場名    | 所在地  | vcrA<br>クローン名 | PCR産物の<br>長さ*(bp) | vcrAの長さ<br>(bp) | Accession No. | bvcA<br>クローン名 | PCR産物の<br>長さ*(bp) | bvcAの長さ<br>(bp) | Accession No. |
|----|--------|------|---------------|-------------------|-----------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|---------------|
| 1  | A-site | 東北地方 | A-v           | 2191              | 1560            | AB586002      | A-b1          | 2069              | 1551            | AB586012      |
|    |        |      | —             | —                 | —               | —             | A-b2          | 2069              | 1551            | AB586013      |
| 2  | B-site | 関東地方 | B-v           | 2191              | 1560            | AB586003      | B-b           | 2069              | 1551            | AB586014      |
| 3  | C-site | 近畿地方 | C-v1          | 2191              | 1560            | AB586004      | —             | —                 | —               | —             |
|    |        |      | C-v2          | 2191              | 1560            | AB586005      | —             | —                 | —               | —             |
| 4  | D-site | 近畿地方 | D-v           | 2191              | 1560            | AB586006      | D-b1          | 2069              | 1551            | AB586015      |
|    |        |      | —             | —                 | —               | —             | D-b2          | 2069              | 1551            | AB586016      |
| 5  | E-site | 関東地方 | E-v1          | 2191              | 1560            | AB586007      | E-b           | 2069              | 1551            | AB586017      |
|    |        |      | E-v2          | 2191              | 1560            | AB586008      | —             | —                 | —               | —             |
| 6  | F-site | 関東地方 | F-v1          | 2191              | 1560            | AB586009      | F-b1          | 2069              | 1551            | AB586018      |
|    |        |      | F-v2          | 2191              | 1560            | AB586010      | F-b2          | 2069              | 1551            | AB586019      |
| 7  | G-site | 九州地方 | G-v           | 2191              | 1560            | AB586011      | —             | —                 | —               | —             |

\*プライマー部分を除く長さ

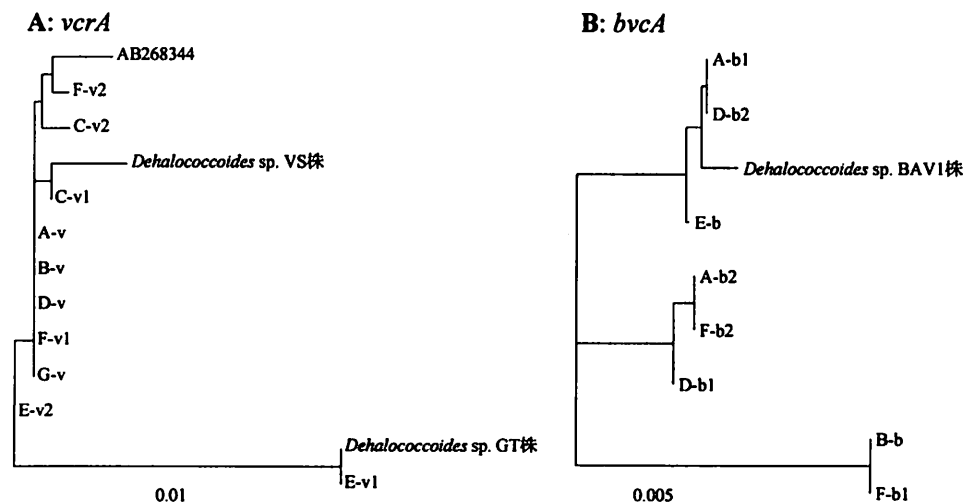


図-1 取得 vcrA および bvcA 遺伝子の系統解析結果

ので、相同性は 98.5%であった。bvcA で系統的に最も離れているものは BAV1 株と B-b・F-b1 で、98.6%であった。比較した範囲内においては、どちらの遺伝子も同程度の多様性を示した。

## (2) 浄化現場での各分解遺伝子の存在割合

前項で解析を行った図-1 のそれぞれの遺伝子データを基に、共通配列部分を利用して、表-1 に示した qPCR 検出用プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを設計した。vcrA, bvcA 遺伝子のスタンダードを測定した結果を図-2 に示す。10<sup>1</sup>~10<sup>8</sup> (copies/PCR-tube) の広い範囲で良好な検量関係が得られ、設計したプライマー、プローブを使って正確に定量検出できることが確認できた。表示した標準偏差の値は、最大値が bvcA の 10 copies/PCR-tube 測定平均値の 3.3% (平均値に対して) であり、再現性良く計測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。

本測定法および既報の測定法<sup>17,13)</sup>により、前述

のクローンを取得した 7 ヶ所 (A~G-site) の TCE 浄化現場地下水中の 16S rRNA 遺伝子、vcrA, bvcA および tceA 遺伝子の 4 種類を qPCR により測定し、図-3 に示す結果を得た。全ての浄化サイトで Dehalococcoides 属細菌全体の数を表す Dehalococcoides 属細菌 16S rRNA 遺伝子の値は F-site を除いて全て 10<sup>5</sup> copies/mL-地下水のオーダーであった。一般的に、バイオレメディエーション技術が適用されるサイトは汚染物濃度が低い場合が多く、このようなレベルであったと考えられる。全てのサイトで、3 種類の塩素化エチレン分解遺伝子 vcrA, bvcA, tceA が検出された。また、E-site を除いて、全てのサイトで vcrA の存在割合が最も高くなった。E-site では bvcA の存在割合が最も高くなった。一方、tceA の存在割合が最も高くなったサイトは存在しなかった。さらに、図中、棒グラフ上の四角内の数値は、vcrA, bvcA, tceA の合計を Dehalococcoides 属細菌 16S rRNA 遺伝子で除した値であり、3 種類の遺伝子を持つ Dehalococcoides 属細菌の割合 (1 種類の

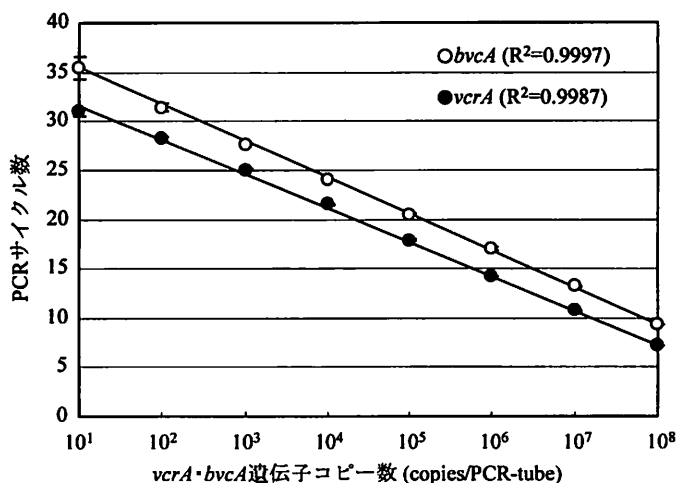


図-2 qPCRによるスタンダード検出  
(プロットは3回測定の平均値でエラーバーは標準偏差)

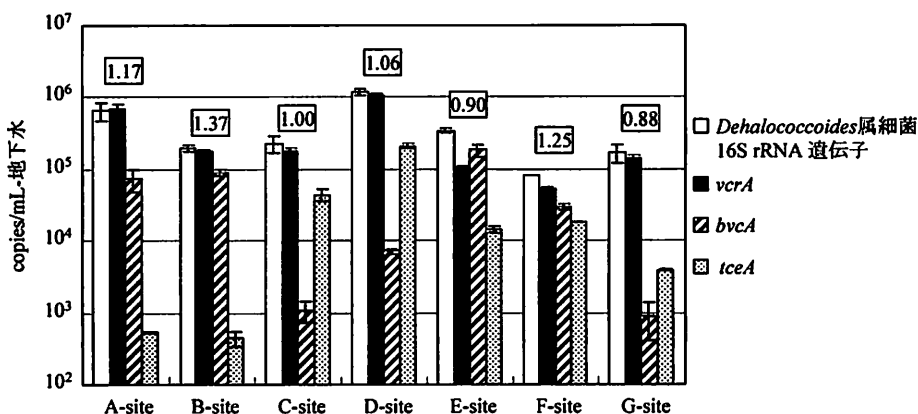


図-3 浄化site 地下水中の各遺伝子の濃度  
(棒グラフの値は3回測定の前平均値でエラーバーは標準偏差。棒上の四角内の数値はvcrA, bvcA, tceAの合計値をDehalococcoides属細菌16S rRNA 遺伝子で除した値。)

*Dehalococcoides* 属細菌は1種類の分解遺伝子しか保有しないと仮定)を示している。値は0.88~1.37の範囲であり、1.0に近い値となった。値が1.0以上になることは想定していないが、これはqPCR測定における誤差範囲と考える。本結果から、日本の浄化サイトでは、主としてvcrA, bvcA, tceAの3種類の遺伝子を有する*Dehalococcoides*属細菌が現場での塩素化エチレンの分解を担っていると推察される。

#### 4. 考察

本研究では国内7ヶ所のTCE浄化現場の地下水からDNAを抽出、vcrAとbvcA遺伝子を含む領域のDNA部分を取得、解析した。表-2に示すとおり、vcrAを含む領域に関しては全てのサイトから取得できた。本結果から、利用したプライマーペア

vcrXfl/vcrXrlは良好に機能したと判断できる。一方、bvrAを含む領域に関してはプライマーペアbvcXfl/bvcXrlを利用したが、C-siteとG-siteの2ヶ所のサイトでPCR増幅産物が取得できなかった。図-3に示すとおり、これら2サイトの地下水中のbvcA濃度は他のサイトと比べて低く、約10<sup>3</sup> copies/mL-地下水であり、標的のDNA濃度が低くbvcXfl/bvcXrlでのPCR増幅が起きなかった可能性がある。また、設計したプライマーはNCBI上のCP000688のデータを基に設計しているが、データが限られているため、増幅できなかったサイトのDNAでは使用プライマーと不一致な部分が生じ、PCR増幅できなかった可能性も残されてる。

7ヶ所の浄化現場地下水由来のDNAからPCR増幅されたvcrAを含む領域のDNA断片は、表-2に示すとおり10個が全て同じ長さである。また、vcrA

の長さも全く同じである。それゆえ、*vcrA* とその周辺領域は変化が少なく保全された領域であると推察する。また、*bvrA* に関しても同様に、8 個の *bvrA* を含む PCR 増幅領域、およびその断片中の *bvcA* どちらも同じ長さであり、変化が少なく保全された領域であると判断できる。

過去の研究では、*tceA* の取得解析を行っているが、国内で取得された *tceA* は海外で取得された *tceA* と大きな差があった<sup>13)</sup>。一方、今回比較したアメリカ由来の *vcrA* および *bvcA* のデータは日本で取得されたものと著しい差はない。また、*tceA* の場合は、遺伝子の大きさも異なるものが取得されている<sup>13)</sup>。それゆえ、*tceA* と比較して、*vcrA* や *bvcA* は地域差を含め多様性が小さい可能性がある。

図-1 に示された全ての *vcrA* および *bvcA* の共通配列部分を利用して、プライマーおよびプローブを設計して、qPCR による定量を行い、どちらの遺伝子に関しても図-2 に示す良好な検量関係を得た。*vcrA*、*bvcA* の qPCR による検出に関しては、既に Ritalahti ら<sup>10)</sup>、Holmes ら<sup>18)</sup>による報告がある。彼らの手法は、加水分解プローブを使い、それを挟む非常に短い領域を PCR 増幅しているため、本研究のように 2 種類のハイブリダイゼーションプローブを使う方法では、増幅領域が短すぎて、適用できない。Ritalahti らの報告<sup>10)</sup>では、スタンダードによる検量線が示されているが、中濃度領域では、本研究の手法の標準偏差の方が小さい。また、今回取得したクローンの塩基配列を基に、これら 2 文獻でのプライマーおよびプローブの配列を調査すると、Ritalahti らの報告の *bvrA* 検出用プローブ Bvc977Probe<sup>10)</sup>で 3 ケ所が共通配列となっておらず、遺伝子の種類によっては完全にハイブリダイズしないことが分かった。他のプライマー、プローブは共通配列部分の範囲であった。

本研究で確立した qPCR 検出法と、これまでの研究で確立した qPCR 検出法<sup>13)</sup>により、7 ケ所の浄化現場で 3 種類の分解遺伝子を測定した結果、図-3 に示した様に、全ての浄化現場で、*vcrA*、*bvcA*、*tceA* が検出され、これら 3 種類の遺伝子の浄化への係わりが示唆された。その中で、*vcrA* の存在割合が、7 ケ所中 6 ケ所で最も高く、かつ、残りの 1 ケ所でも最大値を示した *bvcA* と極めて近い値となっている(図-3)。本結果から、*vcrA* が浄化で重要な役割を果たしている遺伝子であることが明らかとなった。また、*vcrA*、*bvcA*、*tceA* の合計を *Dehalococcoides* 属細菌 16S rRNA 遺伝子で除した値は、0.88~1.37 の範囲であり、これらの遺伝子を保有する *Dehalococcoides* 属細菌が塩素化エチレンの主要分解者であったと推察される。これまでの研究では、Ritalahti らによって *vcrA*、*bvcA*、*tceA* 以外の遺伝子の関与が示唆されているが<sup>10)</sup>、本研究の 7 ケ所の浄化サイトではその様なケースは見られず、*vcrA*、*bvcA*、*tceA* 以外の分解遺伝子は分解に大きく関与しなかったと推察される。

この様に、*vcrA* と *bvcA* を対象とした遺伝子の取

得、解析、および 3 種類の分解遺伝子の検出により、日本の浄化現場での *Dehalococcoides* 属細菌の挙動を把握することができた。今後は、本手法を適用して、さらに多くの浄化現場の解析を行い、本研究の結果のさらなる検証を進めて行きたい。

\*本研究の一部は、平成 22 年度科学研究費基盤研究 B 課題番号 22360216 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) 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.
- 5) 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.
- 6) Sung, Y., K. M. Ritalahti, R. P. Apkarian, and F. E. Löffler: Quantitative PCR Confirms Purity of Strain GT, a Novel Trichloroethene-to-Ethene-Respiring *Dehalococcoides* Isolate, Appl. Environ. Microbiol., Vol.72, pp.1980-1987, 2006.
- 7) Seshadri, R., L. Adrian, D. E. Fouts, J. A. Eisen, A. M. Phillippy, B. A. Methe, N. L. Ward, W. C. Nelson, R. T. Deboy, H. M. Khouri, J. F. Kolonay, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, L. M. Brinkac, S. A. Sullivan, R. Madupu, K. E. Nelson, K. H. Kang, M. Imbraim, K. Tran, J. M. Robinson, H. A. Forberger, C. M. Fraser, S. H. Zinder, J. F. Heidelberg: Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*, Science, Jan 7, Vol.307, pp.105-108, 2005.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Lee, P. K. H., T. W. Macbeth, K. S. Sorenson, Jr., R. A. Deeb, and L. 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, pp. 2728–2739, 2008.
  - 12) van der Zaan, B., F. Hannes, I. N. Hoekstra, H. Rijnaarts, W. M. de Vos, H. Smidt, and J. Gerritsel: Correlation of *Dehalococcoides* 16S rRNA and Chloroethene-Reductive Dehalogenase Genes with Geochemical Conditions in Chloroethene-Contaminated Groundwater, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 76, pp. 843–850, 2010.
  - 13) 中村寛治, 水本正浩, 上野俊洋, 石田浩昭: 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, 環境工学研究論文集, Vol.43, pp.119-125, 2006.
  - 14) 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.
  - 15) 須藤真志, 高野智博, 中村寛治: *Bacillus* 属細菌を捕食する河川中の原生動物の解析, 環境工学研究論文集, Vol.46, pp.511-519, 2009.
  - 16) 中村寛治, 根本工, 高橋正剛, 千葉彩輝, 橋浦康範: 広瀬川河川中に生息する細菌群集の季節変動の周期性と夏期出現優占種, 環境工学研究論文集, Vol.46, pp.521-528, 2009.
  - 17) 中村寛治, 上野俊洋, 石田浩昭: 塩素化エチレン分解に関与する微生物の解析および検出, 土壌環境センターニュース, No.7, pp.1-5, 2003.
  - 18) Holmes, V. F., J. He, P. K. H. Lee, and L. Alvarez-Cohen: Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes, Appl. Environ. Microbiol., Vol.72, pp.5877–5883, 2006.

(2010. 5. 21 受付)

## Cloning and analysis of vinyl chloride reductase genes and their detection at cleanup sites

Kanji NAKAMURA<sup>1</sup>, Satomi ARA<sup>1,2</sup>, Masahiro MIZUMOTO<sup>3</sup>, Toshihiro UENO<sup>3</sup>  
and Hiroaki ISHIDA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku Gakuin University

<sup>2</sup>KURITAZ Co. Ltd.

<sup>3</sup>Kurita Water Industries Ltd.

*Dehalococcoides* bacteria, that carry *vcrA* or *bvcA* gene encoding vinyl chloride reductase, play an important role in the complete dechlorination of trichloroethene (TCE) contaminating soil and groundwater. We obtained 10 *vcrA* and 8 *bvcA* clones from groundwater at 7 cleanup sites in Japan. The DNA sequences of the clones were determined, and phylogenetic analysis was conducted with the DNA sequences in the public database of NCBI. The DNA sequence homologies between 2 most distant *vcrA* genes and *bvcA* genes were 98.5% and 98.6%, respectively. Consensus sequence regions in each of *vcrA* and *bvcA* were used to design primers and hybridization probes to detect the genes by quantitative real-time PCR (qPCR). The each of *vcrA* and *bvcA* was successfully detected by the developed methods. The comparison of copy numbers of three reductive dehalogenase genes, *vcrA*, *bvcA* and *tceA* encoding TCE reductive dehalogenase, in the groundwater showed that *vcrA* is the dominant gene at most of the cleanup sites.