

## 脱ハロゲン呼吸細菌の還元的デハロゲナーゼ

### Reductive Dehalogenases of Dehalorespiring Bacteria

二神 泰基<sup>1</sup>, 後藤 正利<sup>2</sup>, 古川 謙介<sup>3\*</sup>

TAIKI FUTAGAMI, MASATOSHI GOTO and KENSUKE FURUKAWA

<sup>1</sup>九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

<sup>2</sup>九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

<sup>3</sup>別府大学食物栄養科学部食物バイオ学科 〒874-8501 別府市北石垣 82

\* TEL: 0977-67-0101 FAX: 0977-66-9631

\* E-mail: kfurukaw@nm.beppu-u.ac.jp

<sup>1</sup> Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581, Japan

<sup>2</sup> Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581, Japan

<sup>3</sup> Department of Food and Bioscience, Faculty of Food Science and Nutrition, Beppu University, 82 Kitaishigaki, Beppu, 874-8501, Japan

キーワード: 脱ハロゲン呼吸, 還元的デハロゲナーゼ, トランスポゾン, バイオレメディエーション

Key words: dehalorespiration, reductive dehalogenase, transposon, bioremediation

(原稿受付 2007年10月10日/原稿受理 2007年10月13日)

### 1. はじめに

高度に塩素化された化合物は好気的条件下では微生物で分解されにくい, 湖沼の蓄積物, 土壌, 地下水といった嫌気的環境ではこれらを還元的に脱塩素化する微生物が普遍的に生息している。これらの中でも, 脱ハロゲン呼吸細菌はハロゲン化合物を最終電子受容体とする嫌気呼吸によりエネルギーを獲得して増殖し, ハロゲン化合物を極めて効率よく脱ハロゲン化する。したがって, 脱ハロゲン呼吸細菌は嫌気環境下における有機塩素化合物のバイオレメディエーションに利用されており, 特にテトラクロロエテン (PCE) やトリクロロエテン (TCE) の汚染浄化で成功例が報告されている。

脱ハロゲン呼吸細菌は,  $\delta$ -proteobacteria,  $\epsilon$ -proteobacteria, chloroflexi もしくは低 GC グラム陽性細菌から分離されており, これらは通性嫌気性の *Anaeromyxobacter* 属細菌を除いてすべて偏性嫌気性細菌である<sup>2,17)</sup>。脱ハロゲン呼吸の還元的脱ハロゲン化反応は, その呼吸鎖電子伝達反応の末端に位置する還元的デハロゲナーゼ (reductive dehalogenase) により触媒される。現在までに, クロロエテン類やクロロフェノール類を脱塩素化する十数種類の還元的デハロゲナーゼが精製され, 生化学的諸性質が明らかにされている。また, 近年のゲノム解析とメタゲノム解析により, 100種類を超える多様な還元的デハロゲナーゼ遺伝子のホモログが同定されている。本稿では, 脱ハロゲン呼吸細菌の還元的デハロゲナーゼの特

徴と, その機能進化の過程に重要である転移因子との関係について, 筆者らの研究室で分離した脱ハロゲン呼吸細菌 *Desulfitobacterium hafniense* Y51 株の例を中心に紹介する<sup>19)</sup>。

### 2. 還元的デハロゲナーゼの特徴

還元的デハロゲナーゼが触媒する還元的脱塩素化反応は, 2つのタイプに分類されている。塩素原子が水素原子へと1つずつ置き換わる水素置換反応 (hydrogenolysis, 図 1A & B) と, 2つの塩素原子が同時に除去されて C-C 結合が C=C 結合に変換される二塩素除去反応 (dichloroelimination, 図 1C) である。これまでに報告されている還元的デハロゲナーゼのほとんどは, 前者の水素置換反応を触媒するものである。

脱ハロゲン呼吸細菌が基質とするハロゲン化合物は株レベルで異なっており, これは保持している還元的デハロゲナーゼの違いによると考えられる。例えば, *D. hafniense* Y51 株は PCE デハロゲナーゼ (PceA) により PCE と TCE を *cis*-1,2-ジクロロエテン (*cis*-DCE) へと脱塩素化する<sup>20)</sup>。同様の PceA を有する *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 株も同様の脱塩素化反応を行う<sup>12)</sup>。一方, *Desulfitobacterium hafniense* DCB2 株は PceA を保持しておらずクロロエテン類を脱塩素化しないが, クロロフェノールデハロゲナーゼ (CprA) によりクロロフェノール類を脱塩素化する<sup>1,3)</sup>。

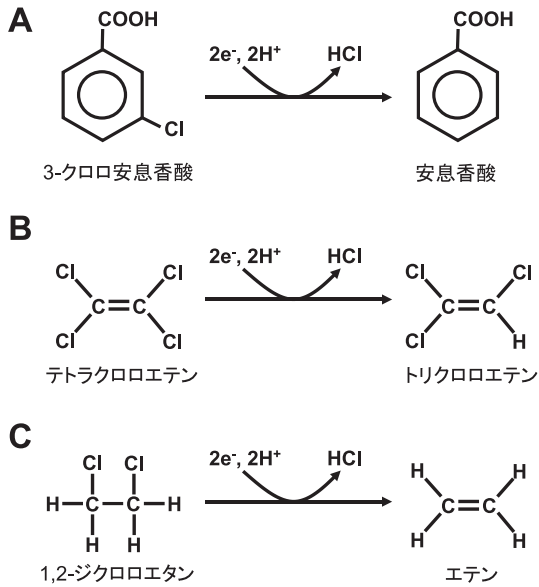


図 1. 脱ハロゲン呼吸における還元的脱塩素化反応。

3-クロロ安息香酸の水素置換反応 (A) テトラクロロエテンの二塩素除去反応 (B) 1,2-ジクロロエタンの二塩素除去反応 (C)。

いくつかの例外を除いて、これまでに報告されている還元的デハロゲナーゼは以下の特徴を有している。まず、N 末端に Tat (twin arginine transport) システムにより認識されるシグナル配列が存在する。Tat システムは細胞内外膜間への蛋白質輸送系であり、*D. hafniense* Y51 株の PceA はペリプラズムに局在することが確認されている<sup>20)</sup>。次に、補因子として 1 つのコリノイドと 2 つの鉄-硫黄クラスターを有している。コリノイドはコリン環を主要骨格とする化合物であり、代表的なものにコバルト (Co) 錯体であるビタミン B12 が挙げられる。還元型のコリノイドは単独でも脱塩素化活性を有することや、コリノイド阻害剤により還元的デハロゲナーゼの活性が阻害されることから、コリノイドが脱ハロゲン化反応の活性中心と考えられる。

還元的デハロゲナーゼの反応機構として、1 つのコリノイドと 2 つの鉄-硫黄クラスターが関与するモデルが提示されている<sup>10,13)</sup>。まず、還元型である Co (I) コリノイドからハロゲン化合物への 1 電子伝達が起こる (図 2)。PCE の場合、これにより塩素イオンが放出されて、トリクロロビニルラジカルと Co (II) コリノイドが生起する。それに続く反応の詳細は不明であるが、トリクロロビニルラジカルと Co (II) コリノイドがそれぞれ鉄-硫黄クラスターにより還元される機構 (図 2A) と、トリクロロビニルラジカルと Co (II) コリノイドが反応することによりトリクロロビニル-Co (III) コリノイドが形成され、これが鉄-硫黄クラスターにより還元される機構 (図 2B) の 2 つが提案されている。これらの反応機構には、活性部位の構造が大きく影響すると考えられる。

還元的デハロゲナーゼ遺伝子上流あるいは下流には、還元的デハロゲナーゼの膜アンカーであると推定される疎水性蛋白質をコードする *orfB* 遺伝子が存在する。

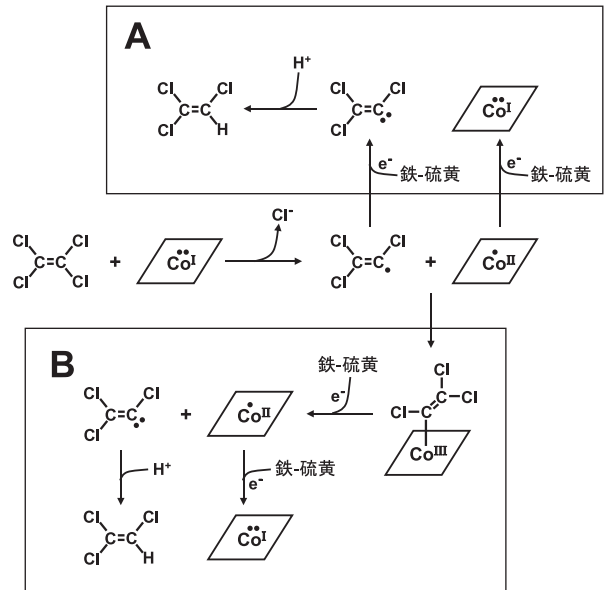


図 2. 還元的デハロゲナーゼによる PCE 脱塩素化反応のモデル図。

Co (I) コリノイドから PCE への 1 電子伝達によりトリクロロビニルラジカルが生じた後、これが鉄-硫黄クラスターにより還元される機構 (A) と、Co (II) コリノイドと反応することによりトリクロロビニル-Co (III) コリノイドを形成する機構 (B) が提案されている。

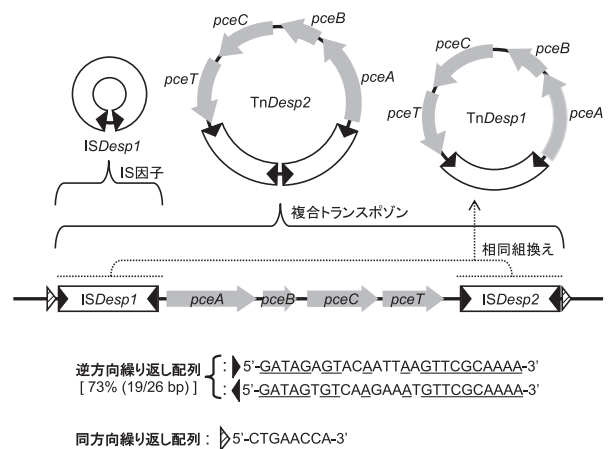


図 3. *Desulfotobacterium hafniense* Y51 株の PCE デハロゲナーゼ遺伝子クラスターと環状体の構造。

*D. hafniense* Y51 株の場合、*pceB* 遺伝子に相当する (図 3) の *orfB* 遺伝子と還元的デハロゲナーゼ遺伝子に保存されている配列を利用することにより、脱塩素化活性を有する集積培養物などのメタゲノムに由来する多様な還元的デハロゲナーゼ遺伝子のホモログが同定されている。また、ゲノム解析によっても、還元的デハロゲナーゼ遺伝子が多数同定されている。例えば、*D. hafniense* Y51 株は約 5.7 Mb の環状ゲノムに 2 つのみであるが、*D. hafniense* DCB2 株は少なくとも 9、*Dehalococcoides ethenogenes* 195 株は約 1.5 Mb の環状ゲノムに 17、さらに、*Dehalococcoides* sp. CBDB1 株は約 1.4 Mb の環状ゲノムに 32 もの還元的デハロゲナーゼ遺伝子のホモ

ログを有することが明らかになっている<sup>3,11,15,18)</sup>。*Dehalococcoides* 属細菌は、*cis*-DCE, 塩化ビニル (VC), 塩化ベンゼンやダイオキシンを脱塩素化できる生物として注目されている。また、*Dehalococcoides* 属細菌は脱ハロゲン呼吸を唯一のエネルギー生産系とする生物であり、脱ハロゲン呼吸細菌の進化の過程を考える上でも重要な存在である。

### 3. 還元的デハロゲナーゼ遺伝子と転移因子

微生物の迅速な環境適応や機能進化の過程には転移因子による遺伝子の重複や水平伝播が重要な役割を担っており、多様な還元的デハロゲナーゼ遺伝子の出現にもこれらの現象が関与していると考えられる。*D. hafniense* Y51 株の PCE デハロゲナーゼ遺伝子クラスター (*pceA*, *pceB*, *pceC* および *pceT* 遺伝子) は *ISDesp1* と *ISDesp2* の 2 つの相同な IS 因子に挟まれており、複合トランスポゾン形成している (図 3)。この PCE デハロゲナーゼ遺伝子クラスターが現在の遺伝子座に挿入された形跡として *ISDesp1* の上流と *ISDesp2* の下流に 8 塩基の同方向繰り返し配列が存在する。これらの転移因子は現在でも機能しており、i) *ISDesp1* の環状体 (*ISDesp1*)、ii) *ISDesp1* から *ISDesp2* までの環状体 (*TnDesp2*)、さらに、iii) *ISDesp1* と *ISDesp2* が相同組み換えを引き起こすことにより生起する環状体 (*TnDesp1*) が出現する<sup>7)</sup>。これらの環状体は転移中間体として機能し、転移できなかった場合は消滅すると考えられる。

*D. hafniense* Y51 株をクロロエテン非存在下で継代培養すると、上記の現象により脱塩素化能を失った株が出現する。これまでに *ISDesp1* が欠失した SD (Small Deletion) 株と *TnDesp1* が欠失した LD (Large Deletion) 株を分離した。SD 株は *ISDesp1* の内部に存在する *pceA* 遺伝子のプロモーター配列の -35 領域が失われたことで *pceA* の転写量が劇的に低下している。また、*D. hafniense* Y51 株をクロロフォルム 1  $\mu$ M 存在下で培養すると、SD 株と LD 株が極めて高頻度に出現する<sup>8)</sup>。これは、クロロフォルムが野生株の生育を阻害するのに対して SD 株と LD 株の生育を阻害せず、野生株から生起する SD 株と LD 株が選択的に生き残るためである。クロロフォルムがなぜ生育阻害を引き起こすのかは現在解明中であり、その阻害機構は電子伝達系の阻害によることが示唆されている。

ゲノム上に多数の還元的デハロゲナーゼを有する *Dehalococcoides* 属細菌の場合も、多くの還元的デハロゲナーゼ遺伝子の近傍にトランスポザーゼやファージ由来のインテグラーゼをコードする遺伝子が同定されており、これらの転移因子が機能していると考えられる<sup>11,18)</sup>。また、VC デハロゲナーゼ遺伝子である *vcrA* 遺伝子や推定 VC デハロゲナーゼ遺伝子である *bvcA* 遺伝子のコドンの使用頻度は、*Dehalococcoides* 属細菌が保持している他のデハロゲナーゼ遺伝子のコドンの使用頻度と異なっており、ゲノム解析より判明した tRNA の構成と一致していない<sup>14)</sup>。したがって、これらのデハロゲナーゼが *Dehalococcoides* 属細菌と異なる菌からの水平伝播により獲得されたことが示唆されている。さらに、*Dehalococcoides* sp. BAV1, FL2, GT 株ではファージ

粒子の出現が検出されており、ファージによる還元的デハロゲナーゼ遺伝子の水平伝播が生じている可能性が示唆されている<sup>16)</sup>。

自然界において、生物地球化学的反応により生起するハロゲン化合物は 3800 種以上と報告されている<sup>9)</sup>。これらのハロゲン化合物を利用する微生物生態系が古くから存在し、近年の環境汚染に適応していると考えられる。各種のハロゲン化脂肪族化合物および芳香族化合物を水素置換反応により脱ハロゲン化した際に生じる Gibbs の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^0$ ) は -130 から -180 kJ/mol, その酸化還元電位 ( $E'$ ) は +260 から +480 mV である<sup>4,6)</sup>。この値は硝酸呼吸において硝酸を亜硝酸に還元する反応 ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ;  $E' = +433$  mV) に匹敵するが、脱ハロゲン呼吸により得られる菌体収量は相対的に低い。そのため、Dolfing は、脱ハロゲン呼吸のエネルギー生産系にはまだまだ改善の余地があり、脱ハロゲン呼吸細菌は進化の途上にあると考察している<sup>4)</sup>。多様な還元的デハロゲナーゼの存在は、触媒反応の効率化や新奇な脱ハロゲン化能の獲得に大きく関わっていると考えられる。

### 4. おわりに

脱ハロゲン呼吸に関する研究は、主にバイオレメディエーションへの活用という観点から行われてきた。環境汚染有機塩素化合物の分解に関与している脱ハロゲン呼吸細菌や還元的デハロゲナーゼの同定、さらに、これらの存在を効率よく検出するための技術開発などが精力的に行われている。一方、近年、*Dehalococcoides* (195 株, CBDB1 株, BAV1 株), *Desulfitobacterium* (DCB2 株, Y51 株), *Geobacter* (SZ 株), *Anaeromyxobacter* (2CP-C 株) のゲノム情報が利用可能となっており、トランスクリプトームやプロテオームなどの網羅的なアプローチにより、脱ハロゲン呼吸の全容をつかもうとする研究が開始されている。この研究は、新奇なバイオマーカーの探索や、生化学的な解析が困難な呼吸鎖電子伝達体の解析に有効であると思われる。また、本稿で示したような機能が不明な還元的デハロゲナーゼが多数同定されている。これらがどのようなハロゲン化合物を基質とするのかなど興味深い課題が残されており、今後の研究の発展が期待される。

### 謝 辞

筆者 (二神) は日本学術振興会特別研究員制度による援助を受けている。ここに謝意を表します。

### 文 献

- Christiansen, N., B.K. Ahring, G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1998. Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*. FEBS Lett. 436: 159-162.
- Cole, J.R., A.L. Cascarelli, W.W. Mohn, and J.M. Tiedje. 1994. Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3536-3542.

- 3) *D. hafniense* DCB-2 whole-genome shotgun project; The DOE Joint Genome Institute (<http://jgi.doe.gov/>)
- 4) Dolfig, J. 2003. Thermodynamic considerations for dehalogenation, pp. 89–114. In M.M. Häggblom, and I.D. Bossert(ed.), *Dehalogenation—Microbial Processes and Environmental Applications*. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London.
- 5) Dolfig, J., and B.K. Harrison. 1992. Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* 26: 2213–2218.
- 6) Dolfig, J., and D.B. Janssen. 1994. Estimates of Gibbs free energies of formation of chlorinated aliphatic compounds. *Biodegradation*. 5: 21–28.
- 7) Futagami, T., Y. Tsuboi, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halo-respiring *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 720–728.
- 8) Futagami, T., T. Yamaguchi, S. Nakayama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Effects of chloromethanes on growth of and deletion of the *pce* gene cluster in dehalorespiring *Desulfitobacterium hafniense* strain Y51. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5998–6003.
- 9) Gribble, G.W. 2003. The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere*. 52: 289–297.
- 10) Holliger, C., G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1998. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 383–398.
- 11) Kube, M., A. Beck, S.H. Zinder, H. Kuhl, R. Reinhardt, and L. Adrian. 2005. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat. Biotechnol.* 23: 1269–1273.
- 12) Maillard, J., W. Schumacher, F. Vazquez, C. Regeard, W.R. Hagen, and C. Holliger. 2003. Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4628–4638.
- 13) McCauley, K.M., D.A. Pratt, S.R. Wilson, J. Shey, T.J. Burkey, and W.A. van der Donk. 2005. Properties and reactivity of chlorovinylcobalamin and vinylcobalamin and their implications for vitamin B12-catalyzed reductive dechlorination of chlorinated alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 1126–1136.
- 14) McMurdie, P.J., S.F. Behrens, S. Holmes, and A.M. Spormann. 2007. Unusual codon bias in vinyl chloride reductase genes of *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2744–2747.
- 15) Nonaka, H., G. Keresztes, Y. Shinoda, Y. Ikenaga, M. Abe, K. Naito, K. Inatomi, K. Furukawa, M. Inui, and H. Yukawa. 2006. Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J. Bacteriol.* 188: 2262–2274.
- 16) Ritalahti, K.M., R.R. Helton, K.E. Fletcher, K. Wommack, and F.E. Löffler. Preliminary evidence for phage-mediated horizontal gene transfer in *Dehalococcoides*. May 21–25. 2007. The 107<sup>th</sup> ASM General Meeting. Tronto.
- 17) Sanford, R.A., J.R. Cole, and J.M. Tiedje. 2002. Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 893–900.
- 18) 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. Impraim, K. Tran, J.M. Robinson, H.A. Forberger, C.M. Fraser, S.H. Zinder, and J.F. Heidelberg. 2005. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science*. 307: 105–108.
- 19) Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera, and K. Furukawa. 2001. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1474–1481.
- 20) Suyama, A., M. Yamashita, S. Yoshino, and K. Furukawa. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* 184: 3419–3425.