

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：51501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18483

研究課題名（和文）光合成細菌の嫌氣的芳香族炭化水素分解における役割

研究課題名（英文）A role of phototrophic bacteria in the anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons

研究代表者

久保 響子 (Kubo, Kyoko)

鶴岡工業高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：40631180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：酸素非発生型の光合成細菌に着目し、水界の堆積物を接種源、芳香族炭化水素を基質とした光合成条件下で集積培養を行った。その中で芳香族炭化水素を分解する可能性のある光合成細菌を特定した。また集積培養中から光合成細菌を分離した。うち一種は好気性光合成細菌に分類される種であり、生理学的に新規な特徴を備えていることをゲノム解析と生理学的試験から明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光照射のみで芳香族炭化水素を分解できる光合成細菌の多様性を解明し、新規集積培養株を得ることは、将来的な光合成細菌のバイオレメディエーションへの利用の幅を広げる。集積培養株を得られたことで、これまで1種しか知られていなかった芳香族炭化水素分解光合成細菌の多様性と、その生理学的な機能の詳細な検討が可能になった。また得られた単離株は系統的に新規な微生物として記載できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：An anoxic enrichment culture from sandy sediment was established with toluene as a carbon source. An aerobic anoxygenic phototroph (AAnP) was isolated from the enrichment culture. AAnPs are so far unknown to be involved in aromatic hydrocarbon degradation. In this study, we analyzed its functional characteristics and a draft genome sequence of the newly isolated strain. The unique physiological characteristics and genetic makeup and provide hints for understanding the involvement of AAnPs in the aromatic hydrocarbon degradation.

研究分野：微生物生態学

キーワード：光合成細菌 芳香族炭化水素 嫌気分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素非発生型の光合成細菌は、河川や湖、土壌等の環境に広く生息し、有機物または硫化水素や水素を酸化して光合成を行う。酸素非発生型光合成細菌のうち紅色硫黄細菌は、嫌気で硫化水素が豊富、かつ光が届く環境で独立栄養的な光合成を行い、部分循環湖で時折ブルームを形成することで知られている。一方、紅色非硫黄および緑色非硫黄細菌は、多くの種で独立栄養的な光合成が可能であるが、主に有機物を炭素源および電子供与体として従属栄養的な光合成を行い、好気暗条件下でも生育が可能で、様々な有機物を利用できることが知られている。そのため一次生産者としてだけでなく、嫌気環境下における有機物分解者としての役割にも注目が集まっている。光エネルギーを利用して生育できることから、バイオレメディエーションへの応用が容易な点でも関心が高い。

ガソリンや灯油など炭化水素は水界や土壌の主要な汚染源である。中でも芳香族炭化水素は生物毒性が高く、分解されにくいことからその除去や無害化には大きな関心が寄せられている。水界では特に河口域は流れが緩やかなため有機物が堆積しやすく、好気分解が進むと堆積物中の酸素はすぐに枯渇する。そのため嫌気的な堆積物中に難分解性の有機物が蓄積しやすい。嫌気条件下で芳香族炭化水素を分解できる微生物として単離されているものは現在まで数十種のみであり、硝酸還元、鉄還元、硫酸還元条件下で生育する微生物が得られている。

光合成細菌のうち唯一、*Blastochloris sulfoviridis* (α -proteobacteria 綱) は、嫌気光合成条件下で芳香族炭化水素のトルエンを分解できることが知られている。(Zengler et al., 1999) の研究では淡水環境における光合成細菌によるトルエン分解は、酢酸で培養できる光合成細菌全体の1%にのぼると推定されている。しかし実際の環境中における光合成細菌の芳香族炭化水素分解への関与の程度は定量的に明らかでない。芳香族炭化水素分解の中間体の一つである安息香酸を分解できる光合成細菌はいくつか知られており、トルエン分解光合成細菌の他にも芳香族炭化水素を分解できる光合成細菌は環境中に生息すると考えられる。

2. 研究の目的

光照射のみで芳香族炭化水素を分解できる光合成細菌の多様性を解明し、新規集積培養株を得ることは、将来的な光合成細菌のバイオレメディエーションへの利用の幅を広げる。本研究では、芳香族炭化水素を分解する酸素非発生型の光合成細菌に着目し、その多様性を明らかにすることと、環境中における芳香族炭化水素の分解への貢献度を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 芳香族炭化水素を基質とした集積培養系の構築

海洋や河口の堆積物および原油にさらされた土壌を用いて、芳香族化合物分解に関わる光合成細菌を集積培養した。12時間周期で白熱灯を照射し、30°Cで培養を行なった。トルエン、ベンゼン、シクロヘキサンなどの炭化水素を炭素源として添加した。そのうち光合成細菌の生産する色素と見られる着色が見られた培養系を対象に以降の解析を行なった。

(2) 微生物群集構造の把握

トルエンを基質として添加した集積培養系を対象に、分子生物学的手法を用いて、集積培養系内に見られる光合成細菌の種を特定した。バクテリアの16S rRNA 遺伝子配列を標的としたクローンライブラリの作成および塩基配列決定を行った。

(3) 単離した光合成細菌の生理学的特徴付けおよびドラフトゲノム解析

上記の集積培養系から、光合成細菌の分離を試みた。単離できた好気性光合成細菌に対して生理学的試験を行い、ドラフトゲノム配列を取得した。

4. 研究成果

(1) 芳香族炭化水素を基質とした光合成集積培養系の構築

山形県の赤川河口堆積物、鳥海山の原油にさらされた土壌、沖縄で採取した海洋堆積物などを接種源として、トルエン、ベンゼン、シクロヘキサンなどの基質を添加して嫌気光合成条件下で培養を行なったところ、海洋堆積物を接種源とした集積培養でピンク色の呈色が見られた。以降の解析にはトルエンを基質とし、海洋堆積物を接種源とした集積培養系を用いた。この集積培養系からクローンライブラリを作成し、継代後の群集構造の変化を確認した(図1)。紅色硫黄細菌として知られる *Marichromatium* 属と、好気性光合成細菌として知られる *Roseibacterium* 属の細菌が集積培養系に含まれていた。

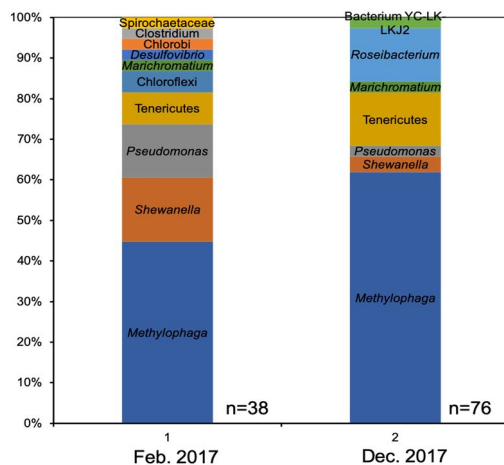


図1 トルエン集積培養内での群集構造の変化

(2) トルエンを基質とした集積培養系からの光合成細菌の分離

上記の集積培養系から、*Marichromatium* 属と *Roseibacterium* 属を標的として分離培養を試みた。*Marichromatium* sp., は *Shewanella* 属と混ざった状態で分離され、まだ純化に至っていない。好気条件下で酢酸を基質として *Roseibacterium* sp. 2-3-A2 株を単離することができた (図2)。

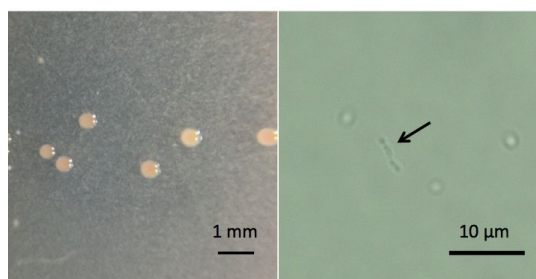


図2 トルエン集積培養から分離された好気性光合成細菌 *Roseibacterium* sp.のコロニー(左)と細胞(右)

(3) 単離された光合成細菌の生理学的特徴およびゲノム情報

単離した 2-3-A2 株が属する *Roseibacterium* 属は、はこれまで 2 種が報告されているが、両者とも好気性光合成細菌であり、嫌気条件下では光合成しないとされていた。しかし 2-3-A2 株は、好気条件下で好気呼吸と光合成を行い、微好気条件、あるいは嫌気条件下でも光合成をしてわずかに増殖する可能性が培養実験で示唆された。このように好気性と嫌気性光合成細菌の中間的な振る舞いをする種は 2-3-A2 株の他に 2 種(*R. mahoneyensis* strain ML6, *C. amphiphototrophicum* EG17)報告があるのみである。

ゲノム解析により、2-3-A2 株はフェノールを分解するのに必要な遺伝子を保持していた。これまでの培養実験では、フェノールを基質としても増殖は見られなかったため、今後さらに条件を検討していく必要がある。また、ゲノム解析からチオ硫酸の異化的酸化に必要な完全 Sox 遺伝子群を持っていることが明らかになった。本株はチオ硫酸を培地に添加しないと増殖が著しく遅くなる。近縁な系統の多くは好気性光合成細菌として報告されている中で、嫌気性の紅色非硫黄光合成細菌に近い挙動を示す本株は、硫黄循環においても新しい位置を占めると考えられる。

< 引用文献 >

Zengler, K., Heider, J., Rosselló-Mora, R., Widdel, F. (1999) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. Arch Microbiol. 172, 204-212.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Kubo, K., Gibu, N., Kasai, D.
2 . 発表標題 Genomic and functional characteristics of an aerobic anoxygenic phototroph isolated from an enrichment culture containing aromatic hydrocarbons
3 . 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会（山梨）
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Fujishima, N. and Kubo, K.
2 . 発表標題 Survival strategy of keratin-degrading microorganisms in marine environments
3 . 学会等名 3rd STI-Gigaku 2018-International Conference of “Science of Technology Innovation”~, Nagaoka, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Kubo, K.
2 . 発表標題 Anoxic enrichment of phototrophic bacteria with aromatic hydrocarbons
3 . 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会（沖縄）P2-067
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Kubo, K.
2 . 発表標題 A sidelight shining on microbial hydrocarbon degradation under anoxic conditions
3 . 学会等名 Retirement Symposium for Prof. Katsumi Matsuura, Energy, Evolution, and Environmental Microbiology of Photosynthesis and Bacteria, Tokyo, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 久保響子, 東岡由里子
2. 発表標題 物部川および赤川河口堆積物における嫌気炭化水素分解微生物の集積培養
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017 (仙台) P-005
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤樹, 久保響子, 齋藤菜摘
2. 発表標題 ポリヒドロキシアルカン酸を生成する微生物株の分離
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017 (仙台) P-155
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考