

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08173

研究課題名(和文) 脱硫菌とPAH分解菌による芳香族縮合型複素環化合物分解マトリックス構築と環境浄化

研究課題名(英文) Degradative matrix construction with aromatic condensed heterocyclic compounds by petroleum desulfurizing and PAH degrading bacteria, and its application for bioremediation.

研究代表者

松井 徹 (MATSUI, Toru)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：90372812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：石油由来の酸性雨原因物質をはじめとする有機硫黄化合物のうち、特に難分解性とされる芳香族縮合型複素環化合物の微生物分解の可能性と、新規な代謝経路解明を目的に検討を行った。研究室保有のバイオ脱硫菌のうち、*R. erythropolis*に属する放線菌がチアンスレン、フェノキサチン、フェノチアジンなどを良好に分解すること、後者2点について新規な分解経路を示すことを明らかにした。また、これら分解はジベンゾチオフェン脱硫酵素遺伝子によることを証明した。さらに、バイオオーグメンテーションによる環境浄化を目的として分解基質と各種石油分解菌との関係を示したマトリックスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、今後ますます需要が高まる石油系化合物汚染地域の土壌、海洋汚染の効率的な浄化を目的とした、微生物製剤の開発に貢献できると考えられる。また、今回明らかになった分解中間化合物を環境中から検出することにより、関連微生物の存在を明らかにし、土着微生物による土壌浄化の可能性を診断することができる。将来的には、類似構造を持つ有機硫黄化合物の生分解性を推測するデータとなり、生分解性の高い化合物のデザインに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Microbial degradation of aromatic condensed heterocyclic compounds, namely ACHC was examined using various petroleum compounds degrading bacteria. An actinomycete belonging to *Rhodococcus erythropolis* could efficiently degrade thianthrene (TH), phenoxathiin (PX), and phenothiadine (PH), with novel degradative pathway for PX, and PH. They were proved to degrade with dsz operon, responsible for dibenzothiophene desulfurization. A matrix table showing the relationship between the ACHC degradation and the bacterial collection was also shown for the application in bioaugmentation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：有機硫黄化合物 微生物分解 放線菌 バイオ脱硫 石油分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境汚染関連物質には、ジベンゾチオフェン(以下 DBT、石油含有物としての酸性雨の原因物質である)、ベンゾチアゾール(人工ゴム合成中間体)、スルホラン(天然ガス、BTX 処理溶媒)、イペリット(遺棄化学兵器)など汚染源は異なるものの硫黄を含んだ有機化合物が少なくない。このうち、DBT は芳香族縮合型複素環化合物(aromatic condensed heterocyclic compounds、以下 ACHC)であるが、ACHC に属する環境汚染物質は、ジベンゾフラン、カルバゾールなど数多い。これら ACHC は難分解性有機化合物であるが、環境中での分解挙動を知るために分解微生物の分離と解析がいくつか報告されてきた。しかしながら、フェノチアジンやフェノキサチンなどの炭素以外の複数の元素を有する ACHC や、環境中・生体内での蓄積が懸念される合成香料(多環ムスク、大環状ムスクなど)は、一部汚染実態の調査は行われているものの、微生物分解の可能性についてさえほとんど未知であるのが現状である。

一方、バイオ脱硫以外を目的とした有機硫黄化合物分解研究は界面活性剤 LAS(linear alkylbenzene sulfonate)に関する研究が多く、その他には人工ゴム加硫促進剤ベンゾチアゾール(ベルギー、Dr.Verachtert グループ)、化学兵器イペリットおよび加水分解物チオジグリコール(九州大、割石グループなど)などが認められるが、DBT 以外の芳香族縮合有機硫黄化合物についてはチアンスレン分解に関する速報が一報あるのみである。

2. 研究の目的

本研究は、有機硫黄化合物と微生物分解の関連を明らかにするために、代表者の保管する多環芳香族分解細菌、DBT 脱硫細菌、BT 脱硫細菌、多環芳香族分解糸状菌、DBT モノオキシゲナーゼ発現菌、ナフタレンジオキシゲナーゼ発現菌と芳香族縮合型複素環(チアンスレン、フェノチアジン、フェノキサチン、多環合成ムスク)の分解マトリックス(分解性、反応生成物に関するデータ)を作成すると共に、未解明の分解関連遺伝子を明らかにすることを目的とした。

代表者はこれまで、石油の酸性雨の原因となる芳香族系有機硫黄化合物の CS 結合を特異的に切断し、有機溶媒中で分解活性を発現する「バイオ脱硫細菌」コレクションを分離、機能解析を進めてきた。また、代表者は、砂漠や熱帯森林などの多様な地域環境を有するチュニジアの Borj-Cedria 研究所と共同研究を行い、好塩性細菌を多数分離した。本研究では、ACHC の分解メカニズム解明と新奇な ACHC 分解菌を目的に検討を行った。

本研究により得られた成果は、今後ますます需要が高まる石油系化合物汚染地域の土壌、海洋汚染の効率的な浄化を目的とした、微生物製剤の開発に貢献できると考えられる。また、今回明らかになった分解中間化合物を環境中から検出することにより、関連微生物の存在を明らかにし、土着微生物による土壌浄化の可能性を診断することができる。将来的には、類似構造を持つ有機硫黄化合物の生分解性を推測するデータとなり、生分解性の高い化合物のデザインに貢献できる。

3. 研究の方法

・スクリーニング

チュニジア国 Borj-Cedria Ecopark 研究所と環境試料の研究利用に関する MOU(Memory of Understanding)契約を行い、チュニジア国内から土壌サンプル等を収集し、スクリーニングに用いた。

・培養条件および供試菌株

有機硫黄化合物を唯一の硫黄源として培養した場合に、増殖が見られることで、当該化合物の分解を容易に評価できる。検討する有機硫黄化合物以外は硫黄源を含まない培地 AG 培地を主に用いた。AG 培地の組成を表 1 に示す。

表 1 AG 培地組成

Glucose	5g
KH ₂ PO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	4g
NH ₄ Cl	1g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2g
CaCl ₂	0.02g
NaCl	0.01g
metal sol.*	10ml
vitamin sol.*	1ml
D.W	Up to 1L
pH	7.5

・供試菌株

ACHC 化合物等の微生物分解における代謝経路解明、分解遺伝子解明に用いた微生物には、主に以下の菌株を用いた(表 2)。また、各菌株 16SrRNA 配列による系統解析結果を図 1 に示した。いずれも高 GC グラム陽性の放線菌に分類され、疎水性有機溶媒に良く分散される性質を有する。

表 2. 供試菌株

菌株	性質	参考文献
<i>Rhodococcus jostii</i> T09	BT 脱硫菌	2)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA2-5-1	DBT 脱硫菌	1)
<i>Gordonia</i> sp. TM414	DBT 脱硫菌	3)

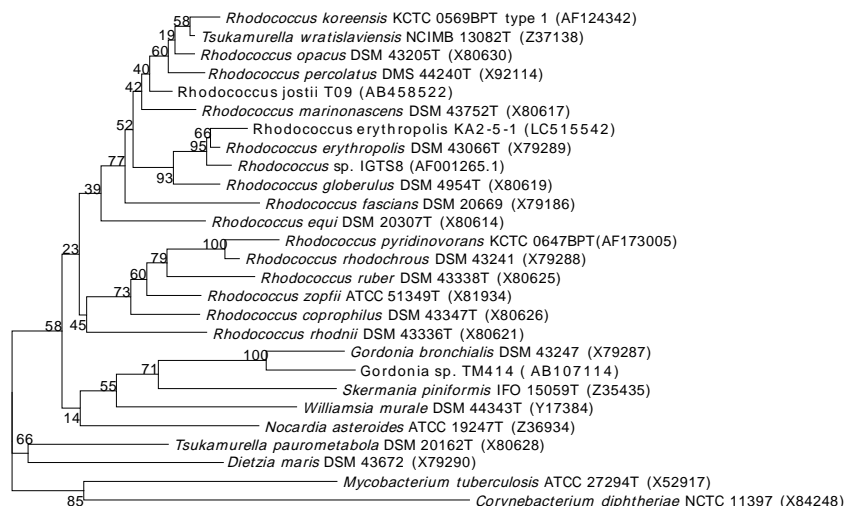


図 1. 16SrRNA 配列による研究に使用したバイオ脱硫菌の系統解析結果

4. 研究成果

(1) スクリーニング結果

チュニジア国内、および東京工科大学周辺（八王子郊外、高尾山麓など）の土壌試料、植物試料などを使用して、高塩濃度（NaCl 10%）条件下での DBT 脱硫菌の集積培養を行ったが、有効な集積培養物は得られなかった。

疎水性石油系基質として n-テトラデカンを唯一の炭素源とした集積培養を行った結果、7 株が分離された（図 2）。東京工科大学周辺試料からも 3 株が分離された。いずれも高塩濃度を要求する、好塩性細菌ではなく、耐塩性細菌であった（図 3 一部データ）。選抜株について n-アルカンの炭素数に対する分解スペクトルと PCR 法による分解関連遺伝子の検討結果をまとめた結果、表 3 のようになった。

今回の検討では明らかにできなかったが、TN21-3 株はアルカン資化性細菌としては報告のない *Sinomicrobium* 属細菌であり、分解関連遺伝子が新規である可能性が高い。

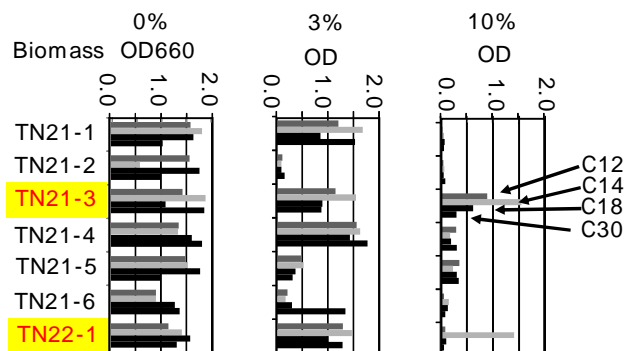


図 2 チュニジア試料から分離した株の高塩濃度におけるアルカン資化性
 (C12;n-ドデカン、C14;n-テトラデカン、C18:n-オクタデカン、C30 : n-トリアコンタン)

Table 3 Summary of the characterization of the isolates

Strain	Origin	Top match (acc. No.)	Degradation*	Genes
TN21-3	Tun	<i>Sinomicrobium oceanis</i> SCSIO 03483 (JQ352762)	C12-30	n.d.**
TN22-1	Tun	<i>Mycobacterium aubagnense</i> CIP 108543 (AY859683)	C12-30	P450
MHA3a	Jpn	<i>Bacillus cereus</i> IAM12605 (D16266)	C10-16	alk B
MHA4a	Jpn	<i>Corynebacterium variabilis</i> NCDO 2097T (X53185)	C12-20	alk B
MHA5a	Jpn	<i>Brevibacterium permense</i> VKM Ac-2280 (AY243343)	C10-20	alk B

*Carbon number of the n-alkanes, ** n.d.; not determined

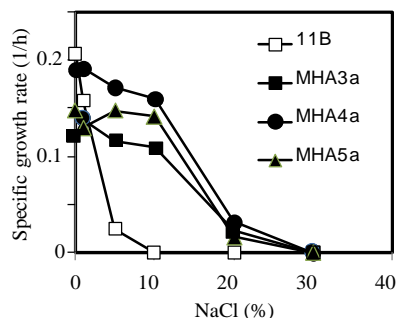


図3 分離株の増殖に及ぼす NaCl 濃度の影響
(11B 株; 対照非耐塩性アルカン資化性細菌)

(2) バイオ脱硫菌による ACHC 分解

研究室保存のバイオ脱硫菌 3 株を用いて各種 ACHC 化合物を唯一の硫黄源とした培養試験を行った。表 4 に示すように、DBT 脱硫細菌である TM414、KA2-5-1 は TH (チアンスレン) を硫黄源としてよく生育したのに対し、BT 脱硫細菌である T09 は生育しなかった。さらに、KA2-5-1 株は PX (フェノキサチン) にも良好な生育が認められたため、KA2-5-1 株を用いて、分解代謝物の抽出と構造決定を行うこととした。

Table 4 Cellular growth in the presence of various OSCs as the sole sulfur source.

Strain	DBT	TH	PX	MgSO ₄ ·7H ₂ O	no Sulfur
TM414	1.09	0.90	0.04	5.19	0.04
KA2-5-1	1.02	0.67	0.77	1.23	0.01
T09	0.11	0.06	0.02	5.79	0.01

KA2-5-1 株を各種 ACHC 化合物を唯一の硫黄源として培養し、培養抽出物の GC-MS 解析結果から、分解中間代謝物の構造を同定し、分解経路の推定を行った。図 4 に PX、TH の分解経路と DBT の分解経路との比較図を示した。

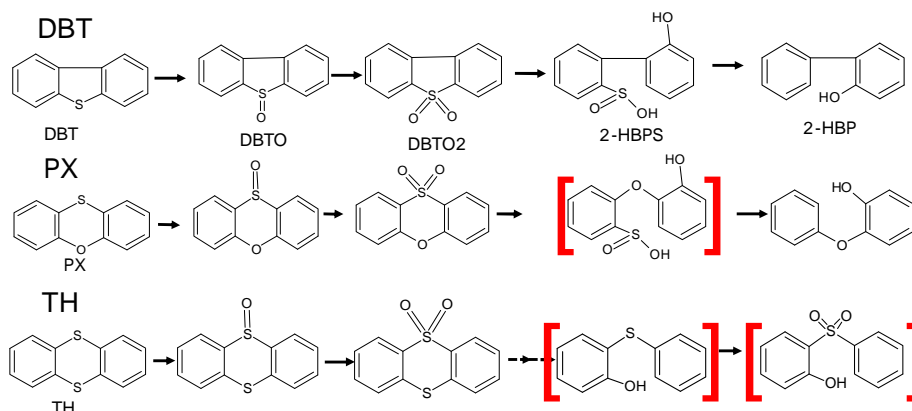


図4 KA2-5-1 株による各種 ACHC の分解経路 ([]は未同定化合物)

得られた分解経路をこれまでの報告と比較した結果、THは *Gordonia* sp. IITR100 とほぼ同様であった⁴⁾。一方、PXはカルバゾール資化性細菌 *Pseudomonas* sp. CA10 による部分分解が報告されている。その分解酸化物は2,2',3-trihydroxy diphenyl sulfide と同定されているが、本研究では、フェノキサチン S-オキッドであった⁵⁾。その後の分解経路を比較しても、KA2-5-1 株の PX 分解経路は、これまでの報告にはない、新奇経路であると考えられる。分解経路の比較結果を図5に示した。

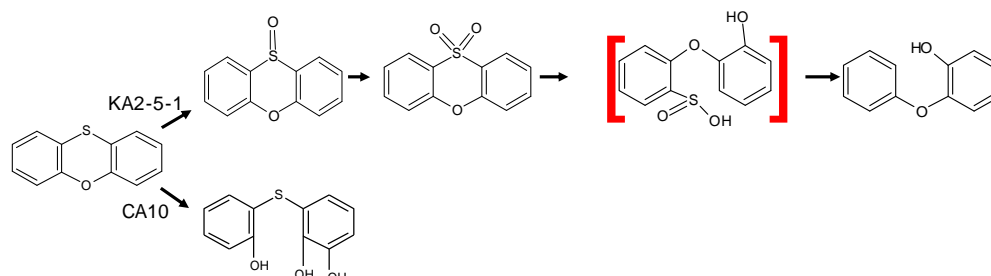


図5 フェノキサチン分解経路の比較

以上、今後ますます需要が高まると考えられる石油系化合物特に ACHC 化合物汚染地域の土壌、海洋汚染の効率的な浄化を目的として、微生物分解の特性を検討した結果、バイオ脱硫細菌が多く ACHC を新奇経路により分解すること、また、分解に関係する遺伝子酵素群を明らかにすることができた。また、各種 ACHC 化合物と分解微生物の関係を明らかにした。また、今回の研究により、ACHC 以外の脂肪族系有機硫黄化合物分解の可能性が示唆されたので、引き続き検討を進めることで、バイオレメディエーションの可能性が拡大すると期待される。

参考文献

- 1) M.Kobayashi, T.Onaka, Y.Ishii, J.Konishi, M.Tamaki, H.Okada, Y.Ohta, K.Koizumi, and M.Suzuki, Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strain., *FEMS Microbiol. Lett.*, 187, 123-126 (2000).
- 2) T.Matsui and K.Marubishi, Isolation of catotenoid deficient mutant from Alkylated Dibenzothiophene desulfurizing nocardioform bacteria, *Gordonia* sp. TM414. *Curr Microbiol*, 48 130-134 (2004)
- 3) L.El Bassi, N.Shinzato, T.Namihira, T.Matsui, Biodegradation of thiodiglycol, a hydrolyzate of the chemical weapon Yperite, by benzothiophene-desulfurizing bacteria., *J Hazard Mater*, 167,124-127 (2009)
- 4)A.Ahmad, A.K.Chauhan, S.Javed, A.Kumar, Desulfurization of thianthrene by a *Gordonia* sp. IITR100., 36, 2209-2214 (2014)
- 5) H.Nojiri, J-W.Nam, M.Kosaka, K.Morii, T.Takemura, K.Furihata, H.Yamane, and T.Omori, Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10., 181, 3105-3113 (1999)

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 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川野璃子、松井徹
2. 発表標題 バイオ脱硫菌T09株の遺伝子破壊株の解析
3. 学会等名 生物工学会東日本支部学生発表討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru MATSUI, Seiji Kabata, Miho Asano, and Leila El Bassi
2. 発表標題 Organic compounds biodegradation under saline conditions
3. 学会等名 Tunisian and Japan Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 練子荷、藤井啓史、古谷陸、望月康祐、浦瀬太郎、筒井裕文、松井徹
2. 発表標題 バイオ脱硫菌による芳香族複素環化合物の脱硫分解
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toru MATSU, Leila El Bassi Ben Moussa
2. 発表標題 Fate of organosulfur compounds in biological systems.
3. 学会等名 Tunisia and Japan Symposium on Science, Society and Technology. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井徹
2. 発表標題 地球環境を清める～バイオレメディエーションとは～
3. 学会等名 化学会CSJ化学フェスタ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上侑弥, 吉村葵, 加藤雄大 松井徹
2. 発表標題 有機硫黄化合物の微生物分解
3. 学会等名 第11回大学コンソーシアム八王子学生発表会
4. 発表年 2019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