

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310047

研究課題名（和文）：石油分解微生物の石油汚染環境下における局在性制御技術の開発と浄化への応用

研究課題名（英文）：Analysis of the interaction between bacterial cells and hydrocarbons in oil-degrading bacteria and its application to bioremediation.

研究代表者

荻原 淳（OGIHARA JUN）

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：50256830

研究成果の概要（和文）：*Rhodococcus* 属細菌は、難分解性化合物に対する資化能力をもつことなどから産業的に有用な菌群であると位置付けられ、環境浄化等への応用が期待されている。そのためには有機溶媒と微生物細胞との相互作用を解析することが重要である。本研究では、*R. erythropolis* PR-4 株がアルカンに対し極めて特徴的な相互作用を示すことを見出し、その相互作用の違いについて物理化学的、生化学的側面から検討を加えた。

研究成果の概要（英文）：*Rhodococcus erythropolis* PR4 is an alkane-degrading bacterium, which grows well in media containing high concentrations of alkanes with translocating to them. These properties give the organism potential in the bioremediation of various environments contaminated by alkanes. In this study, we report the translocation of *R. erythropolis* PR4 from an aqueous phase to an alkane phase during growth in a two phase culture medium to understand the translocation of PR4 to the alkanes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：*Rhodococcus*、グリーンバイオテクノロジー、バイオリメディエーション、プロテオーム解析、土壌汚染、物理化学的相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、国内で揮発性有機溶媒類、重金属類および石油などの油類で汚染された土壌や汚染の可能性のある土地を浄化するために必要な費用の総額は、約13兆円と推定されている。局所的に高濃度の油で汚染された土壌は、焼却により処理することができるが、一般に土壌の油汚染は低濃度で広範囲にわたるため焼却処理は現実的に困難であ

り、二次的汚染の発生や経費面からも難しい場合が多い。一方、焼却に替わる取り組みとしてさまざまなバイオリメディエーションが研究されているが、油汚染は多様な炭化水素の複合汚染であるため浄化は難しく、特に高沸点画分の炭化水素が土壌粒子と強固に吸着し、ほとんどの炭化水素分解性微生物が生育基質として利用できないことから期待した成果が得られない場合が多い。これらの

問題を解決するためには、分解菌の汚染物質への親和性の高さや溶媒耐性能、そして極めて含水量の少ない環境下での汚染物質の代謝機構(非水系代謝機構)が必要であり、さらに、これらのことを可能とし、浄化効率を向上させるため、汚染環境下で活躍する微生物の局在性の制御するための技術が必要である。

申請者グループは上述した要素を兼ね備えた浄化技術を開発するため、高濃度石油耐性石油分解菌である *R. rhodochrous* S-2 株やプリスタン分解菌である *R. erythropolis* PR-4 株を用いて、*Rhodococcus* 属細菌における有機溶媒耐性や微生物細胞と炭化水素との相互作用の解析、微生物の制御法の開発を中心に研究に取り組んできた。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Rhodococcus erythropolis* PR-4 株における有機溶媒耐性機構および細胞の局在性を規定する機構を分子レベルで明らかにし、将来的な石油汚染環境下での微生物の局在性を制御する浄化技術の基礎的基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *Rhodococcus* 属細菌への形質転換

IB 寒天培地上に保存していた *Rhodococcus* 属細菌の菌体を IB 液体培地 5 ml にディスポスティックを用いて植菌し、110 rpm、28°C で 2 日間振盪培養したものを前培養とした。この前培養液をよく攪拌し、同じ条件の IB 液体培地 5 ml に前培養液 5  $\mu$ l 添加し、110 rpm、28°C で 18-20 時間振盪培養したものを本培養とした。本培養液を 15 ml ファルコンチューブに移し替え、8000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離して菌体を沈殿させた後、上清を取り除き氷冷済み 10 mM スクロース溶液 5 ml を加えて沈殿を懸濁し、8000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離する操作を二回繰り返し、沈殿を十分に洗浄した。次に氷冷済み 10 mM スクロース溶液を 1 ml を沈殿に加えて懸濁し、懸濁液を 1.5 ml マイクロチューブに移し替えて 15000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、菌体を沈殿させた。上清を除去後、氷冷済み 10 mM スクロース溶液を 40  $\mu$ l を加えて沈殿を懸濁した。その後 DNA サンプル 10  $\mu$ l を加えて 5 分間氷上に放置した。菌液と DNA の混合液を氷冷済みのキュベットに移し替え、Gene Pulser (BIO-RAD) のチャンバーにセットした後、電圧 1.50 kV、抵抗値 400  $\Omega$ 、電気容量 25  $\mu$ FD の条件で 1~2 秒間、エレクトロポレーションを行った。その後、すぐにキュベットに IB 液体培地を 350  $\mu$ l を加えた (全量 400  $\mu$ l)。使い捨てピペットを用いてキュベット内の菌液を培養チューブに移し替えた。さらに IB 液体培地 600  $\mu$ l を加えて全量を 1 ml にした。

110 rpm、28°C で 2 時間振盪培養し、培養液を全量 1.5 ml マイクロチューブに移し替えて 15000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離して菌体を沈殿させた後、溶液を 100  $\mu$ l に濃縮して全量を抗生物質入り (Km : 100  $\mu$ g/ml、Amp : 200  $\mu$ g/ml、Ts : 25  $\mu$ g/ml) IB 寒天培地に塗抹植菌して 30°C で培養を行った。

### (2) *Rhodococcus* 属細菌からの total DNA 抽出

*Rhodococcus* 属細菌を IB 寒天培地に塗抹植菌し、30°C で 4~5 日間培養した。菌体を回収してチューブに移し、菌体湿重量 1 g 当たり 5 ml の TE バッファーに懸濁した。この細胞懸濁液に終濃度 4 mg/ml になるようにリゾチームを加え、30°C で菌体に粘度が出るまで培養した (1 時間以上)。このサンプル溶液に 0.5 M EDTA 溶液 (終濃度 0.1 M)、とプロテナーゼ K (終濃度 50  $\mu$ g/ml) を加え、30°C で 10 分間培養した。その後、このサンプル溶液に 10% SDS 溶液を終濃度 1% になるように加え、すぐに転倒攪拌して 37°C で培養した。次に、等量の Tris-HCl で飽和させた中性フェノール溶液 (pH 8.0) を加え、5 分間ゆっくり転倒攪拌した後、12000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、先端を切ったチップを用いて上層をゆっくり吸い上げ、新しい容器に移した。次にこのサンプル溶液に中性フェノールと等量のクロロホルム溶液 (クロロホルムとイソアミルアルコールを体積比 24 : 1 で混合したもの) をサンプルと等量加え、5 分間ゆっくり転倒攪拌した後、15000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、先端を切ったチップを用いて上層をゆっくり吸い上げ、新しい容器に移した。この操作は白い中間層がなくなるまで繰り返し行った。中間層がなくなった後、サンプルと等量のクロロホルム溶液を加え、5 分間ゆっくり転倒攪拌した後、15000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、先端を切ったチップを用いて上層をゆっくり吸い上げ、新しい容器に移した。このサンプル溶液に RNase A (和光純薬工業) を終濃度 40  $\mu$ g/ml になるように加え、37°C で 1 時間培養した。RNase 処理後のサンプル溶液は前述したようにフェノール、クロロホルムで処理し、このサンプル溶液に、1/10 体積の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と等量のイソプロパノール溶液を加え、ゆっくり混合した後、サンプル溶液を 15000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し上清を除去して白い沈殿を回収した。この沈殿に適当量 (約 200  $\mu$ l) の 70% 冷エタノールを加え、丁寧に洗浄した後、12000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し上清を除去して白い沈殿を回収した。この沈殿の入った容器を逆さまにすることで風乾し、適当量の TE バッファー (50  $\mu$ l) に溶解させた。その後サンプル溶液の一部をとり、0.8% アガロースゲルを用いて 100 V で電気泳動を行って、目的の DNA が抽出され

ていること確認した。

### (3) 二相培養

本研究に使用した *Rhodococcus* 属細菌は IB 培地で培養を行った。静置培養は全ての株を 30°C で培養し、液体培地による振盪培養では 110 rpm、28°C で行った。前培養液はエレクトロポレーションの際の前培養液と同じ手法で作製した。本培養液は 24φ のねじ蓋付き試験管に 10 ml の IB 培地を添加し、前培養液を  $10^5$  cfu/ml になるように適宜希釈して添加し、アルカンを 0.5 ml 添加して 110 rpm、28°C で行った。培養は 3 日間振盪培養した。坂口フラスコの場合は 150 ml の IB 培地を添加し、前培養液を  $10^6$  cfu/ml になるように適宜希釈して添加し、アルカンを 7.5 ml 添加した。

炭化水素を添加した本培養液の有機層と水層を懸濁して 8 μl をプレパラート (IWAKI) に滴下し、カバーガラス (IWAKI) をのせたものをサンプルとした。位相差顕微鏡 (OLYMPUS DP72) のステージにサンプルを乗せ、スライドガラスにイマージョンオイルを一滴垂らした。対物レンズの倍率を 100 倍にして観察した。

### (4) 菌体からのタンパク質抽出

2 日間振盪培養した培養液を遠沈管に移し、10000 rpm、4°C、10 min で遠心分離した。上清を除去し、菌体湿重量を測定した。湿重量 100 mg あたり、Sample buffer を 30 ml 以上入れ、懸濁した。サンプルを 100°C で 18 min 煮沸した。煮沸後懸濁をし、同条件で煮沸した。サンプルを 12000 rpm、室温、15 min で遠心分離した。上清を回収し、Compat able protein assay kit 1 を 5 倍量(1:5 の割合)添加し、ボルテックスで混合後、室温で 5 min 静置した。Compat able protein assay kit 2 を 1 と同量添加し、混合した。サンプルを 10000 rpm、4°C、15 min で遠心分離した。上清を除去後、Compat able protein assay kit 1 から繰り返した。ミリ Q を 100 μl 添加し懸濁後、アセトンを 400 μl 重層した。サンプルを -20°C で一晩放置した。サンプルを 10000 rpm、4°C、10 min で遠心分離した。上清を除去後、エバポレーターで 5 min、37°C でアセトンを完全に除去した。Denaturing buffer を 100 μl 添加し懸濁した。超音波洗浄機で Sonication 30 sec、冷却 30 sec を 8~10 セット行った。サンプルを 10000 rpm、4°C、10 min で遠心分離し、上清を回収した。サンプルは -20°C で保存した。希釈系列を作製し、96 ウェルプレートにて 3 連で添加し、Working Regand を 200 μl 添加して 37°C で 30 min インキュベートした。O.D.570 nm を測定してタンパク質濃度を算出した。

### (5) SDS-PAGE

サンプルを 10 μg になるように 2×Sample

buffer で希釈し、混合、フラッシュ後、95°C で 5 min 反応させた。泳動装置類を洗剤で洗い、新鮮なミリ Q でリンスした。1×Running Buffer を用意し、ゲルを挟み、泳動槽にセットした。内側から Running Buffer を加え、内側の液量のほうが多いようにした。泳動槽の泡をピペットマンでできるだけ除き、コームを抜いた。Smiling 防止用に 1×Sample Buffer をゲルの端にアプライした。マーカーとサンプル同士を並ばないようにアプライしてフタを閉め、60 V の条件で泳動を開始した。約 3 hour 後に泳動を止め、ゲルを取り出し、あらかじめ洗っておいたタッパーに新鮮なミリ Q と共に入れて 4°C で保存した。

その後、ゲルに固定液を加え 40 min 振盪した後、液を捨て、洗浄液を加えて 10 min 振盪した。続いてミリ Q 水で洗浄した後、増感液を加え、1 min 振盪し、ミリ Q で洗浄した。これを 3 回繰り返す。硝酸銀液を加え、20 min 振盪した。液を捨て、ミリ Q を加え、1 min 振盪した。これを 3 回繰り返す。液を捨て、現像液を加え、約 3 min 振盪した。これはマーカーのバンドが見えるまで振盪した。液を捨て、停止液を加え、10 min 振盪した。液を捨て、ミリ Q を加え、5 min 振盪した。これを 3 回繰り返す。液を捨て、新しいミリ Q に浸した。ゲルを OHP フィルムに挟み、スキャナーに取り込んだ。

あらかじめゲルのレーンを約 6 mm 間隔で 10 等分したものを縦横でバラバラに切断し、サンプルチューブに詰めておいた。以降の作業は遮光で行った。脱色液を 100 μl 加え室温、1300 rpm、10 min 振盪した。液を除去後、ミリ Q を 500 μl 加え、室温、1300 rpm、15 min 振盪した。この作業を計 3 回行った。液を除去後、アセトニトリルを 100 μl 加え、室温、1300 rpm、5 min 振盪した。液を除去後、エバポレーターで 15 min 遠心し、アセトニトリルを除去した。還元液を 100 μl 加え、室温、1300 rpm、5 min 振盪した。その後 56°C で 60 min 反応させた。液を除去後、洗浄用 buffer を 100 μl 加え、室温、1300 rpm、10 min 振盪した。アルキル化液を 100 μl 加え、室温、1300 rpm、45 min 振盪した。液を除去後、洗浄用 buffer を 100 μl 加え、室温、1300 rpm、10 min 振盪した。脱水液を 200 μl 加え、室温、1300 rpm、10 min 振盪した。液を除去後、この作業を繰り返した。液を除去後、エバポレーターで脱水液を除去した。トリプシン溶液を 30 μl 加え、30 min 水中に放置した。余ったトリプシンを除去し、37°C で一晩インキュベートした。抽出液を 50 μl 加え、室温、1300 rpm、30 min 振盪した。フラッシングして液を回収した。抽出液を 25 μl 加え、室温、1300 rpm、30 min 振盪した。フラッシングして液を回収した。サンプルを -20°C で保存し、LC-MS/MS に供した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ショットガンプロテオーム解析

まず初めに、転移状態と吸着状態のタンパク質の発現プロファイルの違いを検討するため、転移状態の代表としてプリスタン(C19)を、吸着状態の代表として *n*-ドデカン(C12)を用い、ショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、C12 を添加した条件に比べ C19 を添加した条件では GroEL2 の発現量が上昇していることが見出された(図 1A)。このことを確認するため、GroEL2 に特異的な抗体を用いてウエスタン解析を行なったところ、同様に発現量の上昇が確認された(図 1B)。ここから、GroEL2 が細胞の転移に関与していることが示唆された。

(A) Shotgun analyses

	C12		C19	
	%	増加率	%	増加率
GroEL2	6.1	0.8	13.5	5.5
Elongation factor tu	6.1	2.0	8.3	8.0
GroEL1	1.0	2.3	1.9	1.2
HTP G	0.2	0.3	1.5	8.1
GroES	0.4	0.3	1.9	4.7
30s ribosome protein s3	0.2	7.7	1.7	4.4

(B) Western blotting

	None	C12	C19
GroEL2			
	1.0	2.6	4.5

図 1 プロテオーム解析

##### (2) *groEL2* 遺伝子の機能解析

PR4 株の GroEL2 は C 末端側に Gly-Met リピートを有することから必須遺伝子と予想された。実際に本研究において遺伝子破壊を試みたが、破壊株を取得することは出来なかった。そこで、PCR により PR4 株の *groEL2* 遺伝子の全長をクローニングし、中央部を欠損させた  $\Delta groEL2$  遺伝子ともに PR4 株に導入し、二相培養環境下での細胞の局在性を検討した。

その結果、細胞が転移する条件である C19 を添加した場合、供試した全ての条件で細胞の局在性の変化は見られなかった。一方で、細胞がアルカン相に吸着する条件である C12 を添加した場合、*groEL2* 遺伝子を導入した形質転換体である PR4(pK4-*groEL2*)では、細胞がアルカン相内に転移している状態が観察された(図 2B)。

次に、PR4(pK4-*groEL2*)の炭素鎖数の違いによる局在性の変化を検討したところ、野生株が生育できないオクタン(C8)添加条件下において、吸着して生育している様子が観察された(図 2A)。

続いて、C12 存在下での生育を検討したところ、*groEL2* 遺伝子の導入により、同菌の生育が約 10 倍から 100 倍上昇した。この条件で

の GroEL2 の発現量を検討したところ 15.6% と C19 添加条件と同じレベルにまで上昇していた。

一方で、データは示していないが、これらの現象は対応するコントロール条件や PR4(pK4- $\Delta groEL2$ )等では確認できなかったことから、GroEL2 の発現量の上昇が i)アルカン相への転移に関与していること、および、ii)同菌の溶媒耐性レベルの上昇に関与していることが示された。

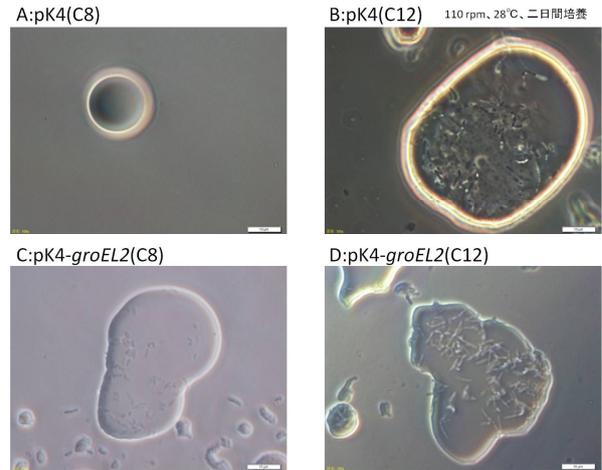


図 2 *groEL2* 遺伝子の影響

##### (3) PR4 株由来の *groEL2* 遺伝子の他の *Rhodococcus* 属細菌に対する影響

上述した結果が PR4 株特有のものか否かを検討するため、PR4 株由来の *groEL2* 遺伝子の他の *Rhodococcus* 属細菌に導入し、二相培養下での細胞の局在性の変化を検討した。

まず初めに、合計で 44 株の *Rhodococcus* 属細菌のアルカンの炭素鎖数による局在性の違いを検討したところ、その多くは炭素鎖数に係わらず一般的な局在性を示した。これらの結果は PR4 株が如何にユニークな特徴を有しているかを支持した。続いて、これらのうち遺伝操作の可能な 4 株について PR4 株由来の *groEL2* を導入した。その結果、これまでに供試したうちの 3 株について、二相培養下での細胞の局在性の変化と溶媒耐性レベルの上昇が確認された。これらの結果から、PR4 株由来の *groEL2* 遺伝子の機能は、*Rhodococcus* 属細菌に一般的なものであると予想された。

##### (4) PR4 株の *groEL1* 遺伝子の解析

PR4 株は、*groES* とオペロンを形成する *groEL1* と *groEL2* の二つの *groEL* 遺伝子を有しており、アミノ酸レベルでの両者の相同性は 73%であることがゲノム解析等によって示されている。本章では *groEL1* 遺伝子が同様の機能を有するか否かを検討した。その結

果、*groES/groEL1* 遺伝子の導入により、C12 添加条件において転移の割合が上昇したことから、C12 相への転移には GroEL2 だけでなく GroES/GroEL1 も関与していることが予想された。

#### (4)まとめ

本研究では PR4 株の有機溶媒耐性機構やアルカンとの相互作用に対する GroEL2 の機能について検討した。その結果、GroEL2 の発現量の上昇がアルカン相への転移や溶媒耐性レベルの上昇等の相互作用全般に深く関与しているという GroEL2 の新しい機能を示した。また、本機能は供試した限り、*Rhodococcus* 属細菌全般に共通しているものと予想された。

*Rhodococcus* 属細菌におけるシャペロンの研究はほとんど無く、現段階で、GroEL2 がどのように作用し、本機能を発現させているかは未解明であるが、今後の進展により、PR4 株がアルカン相内部で生育できる機構が明らかになれば、極めて含水量の少ない非水系環境下での生命活動の理解や、それを利用したバイオテクノロジー技術の発展に大きく寄与するものと考えられた

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① T. Aizawa, N. Iwabuchi, M. Sunairi, M. Nakajima et al. *Bacillus trypoxylicola* sp. nov., a xylanase-producing alkaliphilic bacterium isolated from larval gut of *Trypoxylus dichotomus*, the Japanese horned beetle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 2010, 61-66. 査読あり

② N. Iwabuchi, M. Sunairi, M. Nakajima et al. Role of Interfacial Tension in the Translocation of *Rhodococcus erythropolis* during Growth in a Two-Phase Culture System. *Environmental Science & Technology*. 43, 2009, 8290-8294. 査読あり

③ T. Kawarai, S. Furukawa et al. Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107, 2009, 630-635. 査読あり

④ K. Hosono, J. Ogihara et al. LL-Z1272  $\alpha$  epoxide, a precursor of ascochlorin produced by a mutant of *Ascochyta viciae*. *Journal of Antibiotics*. 62, 2009, 571-574. 査読あり

[産業財産権]

#### ○出願状況 (計 2 件)

名称：形質転換されたロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌、及び、これを用いた炭化水素の処理方法

発明者：岩淵範之、中嶋睦安、砂入道夫他

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2009-206309

出願年月日：2009年9月9日

国内外の別：国内

名称：ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌を用いた代謝方法

発明者：岩淵範之、中嶋睦安、砂入道夫他

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2009-193018

出願年月日：2009年8月24日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

荻原 淳 (OGIHARA JUN)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：50256830

中嶋 睦安 (NAKAJIMA MUTSUYASU)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10059660

(H20→H21：研究代表者)

##### (2) 研究分担者

砂入 道夫 (SUNAIRI MICHIO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80196906

岩淵 範之 (IWABUCHI NORIYUKI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：90328708

古川 壮一 (FURUKAWA SOHICHI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：40339289

安齋 寛 (ANZAI HIROSHI)

日本大学短期大学部・生物資源学科・教授

研究者番号：70168029