

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19987

研究課題名（和文）硫酸還元細菌のパラキシレン分解経路解明と石油汚染環境修復への応用

研究課題名（英文）Degradation pathway of paraxylene in sulfate-reducing bacteria and its application to the remediation of petroleum polluted environment

研究代表者

渡邊 美穂（Watatabe, Miho）

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：70867184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：石油系炭化水素を分解する硫酸還元細菌であるDesulfosarcina属細菌群の新たな石油成分分解機構の解明と新微生物資源の探索を目的として研究を行った。硫酸還元-パラキシレン分解経路の解明のため、微生物による代謝産物の解析とゲノム解析を行った。また、日本国内の計6つの油田・ガス田・温泉から様々な系統に属する新規細菌株を分離した。これら細菌株について原油分解性能等の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学繊維の原料となるパラキシレンはアジアにおける需要が増大し、備蓄プラントの建設が急増している。その中で、プラント施設からのパラキシレンの漏洩による潜在的な環境汚染の懸念が高まっている状況にある。化学製品生産の過程で生じる副産物パラトルイル酸の除去についても工業排水処理における課題となっており、パラキシレン関連物質からの環境浄化法の確立が喫緊の課題である。パラキシレンの硫酸還元細菌による分解という、全く未知の代謝を明らかにするという点で本研究は学術的独自性を有している。本研究課題は環境修復法の開発のみならず、微生物生態的・進化学的にさらなる発展の可能性を秘めており学術的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：The study was conducted to elucidate a mechanism of degradation of p-xylene under anaerobic condition and to search for new microbial resources of the genus Desulfosarcina, a group of sulfate-reducing bacteria that degrade petroleum hydrocarbons. To elucidate the sulfate-reducing p-xylene degradation pathway, we analyzed the metabolites produced by the microorganisms and performed genome analysis. In addition, novel bacterial strains belonging to various lineages were isolated from oil fields, gas fields, and hot springs in Japan. The performance of these strains in degrading crude oil was also investigated.

研究分野：微生物生態学/環境生物学

キーワード：微生物 環境浄化 原油 硫酸還元 無酸素環境 新規微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 石油汚染と硫酸還元細菌群 石油は人類の産業活動に不可欠な物質であるが、その備蓄や運搬にあたり人為的事故による流出がしばしば問題となる。流出石油は生態系に甚大な影響を与えるため、その回収法と環境修復法が模索されている。海底や地下圏などの無酸素環境に拡散した石油成分は除去が困難なので、長期にわたって水圏を汚染しうる。一方、硫酸還元細菌は硫酸イオンを利用して嫌氣的呼吸を行う細菌群である。これらは海洋に普遍的に分布し、堆積物中の有機物分解を担っている。その中の一部のグループは、無酸素環境下で石油系炭化水素を分解できることが知られている。

(2) *Desulfosarcina* 属と炭化水素分解 *Desulfosarcina* 属は石油系炭化水素分解性硫酸還元細菌の代表的なグループである。この細菌群は海洋の石油湧出帯や原油汚染域で数多く検出され、無酸素環境の石油分解に重要な役割を担っていると考えられている。これらのことから、*Desulfosarcina* 属細菌群を利用した汚染浄化技術の確立が期待されている。しかし、これらの細菌の環境中での動態に関する知見はまだまだ乏しく、個々の細菌株の性状も十分に明らかにはされていない。*Desulfosarcina* 属細菌群を環境浄化に確実に適用するためには、それらの生理・生態に関する基礎的知見の蓄積が必要である。

(3) パラキシレンまたはアルカンを分解する *Desulfosarcina* 属細菌の発見 申請者は 2017 年に、原油汚染環境から分離された *Desulfosarcina* 属の細菌 2 株を新種として発表した。この 2 株は、それぞれパラキシレンと直鎖状炭化水素アルカンを分解できる。パラキシレンを分解でき

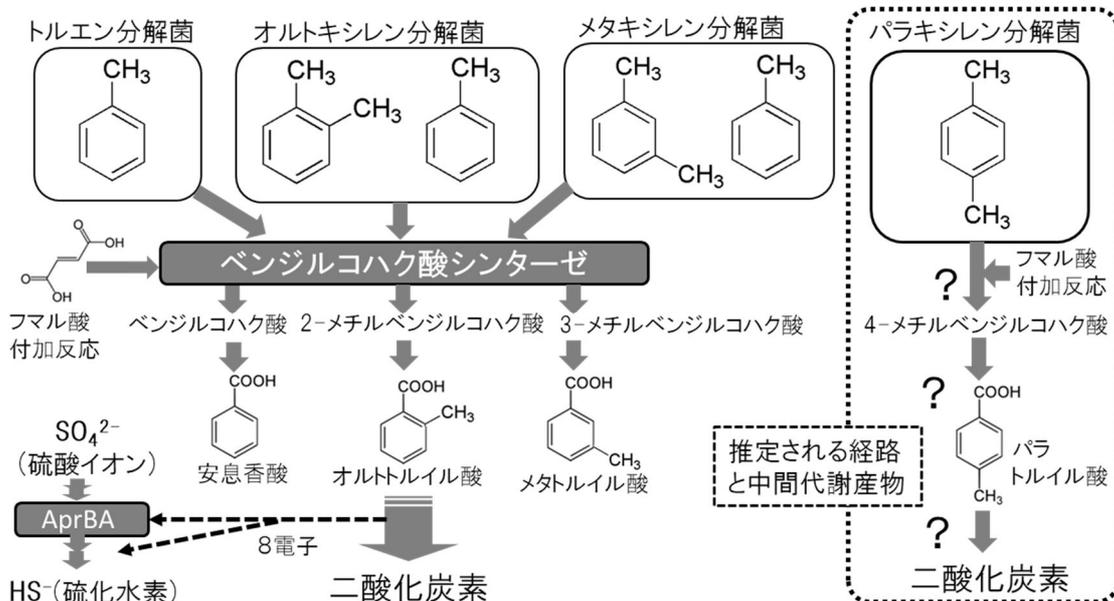


図 1: 硫酸還元細菌によるアルキルベンゼン分解プロセス。パラキシレンについては類似物質の分解過程から推測される経路と中間代謝物を示す。

る硫酸還元細菌株としては同株が細菌学史上初の発見となる。この株は石油系炭化水素のうちパラキシレンのみを利用し、トルエンや異性体のメタ・オルトキシレンを使わないという極めてユニークな性質を有する。既知の硫酸還元細菌において、メタ・オルトキシレンはトルエン分解と同様の経路で分解されることが示唆されている。つまり同株は他のアルキルベンゼン分解と異なる新規経路でパラキシレンを分解している可能性がある(図1)。また、*Desulfosarcina* 属には現在までに 5 種と比較的少ない種数しか含まれていない。しかし、この属はトルエン、オルト・パラキシレン、ヘキサン、デカン等多様な炭化水素を分解できるグループであることが示された。未だ培養されていない *Desulfosarcina* 属細菌の中には、より多様な炭化水素分解性をもつものが存在すると考えられる。

2. 研究の目的

以上のことから、本研究は以下の 4 つを到達目標として掲げる。(1) 硫酸還元-パラキシレン完全分解経路を解明してメタ・オルトキシレンやトルエン分解経路との違いを明らかにする。(2) 石油と関連して見いだされる特殊型硫黄代謝遺伝子と石油系炭化水素分解の関係性を解明する。(3) 多様な石油系炭化水素を利用する *Desulfosarcina* 属細菌株のコレクションを拡充する。(4) *Desulfosarcina* 属細菌株を利用して炭化水素分解菌カクテルを作成し、汚染環境における炭化水素分解性能と細菌群集の構成変化を追跡し、有効性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 硫酸還元パラキシレン分解メカニズムの解明：パラキシレン分解株とメタ・オルトキシレン分解株の保有する遺伝子群の構成に重点的に着目し、硫酸還元パラキシレン分解経路の推定を行う。中間代謝産物を特定するために、ガスクロマトグラフィー質量分析法を用いる。パラキシレンを基質とした培養系における一連の特異的な遺伝子発現を明らかにして、分解に直接関与する遺伝子群を同定する。

(2) *Desulfosarcina* 属細菌のさらなる炭化水素利用性の多様さを培養で示す 各地の原油污染环境から新規な細菌種を分離培養し、石油系炭化水素の利用性が既知のものとは異なる、またはより高効率に分解することのできる株を選抜する。こうして得られた各種の石油系炭化水素利用性菌株を用いて、*Desulfosarcina* 細菌株カクテルを作成する。また、それらの菌株の石油污染环境における遺伝子ベースでの動態評価を行う。

4. 研究成果

(1) 硫酸還元-パラキシレン分解経路の解明：パラキシレンを添加した硫酸還元細菌用培地でパラキシレン分解性硫酸還元細菌株を嫌氣的に培養し、中間代謝産物の特定を行った。細菌株の増殖は、硫酸呼吸に伴う硫化水素生成量によって追跡した。同位体ラベルしたパラキシレンを用いた IR-MS による代謝産物分析の結果、パラ位置にメチル基の保持された物質がいくつか検出された。分析結果とゲノム情報を総合し、当細菌株は一般的な嫌氣的芳香族炭化水素分解経路と類似した付加反応を経由してパラキシレンを分解していることが考えられた。パラキシレン分解に関連した遺伝子発現に関しては、微生物増殖に要する時間が非常に長かったため、本研究課題の期間においてはさまざまな基質で当該細菌株の培養を行い増殖の基礎データを得るにとどまった。

(2) 石油分解硫酸還元細菌株の探索：日本国内の計6つの油田・ガス田・温泉から試料を採取し、硫酸還元細菌を標的にした培養試験を行った。石油系炭化水素（アルカン・シクロアルカン・芳香族炭化水素等）を基質としたいくつかの培養で硫化水素生成が起きており、硫酸還元細菌の生育が示唆された。これらの培養から *Deltaproteobacteria* や *Deferribacter* 門など様々な系統に属する細菌株を分離し、系統的・生理学的特徴づけを行い、原油分解性能の検討を行ったが、原油分解に直接的に寄与しうる細菌株は本研究課題の期間内には得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Miho, Kojima Hisaya, Okano Kunihiro, Fukui Manabu	4. 巻 71
2. 論文標題 Mariniplasma anaerobium gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic marine mollicute, and proposal of three novel genera to reclassify members of Acholeplasma clusters II?IV	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Miho, Fukui Manabu, Kuever Jan	4. 巻 1
2. 論文標題 <i>Desulfoplanaceae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bergey 's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9781118960608.fbm00338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Miho, Fukui Manabu, Kuever Jan	4. 巻 1
2. 論文標題 <i>Desulfococcaceae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bergey 's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9781118960608.fbm00328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Miho, Galushko Alexander, Fukui Manabu, Kuever Jan	4. 巻 1
2. 論文標題 <i>Desulfosarcinaceae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bergey 's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9781118960608.fbm00329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Miho, Kojima Hisaya, Fukui Manabu	4. 巻 113
2. 論文標題 Labilibaculum antarcticum sp. nov., a novel facultative anaerobic, psychrotolerant bacterium isolated from marine sediment of Antarctica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antonie van Leeuwenhoek	6. 最初と最後の頁 349 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10482-019-01345-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Miho, Kojima Hisaya, Fukui Manabu	4. 巻 202
2. 論文標題 Aerosticca soli gen. nov., sp. nov., an aerobic gammaproteobacterium isolated from crude oil-contaminated soil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 1069 ~ 1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-020-01819-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Miho, Higashioka Yuriko, Kojima Hisaya, Fukui Manabu	4. 巻 43
2. 論文標題 Proposal of Desulfosarcina ovata subsp. sediminis subsp. nov., a novel toluene-degrading sulfate-reducing bacterium isolated from tidal flat sediment of Tokyo Bay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Systematic and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 126109 ~ 126109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.syapm.2020.126109	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Miho, Kojima Hisaya, Fukui Manabu	4. 巻 70
2. 論文標題 Aquipluma nitroreducens gen. nov. sp. nov., a novel facultatively anaerobic bacterium isolated from a freshwater lake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 6408 ~ 6413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004551	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 最上華帆, 渡邊美穂, 岡野邦宏, 宮田直幸
2. 発表標題 秋田県内の油田からの嫌気性原油成分分解微生物の探索と培養系の構築
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊美穂
2. 発表標題 無酸素環境の原油分解微生物群を用いた環境修復・新資源創成のための基礎研究
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会第33回講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊美穂, 岡野邦宏, 宮田直幸
2. 発表標題 ゲノム構造からみた坑廃水中のマンガン酸化細菌のエネルギー代謝特性
3. 学会等名 一般社団法人環境資源工学会 Webシンポジウム『休廃止鉱山と土壌環境に関わる研究の新たな展開』
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 DeVos, P., Dedysh, S., Hedlund, B., Kampfer, P., Rainey, F., Trujillo, M.E., Bowman, J., Brown, D.R., Glöckner, F.O., Oren, A., Paster, B.J., Wade, W., Ward, N., Busse H.J., Reysenbach A.L., Whitman, W.B.(editor)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 John Wiley & Sons, Inc.	5. 総ページ数 4
3. 書名 Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria ; Desulfosarcina ほか	

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室
<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbe/eco/>
秋田県立大学 生態工学研究室HP
<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbe/eco/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------