

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：54601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658280

研究課題名(和文)コンポストによる特定悪臭成分分解メカニズムの解明

研究課題名(英文)Comparative Analysis of Enzyme Activities Concerned in Decomposition of Specific Malodorous Substances

研究代表者

伊月 亜有子 (Itsuki, Ayuko)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授

研究者番号：40332051

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)：本研究ではコンポストの有害物質分解能に注目し、有害物質分解時に機能する微生物産生酵素の特定、および環境浄化機能を有する酵素の活性化に必要な条件等の探索を行った。具体的にはコンポストの持つ特定悪臭物質分解能を研究対象とし、コンポスト内の微生物由来の酵素活性化反応を測定することで、有害物質分解能を持つ酵素群の同定を行った。さらに、測定された酵素活性化データにバイオインフォマティクス技術を適用し、酵素群間の活性化相互作用を明らかにすることで、コンポストの悪臭物質分解能をシステムとして解明することを試みた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, environmental pollution due to specific malodorous substances has become a serious problem. One technique for purifying specific malodorous substances involves bioremediation via the metabolism of microorganisms. However, the metabolism of specific malodorous substances by microorganisms is not known in detail. We applied statistical analysis to the activities of enzymes produced by microorganisms during the decomposition of specific malodorous substances. Results revealed associated structure between enzymes to function as a system concerned to treat enzyme activity information existing in the soil environment. To our knowledge, few studies have examined enzymes derived from different microorganisms that cooperatively decompose specific malodorous substances. These findings might therefore contribute to clarifying how specific malodorous substances are decomposed in a real soil environment.

研究分野：土壌生化学

キーワード：土壌酵素活性化解析

### 1. 研究開始当初の背景

近年、土壤環境を始めとする様々な環境において、有害物質による汚染は深刻な問題となっており、有害物質で汚染された環境を速やかに修復することが重要な課題となっている。その方法のひとつとして、微生物の代謝機能を利用し環境浄化を図るバイオレメディエーションが注目されている。従来の物理化学的処理技術と比べ、微生物による汚染浄化システムには、安価 無害化処理が可能 という大きな2つの利点がある。そこで、対象とする有害物質が多く存在するような特殊な環境条件下で生活する微生物を単離・同定し、微生物が持つ有害物質分解能を解明し効率的に利用しようとする研究が行われている。さらに、最近ではメタゲノム解析によって、生態系に存在する有用物質を探索する研究も数多く行われている。このように、生態系には存在する有用な微生物産生酵素について、当該酵素自体、あるいは酵素を分泌する微生物については解明が進んでいるが、しかし、生態系で機能している酵素群を統合的に解析し、異なった微生物由来の酵素同士が協同的に作用することで有害物質分解に寄与していることを言及した研究は少ない。本研究によって、有害物質分解時における微生物産生酵素群の相互作用を明らかにすることは、実際の土壤環境で行われている有害物質分解システム解明に大きく貢献するものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、コンポストの持つ特定悪臭物質分解能に着目し、悪臭物質分解時にコンポスト内で活性化されている微生物産生酵素群の同定を行う。さらに、悪臭物質分解時の酵素活性化について関連性を推定し、酵素間の相互関係を明らかにする。推定した酵素間の相互関係を統合することによって、コンポスト内で行われている悪臭成分分解システムを、1つの代謝系として明らかにしていく。コンポスト内で活性化された酵素群が協同的に機能することで、まるで生体細胞内の代謝系のように働いていると考えている。そのため、活性化された酵素を分泌する有用微生物の同定より、有用酵素群の中での関連性をバイオインフォマティクス技術によって推定し、コンポスト内での有害物質分解メカニズムを明らかにする。さらに、本研究によって酵素活性化データに対するバイオインフォマティクスの解析手法を確立することは、環境分野の実験データに対する新しいアプローチとして期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、特定悪臭物質を中心とした有害有機物質について、分解能を有すると期待される微生物産生の酵素群十数種類の活性化の有無を測定し、各有害有機物質の分解に有用な酵素群の同定を行った。さらに、測定

された酵素活性化情報を元に、酵素群の活性化相互作用推定を行い、土壤環境中で行われている有害物質分解メカニズムの解明を行った。また、有害物質をその有機化学的構造特性から有機溶媒系・硫黄系・アルデヒド系・アミン系・低級脂肪酸系悪臭物質と大きく5種類に分別し、それぞれにおいて特異的に活性化している酵素群を同定した。同定された酵素群について活性化相互作用を推定することで、悪臭物質の構造特異的に機能している酵素間関連構造の同定を行った。同定された酵素間の関連構造と既知の生物学情報と統合的に解析することによって、土壤環境中における微生物産生酵素群による浄化システムの分子生物学的なメカニズム解明も目的とした。

研究代表者は、土壤生化学的手法による実験部分を担当した。

・解析対象とする有害物質の選定、および微生物産生酵素群の同定

本研究では、特定悪臭物質を有害有機物質として解析した。特定悪臭物質の中で特に土壤環境汚染に関係があると考えられる物質を選定した。また、微生物産生の酵素群の中で、環境浄化に関与すると推定される酵素群の選定を行った。

・土壤環境における悪臭物質の濃度測定および培養条件の検討

選定された各有害有機物質が汚染土壤環境において存在する濃度を測定し、土壤培養条件の検討を行った。具体的には、添加する有害有機物質質量の決定、および培養温度(20 ~ 40 )・培養期間(0 ~ 28 日)については括弧内に示した値から最適値の探索を行い、最適な培養条件を検討した。

・土壤酵素活性化条件の特定

選定された有害物質分解が行われている土壤環境条件を特定した。使用土壤としては、本実験と同じ分解土壤を使用し、反応時間・温度・静菌剤等は規定の条件とした。緩衝液の pH および基質濃度等の詳細な酵素活性化条件を検定した。

・有害有機物質に分解能を示す酵素群の活性化測定

滅菌した有害有機物質を含む未分解土壤に、種菌として有害有機物質を分解したと思われる土壤(分解土壤)を添加し、最適と検討された時間・温度で培養した。その後、選定された酵素群についての活性化測定を行った。

・土壤環境における微生物群集解析

PCR-DGGE 法を用い、土壤環境中に存在する微生物群集の解析を行った。土壤環境中では多数の微生物群が存在し、培養による単離同

定が困難であることから、環境中に存在する微生物を群集として全体像を把握し、優占微生物種の比較・時系列による微生物群集の変化等を明らかにした。

研究分担者は、バイオインフォマティクスによる解析部分を担当した。

・測定データのフォーマット整備と標準化

様々な条件下で測定された複数の酵素活性化データを統合して扱うことができるように、データの標準化を行った。特にネットワーク解析のためには、離散型、もしくは連続型の数値データを必要とすることからも、測定データを数値化する手法の確立を行った。

・離散型データからの相互作用推定手法の開発

標準化された酵素活性化データは、活性化の有無という2値データ、もしくは活性化の増大を示した離散型データになることが予想された。そこで、複数の属性について離散型データを持つ変数間の関連性を推定する手法の開発を行った。

・開発した手法を測定された酵素活性化データへ適用

開発した手法を、研究代表者によって測定された微生物産生酵素群の活性化データへ適用し、測定された酵素間の相互作用を推定した。

・推定した酵素間相互作用の全体像から有害物質の有機化学的特性に依存した部分の特定

推定された酵素間の相互作用から、有害物質の有機化学的性質別に分解能を示す酵素群の関連性を抽出し、有害物質の性質別に機能する酵素間相互作用部分を特定した。

4. 研究成果

各種酵素活性および GGM (グラフィカル・ガウシアン・モデリング) 解析を用いた活性化相互作用推定の結果から、本コンポスト系では、培養 10 日前後に微生物相が変化したと考えられる。すなわち、添加した特定悪臭物質の濃度が低い時は、まずコンポスト中に常在する微生物由来の酵素がコンポストに残存する有機化合物を分解していると考えられる。一方、濃度が高い時は、特定悪臭物質の影響により死滅した微生物菌体が、特定悪臭物質存在下で生育できる微生物由来の酵素により分解される。分解された菌体成分(炭素化合物)は特定悪臭物質存在下で生育できる微生物の基質となる。培養後半は、添加した特定悪臭物質の濃度に関係なく、コンポスト中の炭素源が少なくなり、培養前半に生育していた菌体が死滅し、それらの菌体成分を栄養源とする別の微生物群が出現する

と考えられる。これらの結果は、各種酵素活性の経時変化および DGGE 解析による微生物群集構造の変化とも一致していた。

以上の結果から、本研究により、添加した特定悪臭物質の濃度の違いにより、分解過程が異なる様子が明らかとなった。

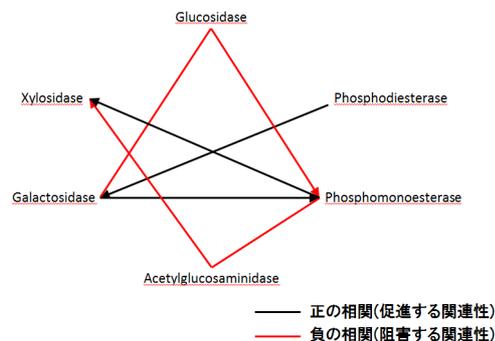


Fig. 1 Network inference between enzymes by GGM modeling

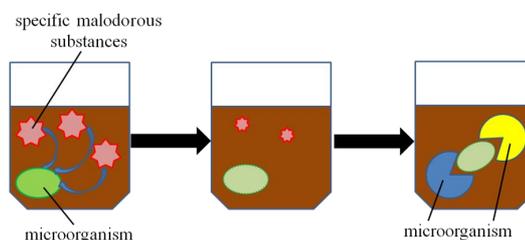


Fig. 2 Model of specific malodorous substances decomposition in compost

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)

Ayuko Itsuki and Sachiyo Aburatani, Comparative Analysis of Soil Enzyme Activities between Laurel-Leaved and *Cryptomeria japonica* Forests, *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 9(1), 119-123, 2015

Ayuko Itsuki and Sachiyo Aburatani, Comparative Analysis of Enzyme Activities Concerned in Decomposition of Toluene, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 86, 126-129, 2014

Ayuko Itsuki and Sachiyo Aburatani, Soil Respiration Rate of laurel-leaved and *Cryptomeria japonica* forests, *International Journal of Environmental, Ecological, Geological and Geophysical Engineering*, 8(6), 453-457, 2014

Ayuko Itsuki and Sachiyo Aburatani, Numbers and Biomass of Bacteria and Fungi Obtained by the Direct Microscopic Count

Method, *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 6(12), 37-41, 2012

〔学会発表〕(計3件)

伊月亜有子・木下智光・天野孝亮・油谷幸代, トルエン分解に關与する微生物産生酵素群測定, 日本生化学会, 2013年9月11日 - 9月13日, パシフィコ横浜

成原寛太郎・伊月亜有子・油谷幸代, 統計的手法を用いたコンポストにおける特定悪臭成分分解メカニズムの解明, 日本分子生物学会, 2012年12月11日 - 12月14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

木下智光・油谷幸代・伊月亜有子, 有害物質分解に關与する微生物産生酵素群測定, 日本生化学会, 2012年12月14日 - 12月16日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊月亜有子

(奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授)

研究者番号: 40332051

### (2) 研究分担者

油谷幸代

(独立行政法人産業技術総合研究所・CBRC・研究チーム長)

研究者番号: 10361627