

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750150

研究課題名(和文) イワムシ糞中における多環芳香族炭化水素(PAHs)分解挙動の解明

研究課題名(英文) Study on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the excrement of *Marphysa sanguinea*

研究代表者

小野里 磨優(ONOZATO, Mayu)

東邦大学・理学部・博士研究員

研究者番号：50610094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円、(間接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、排泄直後のイワムシの糞中には多環芳香族炭化水素(PAHs)が高濃度に含まれ、排泄後2時間以内にPAHs濃度が半減するという奇異な現象を見出した。

その急速なPAHs分解には糞中微生物が関与しているのではないかと考え、ピレンを含む液体培地で糞中微生物を培養し、約2ヶ月経過した培養液に含まれるピレン代謝体の検出を試みた。その結果、ピレンの分解産物と思われる物質が検出された。また、その物質はピレンの代謝体としてよく検出されているヒドロキシピレンとは異なるものであることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have found the two interesting phenomena; the excrement of *Marphysa sanguinea* collected immediately after the organism excreted on sediment contained considerable amounts of PAHs, and the PAHs concentration reduced to half in 2 h. The rapid PAHs reduction might be attributed to the microorganisms in the excrement. To verify the speculation, the microorganisms in the excrement were incubated in the lipid medium suspended with pyrene for about 2 months, and extraction and analyses of a metabolite of pyrene were performed. As a result, we revealed the presence of a substantial metabolite of pyrene.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：多環芳香族炭化水素 環形動物 物質循環 微生物分解

1. 研究開始当初の背景

多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) は、自動車の排気ガス中に含まれているほか、燃焼などによって生じる物質である。中にはベンゾ[a]ピレンのように発がん性を示すもの、変異原性を示すもの、内分泌かく乱作用が疑われているものもある。また、PAHs の性質として、疎水性が高いため、大気中や水中よりも河川や海域の底質中に蓄積し、多く分布しやすいという傾向がある。さらに、底質粒子に吸着した PAHs は底質中に存在している微生物等による分解や太陽光などによる光分解も受けることになるが、このような PAHs 分解は条件 (温度、pH、微生物の種類や数など) によって大きく異なることが知られている。このため、他の研究によって報告されている微生物分解による PAHs の半減期は日～年単位といった広い範囲に及んでいる。

報告者は、多種多様な底生生物が多く生息する千葉県市原市養老川河口干潟における PAHs の動態変化を調査してきた。その結果、イワムシ (*Marphysa sanguinea*、図 1) という環形動物の糞中に含まれている PAHs 濃度は、底質中の PAHs 濃度のおよそ 100 倍高濃度で、イワムシの糞中に PAHs が集積しているという大変興味深い現象があることを発見した。これは、イワムシが主に食餌として摂取している生物の破片や死骸を含むデトリタスには PAHs を始めとした有機環境汚染物質が高濃度に含まれており、イワムシの摂食および排泄行動を介して、さらに糞中に濃縮されるためだと推測している。同様に、界面活性剤についても糞中への濃縮が確認されているが、重金属類に関しては濃縮していないことも明らかにしている。

また、イワムシが排泄した糞をそのまま底質上に放置しておき、2 時間後に採取し、PAHs 濃度を調べると 3-5 環からなる 8 種の PAHs 濃度がいずれも排泄直後の糞と比べるとほぼ半減していることが明らかになった。さらに、その分解反応は擬一次反応として近似することが可能であると分かった。

これらの結果から、他の研究によって報告されている微生物による PAH の分解の半減期と比べると、報告者が見出したイワムシ糞中における PAHs 分解は極めて迅速であり、PAH 分解に関与している因子による PAH 分解能は非常に高いと期待された。しかし、このイワムシ糞中における急速な PAHs 分解メカニズムについては特定できていなかった。



図 1. イワムシ (左図)、イワムシの糞 (右図)
(出典: http://marine1.bio.sci.toho-u.ac.jp/tokyobay/ikimono/bio_images/marphysa.jpg)

2. 研究の目的

(1) PAH 及びその代謝体のモニター

イワムシ糞中に含まれる PAHs は、何らかの“PAHs 分解に関与する因子”によって、他の構造体 (代謝体) へと変換され、その結果として PAHs 濃度が徐々に低下してゆくのだと推測した。そこで、模擬的な実験系を構築し、イワムシ糞中に含まれる因子による PAH 分解の詳細を調べることに加えて、イワムシ糞中に含まれる PAH の代謝体であるヒドロキシピレン (PAH-OH) を試みる。

(2) 「PAHs 分解に関与する微生物の単離」と「PAHs 分解に関与する微生物によるピレン分解機構の解明」

イワムシ糞中に含まれている微生物による PAHs 分解に注目し、以下の 2 つの項目を明らかにする。

① 選択寒天培地を用いて、イワムシ糞に含まれる微生物を培養し、PAHs 存在下における生育が活発である菌を単離及び同定をおこなう。

② 培養した微生物によるピレン分解とその代謝体の検出を試みる。

3. 研究の方法

(1) PAH 及びその代謝体のモニター

ガラスビーズにピレンを吸着させた「汚染ビーズ」を作成し、そこへ「海水+イワムシ糞」を添加することでイワムシ糞に含まれる“PAH分解に関与する因子”によるピレン分解反応を起こさせ、ピレンの濃度低下を調べると同時に代謝体である PAH-OH (ヒドロキシピレン) の定量することを試みた。

① 反応系からピレン及びヒドロキシピレンを検出するための前処理法の確立

まず反応系を「汚染ビーズ」と「水」とに分離した。前者からはヘキサン抽出によりビーズ表面に残存したピレンを回収した。後者からは、塩酸により pH を調整してからヘキサン抽出し、続いてカラムクロマトグラフィーの際に 2 種類の溶出液を用いることでピレンとヒドロキシピレンの分画をそれぞれ得た。

② ピレン及びヒドロキシピレンの測定

ピレン及びヒドロキシピレンの測定については、蛍光法を用いた測定法を確立した。

③ 本実験 (実サンプルを用いたピレン分解)

PAH 汚染ビーズに PAH 養老川河口干潟にて採取したイワムシ糞と海水とを添加し、2 時間反応させた後に冷凍保存した。それを解凍、前処理し、ピレン及びヒドロキシピレンの検出をおこなった。

(2) ① PAHs 分解に関与する微生物の単離

養老川河口干潟 (千葉県市原市) にて、排泄直後のイワムシの糞塊を採取した。あらかじめ調整しておいた選択増菌液体培地 (ピレ

ン濃度: 100 ppm, 50 mL) にイワムシの糞 (3 g) を添加し、振とう培養した (28°C, 120 rpm)。培養開始から 2 週間後にその培養液を分取・希釈した後新しい選択寒天培地に接種、培養・植え継ぎを繰り返すことで、微生物の単離をおこなった。

② PAHs 分解に関与する微生物によるピレン分解機構の解明

養老川河口干潟 (千葉県市原市) にて、排泄直後のイワムシの糞塊を採取した。あらかじめ調製しておいた選択増菌液体培地 (ピレン濃度: 100 ppm, 50 mL) にイワムシの糞 (3 g) を添加し、8 週間振とう培養した (28°C, 120 rpm)。この培養液の上清 5 mL を新しく調製したピレン含有液体培地 (ピレン濃度: 100 ppm, 50 mL) に添加した。培養液添加直後及び 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15, 19, 20 日後に上清 1 mL を分取し、オートクレーブにて滅菌処理 (120°C, 30 分) した。同様に、①で単離したコロニーを新しく調製したピレン含有液体培地 (ピレン濃度: 0.025 ppm, 50 mL) に添加し、上記の培養液添加の場合と同様に経時的に上清を分取、滅菌処理をおこなった。

分取した上清及び培養液を加えていない培地 (ブランク) をそれぞれ酢酸エチル 3 mL で 3 回抽出、脱水・濃縮を行い、試料溶液を調製した。あらかじめ酢酸エチルで洗浄した TLC プレートに試料溶液を 20 µL スポットし、展開溶媒としてヘキサン:酢酸エチル = 9:1 を用いて、成分の分離を行った。展開後のプレートに励起光 (366 nm 及び 254 nm) を照射し、ピレン及び分解産物からの蛍光をデジタルカメラで撮影・記録した。

4. 研究成果

(1) PAH 及びその代謝体のモニター

《汚染ビーズの作成・ピレン分解実験》

プラスチックバイアルにガラスビーズ 7 g を入れ、そこへピレン溶液 (4 mg/mL, 5 mL) を添加した後、溶媒除去をして、「汚染ビーズ」を作成した。そこへ、イワムシ糞 (or 底質、滅菌したイワムシ糞) 1 g 及び海水 5 mL を添加し、2 時間放置した後、冷凍することで反応を停止させた。

《汚染ビーズ等に残存したピレンとヒドロキシピレンの回収 (前処理法)》

冷凍保存しておいたサンプルを解凍し、ビーズと海水とを分離した。汚染ビーズからのピレンの回収は、ヘキサン抽出し、カラムクロマトグラフィーによる精製をおこなえば、100% 近い回収率で回収できることが分かった。一方、ヒドロキシピレンを反応の場として添加しておいた海水中から抽出することを試みたが、ヘキサン抽出をただけではヘキサン層へと分配されず、抽出効率が悪かった。そこで、塩酸を用いて水相の pH (無調整では pH 7 程度) を pH 2 まで下げてからヘキサン抽出をすることで回収率を約 80% まで

で向上させた。標準品を使用して条件検討をおこなったところ、ガラスビーズ上のピレンは海水への溶解が認められたため、ピレン及びヒドロキシピレンの分離する必要が生じた。そこで、適量の綿を詰めたパスツールピペットに 5% 含水シリカゲルを高さ 3.5 cm 分詰めた後、無水硫酸ナトリウム 0.5 cm 分を乗せたカラムを作成した。ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄してから、サンプル溶液 1 mL を負荷し、まずヘキサン 7 mL でピレンを溶出させた。その後、続いて酢酸エチル:ヘキサン (1:9) 10 mL 弱でヒドロキシピレンを溶出させた。カラムから溶出させたヘキサン、酢酸エチル:ヘキサン (1:9) はどちらも 10 mL に定容し、試料溶液とした。

《ピレンとヒドロキシピレンの測定》

蛍光分光光度計を用いて、以下の条件で定量をおこなった。定量の際にはあらかじめ別途調製しておいた標準溶液を測定し、その蛍光強度との比較により、定量、回収率の算出をおこなった。

・ピレン: Ex 333 nm, 測定範囲 350–500 nm, 検出波長 372 nm

・ヒドロキシピレン: Ex 278 nm, 測定範囲 350–500 nm, 検出波長 385 nm

汚染ビーズにイワムシ糞またはオートクレーブによる滅菌したイワムシ糞を添加した後に嫌気的条件下で反応させるなど、様々な条件下で反応させた際のピレン残存量を比較することで、イワムシ糞中に存在する PAH 分解に関与する因子の絞り込むことを期待して確立した実験系ではあったが、実サンプルを用いた本実験では期待していた結果を得ることは出来なかった。これは、実験の始めに作成した汚染ビーズに吸着しているピレン濃度が高濃度過ぎたためであると推測された。また、ブランク (汚染ビーズに超純水を添加し、反応させたもの) では、反応時間を延長すると、より多くのピレンが水から回収される傾向にあることも分かった。この結果から、ピレンはイワムシ糞中の PAHs 分解に関与する因子の有無に関わらず、ガラスビーズ上から水へと移行する可能性があることが示唆された。これらのことを踏まえ、ピレンの初期濃度を適切にし、反応の場として添加しておいた水からもピレンを回収・定量しさえすればピレン残存量のモニターは可能であると判断することが出来た。

(2) ① PAHs 分解に関与する微生物の単離

前述の方法で微生物の単離をおこなったところ、図 2 に示す桃色のコロニーを得ることに成功した。さらに、このコロニーは石油分解菌の一種、Gordonia 属の菌であることが明らかになった。

また、別の日に養老川河口干潟にて採取したイワムシ糞を生理食塩水に懸濁し、ピレンを含む選択寒天培地に接種・培養した。その

結果、前述の方法で得たコロニーと同様のコロニーが生え、植え継ぎを繰り返しても生育したことから、イワムシ糞中にはピレンを唯一の炭素源として生育できる微生物が含まれていることが確認された。

なお、底質や海水、イワムシとは異なる種の環形動物の糞を選択寒天培地に接種し、同様のコロニーが生育するかどうかを調べた。その結果、環境中に広く分布する微生物であるために他の試料でも桃色のコロニーがわずかながらに生える場合もあったが、イワムシ糞のように活発に生育することは全くなかった。この結果から、イワムシ糞中にはPAHsを分解できる微生物が他の試料（底質など）よりも多く含まれており、さらにPAHs分解活性が高い状態にあることが示唆された。

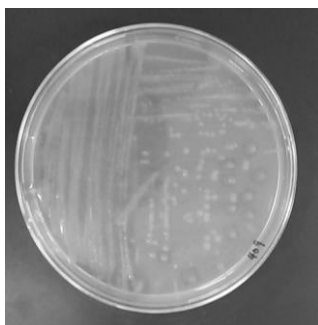


図2 イワムシ糞中から単離された微生物

② 「PAHs 分解に関与する微生物によるピレン分解機構の解明」

ピレン含有液体培地（100 ppm or 0.025 ppm）にイワムシ糞中微生物を含む試料（培養液 or コロニー）を添加し、上清中に含まれるピレン及び代謝体の経時変化（0-5 日後まで）を調べた結果を図3に示す。培養液添加の場合には、培養液直後から5日後までいずれのサンプルからもピレン及び代謝体と推測されるスポットの両方が検出された（図3、左）。一方、コロニーを添加した場合にもコロニー添加直後から代謝体が検出されたが、翌日にはピレンは急激に減少したことが確認された（図3、右）。いずれの条件でも、同様な傾向は20日間を通して見られた。

また、培養液を添加していないピレン含有液体培地（ブランク）と比較すると、培養液添加直後の時点でピレン濃度が大幅に低下し、培養液添加直後のサンプルから分解産物が検出されたことから、培養液がピレン含有液体培地に添加されてから極めて短時間のうちにピレンの分解反応が起こり、ピレン代謝体が生じたと考えられる。さらに、ピレンの分解産物としてよく知られるヒドロキシピレンの R_f 値との比較から、この代謝体はヒドロキシピレンよりも極性の低い化合物であることが明らかになった。さらに、イワムシの糞を酢酸エチルで抽出し、そこに含まれる成分を分離したところ、今回の実験で得ら

れたピレン代謝体とは異なる R_f 値を持つ化合物が検出された（図4）。この結果から、今回のピレン分解実験（ピレン濃度の経時変化）で得られた代謝体は、単にイワムシ糞に含まれていた成分に起因するものではなく、培養した微生物によってピレンが分解された結果として生じた可能性が高いことも明らかになった。

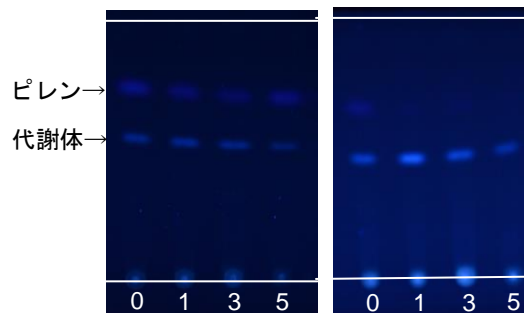
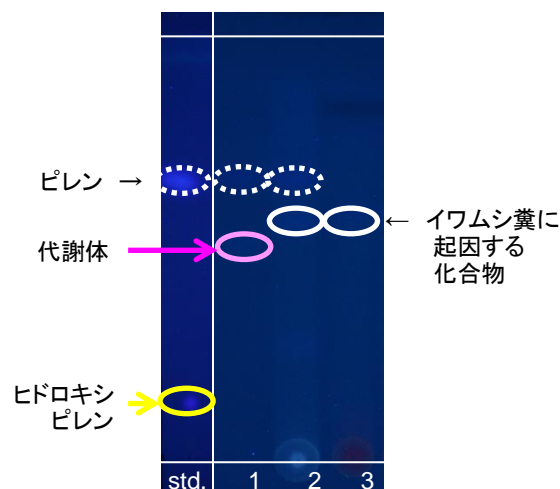


図3 イワムシ糞中微生物によるピレン分解
（励起光：366 nm）
（左：ピレン 100 ppm、培養液添加の場合、
右：ピレン 0.025 ppm、コロニー添加の場合）
《スポットはいずれも、左から試料添加直後（=0 日後）、1, 3, 5 日後》



std: ピレン + ヒドロキシピレン
1: 培養液添加直後 (Pyr: 100 ppm)
2: 8 週間培養後の残渣
3: イワムシ糞 (酢エチ抽出)

図4 ピレン分解産物の推定
（イワムシ糞抽出液との比較）

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

① 小野里 磨優、吉村 佐和子、西垣 敦子、「イワムシ糞中におけるピレンの分解挙動の解明」、日本化学会第94春季年会(2014)。

2014年3月27日. 名古屋大学東山キャンパス (愛知県).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野里 磨優 (ONOZATO, Mayu)
東邦大学・理学部・博士研究員
研究者番号: 50610094

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: