

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26281041

研究課題名(和文)水生植物根圏への芳香族化合物分解細菌の集積メカニズムの解明と浄化技術への応用

研究課題名(英文) Mechanism of enrichment of aromatic compound-degrading bacteria in rhizosphere of aquatic plants, and its application to remediation technology

研究代表者

池 道彦 (Ike, Michihiko)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：40222856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：水生植物とその根圏に集積する細菌を活用した根圏浄化法は、環境適合型の浄化技術として期待される。本研究では、ウキクサ根圏における芳香族化合物分解促進機構の解明を目指し、一連の研究を行った。芳香族化合物として4-tert-ブチルフェノール(4tBP)を用い、4tBP分解が生じたウキクサ根圏に集積された細菌群集を解析したところ、根圏の細菌叢は、環境水中の細菌叢と大きく異なっており、芳香族化合物分解への関わりが知られる細菌が多く存在していた。また、ウキクサ根圏から単離された4tBP分解細菌OM1株のトランスクリプトーム解析から、4tBPの代謝にピバル酸代謝経路が関連していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Rhizoremediation is an environmentally-sound promising technology that utilizes aquatic plants and rhizobacteria to cleanup polluted environment. This study aimed to reveal a mechanism of accelerated degradation of aromatic compounds in the rhizosphere of duckweed. Using 4-tert-butylphenol (4tBP) as a model aromatic compound, bacterial community in the rhizosphere of 4tBP-degrading duckweed was analyzed. Bacterial community of duckweed rhizosphere, where bacteria belonging to family Pseudomonadaceae and Sphingomonadaceae were dominated, was significantly different from that of environmental water. Transcriptomic analysis of 4tBP-degrading *Sphingobium fuliginis* OM1, originally isolated from duckweed rhizosphere, revealed that pivalate degradation pathway is related to the 4tBP degradation.

研究分野：生物環境工学

キーワード：バイオレメディエーション ウキクサ 根圏細菌 芳香族化合物 *Sphingobium fuliginis*

## 1. 研究開始当初の背景

水生植物を用いた水質浄化法は“植生浄化法”とも呼ばれ、極めて省エネルギー・省資源性が高く、かつ低コストな環境適合型水質浄化技術としてその普及が望まれている。これまで、植生浄化法による水質浄化は、主に植物が成長に伴って窒素やリンを吸収することを利用した富栄養化対策や重金属類の除去に利用されてきたが、最近になって、水生植物とその根圏に生息する微生物との共生作用により、難分解性の合成化学物質をも分解・浄化されることが明らかになったことから、この作用を積極的に利用することで、途上国で特に問題となっている有害化学物質汚染のリスク低減にも適用できる高度な水質浄化法へと発展させることが期待されるようになってきた。

我々の研究グループでは、この水生植物—根圏微生物共生系の作用に着目した新たな植生浄化法を“根圏浄化法”と命名して、その性能を評価する一連の研究を実施し、ウキクサやヨシなどの水生植物が根圏に生息する微生物の代謝活性を促進し、界面活性剤や石油系炭化水素、農薬等の多様な成分の分解・浄化を促進することを確認してきた。その中で、根圏浄化法は特に芳香族化合物の分解促進に有効であり、これは水生植物の根圏に芳香族化合物分解能を有する細菌が特異的に集積されるという興味深い現象によるものであることを見出した<sup>2)</sup>。さらに、水生植物根圏から分離される芳香族化合物の分解細菌は、既知の分解細菌とは異なる基質特異性を有するものが存在しており、従来は生分解が認められていなかった 4-tert-ブチルフェノール (4tBP) のような極めて難分解性の芳香族化合物をも分解する細菌も集積されることも明らかにした<sup>3)4)</sup>。

## 2. 研究の目的

以上の研究成果は、水生植物根圏には、難分解性の芳香族化合物の分解を担う細菌を根圏へと特異的に引き寄せ、特異的に増殖・定着させるメカニズムが存在していることを示唆しているものといえる。このメカニズムを詳細に解明することができれば、特に、難分解性芳香族化合物の浄化をターゲットとした根圏浄化法を合理的に設計・制御し、その性能を飛躍的に向上させることができるものと考えられる。本研究では、水生植物のモデルとしてウキクサ (*Spirodela polyrhiza*)、芳香族化合物のモデルとして 4tBP を用い、ウキクサ根圏における芳香族化合物分解促進機構の解明を目指して、ウキクサ根圏に集積される 4tBP 分解細菌群集の解析、およびウキクサ根圏から単離された細菌 *Sphingobium fuliginis* OMI による 4tBP 分解機構の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ウキクサ根圏に集積された 4tBP 分解細菌群集の解析

ウキクサは、A&H 培地を用いて人工気象器内で無菌的に継代栽培したものを使用した。細菌群集は、大阪大学構内の池より採取した環境水を孔径 3  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した後に、ろ液から遠心分離によって回収したものを滅菌 A&H 培地に懸濁し、実験に供した。細菌群集に 4tBP を終濃度 0.05 mM となるように添加しウキクサを植栽した系 (A)、細菌群集に 4tBP を終濃度 0.05 mM となるように添加し、ウキクサを植栽せずに静置培養した系 (B)、実験系 (B) と同様に調製し回転振盪培養した系 (C) の 3 種の実験系を作製した。12 日間の培養 (1 バッチ目) の後、各実験系からウキクサ 20 株および水試料 20 mL を採取し、新たな A&H 培地に植え継ぎ、さらに 15 日間栽培した (2 バッチ目)。全ての実験系において、4tBP 濃度の経時変化を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて測定するとともに、1 バッチ目および 2 バッチ目終了時の植物体と水試料を採取し、シカジーニアス DNA 抽出試薬 (関東化学) を用いて細菌群集の DNA を抽出した後、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析を行った。

### (2) トランスクリプトーム解析による *S. fuliginis* OMI の 4tBP 分解機構の推定

0.5 mM の 4tBP または 1 mM のグルコースを含む無機塩培地に  $\text{OD}_{600} = 1.0$  となるように *S. fuliginis* OMI を接種し、28°C で 30 分間、好氣的に培養した後、培養液を採取した。RNAeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA の安定化と total RNA の抽出を行った。次に RiboMinus (Thermo) を用いて ribosomal RNA を除去した後、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo) を用いてライブラリを作製した。次世代シーケンサー (Ion PGM, Thermo) を用いた RNA-Seq を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ウキクサ根圏に集積された 4tBP 分解細菌群集の解析

ウキクサと細菌群集による 4tBP の分解試験の結果を図 1 に示す。ウキクサを植栽した実験系 (A) では、1 バッチ目では 12 日間で初期濃度の約 40% 分、2 バッチ目では 15 日間で約 80% の 4tBP が分解された一方で、ウキクサを植栽していない実験系 (B) および (C) では、4tBP の有意な分解は確認できなかった。一方、無菌ウキクサにおいても 4tBP の分解が生じないことも確認されていることから (data not shown)、ウキクサと細菌群集の相互作用により 4tBP の分解が促進されたものと言える。ウキクサは一般に、酸素や根分泌物 (糖、アミノ酸、有機酸など) を供給することにより根圏の微生物を活性化することが知られているが、静置培養を行った実験系 (B) と回転振盪培養を行った実験系 (C) の

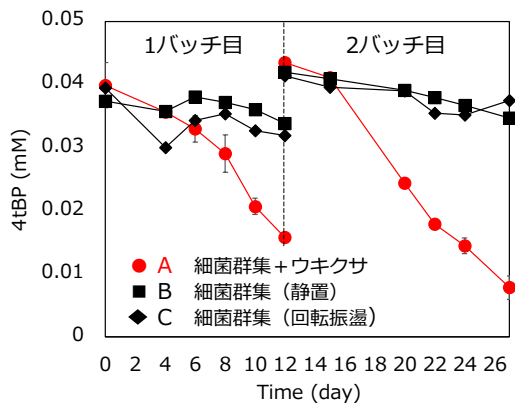


図1 ウキクサと細菌群集による 4tBP の分解.

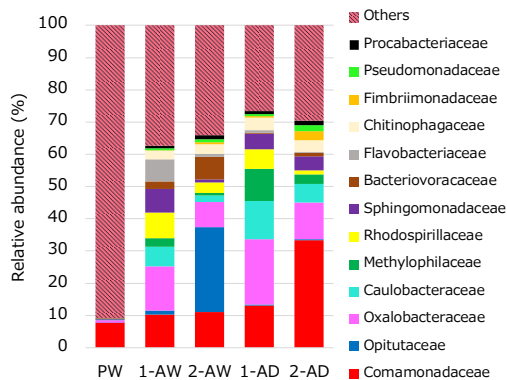


図2 環境水とウキクサ根圏(実験系(A))の細菌群集. ウキクサ根圏において1.5%以上の存在比をOTUのみ表示し, それ以外を"Others"としている. PW: 環境水中の細菌, AW: ウキクサ栽培後水試料中の細菌, AD: ウキクサ表面の細菌. サンプル名の最初の数字はバッチ数を示す.

両者で 4tBP の有意な分解が観察されなかったことから、少なくともウキクサによる 4tBP の分解促進は酸素の供給によるものが主因ではないと言え、根分泌物の供給が重要であると推測された。

続いて、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析により、根圏細菌群集の解析を行った。得られた群集組成を Bray-Curtis 類似度指数によるクラスター解析に供したところ、ウキクサを植栽した実験系 (A) から採取した水またはウキクサの表面の細菌叢は、ウキクサを植栽していない実験系 (B) および (C) から採取した水の細菌叢と大きく異なることが明らかとなった。

実験系 (A) において特に存在比が高かった (1.5%以上) OTU (Operational Taxonomic Unit) に着目すると (図2)、芳香族化合物分解への関わりが多く報告されている Pseudomonadaceae 科や Sphingomonadaceae 科の細菌、及びウキクサ根圏に多く存在することが報告されている Comamonadaceae 科、Caulobacteraceae 科、Methylophilaceae 科の細菌、さらには難培養細菌として知られる Verrucomicrobia 門の Opiritaceae 科細菌が根圏

には多く含まれていた。それらは元の環境水中では合計しても 10%に満たなかったにも関わらず、ウキクサ栽培後には合計で 60~70%程度にまで増加しており、ウキクサの栽培により有意に増加し、恐らく 4tBP の分解に重要な役割を果たしているものと考えられた。

(2) ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析による *S. fuliginis* OMI の 4tBP 分解機構の推定

ウキクサ根圏細菌によるフェノール類の分解のモデルとして、ウキクサ根圏から単離された細菌 *S. fuliginis* OMI による 4tBP 分解機構をゲノム解析およびトランスクリプトーム解析により推定した。これまでの研究で、OMI 株は 4tBP をメタ開裂経路により分解することが知られている。そこで、OMI 株のドラフトゲノム配列のアノテーション結果から、一般にフェノール類のメタ開裂経路に関わるとされる catechol-2,3-dioxygenase (C12O) をコードする遺伝子を探索したところ、C12O 遺伝子とその関連遺伝子群からなる7つの領域を見出した。うち、特に領域4に含まれる *tbp* 遺伝子群はメタ開裂によるフェノール類分解経路の各段階に関わる遺伝子をほぼ全て備えていたことから、フェノール類はこの *tbp* 遺伝子群で分解されていることが推測された。

続いて、RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム解析により、OMI 株の遺伝子の転写を網羅的に解析した。一部の遺伝子を除いて、*tbp* 遺伝子群のほとんどは、4tBP の添加によって転写量が 1.02-5.13 倍に上昇した。また、本解析で検出された全遺伝子のうち、転写量が 11.4-63.2 倍に上昇した一連の遺伝子群は、いずれも OMI 株による 4tBP の分解の過程で

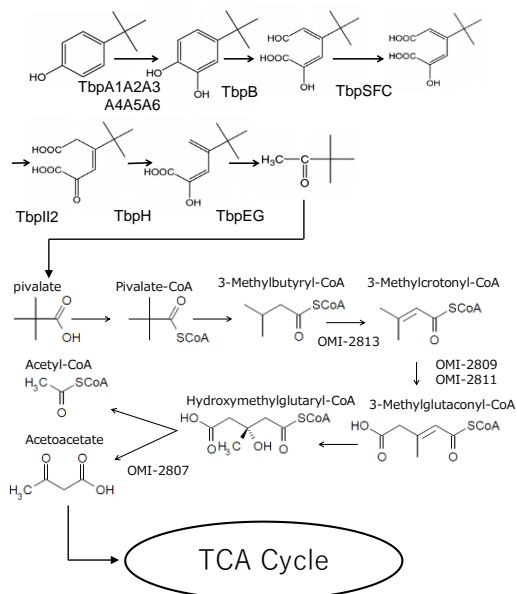


図3 ゲノム解析とトランスクリプトーム解析から推定された *S. fuliginis* OMI による 4tBP 分解代謝経路とそれに関わる遺伝子群.

検出される中間代謝物であるピバル酸の代謝経路に関わることが推測される酵素をコードしていた。

これらの解析より、ウキクサ根圏細菌のフェノール分解機構の解明に向けた基礎的知見として、OMI株の4tBP代謝経路は図3のように推定された。今後、ウキクサがこれらの代謝に関わる遺伝子群の発現をどのように活性化しているのかを明らかにすることで、水生植物の根圏における芳香族化合物の浄化機構の解明につながるものと期待される。

#### 【参考文献】

- 1) 遠山 忠、田中 靖浩、森 一博、植物根圏での植物と微生物の相互作用による化学物質の分解、環境バイオテクノロジー学会誌、13巻2号、2013、69-77
- 2) Toyama, T., Sei, K., Yu, N., Kumada, H., Inoue, D., Hoang, H., Soda, S., Chang, Y., Kikuchi, S., Fujita, M., Ike, M., Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: A mechanism of accelerated biodegradation of phenol, Water Research, 43, 2009, 3765-3776
- 3) Ogata, Y., Toyama, T., Yu, N., Wang, X., Sei, K., Ike, M., Occurrence of 4-tert-butylphenol (4-t-BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza* and isolation of a 4-t-BP-utilizing bacterium, Biodegradation, 24, 2013, 191-202
- 4) Ogata, Y., Goda, S., Toyama, T., Sei, K., Ike, M., The 4-tert-butylphenol-utilizing bacterium *spingobium fuliginis* OMI can degrade bisphenols via phenolic ring hydroxylation and meta-cleavage pathway, Environmental Science & Technology, 47, 2013, 1017-1023

#### 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2件)

- ① Kuroda, M., Ogata, Y., Yahara, T., Yokoyama, T., Ishizawa, H., Takada, K., Inoue, D., Sei, K., Ike, M. Draft genome sequence of *Sphingobium fuliginis* OMI, a bacterium that degrades alkylphenols and bisphenols, Genome Announcements, 査読有, 5:e01323-17, 2017  
10.1128/genomeA.01323-17
- ② 尾形 有香、合田 昌平、遠山 忠、清 和成、池 道彦、*Sphingobium fuliginis* OMI株によるビスフェノールSの分解経路および活性汚泥による分解生成物の除去特性、水環境学会誌、査読有、38巻5号、2015、139-147  
DOI: 10.2965/jswe.38.139

〔学会発表〕(計10件)

- ① 西野 優希、黒田 真史、井上 大介、池 道彦：ウキクサの根圏に形成される細菌群集による4-tert-butylphenolの分解促進、日本農芸化学会2018年度大会(2018)
- ② 阿部 紗裕理、石澤 秀紘、黒田 真史、井上 大介、池 道彦：ウキクサ根圏に集積された細菌のフェノール類分解特性の解析、日本水処理生物学会第54回大会(2017)
- ③ 黒田 真史、矢原 達也、Atefeh Alipour、武尾 正弘、池 道彦：*Sphingobium fuliginis* OMIによる4-tert-butylphenol分解機構の解析、日本水処理生物学会第53回大会(2016)
- ④ 惣田 訓、土倉 嵩一郎、黒田 真史、池 道彦：*Sphingobium fuliginis* OMIによるビスフェノール類の分解動力学、第50回日本水環境学会年会(2016)
- ⑤ Tokura K., Kuroda M., Soda S., and Ike M.: Degradation kinetics of bisphenols as mixed substrates for *Sphingobium fuliginis* OMI, International Anammox Symposium (IANAS2015) (2015)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

池 道彦 (IKE, Michihiko)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40222856

##### (2)研究分担者

惣田 訓 (SODA, Satoshi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：30322176

黒田 真史 (KURODA, Masashi)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20511786