

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510095  
 研究課題名（和文） 有用石油分解菌の培養制御技術の開発と海洋石油汚染浄化への応用  
 研究課題名（英文） Regulation of microbial communities and application to bioremediation in marine environments

研究代表者  
 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

研究成果の概要： *Cycloclasticus* は海洋性の多環芳香族炭化水素(PAHs)分解菌であり、PAHs で汚染された海水中で優占種となる有用な石油分解菌である。本研究では、海水中の複合微生物系の培養を制御し、*Cycloclasticus* の石油分解活性を効果的に誘導する技術開発の取り組みの一つとして、同菌の PAHs 分解活性をプロテオーム解析により検討した。その結果、同菌が優先的に利用する PAHs ダイオキシゲナーゼを見出し、そのオペロンを特定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：海洋石油汚染、*Cycloclasticus*、プロテオーム、多環芳香族炭化水素、バイオリメディエーション、ゲノム、PAHs ダイオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

石油汚染は、一千種以上の炭化水素化合物の複合汚染であり、汚染域には、アルカンのような短期間で分解消失する成分から多環芳香族炭化水素(PAHs)のように長期間残留する成分など多様な化合物が混在する。一方、石油汚染下にも微生物は棲息するが、汚染域に存在する微生物群はその環境に馴化されたコンソーシアではあるが、そこで発現して

いる石油分解活性が必ずしも汚染浄化に効果的な活性とは言い難い。実際に、汚染域に存在する微生物群全体の活性を高めるようなバイオリメディエーションの手法では分解性の高い成分の分解が速まるだけで、分解性の低い画分は分解されずに残留することが明らかになっている。この残留画分には PAHs およびその誘導体を中心とする難分解性成分が含まれていることから、効果的なバ

イオリメディエーション法を開発するためには、残留画分の分解・浄化するための手法の開発が必要となってくる。

その手法の開発には、まず、最も重要なステップである難分解性画分の分解を実際に汚染海洋環境で担う微生物を海洋微生物群集の中から特定し、その菌学的情報を収集・蓄積するといった特定の微生物に注目した解析が必要であり、さらに、これらの微生物が活躍しやすいように微細環境を整え、汚染下の微生物群集構造を適切に変化させるなどの複合微生物群集に注目した技術の開発が必要である。この段階では、複合微生物群集における同種間および異種間の相互作用を制御する技術が必須であり、そのため、多種多様な相互作用の中から浄化に重要なものを選抜することが大切である。

申請者はこれまで一貫して、石油汚染海洋環境における微生物群集の制御技術の開発およびそれを利用した新規バイオリメディエーション法の開発に取り組み、*Cycloclasticus* が実際の汚染下での PAHs の分解に重要であることを見出し、同菌の微生物生理学的性質、分子生態学的性質、およびゲノム情報を明らかにした。

## 2. 研究の目的

上述した経緯を踏まえ、本研究では、海水中の複合微生物系の培養を制御し、*Cycloclasticus* の PAHs 分解活性を効果的に誘導する技術を開発するため、同菌の PAHs 分解遺伝子群の発現をショットガンプロテオーム解析により明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養とタンパク質の抽出

各種 PAHs を添加した条件で *Cycloclasticus* sp. S-4 株を定常期まで培養し、菌体を回収した。回収した菌体重量に対して 30 倍量の SDS-based Sample Buffer を添加し、攪拌した。100°C で煮沸した後攪拌し、再度 100°C で 18 分煮沸し、放冷後、4°C、15,000 rpm で 15 分遠心した。上清を 15 ml チューブに移し、Compatible protein assay kit (Thermo SCIENTIFIC) で精製した後、沈殿にミリ Q 水を 100  $\mu$ l 添加しアセトン沈殿を行った。Denaturing Buffer (0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH8.0) を 100  $\mu$ l 添加し、沈殿物がはがれるまで攪拌した。30 秒超音波、30 秒停止(氷冷)のサイクルを計 8 から 10 回繰り返した後、4°C、10,000 rpm で 15 分遠心し、上清を 1.5 ml チューブに回収した。タンパク質の定量は BCA™ Protein Assay kit (Thermo SCIENTIFIC) を使用した。2 mg/ml BSA スタンダード原液 50  $\mu$ l を 1.5 ml チュー

ブに採取し、Denaturing Buffer を 150  $\mu$ l を加え、500  $\mu$ g/ml BSA スタンダードを調整した。この 500  $\mu$ g/ml BSA スタンダード溶液を 2 倍希釈することで、250  $\mu$ g/ml、125  $\mu$ g/ml、62.5  $\mu$ g/ml、31.25  $\mu$ g/ml、15.625  $\mu$ g/ml を調整し、スタンダード溶液とした。次にサンプルを 10、20、50 倍希釈したものを調整し、上述したスタンダード溶液と希釈サンプルを 25  $\mu$ l ずつ 3 連で 96well のプレートにアプライした。続いて、分注ピペッターで素早く反応液を 200  $\mu$ l ずつ各 well に加え、アルミホイルで遮光し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーで 570 nm における吸光度を測定し、吸光度値からタンパク質濃度を算出した。

### (2) SDS-PAGE

充填するタンパク質量が 10  $\mu$ g/lane になるようサンプル量と Sample Buffer をそれぞれ 1.5 ml チューブに添加しボルテックスした。フラッシュした後、95°C で 5 分放置した。その後、泳動層に分離ゲル濃度 15% の READY GELS J (BIO-RAD) をセットし Running Buffer (0.03% Tris Base, 14.4% Glycine, 0.01% SDS) を泳動層に添加し、1 レーンあたりタンパク質量が 5  $\mu$ g もしくは 10  $\mu$ g になるようにサンプル量をそれぞれ充填した。電気泳動は 60 V で行い、バンドがゲルの下から約 5 mm のところで泳動を終了した。銀染色は以下の要領で行った。ゲルを固定液(50% Methanol, 5% Acetic acid) に浸し 40 分振盪させ、次に洗浄液(50% Methanol) に浸し 10 分振盪させ、ミリ Q 水に浸し 10 分振盪させた。そして増感液(0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) に浸し 1 分振盪させ、ミリ Q 水に浸し 1 分振盪させた。計 3 回ミリ Q 水で 1 分振盪させた後、0.1% 硝酸銀液を入れて氷上で遮光して 20 分振盪させ、再びミリ Q 水で 1 分振盪を計 3 回行った。次に現像液(0.1% HCHO, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) に浸し、分子量マーカーが 6 本見えた後停止液(5% Acetic acid) に浸し 10 分振盪させ、ミリ Q 水で 5 分振盪を 3 回行い、スキャナーで画像を取り込んだ。

### (3) タンパク質のゲル内消化

染色済みのゲルを方眼紙と重ねた OHP フィルムの上に置いた。ゲルをメスで 1 レーンにつき 6 mm 間隔の 10 分画に切り出し、更に、切り出したゲルを 1 mm 角に切断後、1.5 ml エッペンチューブにゲル片を入れた。

各サンプルに脱色液(15 mM, 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) を 100  $\mu$ l ずつ入れ、24°C、1,300 rpm で 10 分振盪した。その後、ゲルを吸い込まないように脱色液を取り除いた。これらにミリ Q 水を 500  $\mu$ l 加え、24°C、1,300 rpm で 15 分振盪し、ミリ Q 水を取り除いた。これ操作を計 3 回繰り返す、脱色液を完全に取り除い

た。アセトニトリルをエッペンに 100  $\mu$ l 加え、24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 5 分浸透した後、アセトニトリルを除去した。遠心エバポレーターで 15 分遠心し、液体を蒸発させゲルを乾固させた。還元液(10 mM Dithiothreitol, 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )を 100  $\mu$ l 加え 56 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 60 分振盪し、その後、室温に戻してから還元液を除去した。続いて、洗浄用 Buffer (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )を 100  $\mu$ l 加え、24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 10 分浸透した後、アルキル化液 (55 mM  $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ )を 100  $\mu$ l 加えて 24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 45 分間遮光しながら振盪し、全ての溶液を除去した。そして、洗浄用 Buffer を 100  $\mu$ l 加え、24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 10 分浸透し脱水液 (50%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )を 200  $\mu$ l 加えて 24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 10 分振盪を行った後、全ての溶液をとり除いた。そして、もう一度これらのサンプルに脱水液を 200  $\mu$ l 加え、24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 10 分振盪し脱水液を除去した。続いてサンプルを乾固させ、修飾トリプシン(Promega)溶液(10  $\mu$ g/ml, 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )を 30  $\mu$ l 加え 30 分間氷上で静置し、ゲル片にトリプシン溶液をしみこませ、トリプシン溶液を除去した。これらのサンプルを 37 $^{\circ}$ C で一晩(12 から 16 時間)反応させた。反応終了後、抽出液(50%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 5%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ )を 50  $\mu$ l 加え 24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 30 分振盪した。フラッシュした後、ゲル片を含まないように注意深く溶液を取り出し別のチューブに回収した。再度、抽出液を 25  $\mu$ l 加え 24 $^{\circ}$ C、1,300 rpm で 30 分振盪した後、フラッシュし液体を同じチューブに回収した。回収したタンパク質抽出溶液は遠心エバポレーターで溶液が完全に蒸発するまで乾燥させた。これらのサンプルに 0.1% ギ酸を 13  $\mu$ l 加え、ボルテックスで混合し、遠心分離後、上清 12  $\mu$ l 回収し LC/MS/MS に供した。

#### (4) LC-MS/MS 解析とデータサーチ

カラムは spray needle (AMR) を伴った Magic C18 (200  $\text{\AA}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\times$  50 nm; Michrom Bioresources) を用いた。Microbore HPLC system は Paragigm MS4 (Michrom Bioresources) を用いた。溶媒は buffer A (2% vol/vol acetonitrile, 0.1% formic acid) および buffer B (90% vol/vol acetonitrile, 0.1% formic acid) を用いた。ペプチドの分離・溶出は 20 分間で 5-65% buffer B の linear gradient で行った。また、ペプチド抽出物は最初に C18 cartridge (Michrom Bioresources) に吸着・脱塩後、分析カラムにスイッチングバブルを用いて導いた。カラム溶出後は直接 electrospray ionization source (AMR) によりイオン化し、LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher) により positive モードにて質量分析した。Peak

の検出は Xcalibur software (Thermo Fisher) を用いて m/z 500-2000 の範囲にて測定した。

次に MS/MS data は SEQUEST 1.2 (Thermo Fisher) を用いて解析した。ペプチドの同定は、2 値のペプチドは correlation factor (Xcorr) の値が 2.0 以上、3 値のペプチドは 2.5 以上の配列情報でありまた、final score (Sf) の値が 0.85 以上の配列情報を用いた。スペクトルデータは S4 の database に対して検索した。

## 4. 研究成果

### (1) 各種 PAHs 添加培養と SDS-PAGE

一般的な PAHs の好氣的な分解は、初発のダイオキシゲナーゼの酸化反応から始まり、カテコール系物質を経由して分解・資化されるといわれている。これまでの *Cycloclasticus* sp. S-4 株のゲノム解析の結果から、同菌は実に 14 セットもの PAHs ダイオキシゲナーゼを有することが見いだされた。また、後続の PAHs 代謝系関連酵素も複数のセットが見い出されていることから、これらのことが同菌の多様な PAHs 分解活性を支えていると考えられる。

そこで今回、同菌が有する PAHs ダイオキシゲナーゼの各種条件による使い分けなどを検討するため、プロテオーム解析を行った。

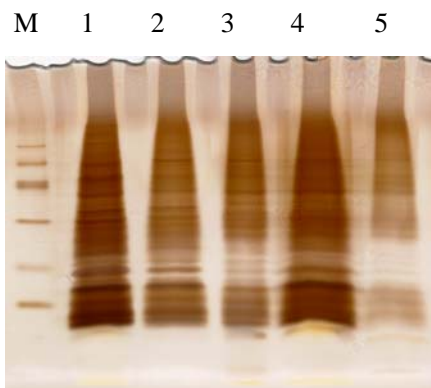


図 1. SDS-PAGE

図 1.にはビフェニル(bph, レーン 1)、ナフタレン(nph, レーン 2)、フェナントレン(phn, レーン 3)、アントラセン(ant, レーン 4)、ピレン(pyr, レーン 5)を添加した培養条件での SDS-PAGE の結果を示した。その結果、各種 PAHs の種類の違いによるバンドパターンの大きな変化は見られなかった。そこで、レーンごとにゲルを全て切り出し、ペプチドを抽出し、LC-MS/MS 解析を行った。

## (2) LC-MS/MS 解析

各種条件での LC-MS/MS 解析の結果、それぞれの条件で約 300 個のタンパク質が検出された。その中から ring hydroxylating  $\alpha$  subunit と  $\beta$  subunit について抽出し、条件ごとに検出された数をまとめたものを表 1 に示した。その結果、添加した PAHs の種類により 3~10 個の ring hydroxylating  $\alpha$  subunit が、4~7 個の  $\beta$  subunit が検出された。また、供試した全ての条件で検出されなかったものは  $\alpha$  subunit で 2 個、 $\beta$  subunit で 1 個であった。

表 1. LC-MS/MS 解析により検出された ring hydroxylating  $\alpha$  subunit と  $\beta$  subunit

PAHs	$\alpha$ subunit	$\beta$ subunit
bph	5	7
nph	7	5
phn	10	6
ant	3	4
pyr	9	5

続いて、全ての条件で共通して検出された ring hydroxylating  $\alpha$  subunit は、全部で 3 個、 $\beta$  subunit は 1 個であった。また、この  $\beta$  subunit は全ての条件で検出された  $\alpha$  subunit の下流に存在した。ここで、そのオペロン構造と相同性を以下に示した。



図2. 全ての条件で検出されたオペロン

表 2. 各 ORF の相同性

ORF no.	相同性
2266	1,2-dioxygenase
2267	Ring hydroxylating beta subunit
2268	Ring hydroxylating alpha subunit
2270	Ring hydroxylating alpha subunit
2271	Phosphate dehydrogenase

本オペロンは、二つの  $\alpha$  subunit の下流に一つの  $\beta$  subunit があり、その下流にカテコール系化合物の酸化酵素が位置していた。ORF2268、ORF2267 は、全ての条件で検出されたことから、同菌の PAHs 分解にとって重要な働きをしていると示唆された。

以上、本研究では、多様な PAHs 分解活性を有する *Cycloclasticus* について、プロテオーム解析を行い、同菌が優先的に利用していると考えられる PAHs ダイオキシゲナーゼの  $\alpha$ 、 $\beta$  subunit を特定した。また、化合物の種類により同菌が多数有する同酵素を使い分けていることが示唆された。本研究の成果は、石油汚染環境下での同菌を利用したバイオリメディエーション等に有用であると考えられた。

今後、各 PAHs ダイオキシゲナーゼの発現条件などを詳細に検討していく事により、より効果的な同菌の利用法を確立でき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 1 件)

### ①岩淵 範之

環境浄化とバイオフィルム-EPS による微生物群集の制御-

防菌防黴誌, 11, 2008, 805-812, 依頼原稿

[学会発表] (計 4 件)

### ①竹石 英伯、岩淵 範之他

*Cycloclasticus* 属細菌の多環芳香族炭化水素 (PAHs) の分解に対する鉄の影響

日本農芸化学会, 平成 21 年 3 月 28 日, 福岡国際会議場

### ②岩淵 範之

油-微生物の相互作用におけるバイオフィルムの役割を考える

日本農芸化学会シンポジウム 2SY02, バイオフィルムの新展開-有効利用と新しい可能性-, 平成 21 年 3 月 28 日, 福岡国際会議場

### ③岩淵 範之

複合微生物系の培養制御技術の開発と海洋石油汚染浄化への応用

理研 BRC 国際シンポジウム, 平成 21 年 2 月 10 日, ハイアットリージェンシー東京

### ④岩淵 範之

有用石油分解菌 *Cycloclasticus* sp. S-4 株のゲノム解析

マリンバイオテクノロジー学会 シンポジウム S-1 マリンゲノム研究の新展開, 平成 19 年 5 月 26 日, 山形大学

[図書] (計 1 件)

①岩淵 範之

微生物の生産する細胞外多糖による石油汚染海洋環境の浄化

バイオフィルムの基礎と制御—特製・解析事

例から形成防止・有効利用まで—所収

株) エヌ・ティー・エス, 2008, 399

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし