

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15738

研究課題名（和文）誰が石油分解を“先導”するのか？：BONCAT法を用いた石油分解の鍵微生物の探索

研究課題名（英文）Who "triggers" oil degradation?: Investigation of the key petroleum hydrocarbon-degrading microbial species by using BONCAT technique

研究代表者

守 次朗 (Mori, Jiro)

横浜市立大学・理学部・助教

研究者番号：10835143

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）：多様な炭化水素種から成る石油の完全な分解には複数の微生物種の共存が必須である。本研究では、優れた石油分解能を持つ独自の土壌細菌コンソーシアム（群集）を研究モデルとして用い、コンソーシアムに含まれる細菌種の中から、石油に含まれる各成分の分解を“先導”するパイオニア細菌種の特定を目指した。

コンソーシアムの各主要細菌種のゲノム解析および培養試験により、芳香族化合物を分解するSphingobium属とアルカンを分解するPseudomonas属の2属が、石油分解を“先導”するパイオニア細菌種として増殖していたことを解明できた。

本研究で得られた研究成果をまとめた論文を計7報、国際学術誌にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

石油の環境中への流出は国際的な問題である。そこで、それらを除去する能力を持つ環境微生物の能力が注目されているが、石油の完全な分解には複数種の微生物の共存が必須である。石油分解能を持つ微生物に関する文献は数多くあるが、その多くは単一種の微生物のみを扱ったものであり、本研究のように、複数種の微生物共同体を用いた石油分解機構の調査は過去の前例が殆ど無い。本研究では、優れた石油分解能を示す土壌細菌群集において、少数のパイオニア細菌が石油分解を“先導”し、共存する他の多数の細菌種がこれらに依存していることを明らかにした。今回得られた知見は将来、微生物を用いた汚染環境浄化の技術開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The coexistence and cooperative activities of multiple microbial groups are required to completely biodegrade the complex mixture of petroleum hydrocarbons derived from the oil pollutant. This project aimed to identify the pioneering bacterial taxa which "triggers" the oil pollutant biodegradation, by using a laboratory-maintained diesel fuel-degrading soil bacterial consortium as a unique microecosystem model.

Through detailed (meta)genomic analyses and growth assays of the main bacterial members in the consortium, two bacterial genera, Sphingobium and Pseudomonas, were identified to be the pioneering players that were responsible for the biodegradation of aromatic hydrocarbons and alkanes, respectively.

Seven research articles that summarized the research achievements of this project have been published in international journals.

研究分野：微生物生態学

キーワード：石油分解微生物 土壌微生物群集 メタゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

石油を構成する炭化水素種の多くは強い毒性・変異原性を有することが知られ、石油流出による環境汚染は現代における最も深刻な問題の一つである。そこで、こうした汚染環境を修復する低コストかつ持続可能な手法として、石油系炭化水素を栄養源として利用し生分解できる環境微生物の利用が期待されている。石油系炭化水素のうち、芳香族炭化水素とアルカン系炭化水素はそれぞれ別の微生物種によって生分解される「棲み分け」があることが知られており、石油の完全な分解には複数種の微生物の共存が必須であると考えられる。そのため、単一の微生物株を用いた従来の方法では、環境中での微生物群集による石油生分解機構を詳細に解明することは難しい。今日、石油汚染環境のバイオリメディエーションを目的とした石油分解微生物の利用技術として主流となっているのは、非特異的に土着の石油分解微生物の生育を促進するために窒素等の栄養源を散布するバイオスティミュレーションと呼ばれるものであるが、これまでに期待された成果はあげられていない。石油を生分解する微生物群集を制御し利用するためには、石油成分の生分解にいち早くとりかかり、分解を“先導”する「パイオニア微生物種」を特定し、またこれに依存し共存する他の微生物種も含めた、群集の挙動を正確に把握する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、石油を生分解する微生物群集生態系において、石油生分解を“先導”するパイオニア微生物種を特定することを目的とし、以下の課題の解決を目指した。

- (1) 石油成分にいち早く反応し、疎水性の油滴に付着・増殖する微生物種の特定
- (2) 石油分解過程において、特に活発に活動する微生物種の時間的・空間的なモニタリング

3. 研究の方法

上記の課題の解決のため、優れた石油分解能を有する独自の石油分解土壌細菌コンソーシアムを研究対象として用いた。この土壌細菌コンソーシアムは、本研究グループにおいて1990年代から継代培養・維持されており、高度に選抜された少なくとも12の細菌属が共存しながら石油を生分解する、独自の優れたマイクロ生態系モデルである。

まず課題(I)の解決に向けて、石油を与えて培養したコンソーシアムから、油滴に付着した細菌の凝集体と浮遊性の細菌群集を遠心分離によって分画し、それぞれの画分の細菌叢を16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンスによって解析・比較した。さらに、培養物のショットガンメタゲノム解析とゲノムピニングにより、各主要細菌種のゲノム情報を復元し、それぞれの細菌種がもつ機能性遺伝子を調べることで、各石油成分の生分解に関わる細菌種の特定を目指した。

また課題(II)については、群集中で特に活発に増殖する細菌細胞を特異的に蛍光標識できるBONCAT (Bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging / 生体直交型人工アミノ酸標識)法を応用した解析により、パイオニア細菌種の挙動の顕微鏡下でのモニタリングを試みた。

4. 研究成果

(1) 石油成分にいち早く反応し、疎水性の油滴に付着・増殖する微生物種の特定

本研究グループが保有する石油分解土壌細菌コンソーシアムを継代し、炭素源・栄養源としてディーゼル油を与えて培養したところ、培養4日目までに巨視的な細菌の凝集体が培養物中に出現した(Fig. 1A)。この培養物について、遠心分離によって沈殿した細菌凝集体の画分と上清の浮遊性画分とに分画した後、それぞれの画分から細菌DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス解析により細菌叢を比較した。その結果、両画分において少なくとも12の細菌属が検出され、*Pseudomonas* 属が最も優占していた(相対的な存在度 63-67%)他、次いで*Sphingobium* 属、*Ochrobactrum* 属、*Achromobacter* 属、*Cupriavidus* 属などが優占的であった(Fig. 1B)。これらの主要細菌属のうち、*Ochrobactrum* 属や*Achromobacter* 属はいずれも浮遊性画分で比較的優占度が高かったのに対し、*Sphingobium* 属は凝集性画分でも優占的(凝集性画分で16.1%、浮遊性画分で6.5%)であったことから、ディーゼル油の油滴により活発に凝集しバイオフィームを形成していたことが示唆された。

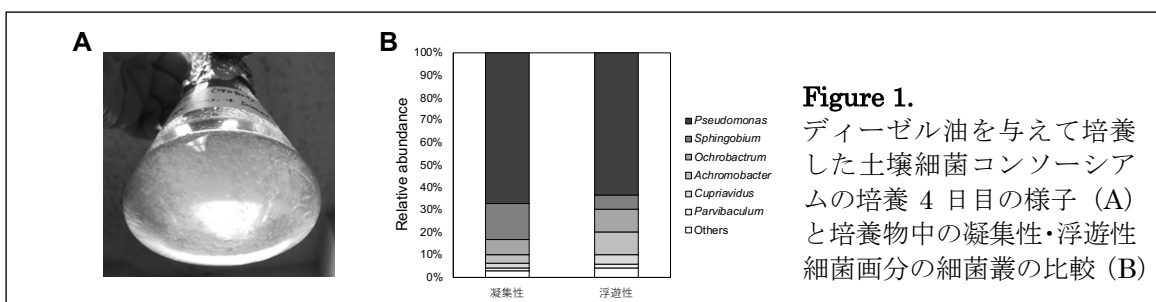


Figure 1.

ディーゼル油を与えて培養した土壌細菌コンソーシアムの培養4日目の様子 (A) と培養物中の凝集性・浮遊性細菌画分の細菌叢の比較 (B)

続いて、上記の解析で検出された主要細菌属のうち、ディーゼル油の各成分の生分解を主とし

て担う細菌属を特定するため、代表的な主成分であるアルカン（ヘキサデカン）、芳香族（フェナントレン、ナフタレン、トルエン）をそれぞれ単一の炭素源として与えて培養したコンソーシアムについて、培養物中の細菌叢をそれぞれ解析して比較した。その結果、ディーゼル油を与えた培養物と比較して、ヘキサデカンの培養物では *Pseudomonas* 属の優占度がより大きくなり、一方、各種芳香族を与えた培養物では *Sphingobium* 属の存在度が顕著に増大し、*Pseudomonas* 属に代わって最も優占的となった(Fig. 2)。すなわち、コンソーシアムの主要細菌属であった *Pseudomonas* 属と *Sphingobium* 属が、ディーゼル油に含まれるアルカン、芳香族炭化水素の生分解をそれぞれ主として担っていたと考えられた。

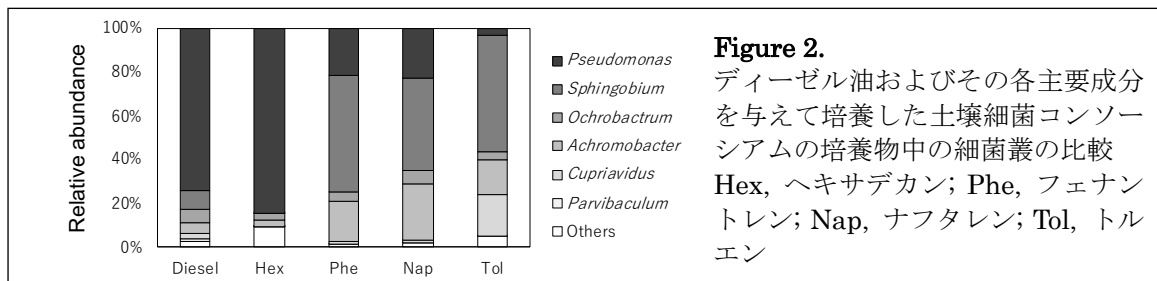


Figure 2. ディーゼル油およびその各主要成分を与えて培養した土壌細菌コンソーシアムの培養物中の細菌叢の比較 Hex, ヘキサデカン; Phe, フェナントレン; Nap, ナフタレン; Tol, トルエン

さらに、ディーゼル油を与えて培養したコンソーシアムの培養物から抽出した細菌 DNA を用いて、これをショットガンメタゲノム解析に供し、各主要細菌属のゲノム情報をゲノムビンニングにより復元した。その結果、*Pseudomonas* 属のゲノムからはアルカン生分解の鍵遺伝子である Alkane-1-monooxygenase (*alkB*) が検出され、また、*Sphingobium* 属のゲノムからは芳香族生分解の鍵となる Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase をコードする遺伝子が複数見つかった(Mori & Kanaly, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020)。これらの結果からも、コンソーシアム中の *Pseudomonas* 属と *Sphingobium* 属がそれぞれディーゼル油に含まれるアルカンと芳香族炭化水素の生分解をそれぞれ“先導”するパイオニア細菌であったことが強く示唆された(Fig. 3)。このうち *Sphingobium* 属については、コンソーシアムから単離した *Sphingobium barthaii* KK22 株について、その完全ゲノム配列を明らかにし(Mori & Kanaly, *Microbiol. Resour. Announc.*, 2021)、さらに培養試験により多環芳香族炭化水素の生分解能をもつことを明らかにした(Maeda *et al.*, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2020; Izawa *et al.*, *J. Hazard. Mater. Adv.*, 2021)。また *Pseudomonas* 属については、同じくコンソーシアムから単離した *Pseudomonas aeruginosa* KK6 株の培養試験により、芳香族にアルキル鎖が結合したアルキル芳香族化合物のアルキル鎖のみを部分的に分解することを明らかにし(Tomiyama *et al.*, *J. Pet. Sci. Eng.*, 2021)、単純なアルカンのみならず、ディーゼル油中のより複雑な炭化水素の生分解に関わっていたことが示唆された。さらに、同じく主要細菌属である *Cupriavidus* 属の単離株 KK10 株についても、完全ゲノムの解読(Mori *et al.*, *Microbiol. Resour. Announc.*, 2021)と培養試験により、単環の芳香族の生分解能をもつことを明らかにした(Mori & Kanaly, *Microbiol. Spectr.*, 2022)。

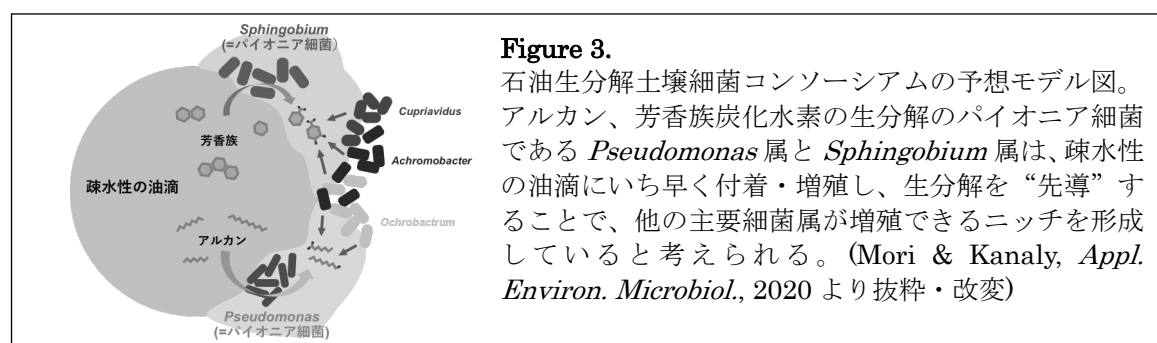


Figure 3. 石油生分解土壌細菌コンソーシアムの予想モデル図。アルカン、芳香族炭化水素の生分解のパイオニア細菌である *Pseudomonas* 属と *Sphingobium* 属は、疎水性の油滴にいち早く付着・増殖し、生分解を“先導”することで、他の主要細菌属が増殖できるニッチを形成していると考えられる。(Mori & Kanaly, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020 より抜粋・改変)

(2) 石油分解過程において、特に活発に活動する微生物種の時間的・空間的なモニタリング

上述の諸実験で得られた結論をさらに実証するため、BONCAT 法を用いたディーゼル油生分解コンソーシアムのモニタリングを試みた。その結果、培養物中で *Pseudomonas* 属が優占的に増殖する様子を観察できたが(未発表)、その継時的な変動や、他の細菌属との相互作用の解明には至らなかった。今後、観察試料として各主要細菌属の単離株を用いたより単純な共培養系を構築するなどし、異種細菌間での協調・競合関係などをさらに解明することを目指していきたい。

以上より、石油生分解土壌細菌コンソーシアムにおいて、石油生分解を“先導”するパイオニア細菌を特定することができた。同様の微生物生態系は石油汚染環境において普遍的に確立される可能性があり、今回得られた知見は、汚染環境の修復技術に応用できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mori Jiro F., Kanaly Robert A.	4. 巻 87
2. 論文標題 Multispecies Diesel Fuel Biodegradation and Niche Formation Are Ignited by Pioneer Hydrocarbon-Utilizing Proteobacteria in a Soil Bacterial Consortium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02268-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02268-20	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 Mori Jiro F., Kanaly Robert A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Sphingobium barthaii</i> KK22, a High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Soil Bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01250-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01250-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Allyn H., Nishi Shinro, Hatada Yuji, Ohta Yukari, Misaka Kanna, Kunihiro Marie, Mori Jiro F., Kanaly Robert A.	4. 巻 151
2. 論文標題 Chemical and genomic analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in <i>Sphingobium barthaii</i> KK22 reveals divergent pathways in soil sphingomonads	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Biodeterioration & Biodegradation	6. 最初と最後の頁 104993 ~ 104993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibiod.2020.104993	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 Tomiyama Yuna, Takeshita Toshihide, Mori Jiro F., Kanaly Robert A.	4. 巻 205
2. 論文標題 Functionalization of the model asphaltene 1-dodecyl-naphthalene by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KK6 through subterminal metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Petroleum Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 108870 ~ 108870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.petrol.2021.108870	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 Mori Jiro F., Nagai Miho, Kanaly Robert A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Cupriavidus necator KK10, an Azaarene-Degrading and Polyhydroxyalkanoate-Producing Soil Bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00423-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00423-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izawa Minami, Sakai Miharuru, Mori Jiro F., Kanaly Robert A.	4. 巻 4
2. 論文標題 Cometabolic benzo[a]pyrene biotransformation by Sphingobium barthaii KK22 proceeds through the kata-annelated ring and 1-pyrenecarboxylic acid to downstream products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hazardous Materials Advances	6. 最初と最後の頁 100018 ~ 100018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hazadv.2021.100018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Jiro F., Kanaly Robert A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Natural Chromosome-Chromid Fusion across rRNA Operons in a Burkholderiaceae Bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e02225-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02225-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Jiro F. Mori, Yuna Tomiyama, Robert A. Kanaly
2. 発表標題 The oil-eating gangs: Metagenomics revealed the multi-species oil hydrocarbon-degrading soil bacterial consortium evolved in the lab-scale enrichment
3. 学会等名 第33回 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuna Tomiyama, Jiro F. Mori, Robert A. Kanaly
2. 発表標題 Investigation of a hydrocarbon pollutant-degrading bacterial consortium and Bradyrhizobium sp. strain KK5
3. 学会等名 第33回 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嘉山豪, Robert A. Kanaly, 守次朗
2. 発表標題 石油生分解を“先導”するバイオニア微生物の探索 -沿岸海水微生物群集をモデルに-
3. 学会等名 第34回 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	カナリー ロバート (Kanaly Robert) (00448656)	横浜市立大学・理学部・教授 (22701)	

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