

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510021

研究課題名(和文) 石油流出時における日本沿岸環境プラスミドの海洋生態系に及ぼす影響  
評価手法の開発研究課題名(英文) The development of the influence evaluation methods exerted on the  
ecosystem of Japanese coastal environment plasmids in the petroleum contamination

研究代表者

久留主 泰朗 (KURUSU YASUROU)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60272118

研究成果の概要(和文)：本研究において、特定石油分解菌由来プラスミドの探索を行った。2地点から分離した特定石油分解菌の中から多くのプラスミドを発見し、いずれも巨大プラスミドであった。これらが環境微生物間を伝達することにより特定石油分解遺伝子群の水平伝搬が起きていることが示唆された。また、プラスミドの安定分配に関わる新規な遺伝子群を2つのプラスミドから発見した。

研究成果の概要(英文)：The plasmids from petroleum-degradation bacteria were searched in this research. Many plasmids were discovered from above bacteria that isolated from two points, and all were giant plasmids. It was suggested that horizontal transfer of a group of petroleum-degradation genes occurred by conjugation between environmental microorganisms. Moreover, the novel genes concerned with the plasmid stability were identified from two plasmids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：環境プラスミド、安定分配、芳香族炭化水素分解菌、脂肪族炭化水素分解菌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、タンカー等の大型船舶の座礁事故に伴う石油流出事故の危惧は、今や地球上全海域に及んでいる。日本周辺海域での大規模事故だけを見ても、日本海沿岸でのナホトカ号事故(1997年1月)、東京湾でのダイアモンドグレース号事故(1997年7月)、伊豆大島付近でのファルヨーロッパ号事故(2002年10月)、さらに茨城県日立港でのチルソン号事故(2002年12月)や同じく茨城県鹿島沖で起きたジャイアント

ステップ号、オーシャンビクトリー号座礁事故(いずれも2006年10月)等が挙げられる。さらに研究期間中の2010年4月に発生したメキシコ湾原油流出事故はこれまで例を見ない甚大な被害をもたらし、流出した原油等は海洋の生態系や水産資源へ悪影響を及ぼすとともに、深刻な社会・経済問題をも引き起こし世界的な環境問題となった。

海洋流出油対策としては、流出油を包囲し回収する物理的回収方法とその固化・沈降を防ぐ乳化分散剤の散布による化学的処理方

法が一般的に用いられている。また最近では、汚染環境の現場に生息している微生物の石油分解活性を増強する目的で、栄養塩等の栄養剤を散布する手法や、さらに特定石油分解菌からなる微生物製剤を散布してより積極的に分解促進を図る手法など、バイオレメディエーション技術が注目されている。しかし、このようなバイオレメディエーション技術の実用化にあたっては、汚染現場に添加する製剤が有効で且つ現場生態系に悪影響を及ぼさないことを科学的に立証することが強く求められている。さらに、海洋環境中の石油分解微生物の多様性情報、特に上記微生物が保持する石油分解プラスミドについての情報が脆弱であり、その生態系変動解析手法もまだ確立されていないため、対象とする海域で用いようとする浄化技術の有効性や安全性の評価を著しく困難にしている。

本研究者は、以前より海洋環境の微生物由来プラスミドの研究を実施しており、これまでに千葉県房総沖深海約 6,000m の海底堆積物から分離した低温性 *Pseudoalteromonas* sp. PS1M3 株由来の 3,138bp のプラスミドや南部マリアナ海域の深海 2,900m の海底熱水噴出孔から分離した好熱性 *Geobacillus* sp 株由来の 34,154bp のプラスミドがある。一方、強力な環境汚染物質分解微生物として注目されているスフィンゴモナス属細菌群の中から、*Sphingobium amiense* JCM11777 株由来の 9,978bp のプラスミドおよび *Sphingobium yanoikuyae* JCM7371 株由来の 5,182bp と 4,908bp の 2 つのプラスミドを同定し、これらのプラスミドが他の海洋性スフィンゴモナス属細菌へ形質転換することを見出している。以上の申請者らのプラスミドに関する研究、また TOL plasmid をはじめとする多くの環境汚染物質分解プラスミドの研究から、分解遺伝子群はプラスミドやトランスポゾンを通じて微生物間を移動し、遺伝子群の水平伝搬と分子進化が行われていると推察されている。しかし、上記バイオレメディエーション技術の実用化に当たって、分解プラスミドや生態系への影響等については未解明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本周辺海域での石油流出事故に備えた特定石油分解微生物由来プラスミドの多様性情報の収集・解析を行い「日本沿岸環境微生物由来プラスミドの Data Base」を構築し、さらに同プラスミド検出用マーカー遺伝子の開発を行い海洋環境における分子遺伝学的評価技術の確立を図る。これらの研究により、流出油や浄化技術の現場環境に与える影響を評価する手法の高度化を図り、実用可能な評価技術や浄化技術へと発展させることを目標とする。以下

に具体的な目標を示す。

1) これまで数多くの浄化手法や浄化促進剤の開発が行われてきたが、その大半は海洋環境中の微生物群集やその活動をブラックボックスとして扱っていたため科学的に実証されず、実際の有効性は不明なままであった。本研究では、日本沿岸域に出現する石油分解菌プラスミドの多様性情報収集を基盤とし、石油汚染など様々な外的環境変動要因によってもたらされる微生物群集の変動を、分子遺伝学的手法によりの確に分解プラスミドをモニタリングする手法の確立を目指す。

2) 従来の栄養剤や分散剤等の散布に加え特定石油分解菌の野外利用が検討され、こういった浄化手法のガイドライン作りが各国で進められており（米国、カナダ、EU など）、我が国でもバイオレメディエーション技術利用指針の作成や法令、規定等の整備が急務となっている。本研究により、日本沿岸海域において基準化された統一的な手法により微生物プラスミド多様性データが収集され、データベース化される。また、各海域での代表的な石油分解菌の分布や賦存状況が解明され、より生物学的側面から油流出事故への対策が可能となるようにデータ化する。

## 3. 研究の方法

サンプリングは日本周辺の海洋微生物群集、特に特定石油分解菌の分離を中心に実施した。主なサンプリング地点は、日本沿岸域の地理的・海流的な要素やタンカー事故対応等を考慮し、日本海側と太平洋側の 2 地点を設定し、日本海側は富山湾、太平洋側は東京湾に観測定点を設置し、平成 20 年と平成 21 年の 2 年間の試料採取を行うこととした。さらに季節変動を考慮し、3 月と 9 月の年 2 回を実施した。採取した海水を Aged Sea Water にリンや窒素等の補助栄養塩を加え、炭化水素源として C 重油を添加した液で集積培養を行った後、炭化水素源を各種炭化水素 (Anthracene, Biphenyl, Phenanthrene, Tetradecane) に変更しそれを 1 種類ずつ添加した同組成寒天培地にて菌を分離した。分離方法は、各測定地点の表層海水をサンプリングし、その後の炭化水素分解菌の純粋分離に供し、分離株について 16SrRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析とプラスミド有無の調査を行った。

また、本研究では強力な特定石油分解菌として知られているスフィンゴモナス属細菌群をモデル微生物として位置づけ、特に海洋性スフィンゴモナス属細菌で有用なプラスミドについて、その遺伝学的特性を明らかにし、分解遺伝子群の安定遺伝に関わる遺伝子の特定と解析を行うこととした。

## 4. 研究成果

### 1) 特定石油分解菌の分離

2海域について年2回を2年間実施し、下記表1に示すように、合計114株を分離した。

表1。サンプリング地点と特定石油分解菌数

分離基質	富山湾	東京湾
Anthracene	15	14
Biphenyl	21	12
Phenanthrene	3	6
Tetradecane	17	15
Biphenyl & Biphenyl	8	0
合計菌数	64	47

これら分離株について16SrRNA遺伝子配列による系統解析を行った。2006年の夏季試料から分離した株は *Alcanivorax*, *Oleispira*, *Bacillus*, *Thalassospira* の4群のいずれかに分類された。前者3群は芳香族炭化水素分解培地から得られ、後者1群は脂肪族炭化水素添加培地から得られた。2006年の冬季試料からの分離株は *Alcanivorax*, *Oleispira*, *Dietzia*, *Sulfitobacter*, の4群に分類された。2007年の夏季試料からの分離株は、*Acinetobacter*, *Janthinobacterium*, *Marinobacter*, *Phaeobacter*, の4群に分類された。2007年の冬季試料からの分離株は *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* の2群に分類された。両地点共通の系統グループとして *Alcanivorax* と *Oleispira* が同定された。また、夏季と冬季で異なる系統群が確認された。

### 2) プラスミドの分離

前述の114株からプラスミドをアルカリ法にて分離し、そのサイズと保有株数を系統群別に表2にまとめた。当初、114株から大型プラスミドが25株から、小型プラスミドが10株から確認されたが、さらに同一菌株の可能性を精査し、下記表2に示すように17株からプラスミドを同定した。

表2。系統グループとプラスミド保持状況

年	場所	系統グループ	Kb	数
2006 夏	東京	<i>Alcanivorax</i>	>25	1
2006 冬	富山	<i>Alcanivorax</i>	>25	2
2006 冬	東京	<i>Dietzia</i>	>25	3
2006 冬	富山	<i>Oleispira</i>	>25	1
2007 夏	富山	<i>Marinobacter</i>	>25	1
2007 夏	富山	<i>Acinetobacter</i>	>25	2
2007 夏	東京	<i>Janthinobacterium</i>	>25	2
2007 夏	東京	<i>Phaeobacter</i>	>25	2
2007 冬	東京	<i>Pseudoalteromonas</i>	1.5 2.5	2
2007 冬	東京	<i>Ruegeria</i>	>25	2

次に、プラスミドが保持する炭化水素分解遺伝子群の有無、プラスミド維持に重要な安

定分配能について解析することとした。分離株中のプラスミドについては、*Pseudomonas* からは既にいくつかの炭化水素分解遺伝子群の存在が確認されているプラスミドが報告され、*Sphingomonad* は全ゲノムが解読されている種から染色体上に炭化水素分解遺伝子群が確認されているものが既に明らかにされている。そこで炭化水素分解の初期反応に関与する monooxygenase と dioxygenase のサブユニットをコードする遺伝子群の検出をPCR法により実施した。その結果、小型プラスミド保持株から1株、大型プラスミド保持株17株から上記遺伝子が検出されたことから、芳香族系炭化水素の分解遺伝子群を保持している可能性が示唆された。

上記表2に示すように、114株の中で17株からプラスミドを発見した。いずれも25K以上のサイズを持つ巨大プラスミドであった。これまでの報告から、多くの難分解化合物分解菌は巨大プラスミドを保持している。いくつかの報告では、巨大プラスミド上に難分解化合物、すなわち芳香族あるいは脂肪族炭化水素等の分解に関わる遺伝子がコードされており、これらが微生物間を伝達することにより遺伝子の水平伝搬が起きていることが示唆されている。本研究において分離された微生物は表1にあるように芳香族あるいは脂肪族炭化水素を栄養とする培地で生育したもので、それらの分解遺伝子群をプラスミド、特に巨大プラスミドが保持していたことはこれまでの仮説を強く支持するものであると考えられる。今後は、これらのプラスミドの安定遺伝に関わる遺伝子群の特定と機構の解明に注力する予定である。

### 3) プラスミド安定分配遺伝子の解析

プラスミド維持に重要な機能となる安定分配機構については、スフィンゴモナス属既知株で芳香族系炭化水素分解能を有する *Sphingobium amiense* と *Sphingobium yanoikuyae* の保持するプラスミド pAMI-1 と pYAN-1 から新規な構成からなる遺伝子群を同定した。これまで報告されている同機構は、2つのタンパク質性遺伝子 (DNA 結合能を有するタンパク質と ATP 分解酵素) と1つのDNA配列 (セントロメア様機能) から構成されている。今回同定したのは、1つのタンパク質性遺伝子と少なくとも2つのDNA配列から構成されるものあり、全く新規な遺伝子構成である。さらに、同遺伝子群を全く別の菌株から分離したプラスミドから極めて相同性の高いものとして同定した。今後は、さらに機能解析を行い、同遺伝子群の多様性と上記分離プラスミドでの遺伝マーカーとしての可能性について進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 6 件）

①林宏恵、久留主泰朗「海洋性*Sphingomonas*属細菌を宿主とする遺伝子組換え系の開発」第13回マリンバイオテクノロジー学会年会 2010年5月29-30日（広島大学）

②Hayashi. H and Kurusu. Y 「Construction of a high-expression system of foreign genes in *Sphingomonad*」  
ASM General 110<sup>th</sup> Meeting 2010年5月23-27日（San Diego, USA）

③大森孟道、雄長誠、林宏恵、久留主泰朗「*Sphingomonas*属細菌由来プラスミドの宿主内分配機構の解析」第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日（パシフィコ横浜）

④ 福田敦史、林宏恵、久留主泰朗「*Sphingomonas*属細菌群を宿主とする高発現ベクターの構築」第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日（パシフィコ横浜）

⑤ Kurusu Y, Ochoi M, Saito M 「Characterization of Novel Plasmids from *Sphingomonad*」 ASM General 109<sup>th</sup> Meeting 2009年5月17-21日（Philadelphia, USA）

⑥菊地真由美、関香織、西村彰浩、久留主泰朗、他3名「日本周辺海洋環境からの石油分解菌の探索とプラスミド解析」日本微生物生態学会第24回大会 2008年11月26日（北大）

〔その他〕

ホームページ等

[http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse  
arch/index.htm](http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse<br/>arch/index.htm)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留主泰朗（KURUSU YASUROU）

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60272118