

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510090

研究課題名（和文）海洋石油分解微生物群集の有用多環芳香族炭化水素分解酵素群の探索と浄化への応用

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（和文）：*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、PAHs 分解微生物群のメタゲノム、メタプロテオーム解析を行った。その結果、DNA レベル、タンパク質レベルで同菌の優占化が確認された。

研究成果の概要（英文）：*Cycloclasticus* is important for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in seawater and is expected to apply to bioremediation for oil spills for marine environments. In this study, metaproteogenomic analysis of PAHs degrading marine bacterial community was performed. The results suggested that *Cycloclasticus* group became predominant in the microbial community.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
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、環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術、メタプロテオーム

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、海水中に存在する *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、また、ショットガンプロテオーム解析から同菌の培養条件によるタンパク質の発現パターンの情報を取得した。

2. 研究の目的

上述した経緯を踏まえ、本研究では、石油汚染海水中の複合微生物系の群集構造を従来方より感度の高い手法で検討し、*Cycloclasticus* の同環境下での重要性を再度検討すると共に、同菌以外に重要な微生物群についての検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)培養系の作製

2009年4月から2011年3月までの期間に岩手県釜石市の平田湾から適宜海水を採取し、これらを微生物源として培養系に用いた。培養系は、生海水 800 ml に対し 200 ml の無機塩溶液(5.0 g of NH_4NO_3 , 0.1 g of $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{nH}_2\text{O}$, 0.1 g of K_2HPO_4 in 200 ml of MilliQ water)を加え、これに炭素源としてピフェニル(bph)、ナフタレン(nph)、フェナントレン(phn)、アントラセン(ant)、ピレン(pyr)を終濃度 100 mg/ml になるように、それぞれを、ま

たは組み合わせて添加した。これらを 28°C で数日間から1ヶ月間振盪培養した。得られた培養液から適宜菌体を回収し、以降の実験に用いた。

また、群集構造のチェックのための DGGE などは定法に基づいておこなった。

(2)タンパク質の抽出

各種条件で培養したサンプルから菌体を回収した。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、Compat able protein assay kit (Thermo SCIENTIFIC)で精製した後、沈殿にミリ Q 水を 100 μl 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 μl 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 BCATM Protein Assay kit (Thermo SIENTIFIC)を使用した。2 mg/ml BSA スタンダード原液 50 μl を 1.5 ml チューブに採取し、Denaturing Buffer を 150 μl を加え、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA スタンダードを調整した。この 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA スタンダード溶液を 2 倍希釈することで、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 μl 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 μl 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。

(3) SDS-PAGE

充填するタンパク質量が 10 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 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 μg もしくは 10 μg 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% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)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_2CO_3)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。

(4) 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 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)を 100 μl 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 μl 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 μl 加え、24°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 NH_4HCO_3)を 100 μl 加え 56°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 NH_4HCO_3)を 100 μl 加え、24°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 μl 加えて 24°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 μl 加え、24°C、1,300 rpm で 10 分浸透し脱水液(50% CH_3CN , 50 mM NH_4HCO_3)を 200 μl 加えて 24°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 μl 加え、24°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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 mM NH_4HCO_3)を 30 μl 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°C で一晩(12 から 16 時間)反応させた。反応終了後、抽出液(50% CH_3CN , 5% CF_3COOH)を 50 μl 加え 24°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 μl 加え 24°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 μl 加え、ボルテックスで混合し、遠心分離後、上清 12 μl 回収し LC/MS/MS に供した。

(5) 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 \AA , 3 μm , 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ルブを用いて導いた。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 価のペプチドは correlation factor (Xcorr)の値が 2.0 以上、3 価のペプチドは 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。

(5) DNA の抽出とメタゲノム解析

培養液を遠心管に移し、遠心により沈殿させた後、cell suspending buffer を加えてよく懸濁した。そこに Lysozyme 溶液を 37°C で 30 分インキュベートし、lysing Solution を加えて再度同条件で培養した。この過程を数回繰り返した。サンプルの体積と等量の PCI 溶液を加え攪拌し 4°C、8,000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。

一方で、残存していた PHAs の沈殿に PCI 溶液を添加し、沈殿を完全に溶解させた。これに、cell suspending buffer を加えて遠心し上清を回収した。この操作を数回繰り返した。得られたサンプルに Lysozyme 溶液、lysing Solution を加えて上述の条件などで繰り返し溶菌させ、再度フェノール抽出をした。

それぞれの過程で抽出されたサンプルを合わせ、そこに 3 M 酢酸ナトリウムとイソプロピルアルコールを加え攪拌し、4°C、12,000 rpm、10 分間遠心した。上層を除去し、70% エタノールを加えリンスし 4°C、12,000 rpm、10 分間遠心した。沈澱を回収し、風乾させ適当量の TE buffer に溶解させた。続いて、終濃度 10 µg/ml の RNase を加え、37°C で 1 時間インキュベートした後、再度フェノール抽出、エタノール沈殿を繰り返し、DNA を精製した。

得られた total DNA はハイドロシェアで物理的に断片化し、平均インサート長が 2-3 kb のショットガンクローンを 5000 クローン得た。これらを両端からシーケンシングし、約 10000 リードのシーケンシングを得た。シーケンシングのクオリティーチェックの後、BLAST 解析を行った。

BLAST 解析は blastx (DNA vs Protein)、blastn (DNA vs DNA) の 2 通で行い、解析に使用したデータベースは、nr に *Cycloclasticus* sp. S-4 株の完全ゲノム情報を加えたデータベースに対して行った。

4. 研究成果

(1)メタゲノム解析

Cycloclasticus 属細菌は、1995 年にワシントン州の Puget Sound から多環芳香族炭化水素 (PAHs) 分解菌として単離された海洋性の PAHs 分解菌であり、現在、実際の海洋石油汚染環境下において重要性が認識されている微生物である。同菌を利用したバイオリメディエーションを確立するため、これまでに単離した *Cycloclasticus* sp. S4 株のゲノム解析

が行われた。本研究では、これらの結果をもとに、*Cycloclasticus* を中心とする海洋における PAHs の分解に関わる他の微生物群の探索や *Cycloclasticus* と他の微生物との相互作用を検討するため、代表的 PAHs として、ビフェニル (bph)、ナフタレン (nph)、フェナントレン (phn)、アントラセン (ant)、ピレン (pyr) について、これらを個々に添加した培養系での 10,000 リード規模でのメタゲノム解析を行った。

BLAST 検索の TOP HIT の結果に対する *Cycloclasticus* の割合を検討したところ、nph では、*Cycloclasticus* と同等以上に *Silicibacter* が優占化し、上位 2 属とそれ以下の差が比較的少なく、多様性が最も多かった。この結果は、われわれが有するこれまでの分子生態学的解析の結果これまでの結果と全く違う傾向を示した。しかしながら、アミノ酸配列レベルの解析では、*Cycloclasticus* の割合が上昇した。これは、多くの *Silicibacter* に高い相同性を示した配列が同細菌のメガプラスミドの配列に相同性を示していたことが理由と考えられた。

続いて、bph、phn を添加した条件では、*Cycloclasticus* が最優占種で、二番手以下のポピュレーションとの割合の差もある程度あり、ant、pyr に比べると多様性に富んでいる群集構造が構築されていた。一方で、ant、pyr を添加した条件では、*Cycloclasticus* が約 8 割存在し、多様性は他の条件に比べて非常に少なかった。これらの傾向はこれまでの結果を支持した。

以上の結果、海洋の PAHs の分解において、最も重要なステップである開環までの過程に深く関与する微生物群は *Cycloclasticus* 属細菌であり、同環境下での PAHs の分解において同菌が最も重要であることがメタゲノム解析でも明らかとなった。

(2)メタプロテオーム解析

メタゲノム解析と同じ培養系を作製し、ショットガンプロテオーム解析を行った。今回は特に bph 添加培養について検討を加えた。

その結果、BLAST 検索の TOP HIT の結果に対する *Cycloclasticus* の割合を検討したところ、10.6% のタンパク質が同菌に相同性を示した。そのうち、リボゾームタンパク質群では 23.1% が *Cycloclasticus* 属細菌由来と考えられ、また、ダイオキシゲナーゼ群では、

64.6%が同菌由来と考えられた。これらのことから、同細菌が PAHs 汚染環境下で活発に活動していることが示唆され、この結果はこれまでの結果を支持した。

(3)メタゲノム解析とメタプロテオーム解析の比較

最後に、bph 添加培養について両方の結果を比較検討した(表 1)。その結果、双方の優占化率は異なるものの、最も主要なポピュレーションを形成した菌群は *Cycloclasticus* 属細菌であった。同菌に続くポピュレーションを形成した菌群は、メタゲノム解析とメタプロテオーム解析とでは違っていた。この理由は様々なことが考えられるが、両方の解析で検出された *Chromohalobacter*、*Pseudomonas*、*Marinobacter*、*Rhodospirillum* 属細菌等は本環境下で重要な役割を担っていることが示唆された。

表 1 メタゲノム解析とメタプロテオーム解析の比較

属	メタゲノム(%)	メタプロテオーム(%)
<i>Cycloclasticus</i>	27.7	10.6
<i>Flavobacterium</i>	5.3	0.2
<i>Chromohalobacter</i>	4.9	0.9
<i>Pseudomonas</i>	4	4.8
<i>Gramella</i>	1.8	0
<i>Silicibacter</i>	1.4	0.2
<i>Marinobacter</i>	1.4	1
<i>Rhodospirillum</i>	0.9	1.1
<i>Rhodobacter</i>	0.8	0.4
<i>Bradyrhizobium</i>	0.8	1.2
Other	51.1	79.6

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 5 件)

① Aizawa T, Iwabuchi N, et al. (他 4 名, 3 番目): *Bacillus trypoxylicola* sp. nov., a xylanase-producing alkaliphilic bacterium isolated from larval gut of *Trypoxylus dichotomus*, the Japanese horned beetle. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010. 60. p61-66. 査読あり

② 竹石英伯, 岩淵範之他. (他 4 名, 6 番目) 海洋性多環芳香族炭化水素(PAHs)分解菌 *Cycloclasticus* 培養制御技術の開発. 廃水と用水. 2010. 52(5). p359-364. 査読なし

③ 岩淵範之. 生物膜成分による石油汚染海洋の浄化—細胞外多糖の性質と機能およびそれを利用した微生物制御技術—. 水環境学会誌. 2010. 33(4). p121-125. 査読なし

④ Iwabuchi N, et al (他 7 名 1 番目): Role of Interfacial Tension in the Translocation of *Rhodococcus erythropolis* during Growth in a Two-Phase Culture System. Environmental Science & Technology. 2009. 49. 8290-8294. 査読あり

⑤ 岩淵範之. 油—微生物の相互作用における細胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) の影響 —EPS を用いた海洋石油汚染の浄化を中心に—. Bacterial Adherence & Biofilm. 2009. 23. p13-18. 査読なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 形質転換されたロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌、及び、これを用いた炭化水素の処理方法

発明者: 岩淵他

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 2009-206309

出願年月日: 2009 年 9 月 7 日

国内外の別: 国内

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