

## 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25日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880027

研究課題名（和文） 鉄還元性多環芳香族化合物分解細菌の探索

研究課題名（英文） Isolation of aromatic compound-degrading iron-reducer

研究代表者

井上 謙吾 (INOUE KENGO)

宮崎大学・IR推進機構・助教

研究者番号：70581304

研究成果の概要（和文）：自然界から採取したサンプルからヘテロ環を有する芳香族化合物であるカルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンいずれかを唯一の電子供与体、炭素源、エネルギー源として利用し、酸化鉄(III)を唯一の電子受容体として嫌気条件下で生育できる微生物を取得した。

研究成果の概要（英文）：Aromatic compound-degrading bacteria were enriched and isolated under anaerobic conditions with a medium in which carbazole, dibenzofuran, or dibenzothiophene is the sole electron donor, carbon and energy source.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農学・農芸化学・応用微生物学

キーワード：鉄還元菌、芳香族化合物、分解微生物、環境浄化、嫌気性細菌、環境汚染物質

## 1. 研究開始当初の背景

多環芳香族化合物には、ベンゼンやPBC、ダイオキシンなどを含み、産業活動によるそれら有害物質の環境中への放出と残存性が問題になっている。微生物による多環芳香族化合物分解に関する研究は、環境浄化や物質生産への有用な技術の開発に向けて精力的に研究が行われてきた。その研究の大半は好気性細菌による酸素依存性微生物分解であり、嫌気性微生物分解に関しては、研究例が比較的少なくその代謝経路や代謝系遺伝子・酵素に関する知見は非常に限られているのが現状である。

鉄還元細菌は嫌気的環境において、有機物を分解、代謝する過程で余剰に産生する電子を細胞外の不溶性酸化鉄(III)などに伝達する能力を持ち、電子供与体として様々な有機化合物が利用されることが知られている。鉄還元細菌の中には、芳香族化合物を分解可能な例もあり、ベンゼン、フェノール、トルエンなどの単環芳香族化合物やナフタレンのような2つのベンゼン環を持つ化合物も利用できるものも知られている。しかし、ナフタレンとピフェニルを除く多環芳香族化合物を電子供与体として利用できる鉄還元細菌の報告は皆無であり、さらに、ダイオキシン

ンと類似の炭素骨格を持つ有害物質、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンといったヘテロ環を持つ多環芳香族化合物を電子供与体とする鉄還元細菌についてもその報告例はなく、これらの化合物が微生物によって電子供与体として嫌氣的に代謝され得るのかどうか、知見は皆無である。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、多環芳香族化合物のうち、特にヘテロ環を有する有機化合物、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンを電子供与体として利用することでこれを分解することが可能な嫌気性鉄還元細菌の取得を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 鉄還元性多環芳香族化合物分解菌（群）の集積培養

植種源として、嫌氣的環境にある河川や水田の底泥など自然界から採取したサンプルを用い、体積比 1/100 として液体培地に添加して集積培養を行った。なお、液体培地にはジベンゾフラン、ジベンゾチオフェン、カルバゾール（以降、これらを基質とする）の 3 種いずれかが唯一の電子供与体、炭素源、エネルギー源となり、かつ不溶性の酸化鉄(III)が唯一の電子受容体となるよう調整し、その他ビタミン、塩類、ミネラル等を加えた培地を用いた（図 1）。集積培養には、液体培地 10 ml を試験管に入れ、培地を窒素と二酸化炭素の混合ガス(80:20)でバブリングすることで、培地中の酸素を追い出し、また、ヘッドスペースガスを置換することで嫌氣的条件にした後、ブチルゴム栓とアルミシールにより密閉し、オートクレーブ滅菌した。植菌は嫌気チャンバー内で行い、培養温度は 30℃として静置培養し、酸化鉄の還元が見られた（本研究で用いた酸化鉄は hematite と呼ばれ、還元されると磁性をもつ磁鉄鉱[magnetite]に変換されるため、目視では、茶色から黒色へ変化し、また磁石による磁性の確認が可能である；図 2）サンプルについては、新鮮な培地にその一部を体積比 1/100 で植菌し、培養した。一つのサンプルについて、この作業を 4 回以上繰り返した。

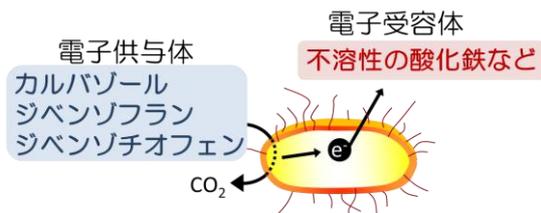


図1. 鉄還元性芳香族化合物分解微生物の代謝

### (2) 鉄還元性多環芳香族化合物分解菌の単離

集積培養が完了したサンプルについては、基質分解性鉄還元細菌を単離するため、ロールチューブ法、及び、寒天平板培地法を試みた。ロールチューブ法は、酸化鉄のように水溶性が低い物質を均一に寒天培地に分布させるため、湯浴中で回転させながら徐々に湯浴温度を下げて寒天を固化させる方法である。ロールチューブ法では、集積培養に用いた培地と同じ組成の培地に寒天を添加したものをを用い、55℃まで冷却した寒天培地に集積培養後のサンプルを混ぜ込んだ後、寒天を固化させた。その後 30℃で培養した。寒天平板培地法においては、市販の栄養培地などを用いた寒天プレートに集積培養後のサンプルを展開し、そこに形成されたコロニー、形態観察と新たなプレートへのストリークによる単一化の後、酸化鉄と基質を含む液体培地に植菌し、鉄還元能力を検証することで、目的の微生物の単離操作を行った（ここでは培地の調整など集積培養時と同じ操作を行った）。また、基質の分解能力に関しては、基質を含む寒天プレート上でのクリアゾーンの形成を指標とした（本研究で用いた基質はいずれも水溶性が非常に低く、培地中では浮遊物あるいは沈殿物として存在する。そこで、適宜有機溶媒を用いて一度溶解した基質を熱した寒天培地とを混合し、冷却固化させることで、白濁した寒天プレートが作成でき、そこに基質分解菌がコロニーを形成するとコロニーの周りにはクリアゾーンが形成される；図 2）。

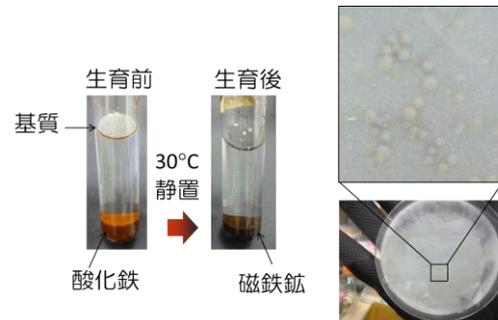


図2. 集積培養とコロニー（クリアゾーン）形成

### (3) 鉄還元性多環芳香族化合物分解菌の属種同定

単離が完了した微生物の一部に関しては、液体培地を用いて生育させた菌体から全 DNA を抽出し、PCR による 16S rDNA の増幅とその塩基配列決定を行った。決定した配列はデータベースとの比較・アラインメント解析から属種を同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 集積培養

カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンいずれかが唯一の電子供与体、炭素源、エネルギー源となり、かつ、不溶性の酸化鉄(III)が唯一の電子受容体となるような培地を調製し、そこに宮崎県内の河川底泥、ダム底泥、水田土壌などを中心として採取したサンプルを植種源として添加し、30℃下で嫌氣的に培養した。酸化鉄(III)の還元が観察されたサンプルについては新しい培地に植え継ぐことで、基質を利用して鉄還元が行える微生物の優占率を高めた。最低4回の植え継を繰り返した後も酸化鉄の還元が観察されたサンプルを、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンそれぞれ22、3、2サンプル得ることができた(表)。

表. 鉄還元性芳香族化合物分解微生物の取得

	カルバゾール	ジベンゾフラン	ジベンゾチオフェン
植菌サンプル数	67	61	58
4回以上植継	22	3	2
コロニー形成	19	1	2
酸化鉄の還元を確認	10	1	1

集積培養の過程において、早いものでは1週間程度の培養時間で酸化鉄の還元が観察されたが、遅いものでは、数か月の時間を要するものもあった。3つの化合物のうち、カルバゾールにおいて、多くの鉄還元細菌が得られたが、これは、カルバゾールは電子供与体として微生物に利用されやすい可能性を示唆している。好氣的なカルバゾール分解菌においても、多種多様な細菌が得られていることから、カルバゾールが好気・嫌気に関わらず、微生物にとって炭素源として利用されやすい化合物であることが示唆された。

集積培養を経たサンプルについては、基質分解性鉄還元細菌の単離を試みた。鉄還元細菌の単離にはロールチューブ法が古くから用いられているため、基質を用いた自家製の培地を用いて試みたところ、酸化鉄を含む茶褐色の寒天培地中に黒色のコロニー(酸化鉄の還元により形成されるもの)の形成は観察されなかった。この理由として、サンプル中に目的の微生物が存在しないということよりも、実験的な問題があると考えられた。すなわち、基質の水溶性が非常に低いため、基質が均一に培地中に分散しないまま寒天が固化してしまうため、鉄還元菌が基質を利用することが困難であった可能性が考えられた。

よって、ロールチューブ法では基質を分解できる鉄還元菌の取得は困難と判断し、寒天平板培地プレートを用いた方法での単離を

試みた。集積培養を経たサンプルを嫌気チャンバー内で嫌氣的に寒天培地プレートに展開し、培養した後、菌株由来のコロニーが形成された場合は、そのコロニーの形態ごとで分離した後、それぞれについて、基質を電子供与体として鉄還元が行えるかどうか検証した。なお、集積培養したサンプルを展開する寒天培地プレートには、基質を唯一の電子供与体、炭素源、エネルギー源とするもの以外にも市販の栄養培地なども用いた。その結果、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェン、それぞれ19、1、2種類のサンプルでコロニーの形成が確認された(表)。コロニーの形成もサンプルによって異なるものの、早いもので2週間、遅いものでは数か月の時間を要した。コロニーの形態が異なるものは別の菌株由来のものとして判断し、それぞれを別の新しい寒天プレートにストリーク後、培養し、そこにさらに形成されたコロニーを観察することで単一に菌に分離されていることを確認した。また、形成されたシングルコロニーを新しい基質と酸化鉄(III)を含む液体培地(集積培養で用いたもの)に植菌し、鉄還元能力を検証した。その結果、コロニーを形成したサンプルから分離した株のうち、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンそれぞれ10、1、1株において、鉄の還元が観察された。

本研究では、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンなどのヘテロ環を持つ芳香族化合物が微生物により嫌氣的に代謝され得ることを示した。それら新規単離株の能力は環境浄化への応用可能性を秘め、また、新規遺伝子・酵素を持つ可能性も考えられるため、今後は、これらの株の基質分解能力や利用できる芳香族化合物の特異性などを詳細に調べると共に分解能力の高いものや多様な芳香族化合物を電子供与体として利用可能な株が見つければ、それらの分解代謝経路を解明し、ゲノム解析や遺伝子工学・酵素工学的アプローチにより、各物質変換を担う酵素を特定する。

##### 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0件)

[学会発表] (計2件)

1. 井上謙吾、渡邊史子、河野好裕「鉄還元性ヘテロ環芳香族化合物分解菌細菌の単離」日本農芸化学会、2012年3月24日、京都

2. 河野好裕、渡邊史子、井上謙吾「鉄還元性難分解性有機化合物分解菌の探索」日本農芸

化学会西日本支部・中四国支部合同大会、  
2011年9月17日、宮崎

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 謙吾 (INOUE KENGO)  
宮崎大学・IR推進機構・助教  
研究者番号：70581304

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 研究協力者

河野 好裕 (KAWANO YOSHIHIRO)  
宮崎大学・IR推進機構・研究員

渡邊 史子 (WATANABE FUMIKO)  
宮崎大学・IR推進機構・研究補佐員