

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310060

研究課題名(和文)石油分解微生物群の石油汚染環境下における相互作用の解析と浄化への応用

研究課題名(英文)Application of *Rhodococcus erythropolis* PR4 for bioremediations

研究代表者

岩淵 範之 (IWABUCHI, Noriyuki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90328708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究において、われわれは、*Rhodococcus erythropolis* PR-4株は、各種石油系炭化水素に分解性を示す石油分解菌であり、高度の有機溶媒耐性と有機相へ細胞が転移しその中で増殖するという特徴的な有機溶媒との相互作用を示す株であることを見出し、GroEL2の高発現がPR4株の有機溶媒との相互作用に深く関与していること明らかにした。しかし、本研究着手段階では、GroEL2がどのように作用しているかは定かではなかったこと。そこで本研究では、GroEL2の細胞内での働きについて最初に検討し、続いてGroEL2の高発現による有機溶媒耐性の付与の一般性についても検討した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the proteins involved in the translocation of *R. erythropolis* PR4. The results of our proteogenomic analysis suggested that GroEL2 was upregulated more in cells that translocated inside of the pristane phase than in those located at the aqueous-alkane interface attached to the n-dodecane surface. The expression of GroEL2 in PR4 (pK4-EL2-1) was 15.5-fold higher than that in PR4 (pK4). The growths of PR4 were enhanced by the introduction of pK4-EL2-1. These results suggested that the overexpression of groEL2 led to changes in cell localization and enhanced growth. We subsequently examined the effects of the introduction of groEL2 and subsequent overexpression of GroEL2 on the alkane tolerance of various *Rhodococcus* strains. The results showed that the introduction of groEL2 led to an increase in alkane tolerance in some rhodococci. As results, we constructed a highly alkane-tolerant strain capable of translocating to and surviving in the presence of n-octane.

研究分野：環境微生物学

キーワード：バイオレメデーション 有機溶媒耐性 GroEL2 *Rhodococcus*

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外での状況

これまでに、国内で揮発性有機溶媒類、重金属類および石油などの油類で汚染された土壌や汚染の可能性のある土地を浄化するために必要な費用の総額は、約 13 兆円と推定されている。それゆえ、安価で現実的な現位置浄化法としてバイオレメデーションの実用化が期待されている。バイオレメデーションは、平成 17 年 7 月の経済産業省、環境省からのバイオレメデーション利用指針に基づき揮発性有機化合物(VOC)汚染等では実施事例が増えている。一方で油汚染では、生分解性の異なる多様な炭化水素の複合汚染であるため浄化は難しく、特に高沸点画分の炭化水素が土壌粒子と強固に吸着し、接触機会が限られるため、ほとんどの炭化水素分解性微生物が生育基質として利用できずに期待した成果が得られない場合が多い。これらの問題を解決するため、分解菌には、汚染物質への親和性の高さや溶媒耐性能、そして極めて含水量の少ない環境下での汚染物質の代謝機構(非水系代謝機構)が求められ、さらに、浄化効率を向上させるため、汚染環境への定着性の高さや基質との空間的位置関係の制御するための技術が必要である。

(2) 本研究の準備状況

申請者グループは上述した要素を兼ね備えた浄化技術を開発するため、高濃度石油耐性石油分解菌である *R. rhodochrous* S-2 株やプリスタン分解菌である *R. erythropolis* PR-4 株を用いて、*Rhodococcus* 属細菌における有機溶媒耐性や微生物細胞と炭化水素との相互作用の解析、微生物の制御法の開発を中心に研究に取り組んできており、その結果、*R. erythropolis* PR4 株が極めて特徴的な有機溶媒耐性を有していることを見出した。すなわち、同菌は、培地/アルカン二相培養系において、加えるアルカンの炭素数によって「アルカン相表面に吸着して水相/アルカン相の界面に存在する吸着型」あるいは「アルカン相内に転移して存在する転移型」の二つの局在性を示す極めて特徴的な挙動を示す微生物であることを明らかにした。続いて各種アルカン存在下での生育を検討したところ、転移型アルカン存在下での生育は吸着型に比べて約 1,000 倍高いことから、PR4 株は、アルカン相内の極めて含水量が少ない環境下で活発な代謝が行われていることが示唆された。また、各種細胞表面解析によりアルカン相への転移機構を検討したところ、吸着型では、一度転移した細胞がアルカン相を通過し界面に露呈され吸着型の局在性を示すが、転移型では、細胞表面の親油性の上昇によりアルカン相/水相の界面ギブスエネルギー

ーが上昇したことにより細胞がアルカン相内に留まるため転移型を示すものと示唆された。上述したように PR4 株の極めて特徴的な性質は、バイオレメデーションに利用するための根幹である微生物の有機溶媒中での生命活動を理解する上で格好の材料であると考えられた。

2. 研究の目的

われわれは、先行研究において、GroEL2 の高発現が PR4 株の有機溶媒との相互作用に深く関与していること明らかにした。しかし、本研究着手段階では、GroEL2 がどのように作用し有機溶媒との相互作用を規定し、耐性能を向上させているかは定かではなかった。

近年、*Mycobacterium* 属細菌において GroEL2 が細胞表面に局在する現象や(Stokes *et al.* 2009)、シャペロニン以外の機能をしていることが示されていることが報告されている(Mande *et al.* 2009)。これらのことを踏まえると、PR4 株の溶媒耐性機構の詳細を明らかにするためには、GroEL2 がシャペロニンとして作用しているのか、あるいは細胞表面や細胞外タンパクとして作用しているのかなどの細胞内外における GroEL2 の局在性と働きを特定する必要があると考えられた。

以上のことから、本研究では、GroEL2 の細胞内での働きについて最初に検討し、続いて GroEL2 の高発現による有機溶媒耐性の付与の一般性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養条件、局在性の確認、生菌数の測定

Rhodococcus 属細菌の菌体を 5 ml の IB2 液体培地[Glucose 10 g, Bacto-Yeast extract (Difco) 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g; NaCl, 0.1 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g; CaCl_2 , 0.132 g; $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g per liter, pH 7.2]に植菌し、28、110 rpm で 2 day 振盪培養し、定常期まで培養した。この培養液を滅菌水で数回洗浄し、最後に同体積の滅菌水に置換した。二相培養系には、IB2 培地の他に、MM 培地[$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g; NaCl, 0.1 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g; CaCl_2 , 0.132 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; per liter, pH 7.2]および NP medium [K_2HPO_4 , 0.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g; per liter, pH 7.2]を用いた。各種アルカンはその終濃度が 5% (v/v) になるように各種培地に添加した。全ての液体培養は、初期菌数が 10^5 cfu/ml になるように前培養液を適宜希釈して接種した後、28、110 rpm の条件で行われた。形質転換体を培養する場合には、カナマイシンを 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加した。コロニー数を測定する際には、アルカン相と水相とをボルテックスを用

いてよく混合して採取し、適宜希釈系列を作製し、IB2 寒天培地に塗抹してコロニー数を算出した。細胞の局在性は、培養液の有機層と水層を懸濁して 8 μ l をスライドガラスに滴下し、カバーガラスをのせたものをサンプルとした。位相差顕微鏡のステージにサンプルを乗せ、スライドガラスにイマージョンオイルを一滴垂らした。対物レンズの倍率を 100 倍にして観察した。

(2) プラスミドの構築と形質転換

PR4 株のゲノム情報からプライマーを設計し、プライマー GroEL2-F1 (1 ~ 24 nt) : 5' -ATG GCA AAG ATC ATC GCG TTC GAC-3' と GroEL2-R1 (1600 ~ 1626 nt) : 5' -TCA GAA GTC CAT GCC GCC CAT GCC GCC GGT CGG-3' を用い、PCR 法にて PR4 株の *groEL2* の完全な CDS を増幅した。この PCR 産物を TOPO TA cloning kit を用いてクローニングし、その後、その塩基配列を確認した。得られたプラスミドを *EcoR* で処理し、精製した 1.6 kb の DNA 産物を大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターの pK4 のカナマイシン耐性遺伝子 (*km'*) の下流の *EcoR* 部位に同方向になるように挿入した。このプラスミドを pK4-EL2-1 とし、また、pK4-EL2-1 を *Aat* で処理し、6.3 kb の DNA 産物を分子内ライゲーションさせ、*groEL2* の不完全な CDS (nt 246-753 を欠損) を含むプラスミドを構築し、これを pK4-EL2-1 とした。

一方、各種 *Rhodococcus* 属細菌の *groEL2* 遺伝子を増幅するため、NCBI に登録されている *Rhodococcus* 属細菌および PR4 株の *groEL2* の配列情報から、縮重プライマー F (nt 1-36) : 5' -ATG GCI AAR ATH ATH GCI GAT TYY GAR GAR GCI MGI-3'、縮重プライマー R (nt 1590-1626) : 5' -RAA RTC CAT ICC ICC CAT ICC ICC IGT IGG RTC ICC-3' を作製し、*R. rhodochrous* ATCC12674、*R. rhodochrous* R-1、*R. rhodochrous* R-2、*R. rhodochrous* S-1、*R. rhodochrous* S-2 の *groEL2* をクローニングし、そのシーケンスを確認した。

各種 *Rhodococcus* 属細菌の形質転換は、対数増殖期初期から中期の菌体に対し、エレクトロポレーション法で行った。Gene Pulser の設定は、印加電圧 1.50 kV、抵抗値 400 Ω 、電気容量 25 μ FD の条件で 1 回パルスした。必要に応じて、この条件を各種菌株の最適条件になるように変更した。全ての菌株において、エレクトロポレーション後のキュベットを氷水上で 1-2 分インキュベートした後、適量の IB 液体培地を加えてキュベット内の菌体を培養チューブに移し、最終的に全量が 1 ml になるように IB 液体培地を加えた。このサンプルを 28、110 rpm で 2 時間振盪培養し、*km* 入りの IB2 寒天培地に塗抹した。

(3) ショットガンプロテオーム

各種培養条件で培養した細胞を回収し 1×10^7 cells/ml に調製した後、これを 100 μ l の sample buffer に懸濁した。この細胞懸濁液を 20 min 煮沸し、タンパク質を抽出した。透明になった懸濁液を 12,000 rpm、15 min、25 $^{\circ}$ C で遠心分離し、細胞の残渣を除去した。これを membrane containing supernatant (MCS) とし、これらサンプルのタンパク質濃度を Bio-Rad Protein Assay kit を用いて測定した。

SDS-PAGE、切り出し、トリプシンのゲル内消化、ゲルからのペプチド抽出等は、基本的に Takihara et al. (2014) の手順に従った。Microbore HPLC system は Paradigm MS4 を用い、カラムは spray needle を伴った Magic C18 (200 \AA , 3 μ m, 0.2 \times 50 mm) を用いて nano LC-ESI-MS/MS 測定を行った。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、ペプチドの分離・溶出は 20 min で 5-65% buffer B の linear gradient で行った。カラム溶出液は直接 electrospray ionization source によりイオン化し、LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer により positive モードにて質量分析した。Peak の検出は Xcalibur software を用いて m/z 500-2000 の範囲にて測定した。

得られた全てのデータサーチとデータインタープレティションは BioWorks 3.3 ソフトウェアを使って行い、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 以上の配列情報を用い、かつ 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 PR4 のゲノムデータベースに対して検索し、RER_09740 を内部標準として、データを標準化した。

代謝系解析は、PR4 株のゲノム情報とオソロググループに基づく KEGG Orthology (KO) の機能カテゴリから、検出された遺伝子を機能分類し、それぞれの代謝系ごとに分類した。

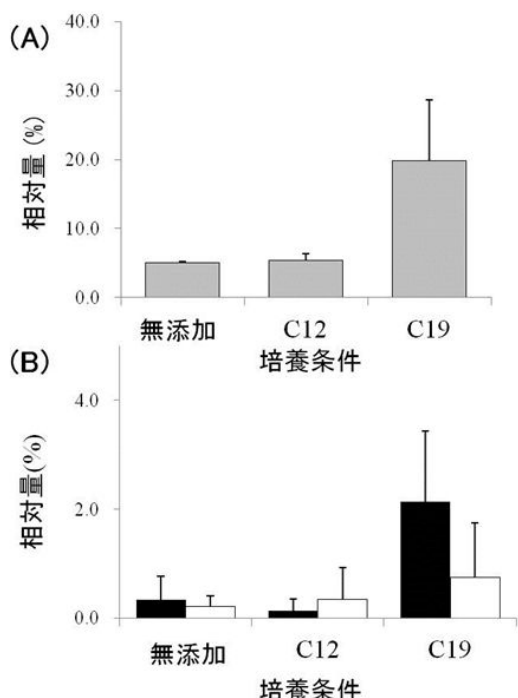
4. 研究成果

(1) GroEL2 の細胞内での機能の推測

PR4 の有機溶媒耐性における GroEL2 の機能を検討するため、ショットガンプロテオーム解析の結果から GroEL1、GroES および GroEL2 の発現量を検討した。転移型のアルカンとしてプリスタン (C19)、吸着型のアルカンとして *n*-ドデカン (C12) を用い、アルカン無添

加条件と共に発現プロファイルを比較検討した。まず、GroEL2 の発現量を見たところ、他の二条件に比べ有意に高く、その相対量は 19.8% と極めて高かった。

一方で、GroEL1、GroES の発現について確認した。これら二つは、その相対量は GroEL2 に比べかなり低かったが、同一オペロン上に存在しながらその発現量は条件により大きく異なっていた。すなわち、GroEL1 は供試した条件ではほぼ同等のレベルであったのに対し、GroES は、C19 を添加した転移型の条件での発現量が他の 2 条件に比べ 6.3 倍上昇していた (下図、A が GroEL2 の発現量、B が GroEL1(白)、GroES(黒)の発現量を示す)。



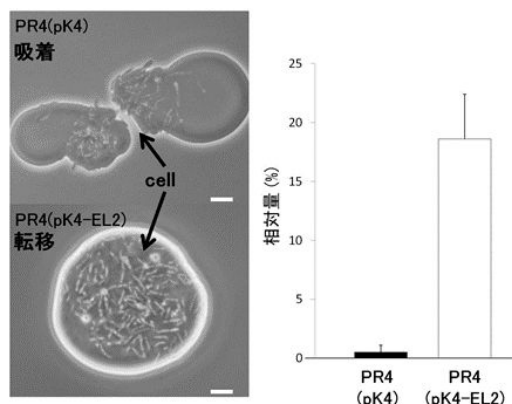
これまでにゲノム解析がなされた細菌のうち約 30% が複数の *groEL* 遺伝子を有することが報告されており、複数の *groEL* 遺伝子の各種ストレス応答に対する使い分けなどが注目されている中で、GroEL が複数存在する微生物においては GroEL2 が GroES との複合体を形成しシャペロンとして機能していることが予想されている。また大腸菌等では、GroEL と GroES は十四量体の複合体を形成してリフォールディングに関与しており、細胞内での EL : ES のモル比は GroEL:GroES=1:0.5 であると報告されている。それ故、今回のショットガンプロテオームの結果から GroEL2:GroES のモル比を検討したところ、約 2:1 であった。このことから、C19 添加条件の転移型細胞では GroEL2 はシャペロンとして機能していることが予想された。

また、GroEL が複数存在する微生物において、通常、初期のストレス応答タンパクとし

て考えられている GroEL1 は、供試した条件でその検出量に有意差が見られなかったことから、転移型細胞では GroEL2 が初期ストレス応答タンパクとして機能していることが推測された。

(2) PR4 株の有機溶媒耐性に与える GroEL2 の影響

PR4 株の有機溶媒耐性に与える GroEL2 の影響を調べるため、*groEL2* 遺伝子をクローニングし、各種菌株に導入し、その影響を調査した。まず、PR4 株由来の *groEL2* 遺伝子を含んだプラスミドを構築し、PR4 株に導入した後、その影響を確認した(下図、右写真は C12 添加時の細胞の局在性を位相差顕微鏡で確認したもの、左グラフはショットガンプロテオーム解析による GroEL2 の発現量)。



その結果、完全長をクローニングした pK4-EL2-1 を導入した結果、IB2 培地に C12 を添加した条件において、細胞の局在性は転移型に変化した。続いて同条件での GroEL2 の発現量を検討したところ、野生株の転移型条件並みの発現量を示した。一方で、コントロールとして用いた pK4 のみを導入した形質転換体では、細胞の局在性的変化も GroEL2 の発現上昇も確認できなかったことから、*groEL2* 遺伝子の導入により、細胞の局在性が変化し、結果として有機溶媒体制が上昇するものと考えられた。

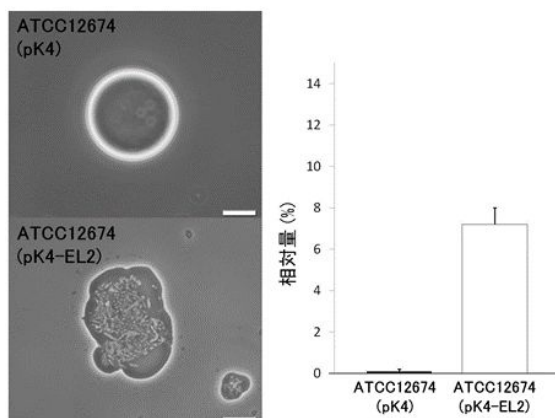
(3) 各種 *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性に対する GroEL2 の影響

続いて、PR4 株で見られた *groEL2* 遺伝子の導入による有機溶媒耐性が他の *Rhodococcus* 属細菌でも見られるか否かを確認した。まず初めに各種 *Rhodococcus* 属細菌 46 株について、それぞれの有機溶媒耐性と相互作用を検討した。その結果、供試した多くの株において、添加するアルカンの炭素数と有機溶媒耐性に相関が見られ、また、その時の細胞の局在性と有機溶媒耐性にも相関が見られた。す

なわち、アルカンの炭素数が長いほど、細胞がアルカン相に細胞が転移した転移型で生育する傾向が見られた。また、添加するアルカンの炭素数を徐々に短くすると、細胞がアルカン粒子の表面に吸着して生育する吸着型に変化し、更に、短くすると生育しないことが明らかとなった。

次にプラスミド pK4 で形質転換が可能であるかどうかを検討し、最終的に形質転換可能な 6 株の候補株を得た。これらの菌株を宿主として、PR4 株由来の *groEL2* 遺伝子、および自身の *groEL2* 遺伝子を導入し、その細胞の局在性、GroEL2 の発現量を検討した。

その結果、供試した 6 株すべてにおいて、*groEL2* 遺伝子の導入により、有機溶媒体制の上昇が確認された。その中でも特筆すべきは、*R. rhodochrous* ATCC12674 株に PR4 株由来の *groEL2* を導入した形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC12674 (pK4-EL2-1) において、非常に効果的な体制上昇がみられたことである。下図はその結果の一部を示してある。右の写真は IB2 培地にオクタン(C8)を添加した条件での細胞の局在性を示している。左グラフは同条件での GroEL2 の発現量をショットガンプロテオームで測定したものである。



その結果、本株は、供試した限り他の野生株および形質転換体が生育できなかったアルカンの中でも毒性の高いオクタン(C8)添加条件において、細胞がアルカン相内部に転移して存在している様子が観察された。さらに、本条件下での GroEL2 の発現量を検討したところ、コントロールに比べ約 72 倍上昇していた。

C8 はアルカンの中でも最も毒性の高いアルカンのひとつであり、供試した限り他の *Rhodococcus* 属細菌は転移型で生育出来ないことから、これらの結果は、*groEL2* の導入が *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性を上昇させるための有用な手法であることを示唆している。

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4件)

Takahara, H., Akase, Y., Sunairi, M., Iwabuchi, N. Mg²⁺-dependent control of the spatial arrangement of *Rhodococcus erythropolis* PR4 cells in aqueous-alkane two phase culture containing *n*-dodecane. *Microbes Environ.* in press. 査読有.

Iwabuchi N., Takiguchi H., Hamaguchi T., Takihara H., Sunairi M., Matsufuji H., Transformation of lignin-derived aromatics into non-aromatic polymeric substances with fluorescent activities (NAPSFA) by *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 3, 2678-2685, 2015. 査読有.

Takahara H., Ogihara J., Iwabuchi N., Sunairi M., *Rhodococcus rhodochrous* ATCC12674 becomes alkane-tolerant upon GroEL2 overexpression and survives in the *n*-octane phase in two phase culture. *Microbes Environ.* 29(4): 431-433. 2014. 査読有.

Takahara H., Ogihara J., Yoshida T., Okuda S., Nakajima M., Iwabuchi N., Sunairi M., Enhanced translocation and growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane phase of aqueous-alkane two phase cultures were mediated by GroEL2 overexpression. *Microbes Environ.* 29(4): 346-352. 2014. 査読有.

[学会発表](計6件)

岩淵範之. バイオフィルムを構成する細胞外多糖の機能性. 日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会秋の勉強会. 土浦亀城プラザ(茨城県土浦市). 2015年10月18日. 招待講演.

岩淵範之, 瀧原速仁, 奥田修二郎, 荻原淳, 砂入道夫. アルカン相内で生育する有機溶媒耐性菌 *Rhodococcus erythropolis* PR4 のタンパク質発現プロファイルの解析. 環境微生物系学会合同大会 2014. アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市). 2014年10月22日.

瀧原速仁, 岩淵範之, 砂入道夫. *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性における *groEL2* の影響. 環境微生物系学会合同大会

2014. アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市). 2014年10月22日.

S. YAMASHITA, H. TAKEISHI, J. OGIHARA, S. OKUDA, H. ANZAI, N. IWABUCHI, M. SUNAIRI. Effects of glucuronic acid contained in residues of S-2 EPS on the bacterial behavior of *Cycloclasticus*, PAHs-degrading bacteria, in PAHs-contaminated marine environment. 第28回日本微生物生態学会大会. 豊橋技術科学大学(愛知県豊橋市). 2012年9月22日.

H. Takihara, N. Iwabuchi, M. Sunairi. The effects of MgSO₄ on the growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane/medium two-phase cultures. 第28回日本微生物生態学会大会. 豊橋技術科学大学(愛知県豊橋市). 2012年9月22日.

H. Takihara, N. Iwabuchi, M. Sunairi. Unique behavior of oil-degrading bacteria during cultivations. The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbial Ecology (JK-ISME2012), S12-3. Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Aichi, Japan. 2012年9月21日. 招待講演.

〔図書〕(計1件)

Iwabuchi N. Selective stimulation of aromatic compound degradation by the indigenous marine bacterium *Cycloclasticus* for bioremediation of oil spills in the marine environment. In Nojiri H., Tsuda M., Fukuda M., and Kamagata Y. (eds), *Biodegradative Bacteria*, Springer, New York, NY. 400 p., pp. 313-333 (2013). 査読有.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 蛍光物質及びその製造方法
発明者: 岩淵範之, 松藤寛, 砂入道夫, 瀧原速仁, 佐々木太平, 白井智也
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 特願 2014-167282
出願年月日: 平成 26 年 8 月 20 日
国内外の別: 国内

名称: 蛍光物質及びその製造方法
発明者: 岩淵範之, 松藤寛, 砂入道夫, 滝口肇, 濱口峻
権利者: 日本大学
種類: 特許

番号: 特願 2013-019971
出願年月日: 平成 25 年 2 月 4 日
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: ロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌を用いた抛油性溶媒処理方法
発明者: 岩淵範之, 中嶋睦安, 砂入道夫, 明瀬由美子, 鷺崎友哉.
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 特許 5747371 号
取得年月日: 平成 27 年 5 月 22 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

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・准教授
研究者番号: 90328708

(2) 研究分担者

荻原 淳 (OGIHARA, Jun)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 50256830

古川 壮一 (FURUKAWA, Soichi)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 40339289
(平成 26 年まで)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: