

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780076

研究課題名(和文)ヘテロ環芳香族化合物の嫌氣的分解経路の解明

研究課題名(英文)Anaerobic degradation pathway of hetero-aromatic compounds

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロ環を有する多環芳香族化合物分解能力を持つ鉄還元細菌を取得するため、カルバゾール(CAR)、ジベンゾフラン(DF)、ジベンゾチオフェン(DT)のいずれかが唯一のエネルギー源・電子供与体、不溶性の酸化鉄(Ⅲ)が唯一の電子受容体となるよう調製した培地に自然界から採取した土壌、河川底泥、下水などを植種源として添加し、嫌気条件下で集積培養を行い、CAR、DF、DT、それぞれ10、1、1株単離した。CAR分解性鉄還元菌のうち1株は、その16S rRNA配列を決定し、属種を同定したが、同じ属種の標準株はCAR分解能力を持たないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Anaerobic biodegradation of heterocyclic compounds, carbazole, dibenzofuran, and dibenzothiophene were investigated. Bacterial strains capable of degrading the heterocyclic compounds were isolated from enriched culture in which the heterocyclic compounds and insoluble Fe(III) oxide were added as the sole electron donor and acceptor, respectively. Inocula were collected from river and dam sediments and soils. Among the enriched cultures, 10, 1, and 1 strains were isolated from the medium in which carbazole, dibenzofuran, and dibenzothiophene were used as the sole electron donor, respectively. 16S rDNA sequencing analysis revealed one of the carbazole-degrading isolates belongs to Desulfovibrionaceae. Its type strain could not degrade carbazole and, thus, their comparative genome analysis is now underway in order to identify the gene involved in carbazole degradation.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：鉄還元細菌 芳香族化合物 ダイオキシン 嫌気性細菌 環境汚染物質 分解微生物 環境浄化 分解系遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの多環芳香族化合物の微生物分解に関する研究については、ナフタレンやビフェニルを中心に好氣的分解の研究例が大半を占め、ほぼ全てにおいて初発反応が酸素添加型の分解経路で、基質から TCA 回路に入るまでの代謝経路の各反応を担う遺伝子・酵素について多くの知見が蓄積している。一方で、嫌氣的な芳香族化合物の微生物分解についての研究報告例は少ないが、その知見によると同じ芳香族化合物であっても、嫌気と好気とでは分解代謝経路は全く異なることが示されている。これまでの芳香族化合物の嫌氣的微生物分解に関する研究報告例のほとんどは単環性芳香族化合物についてであり多環芳香族化合物の嫌氣的な分解の研究となるとナフタレンやビフェニル、多環芳香族炭化水素などの研究例が少数の研究グループから報告されているのみであった。

鉄還元細菌は、嫌気条件下で有機物を電子供与体、酸化鉄を電子受容体として呼吸を行う微生物であり、酸素が地球大気の主成分になる以前から存在したと考えられ、鉄還元細菌が持つ遺伝的多様性が高いことが予想される。しかし、その取扱いの困難さなどからこれまでに単離された鉄還元菌のうち遺伝学的・酵素学的研究まで踏み込んだ例は極めて少ないのが現状である。

上記の多環芳香族化合物分解性鉄還元菌の報告例はナフタレンについてのみであり、その他の多環芳香族化合物の鉄還元細菌による分解の報告例は皆無であった。

## 2. 研究の目的

多環芳香族化合物のうち、特にヘテロ環を有する芳香族化合物(カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンなど)について、その微生物の嫌氣的分解代謝経路を明らかにし、分解を担う遺伝子・酵素を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

自然界から採取した川底汚泥など様々なサンプルを植種源として、カルバゾール、ジベンゾフラン、ジベンゾチオフェンを唯一の電子供与体、不溶性の酸化鉄を唯一の電子受容体として集積培養を行い、鉄還元が観察されたサンプルから寒天プレートを用いて嫌氣的に培養し、形成されたコロニーから、鉄還元を行う微生物を分離する。分離した微生物の基質分解能力と代謝中間代謝物の同定、及び、そのゲノム解析から分解代謝に関わる遺伝子・酵素を解明する。

## 4. 研究成果

カルバゾール(CAR)、ジベンゾフラン(DF)、ジベンゾチオフェン(DT)のいずれかが唯一のエネルギー源・電子供与体、不溶性の酸化鉄( )が唯一の電子受容体となるよう調製した培地を用いた集積培養後、寒天プレートを用いた分離により、鉄還元能力をもつ微生物をそれぞれ 10、1、1 種取得することに成功した。それらのうち MC01 株と命名された 1 株の 16S rDNA 配列を決定したところ *Desulfovibrio* 属細菌と 99%の同一性を有していた。*Desulfovibrio* 属の中には鉄還元を行う株の報告例もあり、さらに単環芳香族化合物分解菌の例も存在するが、カルバゾール分解を行うことを示した報告例はない。MC01 株と最も近縁な属種の標準株(16S rDNA 配列は 100%一致)をカルチャーコレクションより購入し、その株が CAR 分解能力を持たないことを確認した。MC01 株のゲノム決定のため、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を決定しており、ドラフトゲノムを得た。MC01 株を大量培養し、その休止菌体を CAR と反応させ、有機溶媒抽出とそれに続く GC-MS 解析を行ったが、現在までに、この方法を用いて CAR 嫌気分解の中間代謝物を思われる物質の候補を検出することができていない。

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 6 件)

Inoue, K., Usami, Y., Ashikawa, Y., Noguchi, H., Umeda, T., Yamagami-Ashikawa, A., Horisaki, T., Uchimura, H., Terada, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Yamane, H., Fujimoto, Z., Nojiri, H., Structural basis of the divergent oxygenation reactions catalyzed by the Rieske non-heme oxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase、Applied and Environmental Microbiology、査読有、80 巻、2014、2821-2832

DOI: 10.1128/AEM.04000-13

Okamoto, A., Saito, K., Inoue, K., Neelson, K., Hashimoto, K., Nakamura, R., Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species、Energy and Environmental Science、査読有、7 巻、2014、1357-1361

DOI: 10.1039/C3EE43674H

Inoue, K., Ito, T., Kawano, Y., Iguchi, A., Miyahara, M., Suzuki, Y., Watanabe, K., Electricity generation from cattle manure slurry by cassette-electrode microbial fuel cells、Journal of Bioscience and Bioengineering、査読有、12 巻、2013、610-615

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.011.

井上謙吾、梅田隆志、松澤淳、野尻秀昭、芳香族化合物酸素添加酵素の電子伝達システム、Journal of Environmental Biotechnology、査読有、12 巻、2012、113-121

Ashikawa, Y., Fujimoto, Z., Usami, Y., Inoue, K. et al., Structural insight into the substrate- and dioxygen-binding manner in the catalytic cycle of Rieske nonheme iron oxygen system, carbazole 1,9a-dioxygenase、BMC Structure、査読有、12 巻、2012、15

DOI:10.1186/1472-6807-12-15.

Ueki, T., Leang, C., Inoue, K., Lovley, D.R., Identification of multi-component His-Asp phosphorelay system controlling flagella and motility gene expression in *Geobacter* species、Journal of Biological Chemistry、査読有、287 巻、2012、10958-10966

DOI:10.1074/jbc.M112.345041.

[学会発表](計 12 件)

河野好裕、小椋義俊、井上謙吾、高い発電能力を有する新規 *Geobacter sulfurreducens* の比較ゲノム解析、日本農芸化学会、2014 年 3 月 28 日、東京(明治大学)

井上謙吾、微生物による鉄還元と発電 ~ *Geobacter* 属細菌の細胞外電子伝達機構 ~、日本微生物生態学会、2013 年 11 月 23 日、鹿

児島(鹿児島大学)

井上謙吾、*Geobacter* 属細菌における細胞外電子伝達機構とその応用、日本生化学会、2013 年 9 月 19 日、横浜(パシフィコ横浜)  
K. Inoue, T. Ito, Y. Kawano, A. Iguchi, M. Miyahara, Y. Suzuki, K. Watanabe、Electricity generation and treatment of water-suspended cattle manure by microbial fuel cells、4th International Microbial Fuel Cell Conference、2013 年 9 月 1 日、Cairns (Australia)

井上謙吾、徳石崇宏、河野好裕、榊原陽一、水光正仁、*Geobacter sulfurreducens* における OmcZ の修飾と分泌に関わる遺伝子の解析、日本環境バイオテクノロジー学会、2013 年 5 月 31 日、北九州

河野好裕、小椋義俊、井上謙吾、微生物燃料電池で発電能力を有する *Geobacter* 属細菌の単離、日本農芸化学会、2013 年 3 月 25 日、仙台(東北大学)

井上謙吾、微生物の電子伝達による環境汚染物質分解と発電、極限環境生物学会、2012 年 12 月 1 日、東京(日本大学)

伊藤寿宏、鈴木祥広、渡邊一哉、井上謙吾、微生物燃料電池を用いた牛糞尿からの発電と微生物群集構造解析、第 4 9 回環境工学研究フォーラム、2012 年 11 月 28 ~ 30 日、京都  
徳石崇宏、河野好裕、榊原陽一、水光正仁、井上謙吾、微生物燃料電池の発電に関わる遺伝子に関する研究、日本生物工学会、2012 年 10 月 23 ~ 26 日、神戸

河野好裕、井上謙吾、微生物燃料電池において高い発電能力を有する菌株の単離、日本生物工学会、2012 年 10 月 23 ~ 26 日、神戸

井上謙吾、廃棄物処理と発電を同時に行う微生物燃料電池、日本ゲノム微生物学会若手の会、2012 年 9 月 27 日、静岡

井上謙吾、電子伝達で環境浄化とバイオエネルギー、日本微生物生態学会若手の会、2012 年 9 月 19 日、豊橋(豊橋技術科学大学)

[図書](計 3 件)

井上謙吾、エヌ・ティー・エス出版、Bioegradative Bacteria. Structure and function of aromatic-ring hydroxylating dioxygenase system, Nojiri, H., Tsuda, M., Fukuda, M., and Kamagata, Y., eds., 2014、358

Inoue K. 他、Springer、『微生物燃料電池による発電・省エネ型廃棄物・廃水処理技術最前線』第 2 章 牛糞を原料とする微生物燃料電池の開発」p.181-188、2013、234

井上謙吾、シーエムシー出版、『月刊バイオインダストリー』「電流生成菌の発電機構と発電に影響を与える因子」p.5-10、2011、246

[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

<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/kinoue/top>

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

なし

(3) 連携研究者

なし