

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281043

研究課題名(和文) 一細胞ゲノムによる嫌気ベンゼン分解微生物群の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of Anaerobic Benzene Degrading Microbial Community by Single Cell Genomics

研究代表者

栗栖 太 (Kurusu, Futoshi)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30312979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気条件下でのベンゼンの分解のなかでも、メタン生成条件における分解については純粋分離もされておらず、分解機構がほとんどわかっていない。以前研究代表者らがベンゼン分解微生物の候補として特定した細菌Hasda-Aについて、まずは電気培養法によりさらに集積を高めた。次にセルソーティングにより1細胞を分取し、そのゲノム情報を解読した。嫌気ベンゼン分解の主要な経路であるBenzoyl CoA還元酵素の遺伝子を持っていることが明らかとなった。鉄還元条件でのベンゼン初発代謝である炭酸化、硝酸還元条件でのメチル化いずれも見つからず、まったく新規な初発代謝であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among various mechanisms of anaerobic benzene degradation, no isolates has been obtained for the degradation under methanogenic condition, and thus little is known about the degradation mechanisms. Putative benzene degrading bacterium Hasda-A, which we identified before, has been enriched by electrochemical cultivation. Single cell of Hasda-A was obtained by cell sorting and the genome sequence was analyzed. We found Benzoyl Co-A reductase gene, which is in an important pathway of anaerobic benzene degradation. Previously known initial benzene degradation metabolism, neither calboxylase gene in iron reducing condition nor gene for methylation known in nitrate reducing condition, was found. It implied the novel initial metabolism for the methanogenic enrichment culture.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：バイオレメディエーション ベンゼン シングルセルゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

ベンゼンによる地下水・土壌汚染は日本、そして世界において深刻である。現状でベンゼンの汚染は、揚水曝気法などの物理的処理を中心に行なわれている。しかしながら、ベンゼンの環境基準は地下水で 0.01mg/L と非常に厳しく、物理的な処理法では、環境基準の濃度まで低減させることは大変難しい。こうした低濃度広範囲の汚染には一般に、微生物を用いたバイオレメディエーションが有効である。ベンゼンは、好気的な分解は比較的容易に進むため、好気的な浄化手法は実用化されている。反面嫌気的な条件下では、ベンゼンは一般に安定であって分解が進みにくいことが知られており、浄化技術の開発は進んでいない。嫌気的な条件下で分解が可能となれば、地中への酸素供給が必要となる好気的な処理に比べ、低コスト・低エネルギーでの浄化が可能となる。また汚染現場は嫌気的環境である場合が多く、現場における分解を予測する上でも、嫌気条件下におけるベンゼンの挙動を把握しておく必要がある。

研究代表者は、当時の共同研究者である矢木修身(現・日本大学教授)とともに、嫌気的、特にメタン生成条件下でのベンゼン分解微生物群集を確立することに成功した。世界的に見ても、硝酸還元条件での嫌気分解の研究は純粋分離されるまでに進んでいるものの(例えば Kasai *et al. Appl Environ Microbiol* 72:3586, 2006)、硝酸還元条件以外でのベンゼン分解については極めて知見が限られている。我々以外に論文を発表しているのは硫酸還元条件の独ヘルムホルツ環境研究センターの Vogt 博士のグループと、加トロント大学の Edwards 教授のグループのみである。

続いて我々は、ベンゼン分解に関与する微生物種の特性を安定同位体プローブ法(Stable Isotope Probing, SIP 法)により行ない、*Syntrophobacteriales* 目に類するとみられる新規な微生物種 Hasda-A であることを突き止

めた(酒井ら、環境工学論文集、2006、Sakai *et al. J. Biosci. Bioeng.*, 2009)。これはメタン生成条件下でのベンゼン分解微生物種を、直接的に示した初めての報告となった。さらに若手研究(A)(H20-22)「嫌気ベンゼン分解促進因子の生理生態学的アプローチによる解明と汚染浄化手法への展開」では、Hasda-A の定量方法を開発し(Sakai *et al.* 2009)、推定される中間代謝産物の有無や温度などの条件におけるベンゼン分解を調べ、ベンゼン分解と Hasda-A の増殖が必ず対応していることを明らかにした。

また本研究の準備段階において、まったく異なる4か所の土壌からベンゼン分解微生物培養系を集積している。これら由来の異なる集積培養系についても、微生物群集構造は極めて似通っており、さらに SIP 法による解析で、すべて Hasda-A がベンゼン分解を行っていることが明らかとなっている(Noguchi *et al.*, in prep.)。このことから、メタン生成条件下におけるベンゼン分解では、Hasda-A が幅広く存在し、その役割が極めて重要であることが明らかとなってきた。

ただ一方で、これまでに嫌気ベンゼン分解のメカニズム解明を行うために純粋分離に関する検討を行い、またベンゼン汚染土壌・地下水の浄化技術へとつなげるために Hasda-A の安定的培養に関する検討を行っているものの、培養系を十分に制御できていない。既往の方法によらない新たな培養方法や、究極的には培養法によらない分離法を用いた解析を行っていく必要がある。

## 2. 研究の目的

嫌気ベンゼン分解微生物 Hasda-A の機能を解析し、ベンゼン分解の機構を明らかにするとともに、ベンゼン分解の制御因子を明らかにする。そのためのアプローチとして、一細胞ゲノミクス的手法を用いて Hasda-A のゲノム配列を得る。一細胞ゲノミクスによる解読

遺伝子数を増やすために、電気培養法を用いてベンゼン分解集積培養系における集積の高度化を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. 電気培養による分解促進

現有のベンゼン分解集積培養系において、Hasda-A の存在割合を引き上げるため、電気培養に関する検討を行った。電気培養装置を用いた培養実験に先立ち、培養における有機物分解反応を促進させる可能性を持つ電子メディエータについての検討を行った。電子メディエータの候補として、他の物質分解のための培養にも用いられるものとして、Anthraquinone-2-Sulfonate (AQS), Neutral Red (NR), Methyl Viologen (MV), Fe(III) EDTA, Co(II) EDTA を用いた。ベンゼン分解培養系に 0.5mM の濃度 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{Vial}^{-1}$ ) で添加をし、ベンゼン分解試験を試みた。ベンゼン分解培養系は、希釈培養により土壌粒子等を減じたもの (25 倍希釈の培養系を更に 5 倍希釈、0.08g-soil/20mL-medium 相当) を用いた。20 mL の培養系を全容 72 mL のバイアル瓶にテフロンラミネートされたブチルゴム栓とアルミシールを用いて嫌氣的に密封し、培養を行った。培養系は各条件 3 連で用意し、25 °C で静置培養とし、分析のつど振とう混合を行った。初期ベンゼン濃度は液相濃度で 0.3mM (25mg $\cdot\text{L}^{-1}$ ) とした。また、電子授受メディエーターもベンゼンも投与しない No add 系、滅菌した培養系にベンゼンを投与した Sterilized 系を作成した。

また、電気培養実験においては、図 1 の実験装置を用い、ベンゼン分解培養系を電気培養 (一週間程度) 行った。事件は培地 500mL に対して、10mL のベンゼン分解培養系を接種した。経時的にベンゼン濃度および酸化還元電位の測定を行なった。また電気培養終了時に培養系を採取、DNA 抽出し、Hasda-A 菌数の変化を測定した。

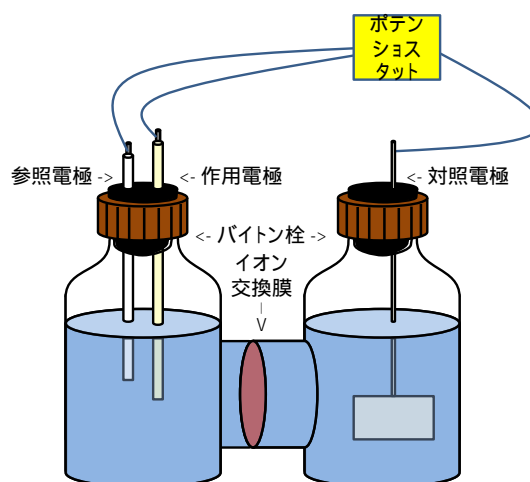


図 1. 電気培養装置

#### 3.2. 一細胞ゲノム解読

一細胞ゲノム解読は、Single Cell Genomics Center (SCGC) at Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (East Boothbay, ME, USA) との共同研究と業務の委託により実施した。できる限り Hasda-A の集積割合が高まった試料 (全細菌群集の約 1 割) を、セルソータにより平均で 1 細胞ずつ well に入るように 384 穴のマイクロプレートに分注した。各 well の細胞を溶解させたのち、Whole genome Amplification により非特異的に DNA を増幅してその後の解析を可能にした。続いて、定量 PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を標的として増幅した。その増幅曲線から 1 細胞のみが well 内に入っていると思われるものを抽出し、さらに遺伝子配列の解読を行った。その結果、Hasda-A に極めて近縁な配列を持つものが 2 つの well にあることが確認できた。

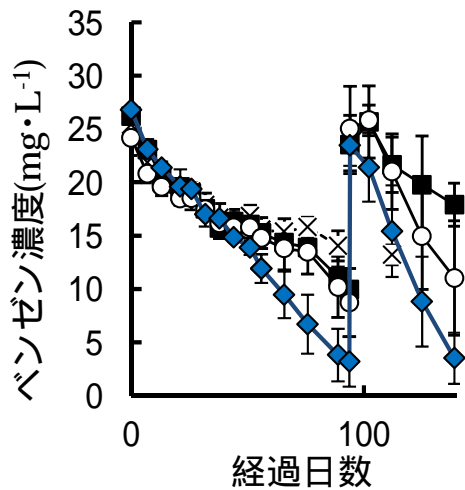
この 2 つの well におけるゲノム遺伝子に対して、Illumina NextSeq により 2x150bp のペアエンド解析を行った。得られた生シーケンスデータについて、解読シーケンスの品質管理などを行ったのちにアセンブリを行い、1000bp 以上のコンティグを以後の解析に用いた。ゲノムのアノテーションは PROKKA を用い、Blast や HMMER による相同性検索を UniRef90 や IMG、COG、Pfam、TIGRfam、KEGG のデータベースに対して実施した。ゲ

ノムの完成度は、checkM により、保存されている1コピーのマーカ遺伝子の存在から推定した。

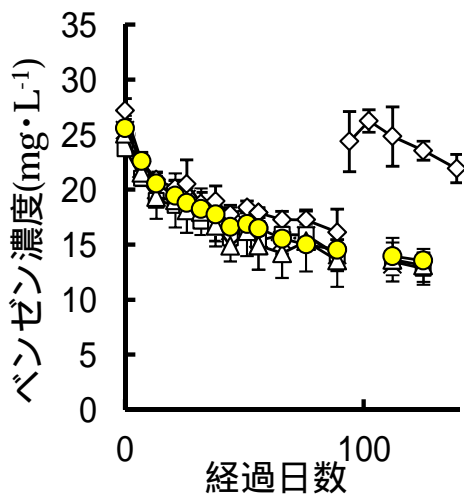
#### 4. 研究成果

##### 4.1. 集積培養系の高度化

電子メディエータを用いた分解促進実験においては、AQS, NR, MV についてはベンゼン分解を阻害する結果となり、これらがベンゼン分解集積培養系には不適であることを明らかにした。一方、Fe(III) EDTA ではわずかに、Co(II) EDTA では明確な促進効果がみられた(図2)。これらの金属イオンが、ベンゼン分解の電子メディエータとして有効である可能性が示された。

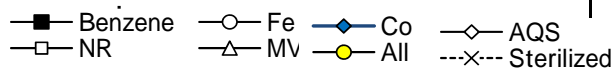


(a) Benzene, Fe, Co 系



(b) AQS, NR, MV, All, Sterilized 系

図2. 電子メディエータの影響



次に、推定代謝産物の添加による影響を見る試験を行った。有効性が示された電子メディエータであるコバルトを加え、参照電極に対し-400mV の電位を付加した実験を行った。その結果、電気培養により培養槽中の酸化還元電位を制御できることが明らかとなり、ベンゼン分解を促進するために必要な環境条件を整えることが可能であることが明らかとなった。

さらに、微生物電気化学分解装置による嫌気ベンゼン分解を実施した。電気培養装置の改良を行い、陰極側の電極表面積を大きくして電子授受の効率を上げて電池の負極とし、陽極側に電子受容体を用いて電池の正極とし、微生物電気化学分解装置として実験を行った。既往の微生物電気化学分解によるベンゼン分解の研究では、正極側の電子受容体に酸素を用いている。しかしながら正負極を隔離しているイオン交換膜が酸素透過性があることが指摘されており、負極におけるベンゼン分解が単に負極槽に拡散した酸素による好気分解である可能性がある。そこで本研究では、フェリシアン化カリウムを正極槽の電子受容体として試験を行った。その結果、負極側でのベンゼン分解に伴い、回路に電流が流れる現象が繰り返し見られた。2~7mg/L のベンゼンが8~20日間程度で1mg/L 以下まで減少した(図3)。ベンゼンから取り出された電子が実際に負極電極に受け渡されているかどうかは明確にはならなかったものの、微生物燃料電池装置においてもベンゼン分解を促進させることが可能であることが示された。

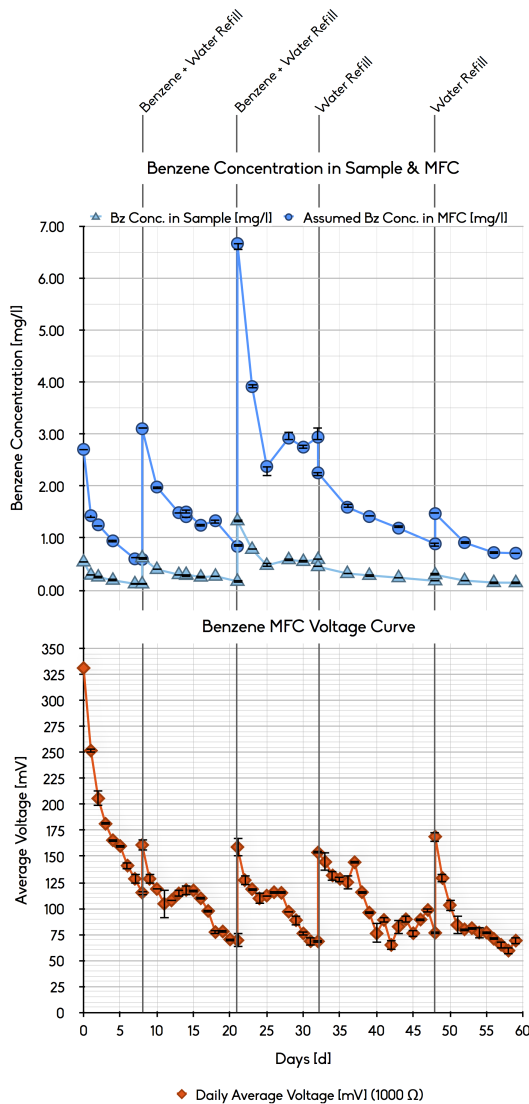


図3．微生物電気化学分解装置によるベンゼンの分解と電圧の変化

#### 4.2.1 細胞ゲノム解読

また、ベンゼン分解集積培養系を用いて、セルソーティングによる1細胞分離を行い、得られた Hasda-A ゲノム DNA の増幅産物のうち、異なる2つの細胞に由来するものの配列について、次世代シーケンサにより解読した。各ゲノム配列それぞれ約2000万bp分の配列をアセンブリしたところ、それぞれ120、85のコンティグ、約150万、110万bpの塩基配列となった。また、平均のコンティグ長はともに12,000bp程度であった。これら2つのゲノム配列をさらに統合したところ、182コンティグ、188万bpの配列となった。

得られた配列に含まれる housekeeping 遺伝子の数から、全ゲノム配列の73%程度配列であることが推定された。つづいて、ソフトウェア RAST を用いて、遺伝子のアノテーションを行った。その結果、1774種の遺伝子、1000強のタンパク質からなっていることがわかった。これらの情報を表1にまとめる。

表1．ゲノム解読結果のまとめ

パラメータ	数値
コンティグ数	182
全長	1,884,059 bp
最大コンティグ長	84,397 bp
G+C 含量	43.74%
遺伝子数	1774
rRNA 遺伝子数	3
tRNA 遺伝子数	23
ゲノム完成度	72.97%

これらの中には、たとえば、異化的硫酸還元に関与する酵素の遺伝子群として、AprAB や、DsrAB を持つことが明らかとなった。このことから、Hasda-A は硫酸還元能をもつ可能性が示唆された。また、安息香酸の分解に関与する benzoyl CoA reductase の遺伝子 BamF-I も見出された(図4)。このことから、Hasda-A は少なくともベンゼン分解の下流に位置する安息香酸分解には関与している可能性が強まった。一方で、これまでに知られている嫌気ベンゼンの初発分解酵素、すなわち鉄還元条件における benzene carboxylase 遺伝子、また硝酸還元条件におけるメチル化に関与する遺伝子のいずれについても、近縁な遺伝子は含んでいなかった。今回得られたゲノムはカバー率が73%であったことから、残りの27%に含まれている可能性は残されているが、Hasda-A によるベンゼン分解はこれまでに知られていない新規な代謝である可能性も比較的高いといえる。今後、メタゲノム解析など他のアプローチで得られた配列と統合す

ること、Hasda-A のゲノム配列を完全に解読することが期待される。そのためにも、本研究における集積の高度化は有用である。

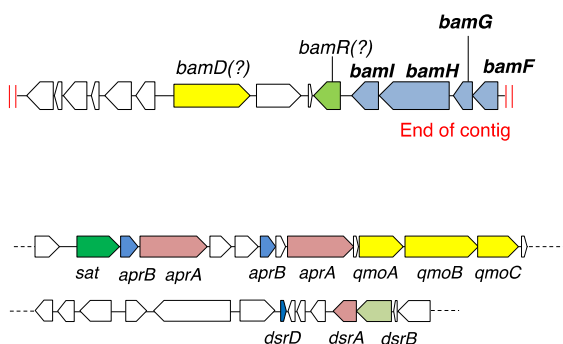


図4 . Hasda-A ドラフトゲノム上に存在が確認された Benzoyl CoA reductase (上) と以下の硫酸還元酵素 AprAB および DsrAB (下)

#### 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 2 件)

Noguchi, M., Kurisu, F., Sekiguchi, Y., Kasuga, I. and Furumai, H. (2016) Microbial community structure of methanogenic benzene-degrading cultures enriched from five different sediments. The Journal of General and Applied Microbiology (accepted).

Masumoto, H., Kurisu, F., Kasuga, I. and Furumai, H. (2014) Benzene and toluene biodegradation potential in methanogenic cultures established by feeding benzene, toluene and their mixture. Journal of Water and Environment Technology 12(2), 77-86.

〔学会発表〕(計 6 件)

野口愛, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明 (2013) 土壌・底泥を起源とする5種のメタン生成ベンゼン分解集積培養系における微生物群集構造の比較, p. 85, 鹿児島市.

Noguchi, M., Kurisu, F., Kasuga, I. and Furumai, H. (2013) DNA stable isotope

probing of benzene degrading bacteria in a methanogenic enrichment culture originated from river sediment, Ann Arbor, MI.

舩本弘毅, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明 (2014) 鉄剤添加によるメタン生成嫌気ベンゼン微生物分解の促進, p. 210, 和歌山市.

舩本弘毅, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明 (2014) メタン生成嫌気ベンゼン分解経路の諸反応に及ぼす温度の影響, p. 210, 仙台市.

MASUMOTO, H., KURISU, F., KASUGA, I. and FURUMAI, H. (2014) Stimulation of anaerobic benzene-degrading culture with external redox mediators under methanogenic condition, Seoul, Korea.

藤原直也, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明 (2015) クエン酸添加によるメタン生成ベンゼン分解の促進に関する検討, pp. 69-71, 郡山市.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.t.u-tokyo.ac.jp/epage/public/engpower/departments/urban/>

[http://www.recwet.t.u-tokyo.ac.jp/furumai/lab/member/kurisu\\_j.html](http://www.recwet.t.u-tokyo.ac.jp/furumai/lab/member/kurisu_j.html)

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

栗栖太 (KURISU, Futoshi)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号：30312979

##### (2) 研究分担者

春日郁朗 (KASUGA, Ikuro)  
東京大学・大学院工学系研究科・講師  
研究者番号：20431794