

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25340074

研究課題名(和文) 環形動物糞からの難分解性有機化合物分解酵素の単離と環境浄化への応用

研究課題名(英文) Isolation of enzymes for persistent organic compounds from the excrement of annelids, and their application to bioremediation.

研究代表者

齋藤 敦子 (SAITO, Atsuko)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：50424718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：環形動物糞中に含まれる、難分解性有機化合物分解酵素の単離と、環境浄化への応用を目的として実験を行った。イワムシ糞中より、ピレン等の多環芳香族炭化水素を分解可能な数種の微生物を単離し、*in vitro*での分解実験を行った結果、それらの微生物によるピレンの分解と、分解生成物であるヒドロキシピレンを確認できた。また、これらの微生物を、実際に多環芳香族炭化水素が高濃度である底質に作用させたが、短時間での濃度の低下は確認されず、環境浄化への応用については、更なる条件検討が必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is isolation of enzymes for persistent organic compounds, from the excrement of annelids, and their application to bioremediation. Some microorganisms which can degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as pyrene, were isolated from the excrement of an annelid, *Iwamushi*. As a result of *in vitro* degradation of pyrene by these isolates, a metabolite of pyrene, 1-hydroxypyrene, was detected from the medium, which was indicative of pyrene degradation. Moreover, although these microorganisms were added to the sediment containing high-concentration of PAHs, degradation of PAHs was not observed in several hours. Further works will be required for the application to bioremediation with these microorganisms isolated from the excrement of an annelid, in this study.

研究分野：環境分析化学

キーワード：多環芳香族炭化水素 環形動物 分解酵素 イワムシ 糞塊 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

多環芳香族炭化水素(PAHs)は、自動車の排気ガス、家庭用暖房機器やタンカー事故による海洋への重油の流出などにより環境中に排出・拡散される。PAHsには、ベンゾ[a]ピレンの様に、強い発癌性を持つものや内分泌攪乱作用を示すものがあり、環境中のPAHsの濃度と挙動を明らかにすることは、人体への影響や環境保全を考える上で重要である。PAHsは疎水性が高いことから、河川や海域の底質に多く分布することが知られている。研究代表者は、干潟環境におけるPAHsの物質循環挙動について調べることを目的として、千葉県市原市の養老川河口干潟において底質、環形動物(ゴカイ及びイワムシ)とそれらの糞塊を採取し、PAHsの定量を行ってきた。その過程で、環形動物イワムシ糞中のPAHs濃度が、底質中と比べて約90倍高濃度であること、更にこの糞を2時間放置することで、濃度が半減する特異な現象を見出した。これらの現象については、平成21年度から23年度に科学研究費の助成を受け、高濃度濃縮については、イワムシの摂食対象物に起因すること、また高速分解については、イワムシ糞中の酵素の働きによって起こることを明らかに出来た。この分解反応は基質選択性が低く、3環から5環の8種PAHsをほぼ同じ速度で濃度低下させることや、他の難分解性環境汚染物質である陽イオン界面活性剤も同様に低下させることを確認しているが、この酵素の由来(イワムシにより産出され糞中へと放出されるのか、糞中微生物により産出されるのか)については未知であった。したがって、本研究で、イワムシ糞中酵素(あるいは微生物)の単離・同定を行い、実試料に対する作用を調べることは、数種の難分解性有機汚染物質を同時に高速除去するような環境浄化技術の開発に繋がると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、イワムシ糞中に存在する、難分解性有機化合物の高速分解酵素の抽出、あるいはそのような酵素を産生する微生物の単離・同定と、それらを用いた環境試料中の汚染物質の分解実験・評価を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) イワムシ糞中微生物の単離・培養と同定  
千葉県市原市養老川河口干潟にて採取したイワムシ糞を、炭素源としてPAHsの一つであるピレンのみを含む液体及び寒天選択培地に添加し、複数回植え継ぎ後、ピレンを分解可能な微生物A~Dを単離した。その後、100 ppm又は50 ppmのピレンを含む寒天選択培地上で継代し、植え継ぎ後1週間の微生物を、各実験に用いた。単離した微生物A~Dは、16SリボソームRNA遺伝子(全長1511bp)による菌種同定を行った。また、微生物Dについては、*rpoB*遺伝子(菌種間多

様性が比較的大きい;全長3507bp)による菌種同定と、ドラフトゲノム全体(約4.9Mbp)を用いた全ゲノム解析を行った。

### (2) イワムシ糞由来微生物によるピレン分解の経時変化の測定

50 ppmピレン含有寒天培地で1週間培養した微生物を、ピレンを含まない液体培地に植え継ぎ、25℃で10日間振とう培養を行った。一定時間経過ごとに、培地中の目的物質を、溶媒抽出し、薄層クロマトグラフィーとデジタルカメラ(TLC-DC)を用いた簡易分析法でピレンと分解生成物の検出を行った後、蛍光検出HPLC(Agilent Technologies, 1260 Infinity)及びGC-MS(SIMADZU, QP-2010)を用いて、培地中のピレン濃度の経時変化を測定した。また、分解生成物(代謝生成物)の同定には、蛍光分光光度計(SIMADZU, FP-6500)、蛍光検出HPLC、LC-MS(SIMADZU, LC-MS2010)を用いた。

### (3) イワムシ糞由来微生物による底質試料中のPAHs及び界面活性剤の分解実験

単離した微生物を用いて、千葉県木更津市新潮見橋下(Fig. 2)で採取した底質試料中のPAHs及び界面活性剤の分解実験を行った。PAHsの定量にはGC-MSを、界面活性剤の定量にはLC-MSを使用した。

### (4) イワムシ糞由来微生物による8種PAHsの分解実験

LB寒天培地上で1週間培養したイワムシ糞由来微生物を、液体培地が入った遠沈管に懸濁させ、8種PAHs(フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、クリセン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレン、ペリレン)各2.5 µgを付着させたガラスビーズ(直径2 mm)7 gが入ったバイアル瓶に10 mL加えた後、室温で静置又は、エアポンプで2~72時間曝気を行った。その後、系中PAHs濃度をGC-MSにより定量した。

## 4. 研究成果

(1) イワムシ糞中微生物の単離・培養と同定  
炭素源としてピレンのみを含む選択培地を用いて、イワムシ糞中より4種のピレン分解微生物A~Dを単離することが出来た。微生物A~Dは、DNA解析の結果、A, B, Dが*Gordonia*属、Cが*Pseudomonas*属であることが分かった。これらの微生物種は、いずれも石油分解微生物として、PAHsを分解可能であることが報告されている。また、微生物Dについて、16SリボソームRNA遺伝子による菌種同定を試みたところ、データベース上に存在しない菌種であることが分かった。これらの結果より、イワムシ糞中に複数種の石油分解菌が存在していることが確認された。したがって、以降の研究は、これらの単離された微生物を用いて行うことにした。得られたDNAシーケンスデータは、

GenBank に登録を行った (微生物 D: TUES-130522, LC107148 (16S rRNA)及び LC107149 (*rpoB*); 微生物 A: TUES-140322-a, LC107145(16S rRNA); 微生物 B: TUES-140322-b, LC107146(16S rRNA); 微生物 C: TUES-140322-c, LC107147(16S rRNA) )。

#### (2) イワムシ糞由来微生物によるピレン分解の経時変化の測定

単離された微生物を用いて、ピレン分解の経時変化を測定したところ、微生物 B では、添加直後からピレンは速やかに低下し始め、9 日間で約 70%の減少が見られた (残存率 30% ; 半減期約 4 日)。また、微生物 A, D, C を添加した系では、培養液中のピレン濃度は 1 日後に 80%まで減少し、その後は緩やかに減少した (半減期 10 日以上)。また、微生物 A~D をピレン含有培地で培養し、溶媒抽出後蛍光分光光度計、蛍光検出 HPLC 及び LC-MS で分析したところ、ピレンの代謝生成物の一つであるヒドロキシピレンが検出され、これらの微生物がピレンを代謝分解し、ヒドロキシピレンを生成することが確認された。これまで、ピレン又はベンゾ[a]ピレンを吸着させたガラスビーズにイワムシ糞をそのまま投入し、本実験同様 *in vitro* のピレン又はベンゾ[a]ピレンの分解実験を行ったところ、糞中での変化と同様に、ビーズ上のピレン及びベンゾ[a]ピレンが約 2 時間で半減するという結果を得ている。しかしながら、本研究で微生物を単体で用いた場合には、2 時間でのピレンの半減を再現することが出来なかった。したがって、糞中での PAHs 等難分解性有機汚染物質の高速分解は、糞に含まれるマトリクスや、多様な微生物群の存在による相乗効果で起こる可能性が示唆された。マトリクスの影響については、栄養源として寒天培地にピレン以外にグルコースを入れて同様の実験を行った場合に、半減期が短縮される結果を一旦は得たが、繰り返し実験での、再現性を確認することが出来なかった。

#### (3) イワムシ糞由来微生物による底質試料中の PAHs 及び界面活性剤の分解実験

本研究で単離したイワムシ糞由来微生物を用いて、実際の底質環境の浄化が可能であるか調べるために、千葉県木更津市新潮見橋下で採取した底質試料に、微生物 A~D の混合液を添加後 0, 2, 18, 24, 48, 72 時間放置し、微生物添加ありの系と添加なしの系に含まれる PAHs 及び界面活性剤の残存率の経時変化を調べた。採取した底質は、これらの物質を高濃度を含むことが本研究室の過去の研究から分かっている。微生物 A~D を添加後、底質中の界面活性剤濃度は 2 時間で 78%まで減少し、約 15 時間で半減、72 時間で 25~40%まで減少した。この変化は、微生物を添加しなかった系とほぼ等しく、元々底質

中に存在していた微生物による界面活性剤分解の結果と考えた。界面活性剤の分解に関わる微生物は、一般的に好気性であることが知られているが、採取した河川底質深部は酸素が少なく、界面活性剤が分解されずに蓄積されやすい状況にあったと思われる。試料採取後に、底質が室内空気に触れ好气的環境に変わったため、好気性微生物が活性化され界面活性剤の分解が促進されたと考えられた。また、底質中の PAHs 濃度は、微生物添加の有無によらず、放置による有意な濃度変化を示さなかった。これらの結果より、微生物 A~D を実際の底質試料にただ添加するだけでは、これらの難分解性化合物の分解能力を発揮させることができないことが分かった。また、界面活性剤の分解については、これらの微生物がピレンを含む選択培地を用いて単離したものであることから、その分解能力を持たない可能性も考えられた。

#### (4) イワムシ糞由来微生物による 8 種 PAHs の分解実験

LB 寒天培地上で培養した微生物 B を、8 種 PAHs を付着させたビーズを含む液体培地に添加し、2 時間室温で静置したところ、8 種の PAHs はそれぞれ約 7%の減少が確認され、微生物 B が、ピレンの他にも複数の PAHs 分解能を持つことが分かった。また、曝気を行った系では、微生物の有無に関わらず、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレンの残存率が、2 時間後に約 20-70%まで低下した。この 4 種類の PAHs は、対象とした PAHs の中でも蒸気圧が高く揮発しやすい性質を持つため、曝気により揮発し、系外に移行したと考えられた。これに対し、クリセン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレン、ペリレンの 4 種類の PAHs は、曝気を行った系で、微生物を加えた場合にのみ、2 時間で約 80%まで残存率が低下することが確認され、曝気が微生物 B による PAHs の分解を促進させることが明らかになった。また 3 日間連続して曝気を行った結果、クリセンとペリレンは約 60~70%、ベンゾ[b]フルオランテンとベンゾ[a]ピレンは約 50%の減少が確認され、微生物 B は、クリセンとペリレンをより効率的に分解することが分かった。

#### 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 1 件)

Mayu Onozato, Atsuko Nishigaki, and Kenji Okoshi, Polycyclic aromatic hydrocarbons in Sediments and Bivalves on the Pacific Coast of Japan: Influence of Tsunami and Fire, PLoS ONE 11(5), 査読有: e0156447.(2016)

DOI: 10.1371/journal.pone.0156447

〔学会発表〕(計 9 件)

Yoshito Tsuchiyama, Atsuko Saito,  
Biodegradation of PAHs by  
Microorganisms Isolated from the  
Excrement of *Marphysa sanguinea*, 10<sup>th</sup>  
Joint Seminar on Biomedical Sciences,  
2017 年

Makoto Fuse, Atsuko Saito,  
Concentration of PAHs in the Excrement of  
Annelids, 10<sup>th</sup> Joint Seminar on Biomedical  
Sciences, 2017 年

Michel Grimbergen, Atsuko Saito,  
Simultaneous Quantification of  
Surfactants in Environmental Samples by  
LC-MS, 10<sup>th</sup> Joint Seminar on Biomedical  
Sciences, 2017 年

土山義人、西垣敦子、イワムシ糞由来微生物  
による多環芳香族炭化水素の分解挙動、日  
本分析化学会第 66 年会、2017 年

Michel Grimbergen, Atsuko Nishigaki,  
Simultaneous determination of anionic,  
cationic and nonionic surfactants in  
environmental samples by liquid  
chromatography mass spectrometry, 分離  
技術年会 2016, 2016 年

齋藤敦子、イワムシ糞由来微生物による有  
機環境汚染物質の分解挙動の研究、4 学部合  
同学術集会、2016 年

Atsuko Nishigaki, Degradation of  
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by  
microorganisms isolated from the  
excrement of *Marphysa sanguinea*, 25<sup>th</sup>  
International Symposium on Polycyclic  
Aromatic Compounds, 2015 年

今井玲伽、齋藤敦子、イワムシ糞中微生物  
による環境ア船物質の分解挙動の解析、4 学  
部合同学術集会、2014 年

小野里磨優、西垣敦子、イワムシ糞中にお  
けるピレンの分解挙動の解明、日本化学会第  
94 春季年会、2014 年

〔その他〕

[http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/env/saito/re  
search/theme02.html](http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/env/saito/research/theme02.html)

「干潟の生物を介した PAHs の濃縮と分解挙  
動の解明」

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 敦子 (SAITO Atsuko)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：50424718

(3) 連携研究者

小野里 磨優 (ONOZATO Mayu)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号：50610094