

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550051

研究課題名(和文) 微生物間代謝ネットワークを考慮した新しい生分解性評価の試み

研究課題名(英文) Evaluation on Biodegradability Considering Metabolic Network of Microorganisms

研究代表者

亀屋 隆志 (KAMEYA, TAKASHI)

横浜国立大学・環境情報研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70262467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微生物種間における基質の授受を加味した微生物生態系全体における物質フローを評価することにより、微生物生態系全体としての化学物質分解機構を解明することを目的とした。GC/MS等を用いた微生物の代謝物質を分析する方法を整備した。環境中において検出される化学物質に対して、分解試験を行いその分解物および微生物細胞内の代謝物の変化をモニターした。また、RNA-SIP法により、安定同位体標識した化学物質を取り込む微生物の検出を行った。

研究成果の概要(英文)：To understand biodegradation pathway of environmental contaminants with microbial metabolic activity, analytical methods for microbial metabolites was established using GC/MS (MS) and LC/MS. Aniline was selected as a target chemical because it have been found in natural environment and its isotope is commercially available. Microbial metabolites in activated sludge were monitored during aniline degradation. And degradation conditions (pH, temperature) were changed. Change in conditions resulted in difference of starting points in aniline degradation. Also, both amount of catechol, intermediates of aniline biodegradation, and metabolites in central metabolites differed among degradation conditions even in the same degradation degree. RNA-SIP (stable isotope probing) revealed that Proteobacteria and Bacteroidetes mainly assimilate ^{13}C derived from ^{13}C aniline.

研究分野：環境安全学

キーワード：代謝解析 GC/MS LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

国際的に管理が強化され、我が国においても化管法等の関連法において対象物質として指定される化学物質は、生態毒性レベルが明らかにされておらず、環境中での挙動も不明である。そのため、化学物質の加水分解、光分解、生分解等による分解生成物については、分解物の構造、生成経路も不明である。生態毒性レベル、化学物質の各種分解性は OECD テストガイドラインに準じ評価可能であり、分解生成物の構造を決定することができる。しかしながら、生分解性試験については、微生物細胞内において分解(代謝)されるために、最終的に残存した分解生成物は同定できるものの、中間代謝物は同定されず、代謝経路を決定することができない。さらに、化学物質によっては、単一微生物種ではなく共生微生物系において分解される可能性があるものの、化学物質分解に関与する微生物が同定されることはなく、環境微生物学・微生物生態学分野におけるこれらの重要な知見は得られない。その一方で、近年、安定同位体を活用した代謝解析・微生物生態解析が盛んに行われており、同位体標識された化学物質を利用し、同位体標識された分解生成物を同定・定量することで微生物内部の中間代謝物の同定およびそのフラックス解析が可能であり、大腸菌、酵母等による有用物質生産の効率化等へ応用されている。また、化学物質に由来する同位体により標識された DNA、RNA を解析する Stable Isotope Probing (SIP) 法により、化学物質分解に関与する微生物の特定が可能であり、環境汚染物質分解に関与する微生物が同定されている。

2. 研究の目的

国際化学物質管理戦略(2006年)等の化学物質のリスクを2020年までに最小化する国際的取組に協調するため、化学物質の生分解性を微生物代謝ネットワークに基づき評価する。すなわち、生分解性試験による分解生成物の同定、生態毒性評価といった既存の分析手法に加え、同位体標識した化学物質をマーカーとして、生分解に関与する微生物を網羅的に検出・同定すると同時に、微生物種間における基質の授受を加味した微生物生態系全体における物質フローを評価することにより、微生物生態系全体としての化学物質分解機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生態毒性を示す化学物質および化学物質分解生成物の特定

本研究では、環境中に存在しうる化学物質であり、かつ、同位体標識物質が入手可能である化学物質を対象としている。そこで、本研究の目的に適した化学物質を下記の手順で選定した。

Cambridge Isotope Laboratory 社 (CIL

社)製品の中で、Environment Contaminant に分類される ^{13}C 標識化合物をリストアップした。

リストアップした物質の中で、我々がこれまでに実施している神奈川県一般環境を中心とした環境モニタリングにおいて測定対象としているかを調査した。

測定対象として分析していることが確認できた物質について、環境中での検出の有無を確認した。

(2) 分解経路既知の化学物質を用いた分解機構解明のための解析条件の最適化

化学物質の生分解過程において、化学物質、あるいは、細胞外酵素により一定の分解を受けた分解物は、微生物の細胞内に取り込まれ、代謝される。これらの代謝物質を網羅的に解析するため、GC/MS、GC/MS/MS、LC/MS/MS を用いた分析法を整備した。

標準物質を用いた分析法の整備

微生物の中心的な代謝経路である解糖系、TCA 回路、アミノ酸の微生物代謝において重要な役割を担う代謝物質の標準物質を入手し、GC/MS (島津製作所 QP2010-GCMS plus)、GC/MS/MS (島津製作所 GCMS-TQ8040)、LC/MS/MS (サーモサイエンティフィック TSQ Quantum™ Access MAX) における分析感度を確認した。また、本研究で最終的に分析対象としたアニリンおよびその分解物についても分析感度を確認した。なお、GC/MS および GC/MS/MS を用いた分析を行う際には標準物質に対して、メトキシ化・トリメチルシリル化による誘導体化を行った後に分析した。

大腸菌を用いた分析感度の確認

整備した方法により実際に微生物から抽出した代謝物が測定できるかについて、大腸菌を用いて確認した。大腸菌 *Escherichia coli* を LB 培地にて培養し、培養開始 24 時間後において、コールドメタノール法により、菌体活動を停止させた。停止させた菌体からクロロホルム/水を添加し、細胞内代謝物を抽出し、GC/MS、GC/MS/MS、LC/MS/MS により分析した。

(3) 環境中に存在する化学物質を用いた分解機構の評価

(1) で選定した化学物質の中で、環境中に存在し、かつ、分析に十分な量を確保できる物質はアニリンのみであった。そこで、アニリン分解過程における中間代謝物の変化を評価した。また、安定同位体を用いて SIP 法を行い、アニリン分解に関与する微生物を特定した。

アニリン分解における環境微生物の代謝物質の検出

アニリン分解過程における中間代謝物質および微生物代謝において重要な役割を担う代謝物質を評価した。クーロメータを用い、

研究室において培養した活性汚泥 30 mg/L にアニリンを 100 mg/L となるように添加し、分解試験を実施した。

また、環境変化に伴う、代謝物質の変化をモニターすることを目的として pH、温度を変化させて試験を行った。代謝物質の分析は、アニリンの分解率 10%、40%、60% となった段階で行った。なお、分解率は酸素消費率より決定した。

アニリン分解に關与する微生物の特定

安定同位体のアニリンを用いて、(1) と同様に、活性汚泥 30 mg/L にアニリンを 100 mg/L となるように添加して分解試験を実施した。アニリンが分解された時点において、活性汚泥を回収し、RNA-SIP を実施した。抽出 RNA に対して CsTFA を用いた密度勾配遠心分離を行い、フラクションを回収した。各フラクションに含まれる 16S rRNA 量を把握するため、各フラクションの RNA を逆転写により cDNA を合成し、リアルタイム PCR を行った。また、密度勾配が直線的に得られたフラクションに対して真正細菌を標的とした次世代シーケンス解析を行い、アニリン由来の ¹³C を RNA に取り込んだ微生物を特定した。

4. 研究成果

(1) 生態毒性を示す化学物質および化学物質分解生成物の特定

CIL 社の取り扱う ¹³C 標識化合物の中で Environment Contaminant に分類される物質は 315 物質であった。その中で、我々が神奈川県においてモニタリングを実施している物質は 108 物質であったことから、環境モニタリングデータを調査し、環境中での検出の有無を確認した。

表 1 安定同位体が入手できる化学物質で、一般環境で検出された化学物質

化学物質	環境中濃度 [ng/L]
アニリン	7.9 - 40.8
フェノール	31.4 - 78.1
DEHA	29.8 - 83.5
ビスフェノール A	9.8 - 21.5
コレステロール	110 - 590
クロロベンゼン	12.6 - 22.3
カフェイン	61.8 - 512

その結果、アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA)、ビスフェノール A、コレステロール、クロロベンゼン (3 異性体)、フェノール、アニリン、カフェインの 9 物質が環境中において検出されていることが確認できた。これらの化学物質のうち、分析必要量が入手できる化学物質はフェノールおよびアニリンであった。フェノール、アニリンともに同

一の分解経路で、既知であるが、実際に一般環境中に存在するという点からこれらの化学物質を対象とし、既に SIP 法による解析が行われているフェノールではなく、複合微生物系における分解微生物が評価されていないアニリンを対象物質とした。

(2) 分解経路既知の化学物質を用いた分解機構解明のための解析条件の最適化

標準物質を用いた分析法の整備

標準物質を用い GC/MS 等を利用し、分析法の整備を行った。GC/MS/MS における結果を図 1 に示した。分析法を検討した結果、解糖系 (2 物質)、TCA 回路 (11 物質)、アミノ酸 (20 物質)、補酵素等の微生物代謝において重要な役割を担う物質 53 物質について検出可能とする分析法を整備した。

また、アニリンの分解物については、アニリンから最初に生成されるカテコール、続くムコン酸を検出することが可能であった。なお、ムコン酸以降の分解物は標準物質が入手できなかった。

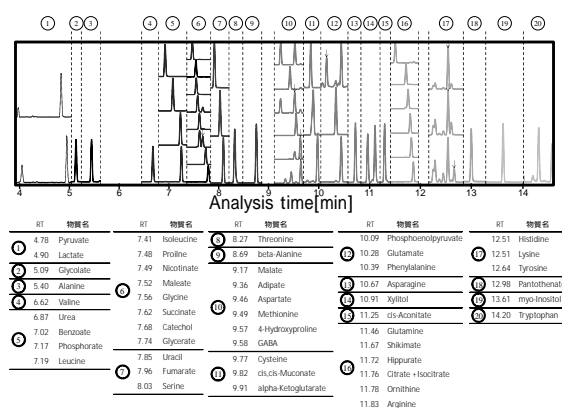


図 1 GC/MS/MS における標準物質のクロマトグラム

大腸菌を用いた分析感度の確認

微生物の代謝解析の報告の多い大腸菌を用いて、整備した分析法により代謝物が検出可能であるか確認した。細胞の回収、代謝物の抽出、分析までの一連の操作について再現性を確認した結果、25 物質の代謝物質が検出可能であった。

(3) 環境中に存在する化学物質を用いた分解機構の評価

アニリン分解における環境微生物の代謝物質の検出

アニリン分解における代謝物質の変化をモニタリングした。また、人為的に環境 (pH、温度) を変化させることによる微生物集団全体の代謝変化をモニタリングした。

図 2 に酸素消費率の経時変化を示した。pH、温度を変化させることにより、アニリンの分解が開始するタイミングが大きく変化し、分解速度も変化が認められた。

また、図 3 にはカテコールの存在量を示した。カテコールはアニリンの生分解過程における最初の分解物である。酸素消費率が同一であっても、環境条件の違いにより、カテコールの蓄積状況は変化しており、同一の汚泥であっても代謝が変化していることが分かった。

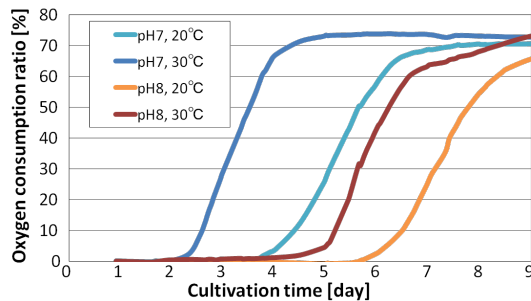


図 2 アニリン分解における酸素消費率の経時変化

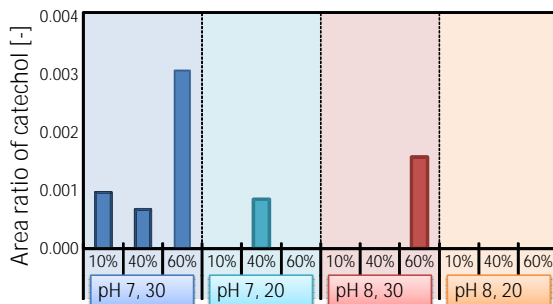


図 3 異なる条件下におけるカテコールの蓄積状況

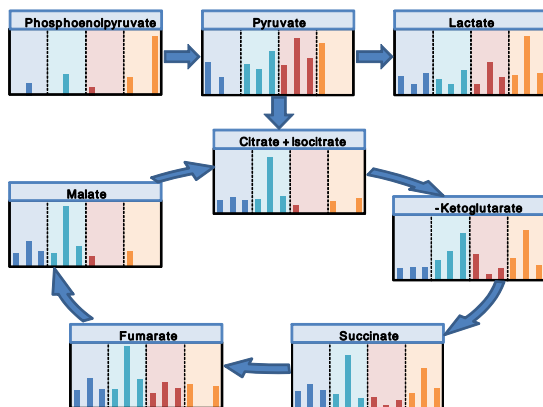


図 4 アニリン分解率が 10%の段階における環境条件と中央代謝物質量的変化

同様に、中央代謝の物質量的も変化していることが確認できた(図 4)。アニリン分解と中央代謝との具体的な関わりについては不明であるが、分解試験において添加した炭素源はアニリンのみであることを考慮す

ると、外的環境への応答に対応するためにアニリンの利用性をシフトさせたと考えられる。また、外的環境に反応して、アニリン分解を担う微生物種が変化したとも考えられる。

アニリン分解に関する微生物の特定

安定同位体のアニリンを用いて、RNA-SIPを実施し、アニリン分解に関する微生物を特定した。酸素消費率が 88%の時点において活性汚泥から RNA を抽出し、密度勾配遠心分離を行った。密度勾配が直線的となっている 11 のフラクションに対して全真正細菌に対してリアルタイム PCR を行った(図 5)。その結果、フラクション番号 3 (密度 1.815 /mL) に 16S rRNA が多く含まれることがわかった。文献値と比較すると密度 1.815 程度には ^{13}C -RNA が多く含まれると考えられた。 ^{12}C -RNA が多く含まれるフラクションを特定することはできなかった。これはアニリンが分解されており、活性汚泥に存在する多くの微生物の RNA が ^{13}C 標識されたためと考えられる。

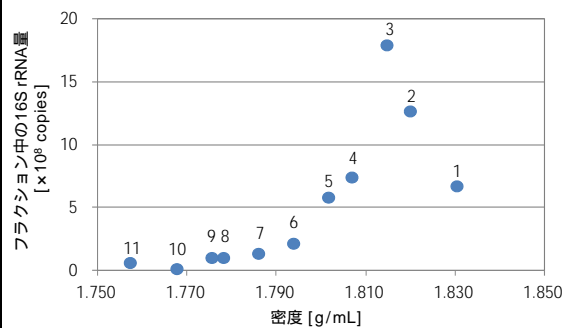


図 5 フラクションの密度と RNA 量の関係 (グラフ内の数字はフラクション番号)

そこで、すべてのフラクションに対して次世代シーケンズを行い、フラクション 3 およびフラクション 3 より密度の大きいフラクション 1、2 において検出された微生物をアニリン由来の ^{13}C を RNA に取り込んだ微生物とした。

フラクションに存在する微生物をすべて合わせると 3,883 種の微生物が存在することが確認でき、活性汚泥にはおよそ 4,000 種以上の微生物が存在していることがわかった。このうち、いずれかのフラクションにおいて存在割合が 1%以上の微生物は 40 種であった。一方、 ^{13}C -RNA が多く含まれると予想されるフラクションにおいては、1,199 種の微生物が存在しており、存在割合が 1%以上の微生物は 28 種存在した。その内訳を図 6 に示した。Proteobacteria、Bacteroidetes の割合が多く、特に Proteobacteria の中でも Comamonadaceae が多かった。これらの最近の中には、ベンゼン、トルエン等を分解する微生物が報告されており、アニリンを直接分解する微生物が含まれると考えられた。

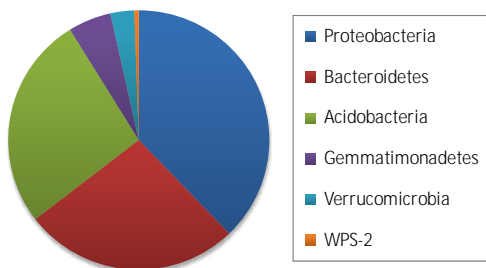


図6 アニリン由来の¹³CをRNAに取り込んだ微生物の内訳
(グラフ内の数字はフラクション番号)

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

鈴木翔, 近藤貴志, 亀屋隆志, 小林剛, 藤江幸一: アニリン分解時における細胞内の TCA 回路、アミノ酸等の代謝物の測定, 第 48 回日本水環境学会年会, 仙台 (2014 年 3 月).

小沼一元, 近藤貴志, 亀屋隆志, 藤江幸一, 鈴木翔: GC/MS 一斉分析による化学物質の生分解と生物代謝の関係解析, 日本水処理生物学会第 50 回大会, 神戸 (2013 年 11 月).

近藤貴志, 松本祐典, 小沼一元, 亀屋隆志, 松下拓, 高梨啓和: 環境中における化学物質の構造変化体と微生物代謝との関連性, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島 (2013 年 9 月).

Y. Matsumoto, T. Kondo, K. Konuma, T. Kameya, K. Fujie: Metabolomics analysis of benzoate degradation in *Pseudomonas putida* NBRC14671, Water and Environment Technology Conference 2013, Tokyo, Japan (June, 2013).

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀屋 隆志 (KAMEYA, Takashi)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号: 7 0 2 6 2 4 6 7