

平成21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310051
 研究課題名（和文） 微生物機能解析に基づく生物学的環境修復技術の新展開
 研究課題名（英文） New development of bioremediation based on analyses of microbial functions
 研究代表者
 内山 裕夫（UCHIYAMA HIROO）
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：00185042

研究成果の概要：

バイオレメディエーション技術を新たに展開させるために必要とされる「浄化作業期間の正確な推定技術の開発」及び「浄化能力の向上化」に取り組むため、本研究では、新たな解析手法である SIP (stable isotope probing) 法を用いて、土壌地下水汚染物質であるテトラクロロエチレン等の揮発性有機塩素化合物及び油の分解を担う機能微生物を検索・同定し、それらの挙動を把握する技術を開発した。また、分解微生物ネットワークの一端を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	0	6,400,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	2,490,000	17,190,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：揮発性有機塩素化合物、油汚染、バイオレメディエーション、安定同位体

1. 研究開始当初の背景

バイオレメディエーション技術は有害化合物を無害化するコストパフォーマンスの良い技術として期待されているが、実際の浄化ビジネスにおいてはバイオレメディエーション技術の浄化に要する作業期間の設定が不確実なことから作業コストの見積もりに支障を来し、また、汚染サイト毎に浄化有効性が異なる。その結果、物理化学的手法に次いだ2次的な浄化対策手法として認識されている。一方では、バイオレメディエーション技術は汚染物質を根本的に無害化し、コストパフォーマンスの良い環境に優しい技術

であるため、経済産業省や環境省によってその普及化が図られている。バイオレメディエーション技術が新たな展開をするに必要な課題は、(A) 正確に浄化作業期間を推定する技術の確立、(B) 浄化技術としての有効性のさらなる向上化、でありその対策が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、新たに開発された分子生物学的手法を駆使して上記2つの課題を解決することにより、現在のバイオレメディエーション技術が置かれている閉塞的状况を打破し、新たな展開

を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ベンゼン分解実験：石油実汚染土壌に無機塩培地を加えたマイクロコズムを作成し、好気条件下でベンゼンの分解実験を行った。ベンゼンを好氣的に分解する微生物群集を明らかにするため、Stable Isotope Probing (SIP)法を用いてアクティブにベンゼンを同化分解する微生物の特定を行なった。上記マイクロコズムに、 ^{13}C -ベンゼンと ^{12}C -ベンゼンをそれぞれ添加した2つの系を作成し、経時的に土壌をサンプリングした。 ^{12}C -ベンゼンを加えた系をコントロールとして作成した。サンプリングした土壌から Total DNA を抽出し、密度勾配超遠心分離によって ^{13}C -DNA バンドを回収し、精製した。16S rDNA の V3 領域の PCR-DGGE 分析を行い、特異的バンドを切り出し、シーケンス解析を行った。

(2) テトラクロロエチレン分解実験：硫化ナトリウムとシステイン塩酸塩により還元条件にした蓮田土壌マイクロコズムを作成した。蓮田土壌マイクロコズムにテトラクロロエチレン (以下 PCE) を添加し分解を観察した。

クロロエチン類に対してアクティブに同化分解する微生物を探索するため、 ^{13}C ラベルされた PCE を用いた SIP 法によりマイクロコズムを用いて調査を行なった。 ^{13}C -PCE 添加後、経時的に土壌をサンプリングし、土壌から total DNA の抽出を行なった。Total DNA を密度勾配超遠心分離にかけ ^{13}C -DNA と ^{12}C -DNA の分離を行なった。超遠心分離後、UV ランプ下で DNA の存在を確認し、比重の重い側から分画化した。各画分について DNA を精製し、定量 PCR により 16S rDNA 量を測定した。

クロロエチン類に対してアクティブな異化分解微生物を探索する手法として、目的微生物が利用可能な炭素源を安定同位体標識して用いる Stable Isotope Probing for Disimilation (SIP-D) を考案した (図 1)。SIP-D 法の有効性を実証するため、既知脱ハロゲン分解微生物 *Dehalococcoides ethenogenes* 195 を含む絶対嫌気性コンソーシアを用いて評価試験を行なった。目的微生物の利用可能な炭素源には、予備実験により資化性が示されたフマル酸を用いた。絶対嫌気性コンソーシアについて PCE 添加区と PCE 非添加区を作成し、それぞれに ^{13}C -フマル酸を添加した。また、コントロールとして ^{13}C 非標識の ^{12}C -フマル酸を添加した系を作成した。フマル酸添加後に経時的にサンプリングを行い、DNA を抽出した。密度勾配超遠心分離後、分画化を行い、ユニバーサルプライマーを用いて 16S rDNA 量を、特異的プ

ライマーにより *Dehalococcoides* 属の 16S rDNA を定量した。 ^{13}C 画分の微生物叢解析を PCR-DGGE により行ない、 ^{13}C 画分に特異的な DNA を特定し、シーケンス解析で微生物種を特定した。

次いで、SIP-D 法により蓮田土壌マイクロコズム内のアクティブな異化分解微生物の探索を行なった。前述と同様に PCE 添加および PCE 非添加のマイクロコズムを作成して ^{13}C -フマル酸を添加し、同様の手順で分画化を行なった。各画分の 16S rDNA 量を定量し、 ^{13}C -DNA 画分を特定後、PCR-DGGE により微生物叢の解析を行い、PCE 添加区の ^{13}C 画分に特異的な微生物種を特定した。

(3) 微生物間相互作用の解明：分解微生物ネットワークを解明するため、微生物相互間の情報伝達物質である PQS に着目し、実験を行った。PQS 非生産株に対して PQS を添加し、その脱窒素活性をガスクロマトグラフにより定量した。また、PQS の受容体の PqsR を欠損させた株を用いて、PQS が PqsR を介して脱窒を抑制するか調べた。プロモーター活性は *xylE* 遺伝子をレポーターとして用いた。脱窒関連酵素活性の測定は、ベンジルビオロゲンなどの人工電子供与体を用いて調べた。硝酸呼吸活性の測定に関しては、NADH を電子供与体として用いた。

4. 研究成果

(1) 石油汚染土壌を用いたマイクロコズムを作成し、ベンゼンを好氣的に分解する系を確立した。ベンゼン好気分解マイクロコズムについて、分解過程を SIP によって解析した。密度勾配超遠心分離により、 ^{13}C -DNA の出現が確認された。出現した ^{13}C -DNA バンドを回収し、DGGE で菌叢解析を行うことで、ベンゼンを直接的に分解する役割を担っている微生物の DNA を特定し、シーケンス解析によって微生物種を明らかにすることが出来た。本実験に用いたマイクロコズムでは、ベンゼンの好気分解に新たな *Pseudomonas* 属細菌が深く関与していることが明らかとなった。

(2) 揮発性有機塩素化合物の分解に関与する微生物の検討を行った。蓮田土壌を用いて、嫌気的条件下で揮発性有機塩素化合物の PCE を *cis*-ジクロロエチレンおよび *trans*-ジクロロエチレンにまで分解する模擬汚染マイクロコズムを確立した。

確立した模擬汚染マイクロコズムについて、揮発性有機塩素化合物の同化的分解に係わる微生物の調査を SIP 法により行った。模擬汚染マイクロコズムに対し、SIP による分解微生物の調査を行った結果、安定同位体標識された微生物は出現せず、揮発性有機塩素

化合物を同化的に分解する微生物は存在しない、あるいはマイナーである事を明らかにするとともに、分解は異化的分解により進行する事を明らかにした。

この結果、揮発性有機塩素化合物分解微生物群集を理解するためには、異化的分解微生物の解析が必要となった。しかし、同化的分解微生物群集解析における SIP 法のような有効な解析方法は、異化的分解微生物解析には存在していなかった。そこで、安定同位体で標識した生育炭素源を用いる新たな手法 Stable Isotope Probing for Disimilation (SIP-D) 法を考案した (図 1)。まず、SIP-D 法が脱ハロゲン分解微生物の解析手法として適切である事を証明するため、既知脱ハロゲン分解微生物 *Dehalococcoides ethenogenes* 195 を含む分解複合系に SIP-D を適用し、手法の有効性評価を行った。PCE 添加コンソーシアに ^{13}C -フマル酸を添加した系において、培養 24h 後に重い DNA の出現が確認された。この重い DNA は、PCE 添加コンソーシアに ^{12}C -フマル酸添加系では出現しなかったことから ^{13}C -DNA であると考えられた。PCE 非添加系では ^{13}C -DNA の画分と ^{13}C 標識前の同密度画分について全バクテリア 16S rDNA に占める *Dehalococcoides ethenogenes* 195 の 16S rDNA を算出した結果、標識後に *Dehalococcoides ethenogenes* 195 の割合が増加していたことから ^{13}C -DNA の出現に *Dehalococcoides ethenogenes* 195 が関与していることが確認された。PCR-DGGE 解析により、 ^{13}C -画分に特異的なバクテリアを特定しシーケンス解析を行なったところ、*Dehalococcoides ethenogenes* 195 と一致した。複合系の中から確実に本菌株を検出出来たことから、

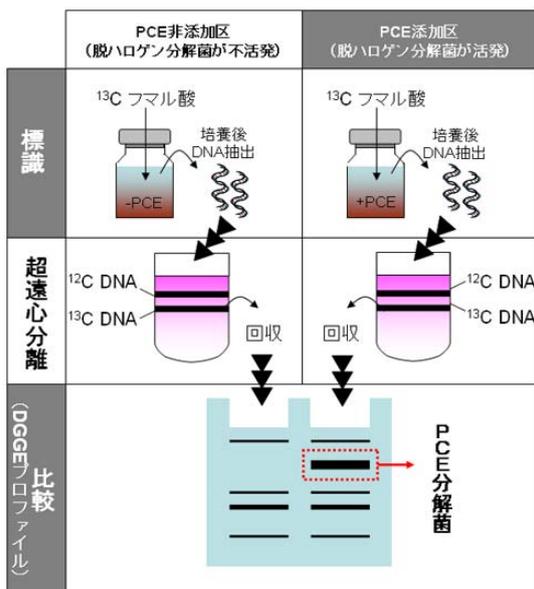


図 1 SIP-D 法

SIP-D 法が異化的分解反応の解析に有効であることが明らかとなった。

次いで、有効性の示された SIP-D 法を模擬汚染マイクロコズムに適用し、脱ハロゲン分解菌の解析を行った。密度勾配超遠心分離後、分画化と 16D rDNA の定量により、PCE 添加区のフマル酸添加後 24 時間に ^{13}C -DNA の出現が確認された (図 2)。PCE 非添加系では ^{13}C -DNA は出現せず、PCE の存在によりスティミュレートされた微生物が ^{13}C -DNA の出現に関与していると予想された。PCE 添加区の ^{13}C -DNA 画分を PCR-DGGE により菌叢解析し、特異的な微生物 DNA の特定に成功した。シーケンス解析により、*Dehalobacter* sp. MS に相同性の高い細菌である事が明らかになった。*Dehalobacter* 属細菌は脱ハロゲン分解を唯一エネルギー源として生育する細菌として報告されている。我々は、*Dehalobacter* sp. MS に相同性の高い細菌が脱ハロゲン分解菌として蓮田土壌マイクロコズムの中で分解の主役として働くことを初めて明らかにすることが出来た。SIP-D 法により特定された *Dehalobacter* 属細菌は系統樹内で、これまでに培養法により報告されてきた *Dehalobacter* 属細菌とクラスターの根元で分岐し、異なる枝を形成していた (図 3)。培養法により報告された

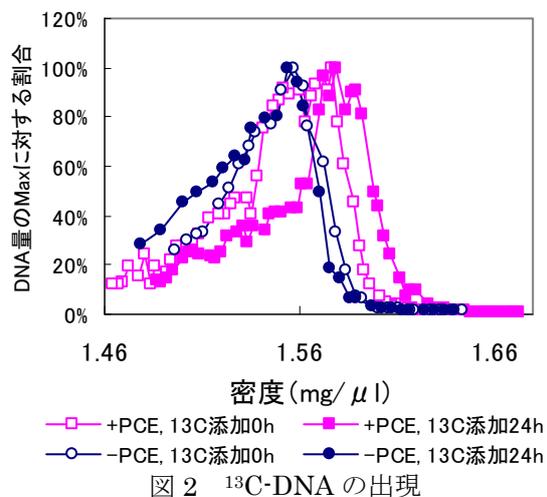


図 2 ^{13}C -DNA の出現

Dehalobacter 属細菌は 1 つのクラスターに集中しており、培養されやすいクラスターの *Dehalobacter* 属細菌のみがこれまでにクローアップされていた可能性がある。SIP-D 法は培養法を介していないため、分解微生物群集の解析において培養法のバイアスを受けることなく、難培養性微生物の解析に有効であることが示唆された。

異化的分解として、ダイオキシン類の脱ハロゲン分解、芳香族炭化水素の分解初期に起きる開環反応など数多く存在している。汚染物質の分解に異化的分解は様々な局面で係わっており、SIP-D 法はそれに係わる微生物

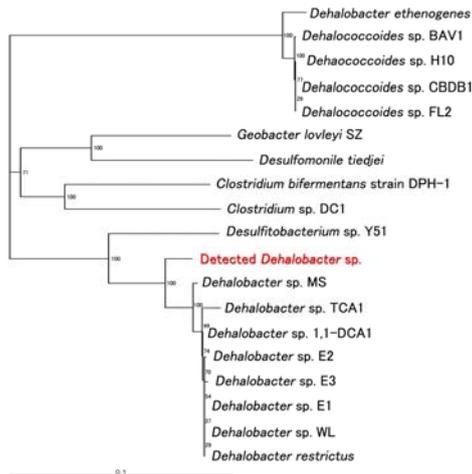


図3 脱ハロゲン分解菌系統樹
物を明らかにするためのツールとして有効
であると考えられる。

(3) さらに、分解は複合系で行われること
から微生物間の相互作用の解明も行い、その
観察法及び細胞間コミュニケーション物質
による相互作用を明らかにした。

P. aeruginosa が生産する微生物間細胞伝
達物質の一種が自身の脱窒活性を抑制する
ことを見出した(図4)。ガスクロなどによっ
て窒素酸化物の生産を定量した他、各脱窒関
連酵素の酸素活性を測定した。その結果、
PQSはその受容体を介さず、酵素活性に影
響を与えることが示された。この結果は、
PQS 受容体を保持しない細菌種に対しても
PQS が作用する事を示唆しており、微生物間
の相互作用においてその役割の解明が期待
される。

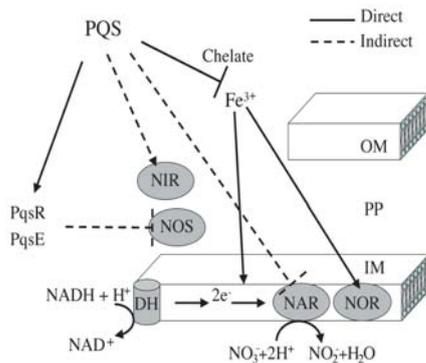


図4 PQS の脱窒抑制機構

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 5 件)

① Yutaka Yawata, Nobuhiko Nomura, Hiroo Uchiyama, Development of a novel biofilm continuous culture method

for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production, Applied and Environmental Microbiology, 74 (17), 5429-5435, 2008、査読あり

② Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura, Eriko Kuno, Yosuke Tashiro, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Bacteriology, 190, 7947-7956, 2008、査読あり

③ S. R. A. Ayoub, H. Uchiyama, K. Iwasaki, T. Doi, K. Inaba, Effects of several surfactants and high-molecular weight organic compounds on decomposition of trichloroethylene with zerovalent iron powder, Environmental Technology, 29, 363-373, 2008、査読あり

[学会発表] (計 15 件)

① 山崎詳平、野村暢彦、中島敏明、内山裕夫、SIP法を使ったテトラクロロエチレン嫌気分解微生物の解析、第24回日本微生物生態学会大会、2008. 11. 28、札幌

② 豊福雅典、野村暢彦、中島敏明、内山裕夫、*Pseudomonas aeruginosa*の生産する細胞間シグナル物質の異種細菌への影響、第24回日本微生物生態学会大会、2008. 11. 28、札幌

③ 原英里、栗原正人、野村暢彦、中島敏明、内山裕夫、食品残渣由来コンポストを用いた油汚染土壌浄化、第60回日本生物工学会大会、2008. 8. 28、仙台

[図書] (計 1 件)

① 内山裕夫、朝倉書店、バイオレメディエーション(環境修復技術):石油、(2008)、2

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 裕夫(UCHIYAMA HIROO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：00185042

(2) 研究分担者

野村 暢彦(NOMURA NOBUHIKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：60292520

(3) 連携研究者 なし