

論文の内容の要旨

論文題目

メタン生成条件におけるベンゼンの分解微生物種と初発代謝経路の解析

氏 名 野 口 愛

ベンゼンは石油に含有される成分であり、本国では主要な化学工業製品の一つである。平成23年度の石油系芳香族・コールタール製品・環式中間物及び合成染料の中では純ベンゼンはキシレン(非石油系を含む)に次いで2番目の生産量である。一方、ベンゼンはヒトに対する発がん性が認められている毒性物質である。また、土壌・地下水汚染の代表的な物質であり、2007~2010年の環境基準の超過件数はVOC類の中で一番多くなっている。さらには、工場の跡地や産業廃棄物の不法投棄等、未報告のベンゼン汚染も懸念されている。

ベンゼンは微生物により分解されることが知られており、酸素存在下における分解に関する研究は約100年前から行われている。一方、酸素非存在下でのベンゼン分解に関しては、1980年代後半に初めて嫌気集積系による分解例が報告された。これまで、嫌気ベンゼン分解菌の特定や分解機構の解明を目的として、集積培養や純粋分離の試みが行われてきた。その結果、硝酸塩還元や鉄還元などの限られた条件において数件の純粋分離例が報告されており、純粋分離株の遺伝子解析や分離株を用いた実験によりベンゼン分解菌に関する情報が得られている。一方、酸化還元電位のより低い硫酸塩還元やメタン生成条件においては未だ純粋分離の報告はなく、その分解経路に関する報告も推定にとどまっている。しかし、汚染現場においては汚染源と周辺に汚染物質の濃度勾配と酸化還元電位勾配が生じており、より汚染源に近い箇所では酸化還元電位の低いメタン生成などの条件にさらされやすい。このことより、嫌気条件下、特にメタン生成条件でのベンゼン分解菌や分解経路を理解することは、汚染における微生物活動を理解するために重要である。

これまでに、著者の研究室では酒井ら(2008, 2009)が茨城県土浦市の蓮田土壌に滅菌した超純水と嫌気剤、そして基質としてベンゼンを添加することによりメタン生成条件でベンゼン分解を行う集積系を獲得している。さらに、同集積系においてStable Isotope Probing- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (SIP-DGGE)法を用いてベンゼン分解に関与していると考えられる*Syntrophus*属に近縁の細菌を検出し、このクローンをHasda-Aと名付けた。同時に、16S rDNAの塩基配列を対象とするプライマーの設計を行った。メタン生成条件におけるベンゼン分解とHasda-Aの関係においては、同じく蓮田土壌を起源とした集積系の中で、ベンゼンの分解が見られた系においてのみHasda-Aが増加することが確認されている(Masumoto et al., 2009)。このように、メタン生成条件におけるベンゼン分解においてHasda-Aが重要な菌であることを状況的に示すデータは蓄積されてきた。しかし、ベンゼン分解においてHasda-Aがどのような役割を持っているのかは示されていない。

そこで本研究ではメタン生成条件におけるベンゼンの分解微生物種と初発代謝経路の解析を目的とし、メタン生成ベンゼン分解系の主要な構成微生物の解明、メタン生成条件下におけるベンゼン分

解菌の特定、そしてメタン生成条件下におけるベンゼンの初発代謝経路の推定を行った。

まず、パイロシーケンス解析によるベンゼン分解集積培養系の構造解析を行った。採取場所や集積期間の異なる5種のメタン生成ベンゼン分解集積系(土浦A集積系, 土浦B集積系, 新芝川集積系, 岩国集積系, 手賀沼集積系)に対し, 16S rRNA遺伝子のV4領域を対象とした群集構造解析を行った。その結果, 非汚染の土壌や底泥を種源としてベンゼンを唯一の基質として嫌氣的に添加し続けることで, 起源の異なる集積系の群集構造が類似し, メタン生成条件下でのベンゼン分解能を獲得したことが示唆された。また, 主要な菌はベンゼン分解に関与すると考えられる菌ではなかったが, メタン生成条件下でのベンゼン分解に適した環境を形成している可能性が示された。

メタン生成条件下におけるベンゼン分解菌の特定は, 3種の集積系(新芝川集積系, 土浦A集積系, 手賀沼集積系)に対して ^{13}C -ベンゼンを用いたDNA-SIPを適用することで行った。その結果, 新芝川集積系と土浦A集積系において, *Desulfobacterales*目近縁のUnclassified *Deltaproteobacteria*, そして *Coriobacteriaceae*科の細菌がベンゼン分解菌の候補として共通に推定された。特に, *Desulfobacterales*目近縁のUnclassified *Deltaproteobacteria*は過去にメタン生成ベンゼン分解集積系においてベンゼン分解菌として推定されたクローンHasda-Aと非常に近縁のものであった。

メタン生成条件下におけるベンゼンの初発代謝経路の推定に関しては, まず土浦A集積系に対してベンゼンの初発代謝産物であると推定されているトルエン, フェノール, 安息香酸をそれぞれ添加し, その分解能を評価した。トルエン・フェノールを添加した系では分解までにラグタイムを生じた。さらに, $^{13}\text{C}_7$ -トルエン, $^{13}\text{C}_6$ -フェノールを用いたDNA-SIPの結果, それらの基質分解に関与している菌は同系でベンゼン分解に関与している菌とは異なり, トルエン・フェノールはベンゼンの初発代謝産物である可能性が低いことが示された。 ^{13}C -安息香酸を用いたDNA-SIPを行った結果, 安息香酸由来の ^{13}C を資化した菌の中ではT-RFLPとクローン・シーケンス解析, そしてパイロシーケンス解析において共通して*Clostridiaceae*科の菌が検出された。本菌は ^{12}C -系列の重画分と比較して ^{13}C -系列の重画分において存在量が大きくなっており, そのため, *Clostridiaceae*科の菌が安息香酸分解菌である可能性が示された。一方, パイロシーケンス解析を用いた ^{12}C -系列と ^{13}C -系列の重画分中の存在率においては差が見られなかったが, ^{13}C -系列の重画分において優占していたフラグメントのクローンの大部分は*Syntrophus gentianae*と非常に近縁な菌であった。*S. gentianae*は安息香酸分解菌として知られる一方, *Clostridiaceae*科の菌は過去に芳香族分解菌としては報告されていない。また, 同系の安息香酸の分解速度はベンゼンのそれよりも大きく, 経時的解析において最も早い時点で ^{13}C を資化した菌を評価できていない可能性がある。そのため, *Clostridiaceae*科の菌が安息香酸を分解していた可能性のほか, *S. gentianae*が同化の伴わない安息香酸の分解を行っていた可能性や, *Clostridiaceae*科の菌が安息香酸の分解産物を資化していた可能性も残された。

本系の中で, *Desulfobacterales*目近縁のUnclassified *Deltaproteobacteria*はトルエン分解, フェノール分解, 安息香酸分解のいずれの系においても検出されなかった。そのため本菌がベンゼン分解菌であるとすればベンゼン分解はトルエン, フェノール, 安息香酸以外の中間代謝産物(たとえば Benzoyl-CoA)を経由している可能性が示された。しかし, 安息香酸の分解速度はトルエン, フェノー

ル、そしてベンゼンと比較して大きく、また $[^{13}\text{C}_7]$ -安息香酸を用いたDNA-SIP試験の結果 $[^{13}\text{C}]$ -資化菌として*Clostridiaceae*科の菌や、 $[^{13}\text{C}]$ -系列の重画分における優占種として*S. gentianae*と非常に近縁な菌が検出された。このことは、本菌が安息香酸分解能を有していたとしても*Clostridiaceae*科の菌や*S. gentianae*近縁菌と比較して増殖速度が小さい為に本研究においてその分解能を評価できなかった可能性を示している。よって、本菌によるベンゼン分解は安息香酸を経由している可能性も残された。一方で、*Coriobacteriaceae*科の菌はベンゼン分解系と安息香酸分解系の双方で共通してそれぞれの基質の分解菌として推定され、本菌がベンゼン分解菌であるとすれば安息香酸を経由してベンゼンを分解している可能性が示された。