

博士論文（要約）

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

平成25年6月

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

野 口 愛

## 博士論文の要約

### 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International Agency for Research on Cancer (IARC, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>)によりヒトに対する発がん性が認められるGroup 1に分類されている毒性物質である。石油含有成分であり、また本国では主要な化学工業製品であって、平成23年度の石油系芳香族・コールドタール製品・環式中間物及び合成染料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。ベンゼンは土壌・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が懸念されている。

ベンゼンは微生物による分解が起こ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する研究は1980年代後半に初めて嫌気集積系による分解が報告されてから進み始めている。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、集積培養や単離の試みが行われてきた(概要については1), 2)。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単離例が報告されており、単離菌の遺伝子解析や単離菌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、汚染サイトにおいては汚染源と周辺には汚染物質の濃度勾配と酸化還元電位勾配が生じていることが知られており、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、実際の汚染サイトでの微生物活動を理解するために重要である。

Sakaiらは、茨城県土浦市のベンゼン非汚染の蓮田土壌より集積した培養系に対して SIP-DGGE法を用いてベンゼン分解菌の特定を試みている<sup>3)</sup>。その結果、嫌気安息香酸分解微生物として報告されている*Syntrophus aciditrophicus* SBおよび*Syntrophus gentianae*に近縁である微生物がベンゼン分解菌として推定されている(Hasda-A)。しかし、Hasda-Aがベンゼンの初発代謝を行っていることは示せておらず、より細かい解析が必要である。

本研究ではメタン生成条件下におけるベンゼンの初発代謝を担う微生物の解明を目的とし、<sup>13</sup>C-ベンゼンを用いた安定同位体プローブ法によりベンゼン分解の初発代謝を行っている菌を同定し、さらに推定されている初発代謝産物(トルエン・フェノール・

安息香酸)を用いた安定同位体プローブ法を用いることで、これらの初発代謝分解菌を特定するとともに代謝経路の推定を行った。

第1章では研究の背景と目的を述べた。第2章では既存の知見をまとめた。第3章では本研究で用いられた実験・解析手法をまとめた。

第4章では、次世代高速塩基配列解析法の1つであるパイロシーケンス解析により、メタン生成条件ベンゼン分解集積系の群集構造解析を行った。本手法を用いることでベンゼン分解に関与している微生物のうち数の少ないものまで検出し、かつ定量的な比較を試みた。ベンゼンのみを炭素源として嫌気条件下で3年以上培養した5つの集積系のバクテリアの16S rRNA遺伝子を対象としたパイロシーケンス解析を行った。それぞれの系でリード数上位の10綱のうち、9綱が5つの集積系(新芝川, 手賀沼, 土浦A, 土浦B, 岩国)で共通していた。上位3つの綱*Clostridia*, *Bacilli*, *Deltaproteobacteria*までは順位が完全に一致し、各系の存在量はそれぞれ25~28%, 20~23%, 8.6~10.3%であった。それ以下は順位が入れ替わることもあったが、存在量は5.6~1.8%の範囲内であった。また、これら9綱の合計割合は培養前には58~67%だったが、培養後には73~76%となっており、その順位も培養前後で変化していた。さらに、培養後の5つの系で212の種が共通しており、全体の91.4%を占めていた。これらの種の大部分が培養前の系で見つかり、全体の84.0%を占めていた。このことより、嫌氣的にベンゼンを与え続けるという条件が菌叢の比率に変化をもたらし、メタン生成ベンゼン分解集積系の微生物群はある構成に類似していくことが示された。

第5章ではメタン生成ベンゼン分解集積系におけるベンゼン分解菌の特定を目的とし、安定同位体プローブ法を用いた解析を行った。本章では、メタン生成条件でベンゼンを分解する微生物を安定同位体標識したベンゼンを用いて3種の集積系に適用した結果、3つの集積系(新芝川, 手賀沼, 土浦A)で*Deltaproteobacteria*綱に属しHasda-Aと近縁な*Desulfobacterales*近縁菌が $^{13}\text{C}$ を資化していた。特に、新芝川と土浦A系で検出された菌は16S rRNA遺伝子配列が99%以上一致していた。また、これら2つの系で共通して検出された菌は*Coriobacteriaceae*科類縁菌が検出された。経時的な解析を行った結果、これらの菌のいずれもがベンゼン分解の寄与している可能性が示された。しかしながら、手賀沼集積系では異なる菌が $^{13}\text{C}$ 資化菌として同定されており、メタン生成ベンゼン分解集積系という非常に限定された条件下においても異なる菌による分解が起こることが示された。さらに、どの系でも2種以上の菌が $^{13}\text{C}$ の資化をしており、メタン生成ベンゼン分解系では単一の菌ではなく共生系(おそらくベンゼン分解菌, 酸生成細菌, メタン菌の3種以上)で成り立っている可能性が高いことが示された。

第6章ではメタン生成ベンゼン分解集積系がその他の芳香族化合物を分解可能であるかを検証し、分解能の観点から各系で起こっているベンゼン分解の経路を推定した。さらにその結果を踏まえて、ベンゼンの初発代謝産物と考えられているトルエン, フェノール, 安息香酸をそれぞれ安定同位体標識した基質を用いて安定同位体プローブ法を適用することでそれらの基質を分解する菌の同定を行った。分解能を試験した3種の集積系, 新芝川,

土浦A, 土浦Bのうちベンゼンの推定初発代謝産物とされているトルエン, フェノール, 安息香酸をすべて分解できたのは土浦A集積系のみであった。しかし, その分解速度は基質により異なり, 安息香酸と比較してトルエン・フェノールの分解速度は非常に小さくなったため, この系においてはベンゼン分解系においても安息香酸を生成・分解している可能性が高いことが示された。

分解試験の結果を踏まえて, トルエン, フェノール, 安息香酸をそれぞれ安定同位体標識した基質を用いて土浦A集積系に安定同位体プローブ法を適用した結果, 安息香酸分解系ではベンゼン分解の際に検出されたT-RF 89 bp, 279 (278) bpが同様に $^{13}\text{C}$ の取り込みを示した。一方同T-RFはトルエン, フェノール系では $^{13}\text{C}$ の取り込みはしていなかった。これらの菌を同定したところ, 280 bpは5章のベンゼン分解系で検出された*Coriobacteriaceae*近縁種と16S rRNA配列が一致し, 同一種の菌がベンゼン・安息香酸両方の分解に関与していることが示された。一方, 89 bpの菌は安息香酸分解菌として既報の*Syntrophus gentianae*近縁種であり, 5章で同定された菌とは異なる目に属した。ベンゼン分解系で同定された菌種の安息香酸分解への関与は示されなかったが, トルエン, フェノール系では分解の時間が非常に長かったことから, 本系においてベンゼンが安息香酸あるいはBenzoyl-CoAを経由して分解されている可能性が最も高いことが示された。

第7章では第4~6章から得られる結論と, 全体のまとめ, そして今後の展望について述べた。本研究では, 1) メタン生成ベンゼン分解系は綱レベルで約75%共通した微生物で構成されており, ベンゼン分解能を獲得することで上位10の綱の比率が一定の値に収束すること, 2) どの系でも*Desulfobacterales*近縁菌ともう1種以上の細菌がベンゼン由来の $^{13}\text{C}$ の資化をしており, さらにパイロシーケンス解析の結果よりメタン菌も検出されていることから, メタン生成ベンゼン分解系では単一の菌ではなく共生系(おそらくベンゼン分解菌, 酸生成細菌, メタン菌の3種以上)で成り立っている可能性が高いこと, そのうち土浦A集積系では3) ベンゼンが安息香酸あるいはBenzoyl-CoAを経由して分解されている可能性が最も高いことが示された。

1) Coates, JD, Chakraborty R and McInerney MJ. 2002. *RES MICROBIOL* 153: 621-628.

2) Vogt C, Kleinstaub S, and Richnow HH. 2011. *MICROBIAL BIOTECH* 4: 710-724.

3) Sakai N, Kurisu F, Yagi O, Nakajima F and Yamamoto K. 2009. *J BIOSCI BIOENG* 108: 501-507.