



Studies on marine bacteria-mediated bioremediation after petroleum spill in specific reference to the outer membrane protein involved in the uptake of environmental...

笠井, 由紀

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2002-09-20

(Date of Publication)

2010-09-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2641

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002641>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 252 】

氏 名 ・ (本 籍) 笠 井 由 紀 (兵 庫 県)

博士の専攻分野の名称 博士 (理学)

学 位 記 番 号 博ろ第64号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成14年9月20日

【 学位論文題目 】

Studies on marine bacteria-mediated bioremediation after
petroleum spill in specific reference to the outer membrane
protein involved in the uptake of environmental chemicals
(原油汚染後の海洋性細菌群によるバイオレメディエーションと
環境中の化学物質除去に関する細胞外膜タンパク質の解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 磯 野 克 巳

教 授 青 木 健 次

教 授 川 井 浩 史

(別紙様式3)

論文内容の要旨

氏名 笠井 由紀論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on marine bacteria-mediated bioremediation after petroleum spill in specific reference to the outer membrane protein involved in the uptake of environmental chemicals

(原油汚染後の海洋性細菌群によるバイオレメディエーションと環境中の化学物質除去に関与する細胞外膜タンパク質の解析)

海洋におけるタンカーの座礁事故等により流出した重油の処理法のひとつとして、近年、微生物による環境修復法（いわゆるバイオレメディエーション）が注目を集めている。しかしながら、その実施による流出石油成分の変化や生態系への影響等に関する基礎的データ不足のため、バイオレメディエーションが現場で採用される例は非常に少ない。バイオレメディエーションの実施により、実際にどのような石油分解菌が活性化され流出原油を分解しているかということ明らかにすることは、バイオレメディエーションの海洋環境への影響を知る上でも重要であり、それによってバイオレメディエーションの方法上の改良も進むことが期待される。

また一般に原油は水溶性が低く、海底堆積物等に吸着しやすいことから、海水中の炭化水素濃度は大変低い。このような自然環境下で石油分解菌が流出油を分解するには、基質の細胞内への取り込みを促進する機構が必要である。

そこでまず、前者の問題については石油分解に関与する微生物群を分子生物学的手法を用いて明らかにし、有用と考えられるものについては単離してその石油分解能を解析した。さらに、後者の問題点である基質の細胞内への取り込みについて明らかにするために、*Pseudomonas putida* のキシレン輸送機構の解析を行った。

Chapter I General introduction (第一章 緒言)

本研究に取り組むにあたっての背景について紹介を行った。特にタンカー座礁事故が起きた時の流出油の挙動について、生分解に重点をおいて述べた。

Chapter II Molecular detection of the marine bacterial population on the beaches contaminated by the tanker Nakhodka's oil-spill accident (第二章 ナホトカ号重油流出事故現場の微生物ポピュレーションの解析)

1997年1月に日本海で起きたロシア船籍タンカー・ナホトカ号座礁事故により5,000t以上の重油が流出した。海岸線は500km以上にわたり汚染され、1999年の6月の時点でも漂着した重油がまだ多く残っていた。流出重油が海洋微生物環境に長期間与える影響を解析するために、事故後2年半に渡り汚染現場から海水および残留油をサンプリングし、微生物ポピュレーションを16S rDNAのV3領域を標的としたPCR/DGGE法で解析した。主要なDGGEバンドについては切り出し、塩基配列を決定し、データベースと照らし合わせ細菌の同定を行った。

その結果、海水サンプル中には海洋に広く分布すると報告されている

Cytophaga, α -proteobacterium および Cyanobacteria に近縁の細菌が優占化しており、汚染、非汚染地区間での細菌ポピュレーションに大きな差はなかった。また、残留油中で優占化している細菌の種類は、海水中的のものとは全く異なっており、石油分解菌として知られている *Alcanivorax* 属や *Sphingomonas* 属に近縁の細菌が数種検出された。残留油中で優占化している細菌数は1グラム当たり 3.4×10^5 から 1.6×10^6 と少なく、このことが自然に起こる分解効率の低さと関係があることが示唆された。

Chapter III Predominant growth of *Alcanivorax* strains in the oil-contaminated seawater supplemented with nutrients (第三章 油汚染海水への栄養塩供給による *Alcanivorax* 属細菌の優占的増殖)

バイオレメディエーションの実施により、実際にどのような石油分解菌が活性化され流出原油を分解しているかということを確認するために、バッチ法による培養、多連干満カラム装置および海浜模擬装置を使用して調べた。フラスコに日本海重油流出事故現場の海水と残留重油を加え、栄養塩添加区と対照区を作り1ヶ月培養したところ、栄養塩を添加した実験区でバクテリアの総数の上昇が観察された。1ヶ月後に存在した微生物群を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) で解析した結果、*Alcanivorax* 属の細菌の優占化が観察された。フラスコ内の原油成分をキャピラリーカラムガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) で分析したところ *n*-alkane が90%以上、ナフタレンとそのアルキル置換体が60%以上分解されていた。次に多連干満カラム装置および海浜模擬装置という実際の海洋・沿岸環境に近似した系において実験的に原油流出事故を起こし、バイオレメディエーションを実施した。微生物群の変化と原油成分の生分解をそれぞれ DGGE および GC-MS により解析した結果、栄養塩添加後直ちに *Alcanivorax* 属の細菌が優占化し、*n*-alkane の90%以上を分解することを明らかにした。このことより、*Alcanivorax* 属の細菌が海洋環境中での流出油のバイオレメディエーションに重要な役割を果たしていることが示唆された。

Chapter IV Bacteria of the genus *Cycloclasticus* is primarily important for the degradation of aromatic hydrocarbons released into the marine environment (第四章 海洋環境中での芳香族炭化水素生分解に果たす *Cycloclasticus* 属細菌の役割)

多環芳香族炭化水素 (PAH) はベンゼン環を複数持つ化合物で、有機物の燃焼・分解や化石燃料の使用により海洋環境中に放出される。PAH は一般に発ガン性を有することが知られており、これらの有害物質の食用海産生物体内への

蓄積が食物連鎖を経て人間の体内に高濃度に蓄積されることは、公衆衛生上大きな問題となる。PAH 分解に重要な役割を果たす海洋性細菌を同定するため、海水にフェナンスレンを加えて集積培養を行い、*Cycloclasticus* 属の細菌を4株単離した。これらの株はすべて原油を唯一の炭素源として生育し、ナフタレン、フルオレン、フェナンスレン、ジベンゾチオフェンといった多環芳香族炭化水素とそれらの一連のアルキル置換体を分解した。

海洋環境中で *Cycloclasticus* 属の細菌が PAH 分解に果たす役割を明らかにするために、海浜模擬装置を使用して原油のバイオレメディエーション実験を行い、*Cycloclasticus* 属細菌の細胞数の変化と原油成分の分解を定量的競合 PCR 法および GC-MS により調べた。その結果、栄養塩添加により *Cycloclasticus* 属細菌の細胞数が増加し、同時に原油中の多環芳香族炭化水素の分解促進が観察された。このことより、*Cycloclasticus* 属の細菌が海洋環境中での PAH の分解浄化に深く関与していることが示唆された。

Chapter V The *xylN* gene product from TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* is involved in *m*-xylene uptake (第五章 *Pseudomonas putida* の TOL plasmid pWW0 にコードされる *xylN* 遺伝子の *m*-xylene 輸送機能)

Pseudomonas putida によるトルエン・キシレン分解は内在性の TOL plasmid 上にコードされている一連の代謝系酵素により触媒される。この代謝経路は上部経路とメタ経路と呼ばれる2つの経路から構成されており、遺伝学的な研究から代謝酵素の遺伝子群はそれぞれの経路に対応した2つのオペロン (上部経路オペロンとメタ経路オペロン) を形成していることが知られている。このうち上部経路オペロンには *xylU-xylW-xylC-xylM-xylA-xylB-xylN* の7遺伝子が存在し、*xylC-xylM-xylA-xylB* はそれぞれトルエン・キシレンを安息香酸にまで分解する酵素をコードしていることが明らかとなっている。上部経路オペロンの最後の遺伝子 *xylN* は52kDaのタンパク質をコードし、47kDaの大きさまでプロセッシングを受けることが分かっているが、その機能は明らかとなっていない。そこで、*xylN* 遺伝子産物の機能について解析を行った。

ウェスタンブロット法により、*xylN* 遺伝子産物が外膜に局在することが示された。次に *xylN* 遺伝子産物の機能を解析するために、*xylN* 遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して破壊株を作成し、その表現形質を解析した。その結果、遺伝子破壊株は野生株が生育阻害を起こす濃度のキシレン存在下でも生育可能であった。また、トルエン・キシレン分解系の酵素活性は野生株と同程度であったのに対し、*m*-キシレン酸化の見かけの K_s 値が野生株の4倍であった

ことから、*xyIN* 遺伝子産物がトルエン・キシレンの膜輸送に関わるポリンであることが示唆された。

(別紙 1)

論文審査の結果の要旨

氏名	笠井 由紀 (かさい ゆき)		
論文題目	Studies on the marine bacteria-mediated bioremediation after petroleum spill in specific reference to the outer membrane proteins involved in the uptake of chemicals in the natural environment (原油汚染後の海洋性細菌群によるバイオレメディエーションと自然環境における化学物質除去に関する細胞外膜タンパク質の解析)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	磯野 克己
	副査	教授	青木 健次
	副査	教授	川井 浩史
	副査		
要 旨			
<p>海洋におけるタンカーの座礁事故等により流出した重油の処理法のひとつとして、近年、微生物による環境修復法 (いわゆるバイオレメディエーション) が注目を集めている。しかしながら、その実施による流出石油成分の変化や生態系への影響等に関する基礎的データ不足のため、バイオレメディエーションが現場で採用される例は非常に少ない。バイオレメディエーションの実施により、実際にどのような石油分解菌が活性化され流出原油を分解しているかということ明らかにすることは、バイオレメディエーションの海洋環境への影響を知る上でも重要であり、それによってバイオレメディエーションの方法上の改良も進むことが期待される。また一般に原油は水溶性が低く、海底堆積物等に吸着しやすいことから、海水中の炭化水素濃度は大変低い。このような自然環境下で石油分解菌が流出油を分解するには、基質の細胞内への取り込みを促進する機構が必要である。</p> <p>本研究では、前者の問題については石油分解に関与する微生物群を分子生物学的手法を用いて明らかにし、有用と考えられるものについては単離してその石油分解能を解析した。さらに、後者の問題点である基質の細胞内への取り込みについて明らかにするために、<i>Pseudomonas putida</i> のキシレン輸送機構の解析を行った。</p> <p>第 1 章は一般的な緒言であり、本研究に取り組むにあたっての背景について紹介を行っており、特にタンカー座礁事故が起きた時の流出油の挙動について、生分解に重点をおいて述べている。</p> <p>第 2 章「ナホトカ号重油流出事故現場の微生物ポピュレーションの解析」では、1997 年 1 月に日本海で起きたロシア船籍タンカー・ナホトカ号座礁事故により 5,000t 以上の重油が流出した事故とその概要について述べている。この事故によって海岸線は 500 km 以上にわたり汚染され、1999 年の 6 月の時点でも漂着した重油がまだ多く残っていた。流出重油が海洋微生物環境に長期間与える影響を解析するために、事故後 2 年半に渡り汚染現場から海水および残留油をサンプリングし、微生物ポピュレーションを 16S rDNA の V3 領域を標的とした PCR/DGGE 法で解析した。主要な DGGE バンドについては切り出し、塩基配列を決定し、データベースと照らし合わせ細菌の同定を行った。</p>			

氏名	笠井 由紀 (かさい ゆき)
	<p>その結果、海水サンプル中には海洋に広く分布すると報告されている Cytophaga, α-proteobacteria および Cyanobacteria に近縁の細菌が優占化しており、汚染、非汚染地区間での細菌ポピュレーションに大きな差はなかった。また、残留油中で優占化している細菌の種類は、海水中のものとは全く異なっており、石油分解菌として知られている Alcanivorax 属や Sphingomonas 属に近縁の細菌が数種検出された。残留油中で優占化している細菌数は 1 グラム当たり 3.4×10^5 から 1.6×10^6 と少なく、このことが自然に起こる分解効率の低さと関係があることが示唆された。</p> <p>第 3 章 「油汚染海水への栄養塩供給による Alcanivorax 属細菌の優占的増殖」では、バイオレメディエーションの実施により、実際にどの様な石油分解菌が活性化され流出原油を分解しているかということを明らかにするために、バッチ法による培養、多連干満カラム装置および海浜模擬装置を使用して調べている。フラスコに日本海重油流出事故現場の海水と残留重油を加え、栄養塩添加区と対照区を作り 1 ヶ月培養したところ、栄養塩を添加した実験区でバクテリアの総数の上昇が観察された。1 ヶ月後に存在した微生物群を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) で解析した結果、Alcanivorax 属の細菌の優占化が観察された。フラスコ内の原油成分をキャピラリーカラムガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS) で分析したところ n-alkane が 90%以上、ナフタレンとそのアルキル置換体が 60%以上分解されていた。次に多連干満カラム装置および海浜模擬装置という実際の海洋・沿岸環境に近似した系において実験的に原油流出事故を起こし、バイオレメディエーションを実施した。微生物群の変化と原油成分の生分解をそれぞれ DGGE および GC-MS により解析した結果、栄養塩添加後直ちに Alcanivorax 属の細菌が優占化し、n-alkane の 90% 以上を分解することを明らかにした。このことより、Alcanivorax 属の細菌が海洋環境中の流出油のバイオレメディエーションに重要な役割を果たしていることが示唆された。</p> <p>第 4 章 「海洋環境中での芳香族炭化水素生分解に果たす Cycloclasticus 属細菌の役割」では、多環芳香族炭化水素 (PAH) の分解について述べている。多環芳香族炭化水素はベンゼン環を複数持つ化合物で、有機物の燃焼・分解や化石燃料の使用により海洋環境中に放出される。PAH は一般に発ガン性を有することが知られており、これらの有害物質の食用海産生物体内への蓄積が食物連鎖を経て人間の体内に高濃度に蓄積されることは、公衆衛生上大きな問題となる。PAH 分解に重要な役割を果たす海洋性細菌を同定するため、海水にフェナンスレンを加えて集積培養を行い、Cycloclasticus 属の細菌を 4 株単離した。これらの株はすべて原油を唯一の炭素源として生育し、ナフタレン、フルオレン、フェナンスレン、ジベンゾチオフェンといった多環芳香族炭化水素とそれらの一連のアルキル置換体を分解した。</p> <p>海洋環境中で Cycloclasticus 属の細菌が PAH 分解に果たす役割を明らかにするために、海浜模擬装置を使用して原油のバイオレメディエーション実験を行い、Cycloclasticus 属細菌の細胞数の変化と原油成分の分解を定量的競合 PCR 法および GC/MS により調べた。その結果、栄養塩添加により Cycloclasticus 属細菌の細胞数が増加し、同時に原油中の多環芳香族炭化水素の分解促進が観察された。このことより、Cycloclasticus 属の細菌が海洋環境中での PAH の分解浄化に深く関与していることが示唆された。</p>

氏名	笠井 由紀 (かさい ゆき)
	<p>第 5 章 「Pseudomonas putida の TOL plasmid pWW0 にコードされる xylIN 遺伝子の m-xylene 輸送機能」では、Pseudomonas putida の TOL プラスミドをモデルとした解析について述べている。P. putida によるトルエン・キシレン分解の経路は上部経路とメタ経路と呼ばれる 2 つの経路から構成されており、遺伝学的な研究から代謝酵素の遺伝子群はそれぞれの経路に対応した 2 つのオペロンを形成していることが知られている。このうち上部経路オペロンには xylU-xylW-xylC-xylM-xylA-xylB-xylN の 7 遺伝子が存在し、xylC-xylM-xylA-xylB はそれぞれトルエン・キシレンを安息香酸にまで分解する酵素をコードしていることが明らかとなっている。上部経路オペロンの最後の遺伝子 xylN は 52kDa のタンパク質をコードし、47kDa の大きさまでプロセッシングを受けることが分かっているが、その機能は明らかとなっていない。</p> <p>ウェスタンブロット法により、xylN 遺伝子産物は外膜に局在することが示された。次に xylIN 遺伝子産物の機能を解析するために、xylIN 遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して破壊株を作成し、その表現形質を解析した。その結果、遺伝子破壊株は野生株が生育阻害を起こす濃度のキシレン存在下でも生育可能であった。また、トルエン・キシレン分解系の酵素活性は野生株と同程度であったのに対し、m-キシレン酸化の見かけの K_s 値が野生株の 4 倍であったことから、xylN 遺伝子産物がトルエン・キシレンの膜輸送に関わるポリリンであることが示唆された。これらに基づき学位申請者は、このような遺伝子を利用することにより、自然環境下におけるトルエン・キシレン分解系の活性化について論じている。</p> <p>以上、本研究は細菌による海水のバイオレメディエーションの可能性について実験的に検証したものであり、自然界における石油分解細菌群についての動的な生態学的側面について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。</p> <p>よって、学位申請者笠井由紀は、博士 (理学) の学位を得る資格があると認める。</p>