

# 複合微生物系の培養制御技術の開発と海洋石油汚染浄化への応用

岩淵 範之 (日本大学 生物資源科学部)

iwabuchi@brs.nihon-u.ac.jp

自然界には、多種多様な微生物が存在しており、それらは、それぞれ独立して存在するのではなく、各々が環境に適応し、複雑な同種間、異種間の相互作用や情報伝達の伴う微生物社会を形成して存在していると考えられている。今回、石油に汚染された海洋環境をその環境固有の様々な種の微生物から構成される群集、いわゆる複合微生物系の分解・浄化能力を制御することで浄化する新しい試みを紹介したい。

## はじめに

石油汚染は、一千種以上の炭化水素化合物の複合汚染であり、汚染域には、アルカンのような短期間で分解消失する成分から多環芳香族炭化水素(PAHs)のように長期間残留する成分など多様な化合物が混在する。一方、石油汚染下にも微生物は棲息するが、汚染域に存在する微生物群はその環境に馴化されたコンソーシアではあるが、そこで発現している石油分解活性が必ずしも汚染浄化に効果的な活性とは言い難い。実際に、汚染域に存在する微生物群全体の活性を高めるようなバイオリメディエーションの手法では分解性の高い成分の分解が速まるだけで、分解性の低い画分は分解されずに残留することが明らかになっている。この残留画分には PAHs およびその誘導体を中心とする難分解性成分が含まれていることから、効果的なバイオリメディエーション法を開発するためには、残留画分の分解・浄化するための手法の開発が必要となってくる。

その手法の開発には、まず、最も重要なステップである難分解性画分の分解を実際に汚染海洋環境で担う微生物を海洋微生物群集の中から特定し、その菌学的情報を収集・蓄積するといった特定の微生物に注目した解析が必要であり、さらに、これらの微生物が活躍しやすいように微細環境を整え、汚染下の微生物群集構造を適切に変化させるなどの複合微生物群集に注目した技術の開発が必要である。この段階では、複合微生物群集における同種間および異種間の相互作用を制御する技術が必須であり、そのため、多種多様な相互作用の中から浄化に重要なものを選抜することが大切である。

本研究では、石油汚染海洋環境における微生物群集の制御技術の開発およびそれを利用した新規バイオリメディエーション法の開発に取り組んでいる。

## 1) 機能性バイオポリマーの発見

まず、残留画分の分解をターゲットとしたスクリーニングを行った結果、放線菌の一種である *Rhodococcus rhodochrous* S-2 株が高濃度石油耐性石油分解菌であることを見出し、同菌の石油耐性には、細胞外多糖(S-2 EPS)の生産が深く関与していることを明らかにした<sup>7,10</sup>。S-2 EPS は、グルクロン酸、マンノース、グルコース、ガラクトースからなる 4 糖の繰り返し構造にステアリン酸とパルミチン酸を含む酸性多糖であり<sup>1</sup>、強力な界面活性作用や溶媒感受性菌への溶媒耐性の付与、保水性や吸湿性の上昇、さらに、微生物細胞表面特性を変化させ外界との相互作用を調節するなどの多様な生理活性をもつ機能性バイオポリマーであることを明らかにした<sup>2,4,5,7,9,10</sup>。

## 2) 微生物細胞表面の新しい性質、疎油性の発見

*R. rhodochrous* S-2 株の石油耐性能が S-2 EPS の生産に依存していたことから、各種 *Rhodococcus* 属細菌の

石油感受性株を用いてそれらの細胞表面の性質や S-2 EPS との相互作用を解析したところ、同細菌は様々なタイプの細胞表面の性質をもつことを示し<sup>8, 11)</sup>、さらに、S-2 EPS はそれぞれの菌株の細胞表面の性質に依存して様々な性質を付与することを明らかにした<sup>4, 9)</sup>。また、*Rhodococcus* 属細菌には、水にも油になじみにくい性質、すなわち、「疎水的かつ疎油的」という極めて特徴的な細胞表面をもつ株が少なからず存在することを明らかにした。このことは、疎水性と親油性は必ずしもイコールではないことを意味しており、ここから、「疎油性」という概念を提唱した<sup>4)</sup>。

以上の結果は、S-2 EPS が溶媒耐性などの様々な生理活性や性質を他の微生物に付与できることを示唆しており、ここから、微生物と分解基質との相互作用が重要な位置を占めているバイオリメディエーションに有効な物質であることを予想させた。

### 3) S-2 EPS による特定石油分解菌の選択的活性化を利用した石油汚染海洋環境の新規浄化法の開発

そこで、石油残留画分のモデルである芳香族画分(AF)を用いて、海水土着の微生物の石油分解活性に対する S-2 EPS の影響を検討した。その結果、S-2 EPS の添加により、海水土着の微生物の生育が増大し、石油分解活性の大幅な促進が確認された(図 1)。続いて、微生物コンソーシアの群集構造を検討したところ、生海水、あるいは、S-2 EPS 無添加条件では確認できなかった *Cycloclasticus* 属細菌 (図 2、バンド B)の優占化が確認された。*Cycloclasticus* 属細菌は、海洋性の PAHs 分解として報告されていたことから、S-2 EPS の投与による石油分解の大幅な促進には、*Cycloclasticus* が深く関与していることが示唆された<sup>6, 10)</sup>。

以上の結果は、海洋微生物群集構造を変化させ、常法では誘導できない PAHs 分解菌である *Cycloclasticus* の分解能力を選択的に活性化し、石油分解を大幅に促進できることを示唆しており、このことは環境負荷の少ない材料を利用して微生物群集構造を制御し、天然の微生物群がもつ希少な生理活性を誘導・利用することによる新しいバイオリメディエーション法を開発できる可能性が示された。

### 4) *Cycloclasticus* の分子生態学的解析と微生物生理学的解析の融合

続いて、S-2 EPS による石油分解促進機構を検討するため、*Cycloclasticus* に注目した解析を行った。これまでの研究から、汚染域での流出油の分解には多様な炭化水素分解菌が関与すると考えられていた。しかしながら、今回、日本近海の表層水、海洋深層水から海洋での実際のアルカン、PAHs などの分解に関わっている微生物群を探索した。その結果、アルカンを添加した条件では、その多様なアルカン分解菌の存在が確認されたが、PAHs を添加したほとんどの条件で *Cycloclasticus* 属細菌の優占化が確認された。このことは、実際の海洋での PAHs の分解に関与する微生物種は多くなく、中でも *Cycloclasticus* は普遍的に関与している数少ない微生物であることが強く示唆された。

同細菌は、寒天培地での培養が困難なため、その生理学的性質は未解明な部分が多かったが、スポ

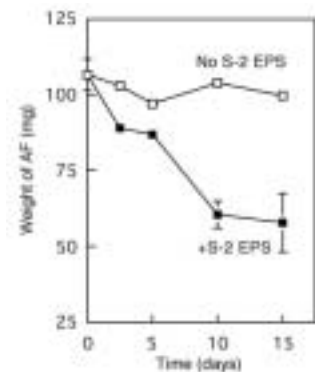


図1.石油分解に対するS-2 EPSの影響

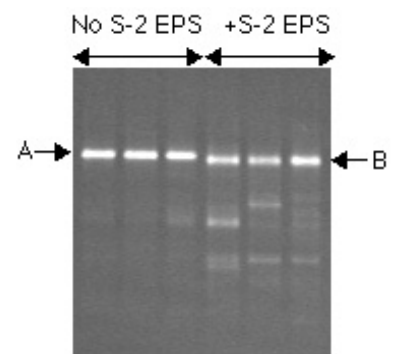


図2.PCR-DGGE解析

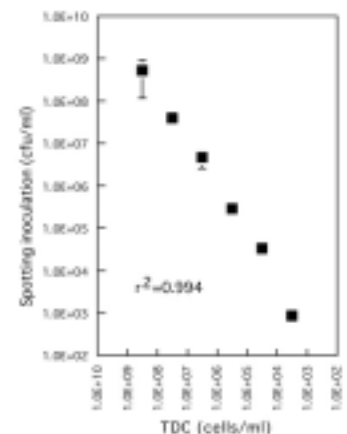


図3 スポット法とTDCによる菌数の比較

ット植菌法による PAHs 分解活性を MPN 法で解析する新たな培養法(SI-MPN 法)を開発することで同菌の定量的な解析手法を確立した(図 3)。その結果、S-2 EPS が同菌の PAHs 存在下での生育や PAHs 分解を促進すること(図 4)、アルカンの存在が微生物群集中での同菌の優占化を抑制することなどの同菌の様々な微生物生理学的性質が明らかになった。これらの結果は、分子生態学的手法により解析されたこれまでの結果を強く支持した。

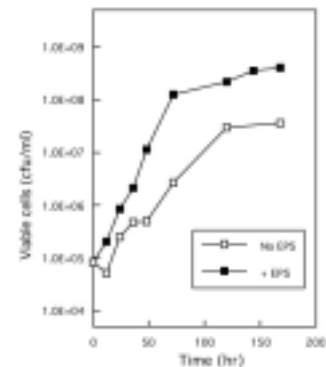


図3 AF存在下におけるPS-1の生育に対するS-2 EPSの影響

### 5) まとめと今後の展望

以上、本研究では分子生態学および微生物生理学的手法により *Cycloclasticus* が海洋での PAHs 分解に重要であることを示し、同菌に注目した機能性バイオポリマーによる複合微生物系の培養制御技術の基礎を確立した。

バイオリメディエーションの主役は汚染域に存在する微生物群である。有効な浄化手法の開発のためには、複合微生物群集がもつ有用な生理活性を探索し、利用することが大切である。現段階で考える限り、*Cycloclasticus* のもつ PAHs 分解活性は、海洋に存在する最も有用な PAHs 浄化力であると考えられるが、通常の海洋複合微生物群集の中では希少なものである。本研究の展開により、このような希少な生理活性を特定し、有効利用する新規浄化技術開発の可能性を導き出した。本技術の開発は、微生物の生産する機能性物質を利用するものであり、21 世紀に求められるクリーンな技術開発に十分応えられるものに発展することが期待できる。そのためには、複合微生物群集における異種微生物間の相互作用や微生物 - 基質間の相互作用をより深く理解する必要があり、今後、それに必要な理論の構築、解析手法などを検討する予定である。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始格別のご指導とご鞭撻をいただきました日本大学生物資源科学部教授・

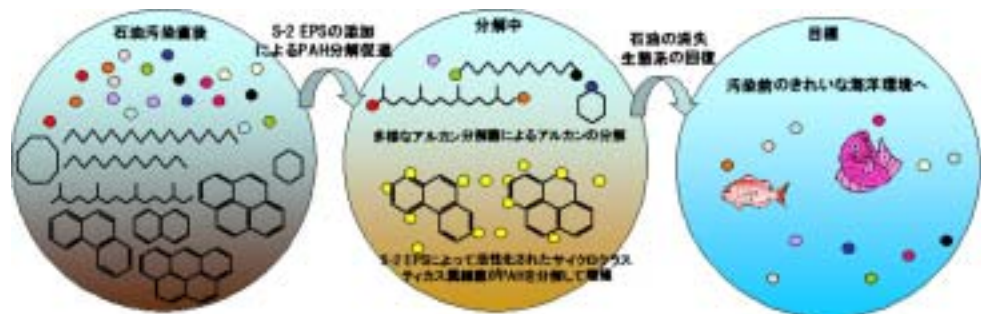


図5 S-2 EPS を利用した石油分解のイメージ

中嶋睦安先生、同助教授・砂入道夫先生、日本大学短期大学部教授・安齋寛先生に心から深謝いたします。また、本賞にご推薦いただきました日本大学大学院総合科学研究所教授・佐々木恵彦先生、同教授・山崎真狩先生に心から深謝いたします。

本研究は、日本大学生物資源科学部と株式会社海洋バイオテクノロジー研究所との共同研究であります。本研究成果の多くは、同学部応用生物科学科分子微生物学研究室において行われたものであり、学生時代から共に過ごした室員の絶え間ない努力の賜物であります。ここに全て室員の皆様から心から深謝いたします。また、本研究の基礎や方向性が見出されたのは、海洋バイオテクノロジー研究所においてであり、同研究所所属時代よりこれまでの間、格別のご指導とご鞭撻をいただきました原山重明所長(現製品評価技術開発基盤機構上席研究員)をはじめ、本研究に携わっていただいた全ての皆様から心より深謝いたします。さらに、微生物細胞表面の物理化学的解析は、立命館大学理工学部教授・森崎久雄先生にご指導いただいたものであり、先生をはじめ関係各諸氏にここに心より深謝いたしま

す。

本研究は、文部科学省 21 世紀 COE プログラム、私学振興共済財団学術振興資金、文部科学省科学研究費補助金、木原記念横浜生命科学財団研究助成金の援助を受けて行われたものであり、さらに、通産省工業技術院の産業科学技術プロジェクト「複合生物等生物資源利用技術開発」の一環として行われたものであります。関係各諸氏に感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) M. Urai, H. Anzai, J. Ogihara, N. Iwabuchi, S. Harayama, M. Sunairi, and M. Nakajima (Submitted) Structural analysis of a novel extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2.
- 2) T. Aizawa, B. Neilan, I. Couperwhite, M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Nakajima, and M. Sunairi. (2005) Relationship between Extracellular Polysaccharide and Benzene Tolerance of *Rhodococcus* sp. 33. *Actinomycetologica* 19(1):1-6.
- 3) M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Sunairi, and M. Nakajima. (2004) A novel viscous extracellular polysaccharide containing fatty acids from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968. *Actinomycetologica* 18(1):1-6.
- 4) N. Iwabuchi, M. Sunairi, H. Anzai, H. Morisaki, and M. Nakajima. (2003) Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 30:51-60.
- 5) M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Sunairi, and M. Nakajima. (2003) A novel moisture-absorbing extracellular polysaccharide from *Rhodococcus rhodochrous* SM-1. *Actinomycetologica* 16(2):26-31.
- 6) N. Iwabuchi, M. Sunairi, M. Urai, C. Itoh, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. (2002) Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (5):2337-2343.
- 7) N. Iwabuchi, M. Sunairi, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. (2000) Relationship between colony-morphology and oil-tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11):5073-5077.
- 8) N. Iwabuchi, M. Sunairi, and M. Nakajima. (1997) Cloning of a DNA fragment from *Rhodococcus rhodochrous* which suppresses its mucoidal morphology. *Actinomycetologica* 11(1):59-63.
- 9) M. Sunairi, N. Iwabuchi, Y. Yoshizawa, H. Murooka, H. Morisaki, and M. Nakajima. (1997) Cell-surface Hydrophobicity and scum formation of *Rhodococcus rhodochrous* strains with different colonial morphologies. *Journal of Applied Microbiology*. 82:204-210.
- 10) 岩淵範之 (2005) 環境浄化とバイオフィルム, バイオフィルム入門編所収, 日科技連出版社(東京都), 印刷中.
- 11) 岩淵範之, 砂入道夫, 中嶋睦安 (1998) 菌体外多糖類: EPS の重要性, 「バイオフィルム」 その生成メカニズムと防止のサイエンス所収, サイエンスフォーラム(東京都), 全 314p (pp84-94 担当)

Regulation of microbial communities and application to bioremediation in marine environments using extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus*

Noriyuki Iwabuchi (Nihon University, College of Bioresource Sciences)

iwabuchi@brs.nihon-u.ac.jp