

# 嫌気性ベンゼン分解菌の分解経路の解明

水口（鈴木） 千穂

東京大学 生物生産工学研究センター

## 研究の目的

ベンゼンは石油に多く含まれる成分であり、様々な有機化合物の溶媒として広く使用されているが、発癌性が高く、水に良く溶けるため、しばしば地下水や土壌の汚染が問題となる。既知のベンゼン分解菌の多くは好気性細菌であるが、汚染された地下水や土壌の多くは嫌気環境下に存在する。このため、汚染箇所に分解菌を導入して浄化を行うバイオオーグメンテーションを想定すると、浄化コストを抑えるためには嫌気性分解菌を取得すること、その菌が持つ分解力を高く保つことが重要となる。

*Azoarcus* sp. DN11 株<sup>1)</sup>は好気・嫌気の両環境下でベンゼンを資化する通性嫌気性細菌であり、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」（実環境中でバイオオーグメンテーションに使用できる菌株の条件）の適合株であるため環境浄化への応用が期待されている。しかし培養中にベンゼン分解能を失うことがあり、その分解経路が未解明なために有効な対策を打てずにいた。本研究ではこのような現状を打破するため、DN11 株の嫌気環境下におけるベンゼン分解経路を解明することを目的とした。

## 方法

嫌気環境下におけるベンゼン分解経路としては、トルエン、フェノール、安息香酸を介する経路が知られている<sup>2)</sup>ものの、いずれの分解経路についても初発の酵素については未同定である。そこで本研究では、嫌気環境下でベンゼン、トルエン、フェノール、安息香酸のいずれも分解することが明らかとなっている絶対嫌気性細菌 *Geobacter metallireducens*<sup>3)</sup>のトルエン分解経路における初発酵素 BssA (benzylsuccinate synthase)、フェノール分解経路における初発酵素 PpsA (phenylphosphate synthase)、安息香酸分解経路における初発酵素 BamY (benzoate coenzyme A ligase) をコードする遺伝子を用いて、DN11 株のドラフトゲノムからこれら遺伝子の相同配列を探索し、ベンゼン分解時の転写量を調べることにした。窒素 95%、水素 5%の混合ガスで満たした嫌気チャンバー内で、終濃度 15  $\mu$ M のベンゼンを唯一の炭素源とする培地を用いて DN11 株を培養し、GC-MS により経時的にベンゼンの残存量を測定した。分解が確認できた経時点で菌体を回収して RNA を抽出し、cDNA 合成後に、上述の配列に対して設計したプライマーを用いて reverse transcription (RT)-PCR を行った。

## 結果

好気環境下において、終濃度 15  $\mu\text{M}$  のベンゼンを唯一の炭素源とする培地を用いて DN11 株を培養すると、24 時間以内に培地中の酸素が消費され、ベンゼンが 50-60% 減少する様子が観察された。嫌気環境下で使用する培地には事前に窒素ガスを通してはいるものの、培地中に還元剤を加えていないため、わずかに溶存酸素が存在する。このため嫌気環境で準備したサンプルについても、培養開始直後は溶存酸素を使ったベンゼン分解が起こり、その後嫌気条件におけるベンゼンの分解が始まると考えられる。嫌気条件で培養を開始し、2, 7, 14, 21 日後にベンゼンの残存量を定量したところ、培養日数を経るごとに緩やかにベンゼンが減少する様子が観察された (図 1)。このため培養開始後 16 日目の菌体から RNA を抽出し、cDNA を合成した。

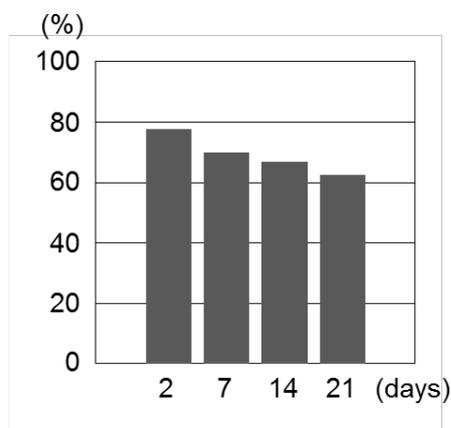


図 1 DN11 株の嫌気環境下におけるベンゼン分解量の推移

縦軸はコントロール (菌体を加えずに静置したバイアル) に対するベンゼン残存量の割合を、横軸は培養開始後の日数を表す。GC-MS を用いて、ヘッドスペース (培養用バイアル内の気相) に残存するベンゼンを定量した。グラフでは 3 回の測定の平均値を示している。

次に、*G. metallireducens* の *bssA*、*ppsA*、*bamY* の配列を用いて DN11 株のドラフトゲノムからこれら遺伝子の相同配列を探索したところ、ADN11\_211、ADN11\_33、ADN11\_73 がそれぞれ *bssA*、*ppsA*、*bamY* とアミノ酸配列で 71%、77%、49% の相同性を示すことが明らかとなった。これらの配列を対象にプライマーを設計し、上述のとおり合成した cDNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、ADN11\_211、ADN11\_73 の転写が確認された一方で、ADN11\_33 の転写はほとんど認められなかった (図 2)。

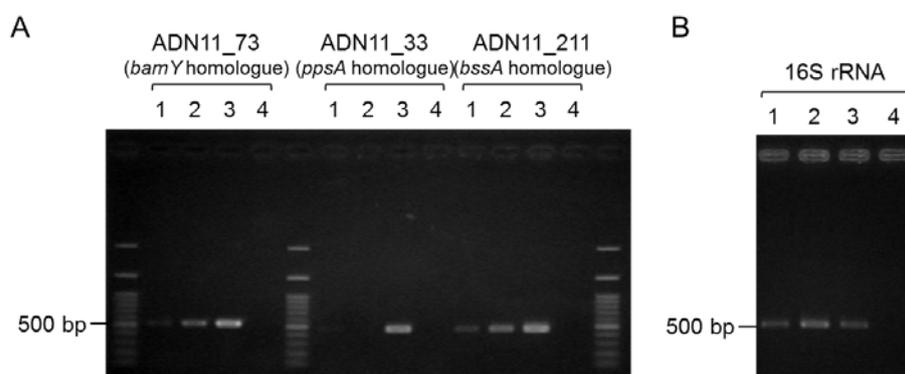


図2 ベンゼン分解時の DN11 株における各種遺伝子の転写量

(A) 安息香酸、フェノール、トルエン分解経路における初発酵素をコードする遺伝子 (*bamY*, *ppsA*, *bssA*) と相同性を示した遺伝子の転写量と、(B) 16S rRNA の転写量を RT-PCR で調べた。1, 2 は独立した 2 回の実験において得られた cDNA (嫌気培養開始後 16 日目に RNA を抽出) を鋳型として、3 はゲノム DNA を鋳型として、4 は鋳型を入れずに PCR を行った結果を示している。

## 結論

過去の報告では、DN11 株は嫌気環境下においてトルエンと安息香酸を唯一の炭素源として生育可能であること、フェノールを資化できないことが示されている<sup>4)</sup>。この点と上記の結果を併せると、DN11 株は嫌気環境下においてベンゼンをトルエンまたは安息香酸に変換した後、それぞれの代謝経路を用いて分解している可能性が高い。*G. metallireducens* はベンゼンをフェノールに変換して分解することが示されている<sup>3)</sup>ため、DN11 株のベンゼン分解経路は *G. metallireducens* とは異なるものと考えられる。今後、DN11 株のトランスクリプトーム解析を行うことで、ベンゼン分解経路についてより詳細に調べることを計画している。

## 文献

- 1) Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., and Watanabe, K. (2006) RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3586-3592.
- 2) Vogt, C., Kleinstueber, S., and Richnow, H. H. (2011) Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microb. Biotechnol.* **4**: 710-724.
- 3) Zhang, T., Tremblay, P. L., Chaurasia, A. K., Smith, J. A., Bain, T. S., and Lovley, D. R. (2013) Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 7800-7806.
- 4) Kasai, Y., Kodama, Y., Takahata, Y., Hoaki, T., and Watanabe, K. (2007) Degradative capacities and bioaugmentation potential of an anaerobic benzene-degrading bacterium strain DN11. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 6222-6227.