

多環芳香族化合物ピレン分解菌群の分解力を決定づける微生物間相互作用の解明

水口 千穂

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究の目的

多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons : PAHs) は毒性や変異原性、発がん性を示す物質を多く含む化合物群であるが、中でも高分子量の PAHs は疎水性、熱力学的安定性が高く、環境中で分解されにくい。このような難分解性有機化合物による環境汚染への対策として、分解菌投与による環境浄化は強力な解決方法となる。我々は過去にタイのマングローブ林の底泥から、PAHs の一種であるピレンの分解菌群を取得した¹。この菌群に含まれていた *Mycolicibacterium* sp. PO1 株はピレン代謝能を持ち、ドラフトゲノム解析から、ピレンをフタル酸、プロトカテク酸を介して TCA サイクル中間体へと変換すると予想された (図 1、黒矢印)。一方、同じ菌群に含まれていた *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 株はフタル酸以降の (図 1、赤矢印)、*Brucella ciceri* PW1 株はプロトカテク酸以降の代謝が可能だが (図 1、青矢印)、ピレンは代謝できなかった。

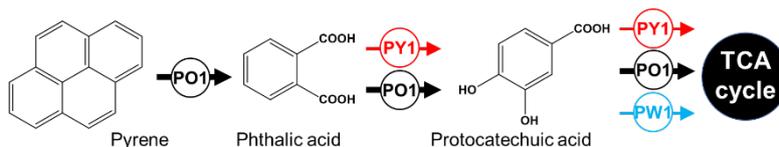


図 1. 本研究で使用したピレン分解菌群の予想代謝経路

これら 3 株を混合すれば、PO1 株が代謝、排出した中間代謝産物を PY1 株、PW1 株が利用することで、代謝フローが強化され分解力が向上すると期待される。実際、PO1 株と PY1 株、PO1 株と PW1 株を混合すると、予想通りピレン分解力の向上が確認された (図 2、緑線、青線)。しかし、これら 3 種の菌を全て混合すると、意外にも分解力は低下してしまった (図 2 黒線)。本研究ではこの混合菌群を対象に、二種混合系での分解力向上効果や三種混合系での分解力低下の原因を解明することを目的とした。

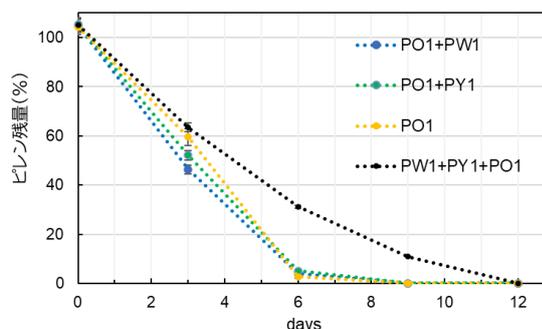


図 2. 各菌株を混合した際のピレン分解力
ピレンを唯一の炭素源とする培地に各菌株を $\sim 10^7$ CFU/mL となるように添加し、培養液中のピレンの量を経時的に HPLC で定量した。

方法

(1) 混合菌群のトランスクリプトーム解析

PO1 株、PY1 株、PW1 株を混合した際に転写変動する遺伝子を調べるため RNA-Seq 解析を行った。PO1 株、PY1 株、PW1 株をそれぞれ 1/4 LB 培地で培養し、洗菌後、ピレンを唯一の炭素源とする培地に、PO1 株のみ、PO1 株+PY1 株、PO1 株+PW1 株、PO1 株+PY1 株+PW1 株の 4 通りの組み合わせで $\sim 10^7$ CFU/mL となるように添加した。培養 3 日目に集菌した菌体から RNA を抽出し、シーケンス解析を実施した。各遺伝子の RPKM 値を算出し、RPKM 値が 2 倍以上または 1/2 以下に変動した遺伝子を、転写量が増加または減少したと判断した。

(2) 顕微ラマン分光法による一細胞レベルでの代謝フローの追跡

PO1 株、PY1 株、PW1 株がピレンを分解する際の物質のフローを一細胞レベルで解析するため、全ての水素が重水素に置換されたピレン (pyrene- d_{10}) を用いて顕微ラマン分光法による解析を行った。この解析では、細菌が重水素標識化合物を代謝し、細胞内の生体分子の水素が重水素に置換することによって出現する C-D 伸縮振動バンドを観測することで、どの細胞がピレン (またはその中間代謝産物) を取り込み代謝したかを評価することができる。Pyrene- d_{10} を唯一の炭素源とする培地で PO1 株、PY1 株、PW1 株、またはそれらを混合した菌群を培養し、共焦点ラマン顕微鏡を用いて経時的に一細胞ごとのラマンスペクトルの測定を行った。

結果

(1) 混合菌群のトランスクリプトーム解析

PO1 株を単独で培養した時に比べて、PO1 株+PY1 株、PO1 株+PW1 株、PO1 株+PY1 株+PW1 株で培養した時に転写変動した PO1 株の遺伝子に着目した。以前のドラフトゲノム解析¹から、PO1 株のゲノムには 5574 個の遺伝子が検出されている。

このうち、PO1 株+PY1 株+PW1 株では 51 遺伝子の転写量増加と 1445 遺伝子の転写量減少が認められた。PO1 株のゲノムには、ピレンの分解を担う酵素をコードすると考えられる遺伝子が 30 個存在するが、このうち 26 個が PO1 株+PY1 株+PW1 株で転写量が減少した遺伝子に含まれていた (図 3)。

これは三種混合系でピレン分解力が低下する現象 (図 2) と矛盾が無いため、PO1 株のピレン分解遺伝子の転写量減少が三種混合系で分解力が低下した原因の一つと考えられた。一方で、分解力が向上する組み合わせである PO1 株+PY1 株でも、これら 30 個の分解遺伝子のうち 25 個が転写量が減少した遺伝子に含まれており、PO1 株+PW1 株ではいずれの分解遺伝子についても転写量の変動は認めら

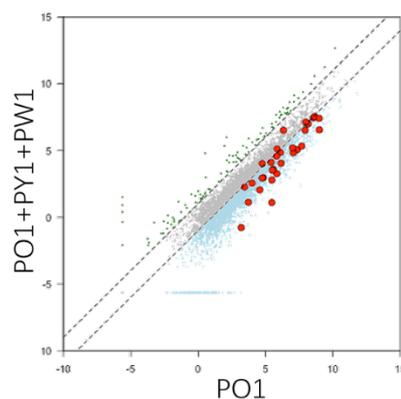


図 3. PO1 株単独と三種混合系での PO1 株遺伝子の転写量の比較 RPKM 値が 2 倍以上に変動した遺伝子を緑色で、1/2 以下に変動した遺伝子を青色で示した。ピレン分解遺伝子は赤丸で示した。

れなかった。PO1 株+PY1 株+PW1 株で転写量が減少した 1445 遺伝子の中には、リボソーム形成やタンパク質合成、細胞内のシグナル伝達、アミノ酸代謝、二次代謝産物の生合成等に関係する遺伝子が多く含まれていた。このことから、PY1 株や PW1 株との共存が PO1 株の代謝活性全般に影響を及ぼしており、結果として PO1 株のピレン分解活性が三種混合系で低下したと考えられた。

(2) 顕微ラマン分光法による一細胞レベルでの代謝フローの追跡

本項目では PO1 株のみ、PW1 株のみ、PO1 株+PW1 株でラマンスペクトルの測定を行った結果について記述する。PO1 株の細胞はカロテノイドの共鳴ラマンバンドを $1155, 1514 \text{ cm}^{-1}$ に示したため、このラマンバンドを利用して PO1 株と PW1 株の細胞を識別した。PO1 株を単独で培養した際には、pyrene-d₁₀ が代謝され重水素が生体物質に取り込まれたことを示す C-D 伸縮振動バンドが 2160 cm^{-1} 付近に観測された。一方、ピレン代謝能を持たない PW1 株を単独で培養した際にはこのラマンバンドは観測されなかったが、PO1 株+PW1 株で培養した際には、培養 9 日目に約 5% の PW1 細胞で C-D 伸縮振動バンドが観測された。この結果から、PW1 株は PO1 株が代謝し排出したピレンの中間代謝産物を利用していることが示された。現在、PY1 株についても顕微ラマン分光法を適用するための条件検討を進めている。

結論

本課題では PAHs の一種であるピレンの分解菌群を対象として、トランスクリプトーム解析と顕微ラマン分光法による解析から、各菌株を混合した際の分解力向上・低下のメカニズムを理解することを目指して研究を実施した。PO1 株+PW1 株の二種混合系でピレン分解力が向上するメカニズムについては、顕微ラマン分光法による解析結果から、PW1 株がピレン分解の代謝フロー強化に寄与していることが原因であると考えられた。一方、トランスクリプトーム解析の結果は、各菌株を混合した際の分解力向上・低下のメカニズムが、分解遺伝子の転写量変化だけでは説明できないことを示唆している。今後、各菌株のメタボローム解析や培養上清中の代謝産物の解析が重要になるだろう。分解菌投与による環境浄化において、投与した分解菌が実際の汚染現場で分解力を発揮できない例は多数報告されているが、その背景には現場に生息する他の細菌との相互作用が存在すると考えられる。微生物間相互作用により負の影響が生じる原因を解明することにより、将来的には分解菌が現場で分解力を発揮するための方策を提案することができるようになると期待される。

文献

1. Wanapaisan, P. *et al.* (2018). Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. *J. Hazard. Mater.* **342**: 561-570.