

有機硫黄化合物の微生物分解

Microbial Degradation of Organosulfur Compounds

村上侑弥¹⁾, 吉村葵¹⁾, 加藤雄大¹⁾
指導教員 松井徹¹⁾,

1) 東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 バイオプロセス工学研究室

キーワード: 有機硫黄化合物、微生物分解、バイオレメディエーション、遺棄化学兵器

1. はじめに

有機硫黄化合物は、石油の酸性雨原因物質に代表されるように環境汚染にかかわるものが少なくない。バイオプロセス工学研究室では、酸性雨原因物質ジベンゾチオフェン (DBT)、ベンゾチオフェン (BT) などを効率的に分解する独自の微生物コレクションを有している。一方、1997 年発効の化学兵器禁止条約では、日本が中国に遺棄した化学兵器処分が義務付けられており、その一つであるイペリットは有機硫黄化合物である。本研究では、イペリットのモデル化合物クロロエチルフェニルスルフィド (CEPS) の微生物分解の可能性を検討した。

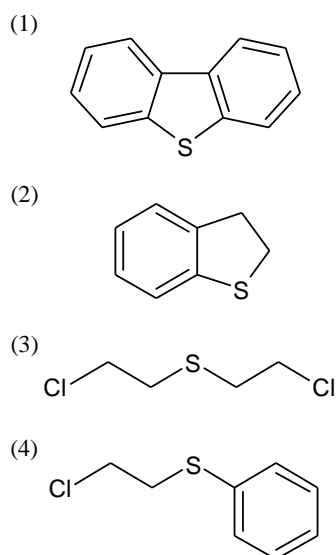


図 1. 有機硫黄化合物の化学構造

(1)DBT, (2)BT, (3)イペリット, (4)CEPS

2. 実験材料および方法

使用菌株; バイオプロセス工学研究室にて分離した DBT 脱硫細菌及び BT 脱硫細菌を用いた。脱硫菌とは、有機硫黄化合物を分解して亜硫酸イオンを遊離する代謝反応を有する微生物のことをいう。培養方法; 硫黄分を含まない AG 培地に CEPS を唯一の硫黄源として添加して 30°C にて振とう培養した。これにより増殖が認められれば、CEPS を分解して硫黄源として生育する能力があることがわかる。

表 1. AG 培地組成

Glucose	5	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
K ₂ HPO ₄	4	g
NH ₄ Cl	1	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2	g
CaCl ₂	0.02	g
NaCl	0.01	g
metal sol.	10	ml
vitamin sol.	1	ml
Sulfur source		
D.W.	Up to 1 L	
pH	7.5	

抽出方法: 培養液を酸性条件下、酢酸エチルにより抽出し、Na₂SO₄ 添加により水分除去後、ロータリーエバポレータにより濃縮したものを培養抽出液とした。

分析方法:

分解代謝物解析: ガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。GC 分析でピークが確認されたサンプルは GC/MS 分析にて代謝産物の構造を推定した。

GC 分析条件

カラム: DB-5 (Agilent Technologies)

カラム温度; 80°C, 4min ~ 10°C/min ~ 250°C, 4min

注入口温度; 300°C

検出器および検出温度 ; FID、250℃

3. 結果及び考察

・CEPS 分解微生物の選抜

研究室保存の脱硫菌 3 株 T09, T14, T20 株を硫黄源を CEPS とした AG 培地で培養した。実験の結果を図 2 に示す。その結果、T09, T14, T20 の 3 株すべてに CEPS に資化性を持つことが確認された。T09, T14, T20 株をそれぞれ CEPS 有りの AG 培地と無しの培地で培養した結果、CEPS を加えた培地では、3 株すべてで菌が増殖した。それに対して、CEPS を加えなかった培地で培養した 3 株では増殖が認められなかった。よって、この 3 株は CEPS を硫黄源として増殖していることが明らかとなった。

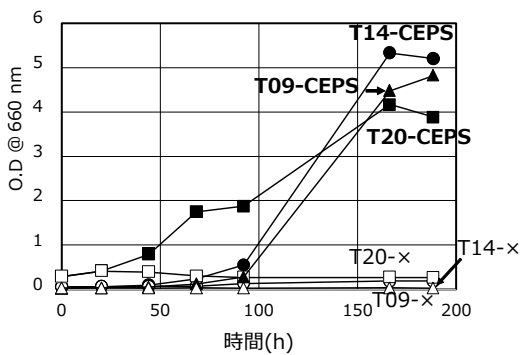


図 2. CEPS を硫黄源とした場合の生育

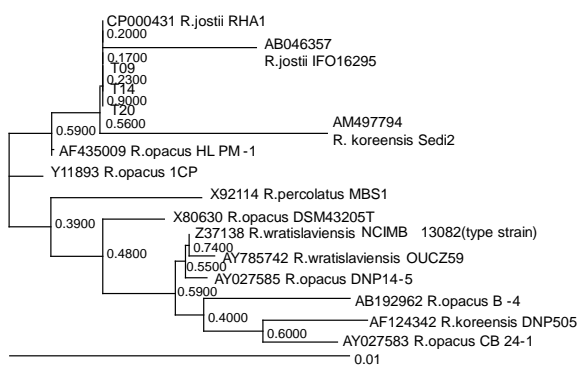


図 3. 16SrRNA 配列をもとにした系統樹

資化性を示した脱硫菌 3 株について 16srRNA 解析を行った。その結果をもとに系統樹を作成した。系統樹は図 3 に示す。結果、T09, T14, T20 株は 3 株とも *Rhodococcus.jostii* と近縁であることが明らかとなった。

・選抜株による CEPS 分解経路

T09 株を用いて CEPS 0.1 g/L を含む AG 培地で 30℃、7 日間振とう培養後、方法に従って培養抽出液を調整した。培養抽出液のガスクロマトグラムを図 4 に示す。基質である CEPS ピーク (保持時間 14.17 分) 以外に分解代謝物と考えられる複数のピークが認められた。

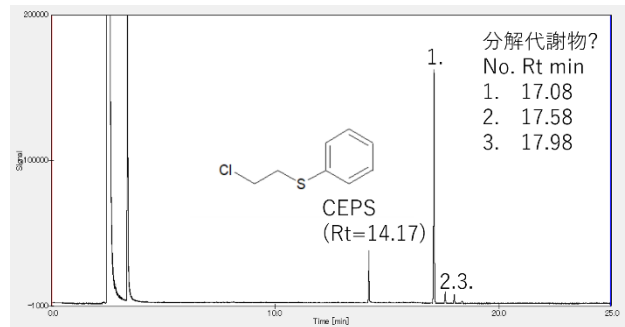


図 4. T09 株培養抽出液のガスクロマトグラム

4. まとめ

環境汚染に関連した有機硫黄化合物の微生物分解の例として、遺棄化学兵器イペリットのモデル化合物である 2-クロロエチルフェニルスルフィド (CEPS) の微生物分解を検討した結果、以下のことが明らかになった。

- ・BT 脱硫菌が CEPS を硫黄源としてよく生育した。
- ・CEPS 分解菌はロドコッカス属に属していた。
- ・培養抽出液の GC/MS 解析結果をもとに CEPS 分解経路を推定した。

今後は、有機硫黄化合物の分解に関係する遺伝子を発現するなどして分解と遺伝子の関係を明らかにし、分解効率の向上を目指していく。

5. 参考文献

T.Matsui et.al., Alkylated benzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain T09. Biosci. Biotech. Biochem. 64, 596-599 (2000)

謝辞 GC/MS 分析実験にご協力いただいた東京工科大学応用生物学部浦瀬太郎教授に深く感謝致します。