

論文内容の要旨

論文題目 海洋微生物関与の硫化メチルの変換と分解

氏名 布施博之

硫化メチル(DMS)は、陸上ではパルプ製紙工場や尿尿処理場などで発生する悪臭物質であるが、海では磯の香として親しまれてきた物質でもある。この海洋で発生する DMS は地球上の硫黄の循環において重要な流れを形成していると同時に、上空での雲の形成に関与することで地球の気候変動にも関与している。この海洋の DMS は主に藻類によって生産されるその前駆体から生成する。その後、生成した DMS は光による分解を受けるか、微生物分解で失われていくか、大気中に揮散していくというのが大きな流れであり、海洋中における分解は大気中への揮散と拮抗しているという意味で、重要な意味を持っている。DMS の分解に関与する微生物としては、海洋・陸上からメタノール資化菌や硫黄酸化細菌などが既に報告されているが、本論文においては、より広く微生物の関与を検索する事により、海洋における DMS 分解の流れをより明確にする事を目指して研究を行った。具体的には、DMS の生産者であると同時に海洋において大きなバイオマスを有する藻類の DMS 分解への関与、陸上の脱硫細菌において知られているジメチルスルホキシド(DMSO)を経由する分解経路の海洋での存在、多くの有機化合物を酸化することが可能なメタン資化性菌の

DMS 酸化への関与、の3点から検討を行った。

1. 各種藻類による硫化メチルの変換

数種の単細胞藻類を蛍光灯下において DMS と反応させたところ DMSO の生成が確認され、しかも、熱処理により藻を殺した方が DMSO の生成が良くなる傾向が見られた。藻体と培養上清に分画したところ、その変換に関与する因子は主に藻体側にあることが示され、その変換反応には光が必要であった。その因子はアセトンや、クロロホルム・メタノール混液などにより抽出可能であり、そうした処理により生藻体のままよりも変換活性が上昇する傾向が見られた。さらに、大型藻類や陸上植物など調べたところ、それらについても変換活性が見られ、その活性は植物体中のクロロフィル量と相関が見られた。しかし、藻体や植物体そのもの及びその抽出物は、そこに含まれるクロロフィル量から予想される変換活性よりも、はるかに強い変換活性を持っていた。クロロフィル a の場合にも、熱処理によってその変換活性の上昇が見られることから、その分解産物であるフェオフィチン a についても検討を行ったところ、確かに同量のクロロフィル a よりも変換活性は高かったが、やはり、藻体や植物体そのもの及びその抽出物の活性を説明する事はできなかった。このように、これらの変換因子は光合成に関与する色素類であることが想定されるものの、少なくともクロロフィル a もしくはフェオフィチン a はその活性の主たる成分ではない。

2. 海洋性脱硫細菌による硫化メチルの変換と分解

陸上の脱硫菌で知られているような DMS が DMSO を経て分解されていく経路の海洋での存在を確認すべく、沿岸の海から DMS を硫黄源として生育できる菌のスクリーニングを行い、DMS-S1 株を得た。本株は、その性質や 16S rDNA の解析結果から *Marinobacterium* 属の細菌であると同定された。本株は、DMS 以外にもメチルメルカプタン(MM)やメタンスルホン酸(MSA)などを有機硫黄源として生育できた。硫酸イオン、MM、MSAなどを硫黄源として生育するときには、暗条件下でも生育できたが、DMS を硫黄源として生育するときには光を必要とした。さらに、DMS を硫黄源として生育するときには、硫酸イオンを硫黄源として生育するときの 100 倍近くの DMS を

必要とした。DMS を硫黄源として生育したときの代謝産物を調べたところ、減少した DMS の大部分は DMSO に変換されていた。ただ、この菌は光の有無に拘わらず、DMSO を硫黄源として生育することはできなかった。この DMS を DMSO に変換する因子は、主に培養液中に放出される熱安定な分子量 10,000 以下の低分子物質であり、この変換にも光が必要であった。特定の波長域の光のみを透過する光学フィルターを用いた実験により、この DMS を DMSO へと変換するのに必要な光の波長は、ほぼ 380~480 nm の範囲にあることが示された。この菌の培養上清はほとんど無色であるが、340 nm と 412 nm 付近に極大吸収を有している。さらに、DMSO 以外の DMS からの代謝産物としてギ酸とホルムアルデヒドが検出され、光がないとやはりその生成は抑制された。ギ酸の生成量は加えた DMS の約 3~5% (モル比) であった。ホルムアルデヒドへの変換に関与する因子は、DMSO 生成の場合と同じく主に培養液中に放出され、熱安定であり、DMS からホルムアルデヒドへの変換の過程では MM の生成は確認されなかった。これらの結果や、DMS の大気中での光分解との類推から、この DMS-S1 株は、培地中に放出した物質と光の作用によって DMS からホルムアルデヒドができるときに生成すると考えられる硫酸、亜硫酸、MSA などを硫黄源として生育しているものと推定された。

3. 海洋性メタン資化性菌による DMS の変換

海洋性メタン資化性菌の DMS 変換への関与を明らかにするために、まず、海からメタン資化性菌の集積と分離を行った。分離に際しては、より広い基質特異性を持つ可溶型のメタンモノオキシゲナーゼ(sMMO)を持つ株の分離を目指したが、20 数株のメタン資化性菌を分離した中で sMMO 用のアッセイ試験で検出されたのは NI 株の 1 株だけであった。NI 株についてはその性質の検討や 16S rDNA の解析結果から *Methylomicrobium* 属の細菌であると同定された。また、増殖に最適な塩濃度は 2.8~5.6% であって、低塩濃度では生育が見られず、海洋性の菌であることが確認された。この菌が sMMO を持っていることは、sMMO 遺伝子群の *mmoX* 遺伝子の一部を PCR により増幅し、その塩基配列を既知の遺伝子と比較することにより確認した。その発現に関してはトリクロロエチレン(TCE)の分解活性で検出することにより、過剰の

銅イオンによって発現が抑制されることを確認した。この NI 株の銅過剰条件下と銅欠乏条件下での DMS 酸化活性の比較や、NI 株と他の sMMO の検出されなかった分離株との DMS 酸化活性の比較により、DMS は sMMO が発現しているかどうかに関わりなくメタン酸化性菌によって DMSO に変換されることが確認された。

4. 総括

本研究によって、光条件下では、DMS-S1 株が培地中に放出する物質や藻体の成分によって、DMS が DMSO へと変換されることが示された。この反応に関与するそれぞれの物質は熱安定であり、この反応が光増感反応であることが示唆された。この光増感反応は実海域中でも DMS の酸化反応として広く起こっていると考えられてきたが、最初に光エネルギーを受け取る物質については、明確にはされてこなかった。本研究の結果は、藻類や DMS-S1 株のような細菌が生産する物質が、DMS の海洋での光分解へ関与しうる可能性を示したものと見える。特に DMS-S1 株の放出する物質については、DMS の変換に有効な光の波長が、実海域で DMS の光分解に有効とされる波長とほとんど一致していた。また、この株は、光存在下で DMS を DMSO に変換するのみでなく、メチル基をホルムアルデヒドとして脱離させる反応にも関与しているが、実海域においても、DMS の光分解で DMSO 以外のものがかなり生じていることが報告されてきており、これらの物質の解明により実海域における DMS の光酸化反応についての理解が深まることが期待される。藻類の有する光増感物質については、脂溶性でもあり、藻体内での DMS 変換への関与が強い事が予想され、藻体内の DMSO 生成との関連が注目される。

海洋性メタン酸化性菌による DMS の DMSO への変換そのものについては、ほぼ予想されたとおりであったが、NI 株は海洋性で sMMO を有する唯一の株であり、その広い酸化活性から環境浄化等への応用が期待される。