

Sphingomonas bisphenolicum AO1株を用いた

フェノール系化合物の生分解



研究ノート

松村吉信*

Biodegradation of phenolic compounds by
Sphingomonas bisphenolicum AO1

Key Words : Environmental pollutant, phenolic compound, cytochrome P450,
monooxygenase, endogenous plasmid

1. はじめに

近年、化学工業の発展に伴い、新しい合成化合物が生み出され、そして大量生産されている。この恩恵として人々の生活は便利で快適になっている。特に、日常的に使用されるプラスチック製品は利便性や耐久性、費用対効果に優れているため、食器やラップ類などの日用品や、玩具、哺乳瓶等にも利用されている。しかし、これらはいずれ廃棄されるが、合成化合物の特徴である生分解性の乏しさ由に、環境汚染の原因となることも示唆されている。この中でも、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として大量に使用されているビスフェノール A (BPA) は内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) として認識され、生態や人体への悪影響から一部の国ではその使用を制限あるいは使用・廃棄についての注意が喚起されている¹⁾。

BPA は、日本国内で約 50-55 万 t (2007-2011 年)、世界で約 390 万 t (2009 年) 生産される合成化合物で、一般的にポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として用いられる。重合したプラスチックは水に不溶で、生分解性が乏しく、環境中では、モノマー型 BPA は検出されないと考えられていた。しかし、実際には多くの水環境で微量ではあるが検出され、プラスチック関連工場付近の水環境や埋立て地の浸出水から多量の BPA が検出された。一方、BPA の

毒性を評価すると、眼や気管での刺激性や皮膚 (光) 感作性は知られており、特に眼刺激性は高いとされる。マウスを用いた BPA の反復投与毒性試験では、肝臓への影響が懸念されている。しかしながら、一般的な急性毒性は低く、LD₅₀ はラットの経口投与で 3,000 mg/kg 以上、マウスの経口投与で 4,000 mg/kg 以上である。発ガン性に関しても陰性である。これらのデータから、BPA が無害ではないものの、日常生活において特段の注意を払う物質でないと考えられてきた。しかしながら、レイチェル・カーソンの「沈黙の春 “Silent Spring” (1962)」や、シーア・コルボーン、ジョン・ピーターソン・マイヤーズ、ダイアン・ダマノスキの「奪われし未来 “Our Stolen Future” (1996)」で、内分泌系に影響を及ぼす一部の合成化合物が環境中で蓄積すると、生態系への悪影響が大きく、場合によっては種の消滅や滅亡につながると推察された。このようなことから、内分泌攪乱化学物質による環境汚染が着目され、BPA を含む一部の化合物がエストロゲン様作用を示すことが報告され、内分泌攪乱化学物質の使用が、自主的なものを含めて、制限されるようになっていく。しかしながら、代替化合物が開発できない等の理由から、BPA についてはその生産量および使用量がほとんど制限されていない。

このようなことから、土壌や工場排水からの効果的な BPA 除去法の開発が望まれている。そこで、我々は BPA を効率的に分解する細菌を土壌より単離し、その特性解析と環境浄化への適応に向けた基礎的研究を進めている。

2. ビスフェノール A 分解菌の単離

様々な土壌からの BPA 分解菌の単離を試みた^{2,3)}。培地には単一炭素源として 50-115 mg/L の BPA を含む無機塩培地を用い、土壌サンプルに日本各地か



*Yoshinobu MATSUMURA

1965年11月生
大阪大学大学院工学研究科醸酵工学専攻
博士課程後期課程 (1994年)
現在、関西大学 (1)化学生命工学学部
生命・生物工学科 (2)先端科学技術推進
機構 准教授 博士(工学) 微生物工学
TEL : 06-6368-0934
FAX : 06-6388-8609
E-mail : ymatsu@kansai-u.ac.jp

ら採取したものをを用いた。107個の土壌試料のBPA分解能を調査した結果、85試料でBPA分解が確認された。さらに、集積培養を続けてBPA分解菌の集積を繰り返した結果、単一でBPAを分解する細菌が26株単離された。これらBPA分解菌を同定したところ、グラム陰性菌だけではなく、グラム陽性菌も含まれ、土壌中にはBPA分解能を持つ細菌が多数存在していた。しかし、単離された株は、継体培養や凍結保存中にBPA分解能を失っていた²。つまり、土壌のBPA分解能力は高いものではなく、BPA汚染土壌の修復に人為的なBPA浄化システムが必要であった。そこで、別の実験で単離した比較的安定なBPA分解菌、*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を用い、BPA分解・浄化システムの構築に向けた基礎的研究を進めた³。

3. *S. bisphenolicum* AO1株のBPA分解能

AO1株のBPA分解とその代謝産物の確認をHPLCおよびLC-MS/MS分析で行った。単一炭素源として115 mg/LのBPAを含む無機塩培地で培養した場合、AO1株によるBPA代謝に約5日間、

BPA代謝産物の分解を含めると約6日間必要であった。これに100 mg/Lのグルコースを加えると、AO1株のBPA分解は格段に向上し、2日間以内に代謝産物も含めて分解されていた。また、栄養豊富なL培地では、115 mg/LのBPAを約8時間で完全分解した。これらの結果は、AO1株が単独でBPAを分解する能力を有していること、BPA分解に大量のエネルギーが必要であることを示している⁴。

4. AO1株におけるBPA代謝経路の解明

Lobosら⁵やIkeら⁶が単離した細菌におけるBPA代謝に関する研究から、図1に示したBPA代謝経路が予測されていた。我々はAO1株でのBPA代謝産物をLC-MS/MSやNMR分析で同定した結果、彼らが示したBPA代謝産物と同じ化合物が確認され、彼らが示した代謝経路でAO1株もBPAを分解していると予想された⁷。また、BPA代謝の初発の水酸化反応を触媒する酵素群を精製したところ、シトクロムP450 (P450_{bisd})モノオキシゲナーゼやフェレドキシン、フェレドキシン還元酵素が精製された。さらに、これら酵素遺伝子をクローニングすると、

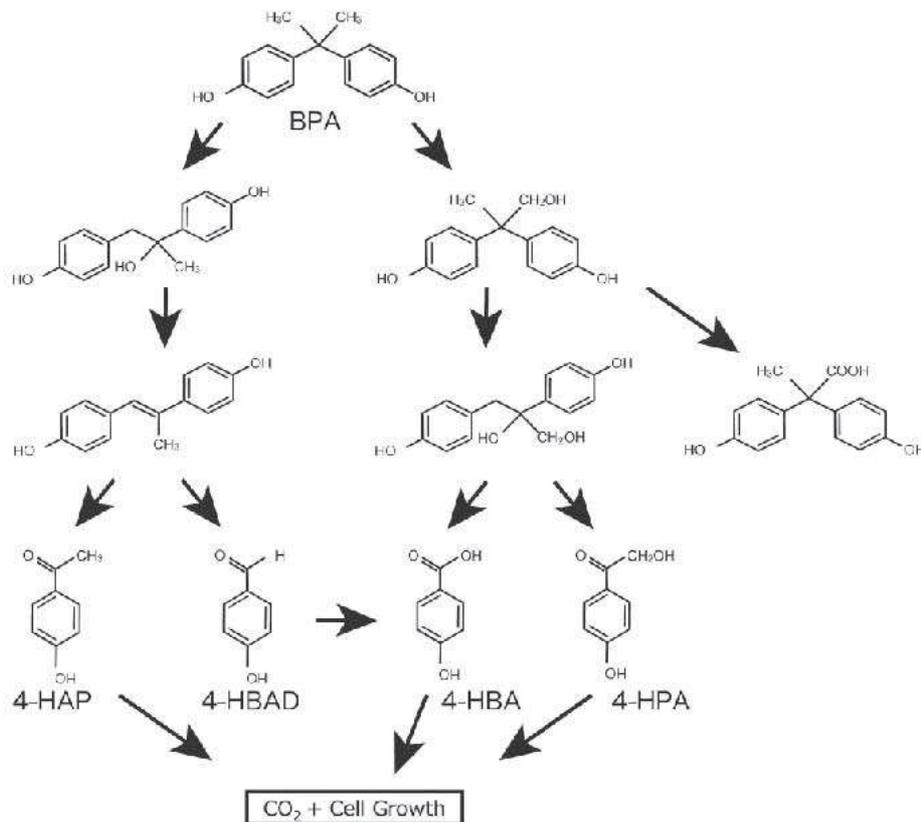


図1 細菌におけるBPA代謝経路

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ遺伝子 (*bisdB*) とフェレドキシン遺伝子 (*bisdA*) がオペロンを構成し、プラスミド pBAR1 にコードされていた⁸。

5. AO1 株によるビスフェノール系化合物分解

次に、BPA 以外のビスフェノール系化合物分解を調査した。化合物には、1,1-bis(4-hydroxyphenyl)ethane、2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane、1,1-bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane、bis(4-hydroxy)methan を用いた。また、フェノール分子同士の架橋部が硫黄である 4,4-dihydroxydiphenylsulfone も用いた。その結果、4,4-dihydroxydiphenylsulfone では AO1 株の増殖阻害は確認されなかったが、2 週間の培養でも分解は確認されなかった。その他の化合物については HPLC 分析で 4 日間以内にその対応するピークの消失が確認された (図 2)。

6. AO1 株によるビスフェノール系以外の環境汚染化合物分解

P450_{bisd} モノオキシゲナーゼシステムはすでに精製されているが、その基質特異性は明らかでない。一方で、細菌型シトクロム P450 モノオキシゲナーゼには広い基質特異性を有するものも報告されている。そこで、ビスフェノール系化合物やフェノール系化合物、有機塩素系化合物における AO1 株の分解能を L 培地培養で評価した (表 1-3)。その結果、AO1 株は様々な環境汚染化合物を分解できることが明らかとなった。

7. AO1L 株による環境汚染化合物分解

AO1L 株は凍結保存していた AO1 株から単離された BPA 分解能のない自然突然変異株である。これまでの研究で AO1L 株では、少なくとも、pBAR1 にコードされている、P450_{bisd} モノオキシゲナーゼシステムを構成する酵素の構造遺伝子である *bisd-AB* が欠失していることを確認している⁸。そこで、AO1L 株の環境汚染物質分解能を確認した結果、AO1L 株は 1-naphthol のみ分解し、それ以外の化合物は分解できなかった。この結果は、AO1 株の環境汚染物質分解に pBAR1 が必須であることを示している。

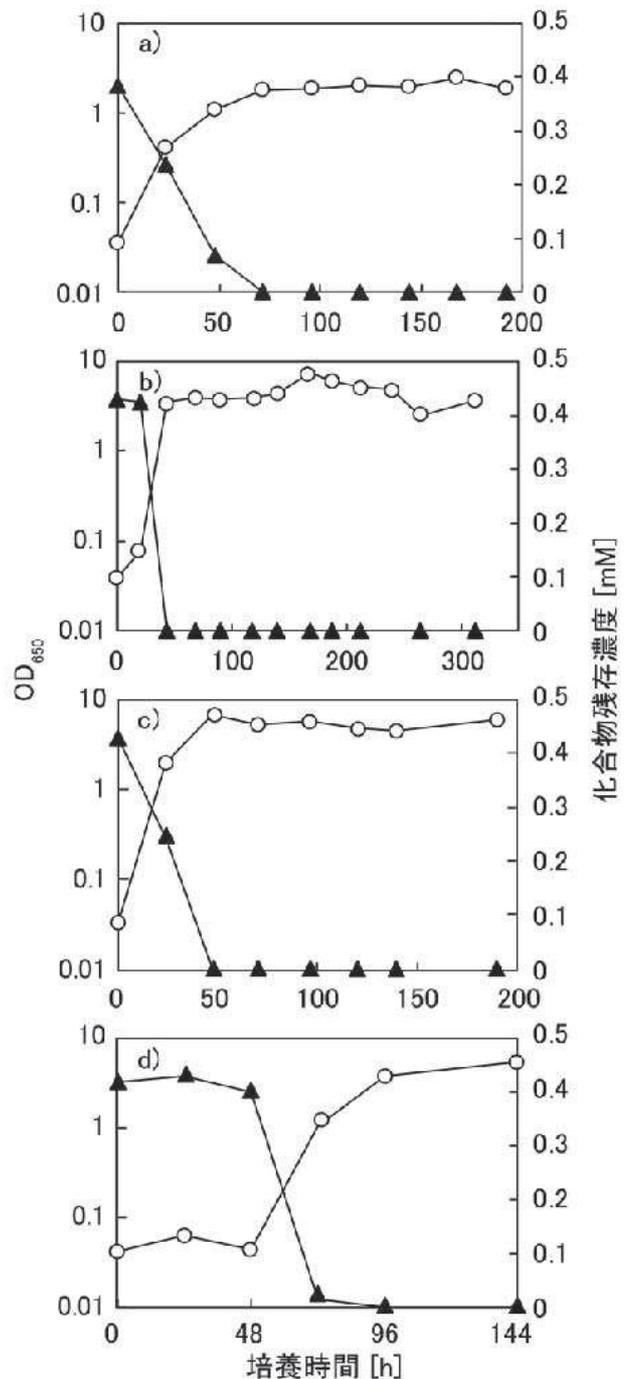


図2 フェノール系環境汚染物質を含むL培地での AO1 株の培養とその化合物残存量

フェノール系環境汚染物質には、
 a) 1,1-bis(4-hydroxyphenyl)ethane、
 b) 2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane、
 c) 1,1-bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane、
 d) bis(4-hydroxy)methan を用いた。
 ○は増殖 (OD₆₅₀)、▲は化合物残存濃度を示した。

表1 AO1株によるビフェニル類化合物の分解

compound		degradation (duration)
2-hydroxybiphenyl (0.1 mM)		○ (2-3 days)
4,4'-dihydroxybiphenyl (0.1 mM)		○ (3-11 days)
4-hydroxybiphenyl (0.1 mM)		× (10 days)
biphenyl (0.05 mM)		× (14 days)

L培地に各種化合物を添加し、AO1株を培養した。
 培養上澄み液を HPLC 分析し、それぞれの分解を確認した。
 ○は完全分解、×は分解が確認されなかったことを示す。

表2 AO1株による有機塩素化合物の分解

compound		degradation (duration)
4-chlorobenzaldehyde (0.5 mM)		○ (1 day)
4-chlorobenzoic acid (0.5 mM)		○ (5 days)
tetrabromobisphenol A (0.5 mM)		× (12 days)

表1と同条件で分析した。
 ○は完全分解、×は分解が確認されなかったことを示す。

表3 AO1株によるフェノール類化合物の分解

compound		degradation (duration)
4-hydroxybenza dehyde (0.8 mM)		○ (3 days)
4-hydroxybenzoic acid (1.5 mM)		○ (3 days)
4'-hydroxyacetophenone (0.5 mM)		○ (3 days)
ethyl 4-hydroxybenzoate (0.6 mM)		× (3 days)
4-ter t-butylphenol (0.5 mM)		○ (5 days)
catechol (1.0 mM)		○ (5 days)
4-nonylphenol (0.2 mM)		× (14 days)
1-naphthol (0.2 mM)		○ (6-14 days)

表1と同条件で分析した。
 ○は完全分解、×は分解が確認されなかったことを示す。

8. おわりに

我々の研究は、AO1株がフェノール系環境汚染物質および一部の有機塩素化合物の分解・除去に有効な菌株であることを示すものである。本稿ではデータを記載していないが、BPA汚染土壌の修復実験も行い、AO1株が土壌中の汚染物質も分解し、また、汚染が除かれた後にはAO1株自身もその環境から消失することを確認した。これはAO1株が様々な環境で利用できることを示している。しかしながら、現状では遺伝的不安定性により、人為的に制御して長期間安定にAO1株の能力を発揮させるまでに至っていない。今後、環境汚染物質の代謝中間体の同定とpBAR1の遺伝子構造解析を行い、AO1株における環境汚染物質分解の効率化を目指した研究を進める予定である。また、pBAR1やAO1株ゲノム構造の解析から、細菌の新しい能力を獲得するしくみが予想できるものと期待している。

9. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究者である森(佐々木)美穂専任講師(現近畿大学)に深く感謝いたします。AO1株の単離と同定を行っていただいた大志万浩一博士(住友林業(株))に厚く御礼申し上げます。様々なご助言をいただいた土戸哲明教授(関西大学)に御礼申し上げます。様々な実験

を的確に遂行していただいた関西大学化学生命工学部生命生物工学科生物制御工学研究室の皆様にも深く感謝いたします。本研究の一部は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成20年～平成24年)」の支援を受けたものであり、あわせて感謝いたします。

10. 参考文献

1. Rubin, B. S., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **127**, 27-34 (2011).
2. Matsumura, Y., et al., *Biocontrol Sci.*, **14**, 161-169 (2009).
3. Oshiman, K., et al., *Biodegradation*, **18**, 247-255 (2007).
4. Sasaki, M., et al., *Biodegradation*, **16**, 449-459 (2005).
5. Spivack, J. et al., *J. Biol. Chem.*, **269**, 7323-7329 (1994).
6. 陳昌淑ら, *日本水処理生物学会誌*, **32**, 199-210 (1996).
7. Sasaki, M., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8024-8030 (2005).
8. Sasaki, M., et al., *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 1158-1169 (2008).

