

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780301

研究課題名（和文） 担子菌および細菌を用いた環状ジエン系有機塩素化合物のバイオレメディエーション

研究課題名（英文） Bioremediation of polychlorinated cyclodiene pesticides by basidiomycetes and bacteria

研究代表者

亀井 一郎（KAMEI ICHIRO）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90526526

研究成果の概要（和文）：担子菌である *Phlebia brevispora* が有害汚染物質であるディルドリンの分解菌として選抜され，9-hydroxy-dieldrin が代謝物として検出された．エンドスルファンは有機塩素系農薬であり，その代謝物であるエンドスルファンサルフェートは難分解性でかつ有害である．担子菌である *Trametes hirsuta* はエンドスルファンサルフェートを分解できることが明らかとなり，新規な分解経路が明らかとなった．これらの結果はディルドリンやエンドスルファンにより汚染されたサイトの生物的浄化に有益な成果である．

研究成果の概要（英文）： *Phlebia brevispora* degraded dieldrin, one of the Persistent Organic Pollutants, and 9-hydroxy-dieldrin was detected as a metabolite in the cultures of *P. brevispora*. Endosulfan, an organochlorine insecticide, and its metabolite endosulfan sulfate, are persistent in environments and are considered toxic. High degradation of endosulfan and low accumulation of endosulfan sulfate were found in cultures of the *Trametes hirsuta*. These results suggest that *T. hirsuta* has multiple pathways for the degradation of endosulfan and endosulfan sulfate; thus having great potential for use as a biocatalyst in endosulfan bioremediation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：環境農学

科研費の分科・細目：環境浄化

キーワード：バイオレメディエーション，ディルドリン，

1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質 Persistent Organic

Pollutants (POPs) は、残留性(難分解性)、生物蓄積性、長距離移動性、および毒性のす

べての特性を有する物質として定義されている環境汚染物質である。ダイオキシン問題はある程度収束に向かっているものの、他の POPs 類の汚染が明るみに出ている。POPs 指定を受けているディエルドリンおよびエンドリンは 1975 年に登録失効した農薬であるが、投入後 30 年経過した現在でも環境基準値を超過して検出される。また、エンドサルファンおよびその代謝物であるエンドサルファンサルフェートは近く POPs として規制されるべく現在議論されている化合物である。これらの化合物により汚染された土壌を浄化することは食の安全や環境保護の観点から重要な課題である。一般に汚染土壌対策としては、土壌の掘削、その後別の場所への投棄もしくは焼却が行われるが莫大な費用がかかりため、局所的に高濃度で汚染された土壌の処理には適しているが、低濃度、広範囲な汚染に対しては現実的ではない。そこで申請者はバイオレメディエーションに着目した研究を進めてきた。

バイオレメディエーションは汚染された環境を微生物もしくはその酵素を用いて浄化する技術であり、先の掘削、投棄、焼却方法に比べてコスト、エネルギー上の利点がある。特に、中国、東南アジア、アフリカ等汚染が深刻であると報告されている地域では、汚染が広範囲であるため注目を集めている。しかしながら現在のところディエルドリン、エンドリンを効率的に分解できる微生物の報告はなく、エンドサルファンについても微生物による分解は困難である。

申請者は、POPs により汚染された土壌の微生物浄化を目的として、POPs 分解菌の単離と解析を行ってきた。結果、高塩素化ダイオキシン分解性担子菌の単離に成功し、ヘキサクロロベンゼン資化性細菌の代謝経路を解明した。また DDT の分解菌の選抜と新規な微生物分解経路の解明に成功している。しかしながら、ディエルドリンの効果的な分解菌の報告は無く、エンドサルファンおよびエンドサルファンサルフェートを分解可能な菌の報告もない。

2. 研究の目的

ディエルドリンおよびエンドリンについては *Phanerochaete chrysosporium* ではほとんど分解されないことが分かっている。そこで、本研究ではまず、ディエルドリンを高度に分解

可能な担子菌の選抜を目的とした。また、エンドサルファンは一般に環境中でエンドサルファンサルフェートに変換され蓄積するが、白色腐朽菌 *P. chrysosporium* による処理でもエンドサルファンサルフェートが最終代謝物として蓄積することが報告されている。そこで、エンドサルファン分解中にサルフェート体の蓄積が見られず、サルフェート体そのものも分解することができる担子菌の選抜を目的とした。さらに、選抜された担子菌の種の同定、ならびに代謝物の詳細を明らかにすることで、担子菌による環状ジエン系有機塩素化合物の分解機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 分解菌の選抜

供試菌株として分離済みの白色腐朽菌(同定、未同定株を含む)を用いた。暗所 25 °C で 1 週間前培養後、10 mM ディエルドリンおよびエンドサルファンサルフェートの溶液(DMF 溶液)10 µl を加え密栓後、さらに同条件で 2 週間培養した。培養終了後、アセトニトリル 15 ml を加えて反応を停止した後、内部標準物質として 10 mM pentachloronitrobenzene (PCNB)溶液を 5 µl 加え、ホモジナイズし遠心分離(3,000 rpm, 10 min)を行った。遠心分離後上層 1 ml を試験管にとり、飽和食塩水 1 ml とヘキサン 1 ml を加えてボルテックスした。短時間静置し上層をバイアルに回収し、GC/ECD を用いて分析を行い、分解率を算出した。

3-2 代謝物の検出、同定

培養終了後の培地の pH を酸性にし、等量のアセトンと 2 倍量のヘキサンを加えて共にホモジナイズした。ガラス製遠心管に移し遠心分離後、有機溶媒相を回収した。これを 3 回繰り返した。回収した有機溶媒画分は混合後、エバポレーターで濃縮し、GC/MS 分析に供した。GC-MS は HP 6890GC に連結した HP 5973 mass selective detector を用い、カラムは 30-m fused DB-5MScolumn (J&W Scientific, Folsom, CA)を用いた。オーブンは 80 から 320 °C まで 1 分あたり 20 °C の昇温プログラムで行った。

3-3 菌の同定

5.8S rDNA 配列を含む ITS1 および ITS2 の領域を既報に従い増幅し、シーケンスを行った。得られた配列情報は BLAST サーチによ

り解析された。

4. 研究成果

ディルドリンを対象とした分解実験の結果、未同定菌株 YK543 による 2 週間の処理で、添加したディルドリンの約 30% の分解が確認された (図 1)。GC/MS を用いて代謝物の検出を試みた結果、9-hydroxydielldr in が検出された (図 2)。9-hydroxydielldr in はラットなどの動物における主要な代謝物として報告されており、類似の代謝変換を持つことが示唆された。

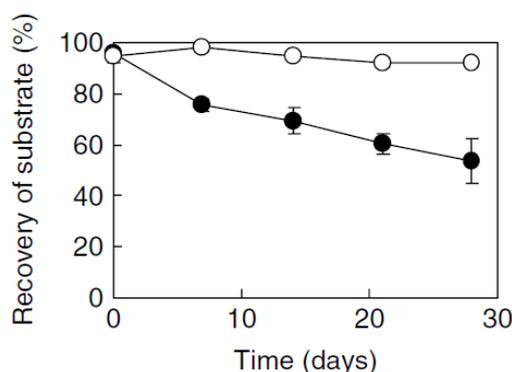


図 1 白色腐朽菌 YK543 によるディルドリンの分解。○：コントロール，●：処理区

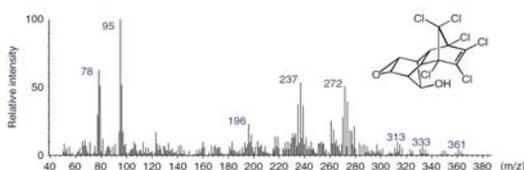


図 2 ディルドリンの代謝物として検出された 9-hydroxydielldr in のマススペクトルと構造

さらに 5.8S rRNA 遺伝子配列を解読し BLAST サーチで解析を行った結果、*Phlebia brevispora* TMIC33929 と 99.8% 一致し、同一種であることが示唆された (Table 1)。*P. brevispora* は筆者らの過去の研究で、塩素化されたダイオキシンや PCB に対して高い分解能を有することが明らかになっており、その初発の代謝変換が水酸化反応であることが示されている。本実験結果でも、*P. brevispora* がディルドリンを水酸化することが明らかとなったことから、*P. brevispora*

は芳香族化合物だけでなく、その他多くの化合物に対して分解能を有することが示唆された。*P. brevispora* の持つ水酸化酵素の多様性に興味を持たれる。実際に本研究の関連成果として、*P. brevispora* がヘプタクロルやヘプタクロルエポキシドに対しても高い分解活性を有することが示され、さらに DDT に対しても高い分解活性を示すことが明らかとなった。また、その代謝経路には基本となる炭素骨格に対して水酸基を導入する反応が含まれており、本菌の多様な化合物に対する水酸化能を支持する結果が得られた。

Table 1. Identity of ITS sequence regions between YK543^a and *Phlebia* species

Fungi	Strain number	Accession number	Identity with YK543 (%)
<i>Phlebia brevispora</i>	TMIC33929	AB084614	99.8
<i>Phlebia brevispora</i>	TMIC34596	AB084615	99.0
<i>Phlebia brevispora</i>	HHB-7024-Sp	AB084616	98.6
<i>Phlebia radiata</i>	ATCC64658	FJ746663	90.8
<i>Phlebia radiata</i>	HHB-5324-Sp	AB084619	90.4
<i>Phlebia lindtneri</i>	GB-1027	AB210076	90.1

^a Accession number AB519182.

エンドスルファンを基質としてエンドスルファンサルフェートの蓄積が少ない菌株を選抜した結果、多くの菌でエンドスルファンを分解することが可能である一方で、エンドスルファンサルフェートを蓄積することが明らかとなった。しかしながら、*Trametes hirsuta* がエンドスルファンサルフェートをほとんど蓄積しないことが明らかとなった (図 3)。エンドスルファンを基質とした分解挙動を経時的に追跡したところ、*T. hirsuta* はエンドスルファンを分解する過程で、一旦エンドスルファンサルフェートを生成するものの、その後エンドスルファンサルフェートをさらに分解することが示された (図 4A)。実際にエンドスルファンサルフェートを基質とした分解試験を行った結果、*P. chrysosporium* によるエンドスルファンサルフェートの分解は観察されない一方で、*T. hirsuta* では 10 日間で約 70% の分解が観察された (図 4B)。従って、本菌は他の菌株が分解できないエンドスルファンサルフェートを分解可能な特異なメカニズムを持っていることが示唆された。

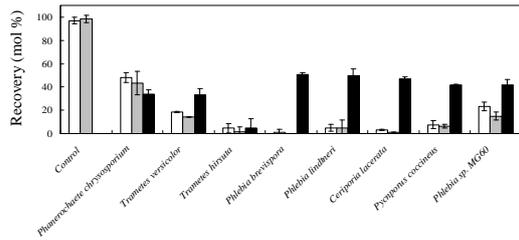


図3 各種白色腐朽菌によるエンドスルファンの分解（白色： 体，灰色： 体）とエンドスルファンサルフェートの蓄積（黒色）. 分解実験 10 日目の結果を示す .

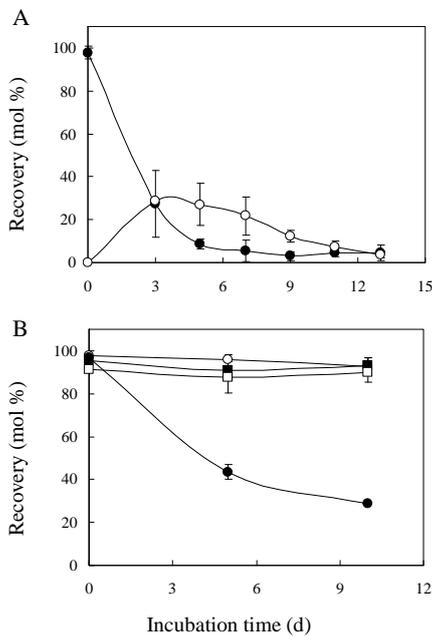


図4 *T. hirsuta* によるエンドスルファンの分解とエンドスルファンサルフェートの蓄積 (A) およびエンドスルファンサルフェートの分解 (B:) .

代謝物を検出した結果、endosulfan diol, endosulfan lacton, endosulfan ether, endosulfan dimethylene が検出された。すなわち *T. hirsuta* は、*P. chrysosporium* や他の微生物と同様にエンドスルファンをエンドスルファンサルフェートへと変換するが、さらにエンドスルファンサルフェートを分解することが可能であることが明らかとなった。また、中間代謝物を基質として用いて代謝試験を行った結果、endosulfan dimethylene は endosulfan diol、endosulfan

lacton, endosulfan ether を分解基質とした処理区からは検出されず、エンドスルファンサルフェートからのみ検出されることから、異なる分解経路で産生されることが示唆された (図5) .

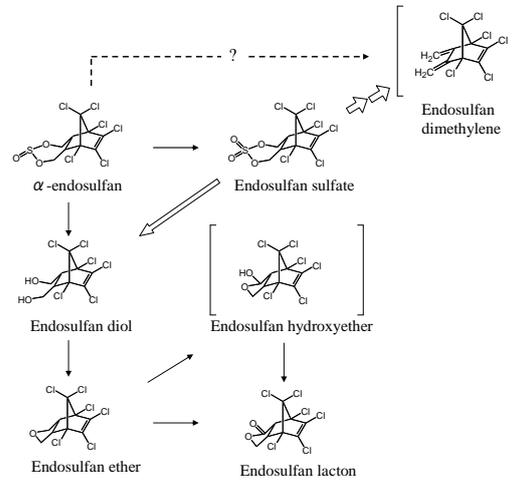


図5 *T. hirsuta* によるエンドスルファンの推定代謝経路 . は既知の代謝変換を示し、は本研究で新たに示された経路を示す .

すなわち、*T. hirsuta* によるエンドスルファン分解の最初の反応は、エンドスルファンサルフェートへと酸化する経路とエンドスルファンジオールへと加水分解する経路の二経路あることが示された。また特徴的なのは、生じたエンドスルファンサルフェートをさらに分解することができる点であり、加水分解によりエンドスルファンジオールを生成する経路と、エンドスルファンジメチレンを生成する未知の経路が存在することが明らかとなった。本菌のように、エンドスルファンサルフェートを分解可能な菌はエンドスルファンにより汚染された土壌の浄化に有益であると考えられる。

以上、白色腐朽菌は環状ジエン系有機塩素農薬の分解にも優れた能力を発揮することが示された。今後は実際の土壌における有効性を確認する必要がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Degradation of endosulfan and endosulfan sulfate by a white-rot fungus *Trametes hirsuta* 2011年03月
Journal of Wood Science : Ichiro Kamei, Kazuhiro Takagi, Ryuichiro Kondo

2. A novel metabolic pathway for biodegradation of DDT by the white rot fungi, *Phlebia lindtneri* and *Phlebia brevispora* 2011年02月
Biodegradation : Pengfei Xiao, Toshio Mori, Ichiro Kamei, Ryuichiro Kondo

3. Degradation of chlorinated pesticide DDT by litter-decomposing basidiomycetes 2011年02月
Biodegradation : Hiroto Suhara, Ai Adachi, Ichiro Kamei, Nitaro Maekawa

4. Metabolism of organochlorine pesticide heptachlor and its metabolite heptachlor epoxide by white rot fungi, belonging to genus *Phlebia* 2011年01月
FEMS Microbiology Letter : 314 (2) 140 - 146 Pengfei Xiao, Toshio Mori, Ichiro Kamei, Ryuichiro Kondo

5. Biotransformation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin by *Coprinellus* species 2011年01月
Mycoscience : 52 (1) 140 - 146 Hiroto Suhara, Ichiro Kamei, Nitaro Maekawa, Ryuichiro Kondo

6. Cloning and transcriptional analysis of the gene encoding 5-aminolevulinic acid synthase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 2011年01月
Bioscience Biotechnology and Biochemistry : 75 (1) 178 - 180 Kenta Misumi, Tatsuki Sugiura, Shinya Yamaguchi, Toshio Mori, Ichiro Kamei, Hirofumi Hirai, Hirokazu Kawagishi, Ryuichiro Kondo

7. Biodegradation of Dieldrin by a Soil Fungus Isolated from a Soil with Annual Endosulfan Applications 2010年09月
Environmental Science & Technology : 44 (16) 6343 - 6349 Ryota Kataoka, Kazuhiro Takagi, Ichiro Kamei, Hiromasa Kiyota, Yuuki Sato

8. Application of mushroom waste medium from *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil 2010年08月
International Biodeterioration & Biodegradation : 64 (5) 397 - 402 Adi Setyo Purnomo,

Toshio Mori, Ichiro Kamei, Takafumi Nishii, Ryuichiro Kondo

9. Degradation of dibenzo-*p*-dioxin by ectomycorrhizal fungus *Lyophyllum shimeji* 2010年08月
Mushroom Science and Biotechnology : 18 (3) 95 - 98 Hiroto Suhara, Ai Adachi, Ichiro Kamei, Nitaro Maekawa, Ryuichiro Kondo

10. Bioconversion of dieldrin by wood-rotting fungi and metabolite detection 2010年08月
Pest Management Science : 66 (8) 888 - 891 Ichiro Kamei, Kazuhiro Takagi, Ryuichiro Kondo

〔学会発表〕(計1件)

1. 木材腐朽菌 *Phlebia* 属菌の POPs に対する分解性能. 肖鹏飞, 亀井一郎, 森智夫, 近藤隆一郎. 第61回日本木材学会大会
2011年3月18日 京都大学

〔図書〕(計1件)

1. 菌類の事典. 亀井一郎, 近藤隆一郎. 朝倉出版 2011 出版予定

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者
亀井 一郎 (KAMEI ICHIRO)

宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：90526526

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：