

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12297

研究課題名(和文) 希少な反応を触媒するノニルフェノール酸化酵素を用いたビスフェノールS分解系の構築

研究課題名(英文) Establishment of bacterial bisphenol S mineralization system involved in a novel reaction by nonylphenol monooxygenase

研究代表者

武尾 正弘 (TAKEO, MASAHIRO)

兵庫県立大学・工学研究科・教授

研究者番号：40236443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、工業的に重要でありながら、内分泌攪乱作用を有するビスフェノールS(BPS)の迅速な生物分解系を構築するために、BPSを分解できるノニルフェノール酸化酵素の遺伝子(nmoA)を、その分解で生じるハイドロキノンスルホン酸(HQS)やハイドロキノン(HQ)の資化菌であるDelftia lacustris HQS1株やPseudomonas putida TSN1株に導入し、BPSの効率良い分解に成功した。また、もう一つの間mediateであるフェノールスルホン酸(PS)の資化菌Cupriavidus basilensis PSY7株を加え、これらの間mediateを蓄積しない分解系を樹立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビスフェノールS(BPS)は、スーパーエンジニアリングプラスチックの原材料等の用途で年間10万トン以上生産されている重要な化学物質であるが、すでに内分泌攪乱作用が認定されているビスフェノールA(BPA)と同等の内分泌攪乱作用を有することが知られている。また、本物質はビスフェノールの中で最も難分解であること、また、環境を広く汚染していることも知られている。これまでに実質的なBPS資化菌は報告されておらず、BPSの生物分解系も樹立されていないことから、本研究の成果は、学問的のみならずBPS含有工業廃水の処理やBPS汚染環境の浄化法の開発などに適用できる、応用的見地からも意義ある結果と考えられる。

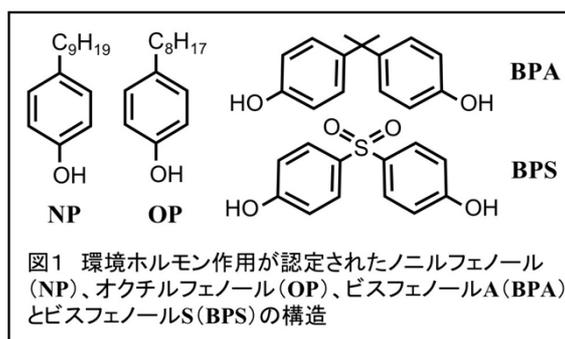
研究成果の概要(英文)：Bisphenol S(BPS) is an industrially important compound, but known to be an endocrine disrupting chemical. In this study, to establish an artificial BPS-biodegradation system, a nonylphenol monooxygenase gene (nmoA), of which gene product can degrade BPS efficiently into hydroquinone (HQ), phenolsulfonic acid (PS), and hydroquinonesulfonic acid (HQS), was introduced into an HQS-assimilating bacterium, Delftia lacustris HQS1 and an HQ-assimilating bacterium, Pseudomonas putida TSN1. The resultant strains could efficiently degrade BPS. In addition to these strains, by using Cupriavidus basilensis PSY7 which can assimilate another metabolite PS, an effective BPS biodegradation system was successfully established without the accumulation of these intermediates.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ビスフェノールS 微生物分解 固定化 ノニルフェノール ハイドロキノンスルホン酸 ハイドロキノン フェノールスルホン酸

1. 研究開始当初の背景

**(1) 外因性内分泌攪乱物質** 化学物質の中には毒性を示す濃度より数桁低い濃度で生物の性を攪乱する**外因性内分泌攪乱物質 (環境ホルモン)**が存在し、主に魚類などの水生生物の生殖に悪影響を与えている。日本では、環境省が環境ホルモンに関する調査・研究 (SPEED'98, ExTEND2005 等) を実施し、環境ホルモン作用が疑われる化学物質を重点的・科学的に評価し、今日までに分岐型側鎖を持つノニルフェノール(NP)、オクチルフェノール(OP) およびビスフェノール A(BPA)



(図1) に環境ホルモン作用を認定している。また、近年、BPA の代替物質として、あるいは耐熱性エンジニアリングプラスチックの原材料としてビスフェノール S(BPS) (図1) が大量に使用されるようになったが、本物質にも BPA 同等の環境ホルモン作用が報告されている。

**(2) 環境ホルモンによる環境汚染** 非イオン系界面活性剤として年間 40 万トン以上生産されてきたアルキルフェノールポリエトキシレートが、下水処理場や水環境で部分的に生物分解を受けて NP および OP を生じる。瀬戸内海の下水処理場付近の水域では、魚類に対する安全値の 1300 倍の NP が底泥から検出されており、生物への影響が憂慮されている。また、BPA は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原材料として年間 400 万トン以上生産されており、その生産量の大きさから環境に放出される量も莫大で、環境水や底質から NP および OP と同等の濃度レベルで検出されている。このような状況から、環境ホルモンの排出源での除去対策や汚染された環境の浄化手法の開発が必要とされている。一方、BPS はプラスチック材料や感熱シートに大量に使用されてきたことから、BPA と同等に環境を広く汚染していることが明らかとなっている。BPS の生産は、和歌山市内の化学会社が世界的に大きなシェアを持っており、BPS を含む工業廃水の低コスト処理のニーズも想定される。

**(3) BPS の難分解性と分解菌の不在** BPS の生物分解についてはかなり古くから検討されてきたが、主要なビスフェノール類の中では最も生分解性が悪く、環境水ではほとんど分解されないことが示唆されている(1)。また、BPS を資化する微生物として、中国の河川堆積物から分離された 2 株の分解菌が報告されているが、これらは最適条件で 10 日程度の培養で 0.8mg/L あるいは 1.6mg/L の BPS を減少させたのみで、その分解・資化はかなり疑わしい(2)。また、ブチルフェノール分解菌により BPS が部分分解された例も報告されている(3)が、これは共代謝による部分分解に過ぎない。従って、BPS の分解経路に関する情報は極めて乏しい状況にある。

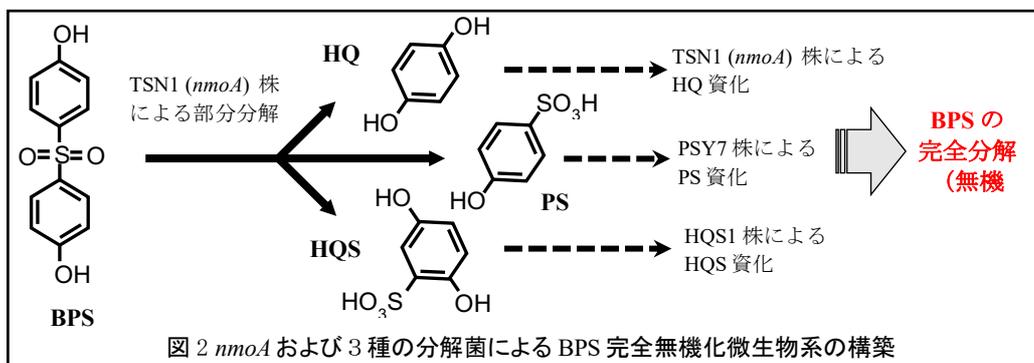
2. 研究の目的

本研究では、産業上重要な化学物質であり、また環境ホルモン作用により生態系へ悪影響を及ぼし得る BPS について、この物質を分解できる NP 酸化酵素(4)を用いて BPS 分解を実施し、その分解経路を解明することを第一の目的とし、また、BPS 含有工業廃水の生物処理法の検討として、本酵素の遺伝子を用いて BPS を完全分解できる微生物系を樹立することを第二の目的としている。

3. 研究の方法

**(1) NP 酸化酵素による BPS 分解** *Sphingomonas* 属細菌由来の NP 酸化酵素の遺伝子 *nmoA* (1503bp) には、約 60kDa のポリペプチド (501aa) がコードされており、その推定アミノ酸配列中には典型的な FAD および ADP 結合モチーフが認められるため、この酵素は補酵素 NADH (あるいは NADPH) から電子を受け取り、酵素内の補欠分子族 (FAD のようなフラビン) を介して分子状酸素を活性化し、芳香環に酸素添加するフラビンモノオキシゲナーゼに属する酵素と推定している。本酵素は、NP と同じ 4-置換フェノール構造を有する多くの化学物質を分解でき(4)、本研究課題の BPS についても、*nmoA* を保有する *Pseudomonas putida* KT2440 株 (*nmoA*) を用いた BPS 分解試験により、BPS がヒドロキノン (HQ)、フェノールスルホン酸 (PS)、ヒドロキノンスルホン酸 (HQS) に分解されることが明らかになっている。本酵素の酵素レベルでの特徴付けは未だなされていないため、本酵素の大腸菌発現系による大量発現とタンパク精製を試み、精製酵素による BPS の分解と分解代謝物の同定、さらには酵素反応条件の最適化を試みる。また、各種 BPS 誘導体に対する分解性も検討する。

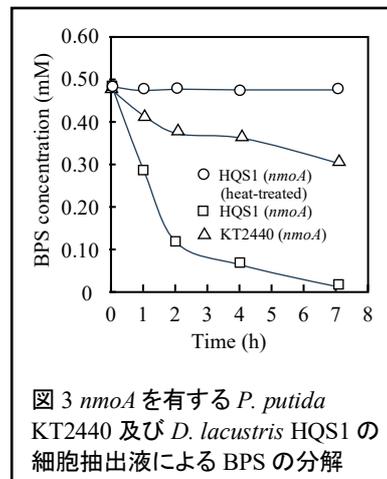
**(2) BPS を完全分解（無機化）する微生物系の樹立** NP 酸化酵素により、BPS は HQ、PS、HQS に分解されるが、これらの物質の資化菌が *nmoA* を保有すれば、BPS を分解した後、生じた HQ、PS、HQS を炭素源として利用し、増殖できることになる。これまでの研究で、広宿主域ベクター-pBBR1MCS-2 に *nmoA* を組み込み、上述した通り、研究室保有の *P. putida* KT2440 株に導入したところ、組換え株は良好に BPS を分解し、これらの中間体が生成されることを確認している。また、活性汚泥から新たに PS 資化菌 *Cupriavidus basilensis* PSY7 株及び HQS 資化菌 *Delftia lacustris* HQS1 株の分離に成功している。一方、以前の研究で、3-メチル 4-ニトロフェノールの分解菌として *P. putida* TSN1 株を分離することに成功した(5)が、HQ 資化菌を取得する研究の中で、本菌株が候補株の中で最も迅速に HQ を分解・資化できることが明らかになったため、本菌株を HQ 資化菌として利用することにした。



本研究では、*nmoA* とこれらの BPS 分解代謝物の資化菌を組み合わせ、BPS を最も良好に完全無機化できる微生物系の構築を行うことにした。例えば (図 2)、まず、HQ 資化菌 TSN1 株に *nmoA* を導入して TSN1 株 (*nmoA*) を構築し、本菌株に BPS を分解させる。次いで、その分解代謝物である HQ、PS、HQS を、それぞれの資化菌 TSN1 株 (*nmoA*)、PSY7 株及び HQS1 株に分解・資化させる。分解系の組み合わせは、この例に限らず最適の組み合わせを検討する。

#### 4. 研究成果

**(1) NP 酸化酵素による BPS の分解** *nmoA* の遺伝子産物である NP 酸化酵素 (NmoA) の酵素的な特徴づけや BPS 及びその誘導体への分解性を検討するために、まず、NmoA の大量発現・精製を目的に、ヒスチジンタグ (His-tag) 融合タンパク発現ベクター-pET-28a を用いて、大腸菌において NmoA を N 末端側あるいは C 末端側に His-tag を融合したタンパクとして発現させ、その精製を試みた。大腸菌で発現させた結果、SDS-PAGE 分析で、いずれの細胞抽出液画分にも約 60kb 付近にベクターコントロールにないタンパク質の発現を認め、さらに C 末端側 His-tag 融合タンパクについてはアフィニティーカラムによる精製にも成功した。しかしながら、細胞抽出液及び精製タンパクを用いた BPS 分解試験で、いずれも BPS の分解が認められなかった。一方、広宿主域ベクター-pBBR1MCS-2-Cm (pBBR1MCS-2 の薬剤耐性遺伝子を Km<sup>r</sup> から Cm<sup>r</sup> に変更) に *nmoA* をクローニングして pBBRNMOA-F-Cm を構築し、これを *P. putida* KT2440 あるいは *D. lacustris* HQS1 に導入し、その細胞抽出液にて BPS 分解試験を行なったところ、図 3 に示す通り、両者で BPS の分解が確認され、特に HQS1(*nmoA*)の分解は顕著であった。反応液はキノン体酸化物形成を示唆するダークピンクに呈色した。そこで、この発現タンパク質にさらに His-tag を C 末端側に付与するように新たに pBBRNMOA-F-Cm-His を構築し、HQS1(*nmoA-his*)の細胞抽出液を調製後、NmoA-His をアフィニティーカラムにより精製することに成功した。この精製タンパクを用いて BPS の分解試験を実施したが、6h 反応でも 5%程度しか BPS が減少しなかった。従って、本研究期間中には、精製酵素を用いた BPS の分解反応系の完全な構築に至らなかったが、その糸口に辿り着いたところである。今後、反応液組成の最適化や失活防止対策など、さらなる検討が必要である。



**(2) BPS を完全分解（無機化）する微生物系の樹立** 図 3 のような BPS の完全分解系を構築するために、本研究では、HQS 資化菌として *Delftia lacustris* HQS1 株、PS 資化菌として *Cupriavidus*

*basilensis* PSY7 株、HQ 資化菌として *P. putida* TSN1 株を利用した。なお、HQS1 株は後の検討で、HQS のみならず PS も分解できることがわかったため、本研究では HQS1 株を中心に分解系を構築することにした。まず、HQS1 株に pBBRNMOA-F-Cm (*nmoA*) を導入し、HQS1(*nmoA*) 株を構築した。その細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 4) による BPS の分解を図 4 に示す。このように BPS は 4h 程度でほぼ完全に分解され、予想通り HQS や PS がほとんど蓄積しないことがわかった。一方、本菌株は HQ を分解できないため、かなりの量の HQ が蓄積した。HQ は細胞毒性が高く、後の検討で HQS や PS の分解も阻害することがわかったため、安定な分解系を構築するためには、BPS 分解の初期から、生成する HQ を除去する必要があると判断した。そこで、HQ 資化菌 *P. putida* TSN1 株から HQ 分解遺伝子 (二成分系 HQ ジオキシゲナーゼ遺伝子: *pnpCD*) を取得して、これを pBBR1MCS-2 に結合し、同様に HQS1 株に導入して HQS1(*pnpCD*) 株を構築した。この組換え株の細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 4) を用いて HQ (0.2mM) の分解試験を行なったところ、24h でほぼ完全に分解した。これにより HQS1 株に HQ 分解能を付与することができた。

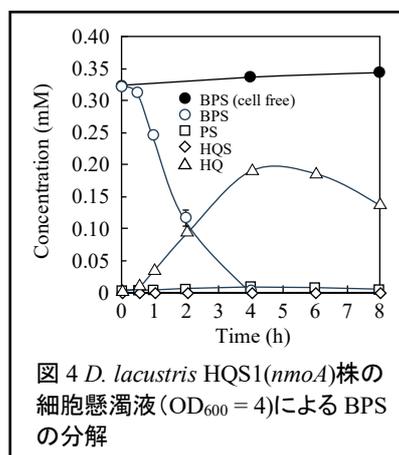


図 4 *D. lacustris* HQS1(*nmoA*) 株の細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 4) による BPS の分解

次に、BPS 分解のために HQS1(*nmoA*) 株の細胞懸濁液を、また HQ の分解のために HQS1(*pnpCD*) 株の細胞懸濁液を調製し、これらを混合して BPS の分解試験を実施した。その結果、図 5 に示す通り、BPS は良好に分解され、HQ の生成・蓄積もわずかであった (図 4 と比較)。また、PS あるいは HQS の蓄積もほとんどなく、この組み合わせは中間体を蓄積させない BPS の分解方法として良い方法であることがわかった。しかしながら、*pnpCD* の遺伝子産物は、HQ を開環し、 $\gamma$ -ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド ( $\gamma$ -HMS) を生成する酵素であるため、 $\gamma$ -HMS を代謝する経路を HQS1 株が持たない場合、この物質を蓄積してしまう。*P. putida* TSN1 株は、 $\gamma$ -HMS を蓄積せずに HQ を資化できるため、次に、この菌株を新たな宿主として使用することにした。まず、TSN1 株に pBBRNMOA-F-Cm (*nmoA*) を導入し、TSN1(*nmoA*) 株を構築した。その細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 2) を用いて BPS (0.2mM) を分解させたところ、6h 程度で完全に BPS が分解された。図 6a に分解終了時点の HPLC 分析のクロマトグラムを示す。この分解物では、270nm の検出波長で Rt=4.4min に PS のピークが検出され、また、300nm の検出波長で Rt=8.0min に HQS のピークが検出されているが、HQ (Rt=4.8 にピークが出現する) は検出されず、TSN1(*nmoA*) 株による分解で HQ が完全に除去されることがわかった。

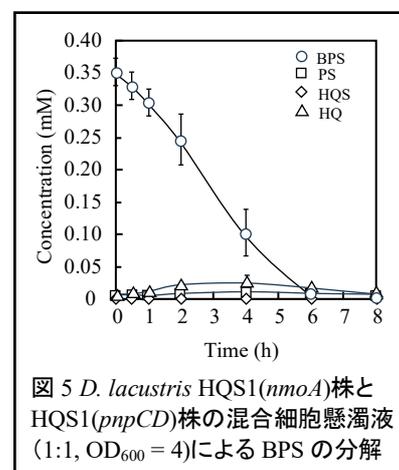


図 5 *D. lacustris* HQS1(*nmoA*) 株と HQS1(*pnpCD*) 株の混合細胞懸濁液 (1:1, OD<sub>600</sub> = 4) による BPS の分解

この BPS 分解代謝物を PS 資化菌 *C. basilensis* PSY7 株の細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 2) で 3h 程度振盪培養したところ、図 6b に示す通り PS のピークも完全に消失した。また、この BPS 分解代謝物を HQS 資化菌 *D. lacustris* HQS1 株の細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 2) で 3h 程度振盪培養したところ、図 6c に示す通り HQS のピークも完全に消失した。さらに、この BPS 分解代謝物を PSY7 株及び HQS1 株の細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 2) の混合液で 3h 程度振盪培養したところ、図 6d に示す通り HQS のピークは完全に消失し、また PS のピークが大部分消失した。これらの結果から、BPS 分解代謝物を資化する細菌宿主に *nmoA* を導入し、毒性の高い HQ を蓄積させない工夫をしながら混合微生物を使用すれば、ほぼ有害な中間代謝物を蓄積せずに BPS を分解できることが明らかになった。

本研究で使用した HQS1 株は、HQS のみならず PS をも分解し、BPS 完全分解系で重要な役割を果たすことから、追加研究として、次世代シーケンスによる全ゲノム配列の解析を実施した。その結果、6.9Gb の環状染色体と 40kb のプラスミドの配列が得られた。環状染色体の配列を分析したところ、HQS に化学構造の似たゲンチジン酸の分解遺伝子群も見い出された。

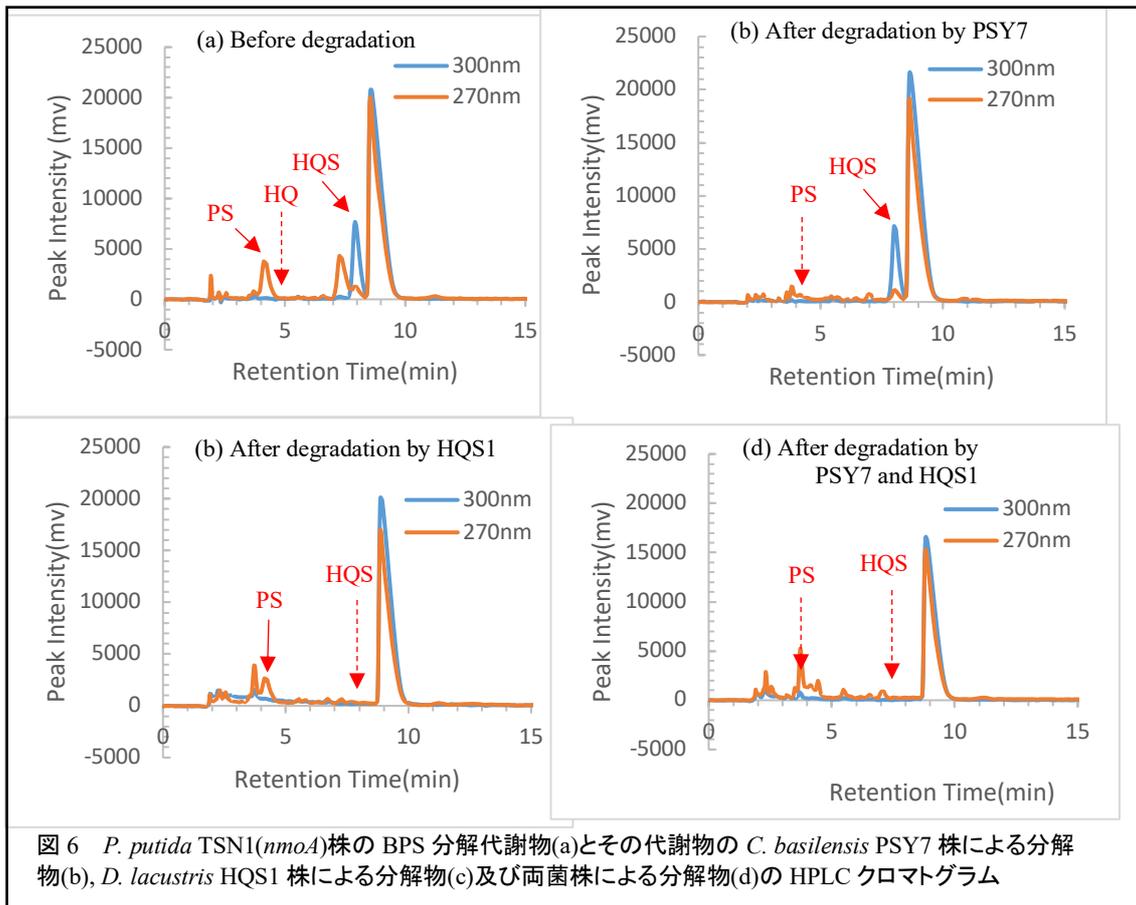


図6 *P. putida* TSN1(*nmoA*)株のBPS分解代謝物(a)とその代謝物の *C. basilensis* PSY7 株による分解物(b), *D. lacustris* HQS1 株による分解物(c)及び両菌株による分解物(d)のHPLCクロマトグラム

**(3) 高濃度 BPS を分解できる新規 BPS 分解真菌の分離** 背景で記述したが、BPS はビスフェノールの中では極めて分解性が悪いことが知られ、これまで本質的に単一菌株で BPS を分解・資化する微生物が報告されてこなかったため、本研究では BPS を分解可能な酵素の遺伝子とその分解に伴って生成する HQ, PS, HQS の資化菌を組み合わせ、BPS 完全分解系の構築に取り組んだ。しかしながら、応用面からは、廃水処理などに組換え菌株を使用することには多くの規制やリスクが伴い、また処理コストの増大につながることも想定できる。そのような理由から、本研究の進展研究として、並行して BPS 分解菌の集積培養を進めていたところ、高濃度の BPS を分解・資化できる黒色酵母 *Exophiala xenobiotica* BPS1 株の分離に成功した。この菌株は 120mg/L の BPS をほぼ 2 週間で分解し、理論炭素量の 73%の溶存炭素量の減少と理論硫黄量の 55%の硫酸イオンの生成を認めた。さらに、この菌株の菌体をアルギン酸で固定化したところ、800mg/L の BPS をわずか 2 日程度で分解できることが明らかとなった。そこで、本菌株を NBRC へ寄託・登録 (NBRC 115858) を行い、特許出願するに至った。本研究では、上記の組換え菌株の菌体をベストな組み合わせで固定化し、BPS の総合的な分解を検討する予定であったが、強力な BPS 分解真菌が得られたため、今後はこの菌株の固定化とその応用について検討する予定である。

<参考文献>

- (1) E.Danzl, K.Sei, S.Soda, M.Ike and M.Fujita: Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. Int. J. Environ. Public Health, 6, 1472-1484 (2009).
- (2) X.Wang, J.Chen, R.Ji, Y.Su, and R.Guo: Degradation of bisphenol S by a bacterial consortium enriched from river sediments. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 103, 630-635 (2019).
- (3) Y.Ogata, S.Goda, T.Toyama, K.Sei, and M.Ike: The 4-tert-butylphenol-utilizing bacterium *Sphingobium fuliginis* OMI can degrade bisphenols via phenolic ring hydroxylation and meta-cleavage pathway. Environ. Sci. Technol. 47, 1017-1023 (2013).
- (4) M.Takeo, J.Akizuki, A.Kwasaki, and S.Negoro: Degradation potential of the nonylphenol monooxygenase of *Sphingomonas* sp. NP5 for bisphenols and their structural analogs. Microorganisms, 8, 284 (2020).
- (5) M.Takeo, K.Yamamoto, M.Sonoyama, K.Miyanaga, N.Kanbara, K.Honda, D.Kato, and S.Negoro: Characterization of the 3-methyl-4-nitrophenol degradation pathway and genes of *Pseudomonas* sp. TSN1. J. Biosci. Bioeng., 126, 355-362 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒江真由、大滝世和、石澤秀紘、武尾正弘
2. 発表標題 ハイドロキノンスルホン酸分解菌 <i>Delftia lacustris</i> HQS1 のゲノム解析と芳香族酸分解遺伝子群の染色体上での分布
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島大樹、石澤秀紘、武尾正弘
2. 発表標題 黒色酵母 <i>Exophiala xenobiotica</i> による ビスフェノール S の生物分解
3. 学会等名 第58回日本水処理生物学会熊本大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武尾正弘、猪野椋太、大滝世和
2. 発表標題 フェノールスルホン酸及びハイドロキノンスルホン酸分解菌を用いたビスフェノールS代謝物の分解
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野笑奈、黒江真由、石澤秀紘、武尾正弘
2. 発表標題 ハイドロキノンスルホン酸の微生物分解機構の解明
3. 学会等名 第59回日本水処理生物学会山形大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ジヒドロキシフェニルスルホン化合物を分解資化可能な微生物	発明者 武尾正弘、戸村正稔、福島大樹、新家悟之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、07202022JP	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------