

平成21年 5月29日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007-2008  
 課題番号： 19560778  
 研究課題名 (和文) 有機リン酸系殺虫剤フェニトロチオンの生物分解性評価と分解促進法の開発  
 研究課題名 (英文) Evaluation of biodegradability of organophosphorus pesticide fenitrothion and development of its enhanced biodegradation methods  
 研究代表者  
 武尾 正弘 (TAKEO MASAHIRO)  
 兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号： 40236334

研究成果の概要：本研究は、有機リン酸系殺虫剤・フェニトロチオン(FT)に対する土壌での生分解性を代謝物の蓄積を含めた観点から評価するものであり、併せて、FT やその代謝物に汚染された土壌のバイオレメディエーションを想定した、微生物の土壌挙動の把握と分解促進法の開発をも目的としている。兵庫県内各地から採取した土壌試料と活性汚泥では、速やかな FT の分解と代謝物として3-メチル 4-ニトロフェノール (3M4NP) の蓄積を認めた。蓄積する 3M4NP の分解を促進するために、3M4NP 分解菌を分離し、その性質と分解挙動を明らかにした。また、T-RFLP, PFGE, Real-time PCR などにより、分解菌の土壌での挙動を解析する手法を検討した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 工学  
 科研費の分科・細目： プロセス工学・生物機能・バイオプロセス  
 キーワード： 生物機能工学、バイオレメディエーション

## 1. 研究開始当初の背景

有機リン酸系農薬や殺虫剤は、植物病害虫の防除や伝染病・感染症予防のために幅広く使用されている。しかしながら、それらは高等生物の神経系に強く作用する猛毒であり、代表的な有機リン酸系殺虫剤のパラチオンやメチルパラチオンは、強い毒性のため、日本をはじめとする先進国でその使用が禁止され、現在は化学構造の若干異なる低毒性のものが大量に使用されている。一方、インド

などの発展途上国の農業国では、茶や綿花の病害虫抑制やマラリア蚊の防除のために、未だに安価で入手できるこれらの薬剤が大量使用されており、人間や生態系へ強い影響を与えている。これらは、太陽光や土中の微生物の作用で徐々に加水分解を受け、リン酸部分と4-ニトロフェノール (4NP) に分解されることが知られている。生じた4NPも極めて毒性が強い上に生物分解性が悪いため、インドのアッサム地方の茶畑土壌では高濃度の4

NP (20–25mg/kg) が蓄積している。このようなことから、パラチオンやメチルパラチオンの生物分解とともに4NPの分解について、これまで世界中の研究者が精力的に研究を行ってきた。

一方、日本では、猛毒のパラチオンに代わり、低毒性のフェニトロチオン (FT) が水田や畑地に、あるいは松食い虫防除のために山林に大量に使用されてきた。この物質は、ほ乳動物に比較的毒性低であることの特徴とするが、水生生物にはパラチオンと同等の影響がある。また、2001年にFTに強い抗男性ホルモン作用が見いだされ、環境ホルモンであることも報告された。

以上のことから、日本ではFTの環境での挙動に強い注意を払う必要がある。FTは既に農薬として登録されているため、高等生物での代謝や毒性、また生物への影響はチェックされているが、その環境動態においては、本物質の消長が確認されているのみ(生分解性は良好でない)である。また、代謝経路が完全に解明されていないために、4NPのような毒性の代謝物の蓄積が考慮されていない。このようなことから、(1)ごく一般的な、水田、畑地、山林の土壌や河川底泥などで、FTがどの程度分解され、4NPのような毒性の代謝物をどの程度蓄積するのか？ (2)また、そのような分解環境にはどのような分解菌がどの程度存在するのか？ (3)さらにFTを単一炭素源として増殖できる分解菌が得られた場合、その代謝経路はどのような経路で、その分解に関わる酵素や遺伝子はどのようなものなのか？ などの疑問を持っている。

FTの生物分解については、FT汚染土壌から分離された *Burkholderia* sp. NF100 が、プラスミド依存性のFT加水分解酵素などにより、メチルヒドロキノンを経由してFTを代謝することが報告されているが、分解経路が完全には解明されていない。

## 2. 研究の目的

上記背景より、本研究では、FTに対する土壌での生物分解性を代謝物の蓄積を含めた観点から再評価するものであり、併せて、FT及びその代謝物に汚染された土壌のバイオレメディエーションを想定した、微生物の土壌挙動の把握と分解促進法の開発をも目的としている。具体的には、(1)一般土壌でのFT生分解性の評価と代謝物の分析、(2)FT分解菌の分離と特徴づけ(代謝経路やそれに関連する酵素や遺伝子の解析)、(3)バイオレメディエーションを想定した土壌マイクロフローラや分解菌の土壌での挙動の分析を行なう。(FTが土壌でかなり容易に分解し、3M4NPを大量に蓄積することが明らかになっ

たため、(2)と(3)については、FT分解菌でなく3M4NP分解菌あるいは既知4NP分解菌を研究対象に変更した)。

## 3. 研究の方法

### (1)土壌でのFT分解性評価

#### ①土壌でのFT分解試験

60°Cの乾燥機で十分に乾燥した土壌10gに5mg/100g soilとなるようにメタノールで溶解したFTをスパイクし、溶媒を除去するために一晚デシケーター内で乾燥させた。その後スパイクした土壌を90gの土壌と混ぜ合わせた。これをFT人工汚染土壌として実験に使用した。汚染土壌の含有水量を40–50%に調整して、30°Cの恒温槽にて静置した(サンプリング時にかき混ぜ)。この土壌を2日おきに5gずつサンプリングし、10mlのメタノールを加えて30°C、160rpmで30分間振盪し、この抽出液をろ過した後、さらにそのろ液1mlを遠心分離(4°C、8000rpm、5min)し、その上清をHPLC分析に供し、FTとその代謝物を分析した。

#### ②土壌細菌によるFT分解試験(液体培地)

30gの土壌を100mlの滅菌水に懸濁し、その上清1mlを50mg/lになるようにFTを添加した100mlの無機塩培地(0.1% (w/v)酵母エキス含む)に加えて振盪培養(30°C、160rpm)を行った。この培養液を2日おきに1mlサンプリングし、遠心分離(4°C、12000rpm、10min)後、その上清をHPLC分析に供した。

### (2)3M4NP分解菌の分離と特徴づけ

#### ①分解菌の単離と16S rDNA配列決定

土壌を無機塩培地に懸濁した後、静置し、その上清0.5mlを終濃度100mg/lとなるように3M4NPを添加した無機塩培地(0.5% (w/v)酵母エキスを含む)10mlに加え、30°C、160rpmで振盪培養した。1週間毎に培養液100μlを新たな同培地に移し、振盪培養を続けた。この培養液を100mg/lとなるように3M4NPを含添加した無機塩寒天培地に塗布し、30°Cで培養し、3M4NP分解菌の単離を行なった。

得られた3M4NP分解菌からDNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen)を使用して全DNAの抽出を行った。これを鋳型にしてPCR反応により、16S rDNAを増幅した。増幅したDNA断片をTベクターpXcmkn12に結合させ、*E. coli* JM109へ形質転換した。形質転換株から組換えプラスミドをアルカリ-SDS法にて抽出し、Shimadzu DSQ-2000Lにて塩基配列の解析を行なった。

#### ②3M4NP分解試験

分解菌を寒天培地から0.25mMの3M4NPを含む無機塩培地(1% (w/v)酵母エキスを含む)に植菌し、30°C、120rpmで24時間振盪培養した。この培養液から菌体を遠心分離(4°C、8000rpm、5min)により集菌し、10mlの

10mM リン酸緩衝液(pH 7.6)で洗浄した後、0.25mM の 3M4NP を含む同緩衝液で懸濁 (OD600=1.0) し、30°C、160rpm にて振盪培養した。培養液を経時的にサンプリングし、メンブレンフィルター(0.20 μm、ADVANTEC 製)で菌体を除去した後、HPLC 分析に供し、3M4NP 及びその代謝物を分析した。

### ③3M4NP 分解菌の遺伝子ライブラリーの構築と分解遺伝子のスクリーニング

3M4NP 分解菌からフェノール法で全 DNA を抽出後、制限酵素 *Sa*II で部分消化し、電気泳動で 6–20kb の DNA 断片を分離、精製し、ベクター pUC19 の *Sa*II 部位に導入した。これを *E. coli* JM109 へ形質転換し、アンピシリンを含む LB 培地で選択した。3M4NP を含む無機塩寒天培地 (0.5%(w/v)酵母エキス含む) にレプリカし、3M4NP 由来の黄色の脱色、あるいは中間代謝物の蓄積による呈色を観察した。

### (3) 土壌マイクロフロラ及び分解菌の T-RFLP, PFGE, Real-time PCR 分析の検討

#### ①T-RFLP 分析の基礎検討

山林土壌 1g から、土壌 DNA 抽出キット ISOIL (Nippon Gene) を用いて全 DNA を抽出した。16S rDNA 増幅用の 5' 末端に蛍光色素を修飾した 27F プライマー及び 1492R プライマーを用いて PCR を行い、土壌 DNA から 16SrDNA を増幅した。増幅した DNA 断片を 4 つの制限酵素 (*Alu*I, *Hha*I, *Sty*I, *Taq*I) にてそれぞれ完全に消化した。消化した DNA 断片を Shimadzu DSQ-2000L で泳動を行い、その泳動像を確認した。また、3M4NP 分解菌の 16S rDNA も同様に増幅し、制限酵素処理後、電気泳動を行い、検出されるフラグメントのパターンを確認した。

#### ②PFGE 分析の基礎検討

PFGE によるゲノム構造の解析の基礎検討として、既知 4NP 分解菌 *Rhodococcus* sp. PN1 株のゲノム解析を実施した。PN1 株を LB 培地にて 30°C、120rpm で 24 時間振盪培養し、PFGE 装置 CHEF DR-II (Bio Rad) のプロトコールに従い、アガロースブロックの作製、溶菌操作を行ない、種々の条件で CHEF DR-II により PFGE を実施した。

#### ③Real-time PCR 分析の検討

既知 4NP 分解菌 *Rhodococcus* sp. PN1 は、2 つの二成分系 4NP 酸化酵素遺伝子群 (*nphA1A2* 及び *npsA2A1*) を有する。これらのうち、*nphA1* 及び *npsA1* の特異的 PCR 用 FAM ラベル化プライマーを設計・合成した。発現量の標準化のために 16S rDNA に対するプライマーも設計・合成した。次に、PN1 株を LB 培地で増殖させ、無機塩培地で洗浄後、0.3mM の 4NP を含有する無機塩培地に懸濁 (OD600=1.0) し、30°C で振盪培養した。経時的に細胞から *illustra* RNAspin mini RNA

Isolation kit (GE Healthcare BioScience) を用いて全 RNA を抽出、DNaseI (Nippon Gene) による DNA 分解処理、QuantiFect Reverse Transcription kit (Qiagen) を用いた cDNA 合成を経て、MiniOpticon (Bio Rad) を用いて、Real-time PCR を実施し、それらのコピー数を計数した。

## 4. 研究成果

### (1) 土壌での FT 分解性評価

#### ①土壌での FT 分解試験の結果

兵庫県内の 9ヶ所の土壌 (河川、田畑、山林、一般家庭の庭などから採取) を用いて、FT の土壌分解試験を行った。その結果、程度の差はあったが 2 週間程度でいずれの土壌でも FT のかなりの消失が認められた。Fig. 1 にその一例を示す (家庭の庭土)。しかしながら、非滅菌土壌でもかなり減少を示す試料も存在したために、生分解以外の要因も疑われた。そこで、次に、これらの土壌試料から抽出した土壌微生物による FT の促進分解試験を液体培地で実施することにした。

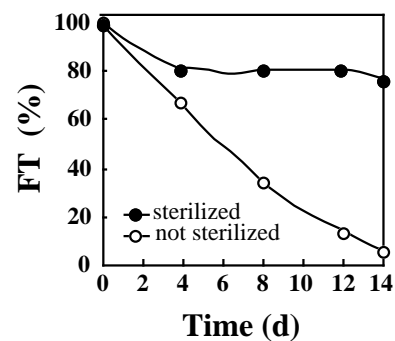


Fig.1 Fenitrothion degradation by garden soil

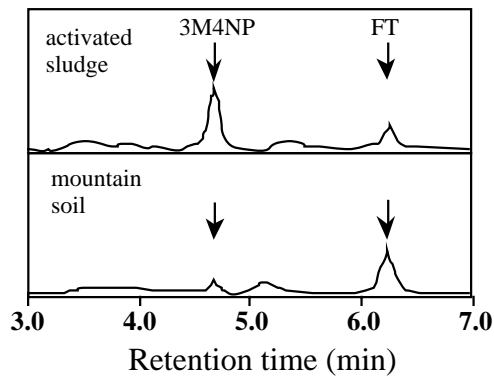
#### ②土壌細菌による FT 分解試験 (液体培地)

土壌微生物による FT の分解性を確認するために、土壌あるいは活性汚泥の水懸濁液の上澄みを植種として FT 分解試験を実施した。FT は水への溶解性が低く、過剰分の FT が油滴として液面に浮くため、培養液中の FT の定量値は一定しないが、河川、田畑、山林土壌及び活性汚泥の 4 試料で、いずれも FT の代謝物と推定される 3-メチル 4-ニトロフェノール (3M4NP) を検出した。Fig. 2 は活性汚泥あるいは山林土壌を植種し、8 日間培養した培地の HPLC 分析の結果を示している。HPLC による分析で、活性汚泥植種分では 0.18mM の FT から 0.08mM の 3M4NP が検出され、本物質が主代謝物として蓄積することが明らかとなった。

### (2) 3M4NP 分解菌の分離と特徴づけ

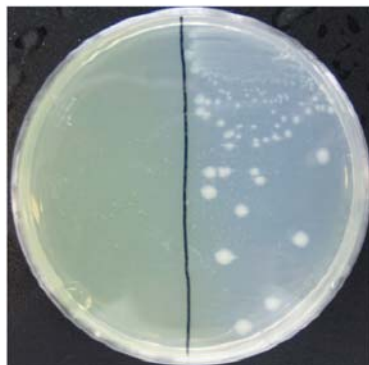
#### ①分解菌の単離と 16S rDNA 配列決

FT が比較的土壌 (土壌微生物) で分解される一方、4NP と比べても毒性の高い 3M4NP を



**Fig.2 HPLC analysis of 8-d cultures inoculated with activated sludge and mountain soil bacteria**

かなり蓄積することが明らかとなったため、FT の土壌での完全分解を促進するために、3M4NP の蓄積を防ぐ必要がある。そこで、ここでは、3M4NP 分解菌の分離を試みた。3M4NP を含む無機塩培地（酵母エキス）を用いて集積培養を行なったところ、家庭の庭土から、3M4NP 特有の黄色を寒天培地上で脱色する菌株が出現した (Fig. 3)。この菌株を SN1 株と命名した。Fig. 3 ではコロニーの存在する右半分のみが脱色されている。



**Fig.3 3-Methyl-4-nitrophenol (3M4NP) degrading bacterium SN1 on mineral salt agar plate containing 3M4NP.**

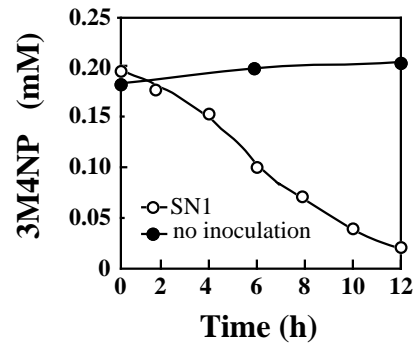
本菌株の 16S rDNA を解析したところ、*Pseudomonas putida* の既知菌株と 99%以上の相同性が認められたため、本菌株を *P. putida* と同定した。

#### ②3M4NP 分解試験

SN1 株の 3M4NP 分解性を確認するために、本菌株の細胞懸濁液を用いて 3M4NP 分解試験を行なった。その結果、Fig. 4 に示す通り、12 時間で 0.2mM 程度の 3M4NP を完全に分解できることが明らかとなった。また、HPLC 分析により、代謝物として微量のメチルヒドロキノンが検出された（データ示さず）。

#### ③3M4NP 分解菌の遺伝子ライブラリーの構築と分解遺伝子のスクリーニング

SN1 株の 3M4NP 分解経路や分解遺伝子・分



**Fig.4 Degradation of 3M4NP by *P. putida* SN1**

解酵素系を解明するために、3M4NP 分解遺伝子の取得を試みた。SN1 株の全 DNA を *Sa*II により部分消化した後、6-20kb の DNA 断片を精製して pUC19 に組み込み、*E. coli* JM109 へ形質転換した。約 2000 の形質転換株が得られ、ほぼ全ての形質転換株が平均 7kb の SN1 株の DNA 断片を保持することがわかった。そこで、3M4NP を含む無機塩寒天培地上で分解の簡易スクリーニング（脱色・呈色の観察）を行なったが、現段階で 3M4NP を分解する菌株は得られていない。ライブラリーをより発現効率の高い *P. putida* KT2440 などの近縁種に導入して、スクリーニングを行なう予定である。

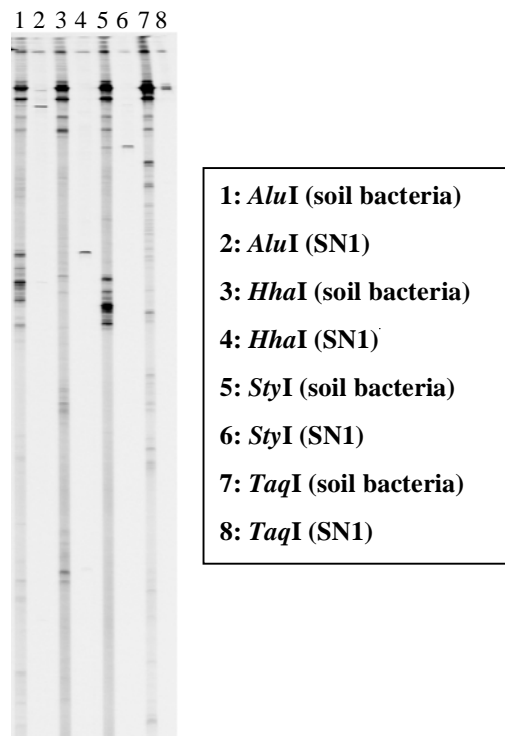
#### (3) 土壌マイクロフラ及び分解菌の T-RFLP, PFGE, Real-time PCR 分析の検討

##### ①T-RFLP 分析の基礎検討

土壌から抽出した DNA を鋳型に PCR 法により土壌細菌の 16S rDNA を増幅し、制限酵素で処理後、DNA シーケンサー (native PAGE) で分析した。その結果を Fig. 5 に示す。このように土壌細菌の存在をパターンニングすることができた。一方、将来的に SN1 株を土壌に蓄積する 3M4NP の分解に活用することを前提に、SN1 株の 16S rDNA を増幅し、同様に DNA シーケンサーで分析したところ、明瞭なバンドが検出できた (Fig. 5)。従って、SN1 株特異的なプライマーを使用すれば、土壌のマイクロフラ中でも本菌株の挙動を確認できると考えられる。本菌株を添加した 3M4NP 含有土壌中での本菌株の挙動解析を実施する予定である。

##### ②PFGE 分析の基礎検討

土壌のバイオレメディエーションで多数出現すると予想される分解菌のゲノムタイピングを行なうために、PFGE 分析の基礎検討を既知 4NP 分解菌 *Rhodococcus* sp. PN1 株を用いて行なった (*Rhodococcus* 属細菌は、グラム陽性の土壌細菌のモデルになる)。2V/cm, Switch time 1800sec, 72h の泳動でのゲノム及び巨大プラスミドの解析の結果、本菌株に約 100kb 及び約 650kb のプラスミドが検出された（データ示さず）。この結果から、土壌に存在する分解菌のタイピングと目的菌の



**Fig.5 T-RFLP analysis of soil bacteria and *P.putida* SN1**

判別同定が本法により可能と考えられる。

### ③Real-time PCR 分析の検討

3M4NP 分解菌 *P. putida* SN1 株から 3M4NP 分解遺伝子がまだ取得されていないため、既知の 4NP 分解菌 *Rhodococcus* sp. PN1 株の 2 種類の 4NP 酸化酵素遺伝子 (*nphA1* 及び *npsA1*) を用い、Real-time PCR による特異的な遺伝子発現の検出を試みた。まず、本菌株の菌体を 0.3mM の 4NP を含む無機塩培地で振盪し、経時的に細胞から RNA を抽出し、Real-time PCR で両遺伝子が 4NP の分解時にどのように発現しているか追跡した。その結果、4NP を含まない無機塩培地での振盪に比べ、4NP を含む無機塩培地で振盪した細胞は、分解終了 (8 時間) までの全てのサンプリングポイントで、両者とも数倍～数千倍これらの遺伝子が多く発現しており、また、絶対量では後者が 10 倍以上発現していることがわかった。この結果から、土壤に分解菌を添加し、効率良く RNA を抽出することができれば、特異的な遺伝子発現のモニタリングが可能と判断される。

### 研究結果のまとめ

土壤での FT 分解性を代謝物の蓄積を含めた観点から評価したところ、土壤で FT は容易に 3M4NP に変換されることがわかり、有害物質の 3M4NP の蓄積が新たな問題として提起できた。蓄積する 3M4NP の分解促進のために、FT 分解菌の分離にかわり、3M4NP 分解菌の取得を試みたところ、これに成功した。また、

分解菌の特徴づけや 3M4NP 分解についても検討を行い、一定の成果が得られた。3M4NP の代謝経路や分解に関わる酵素・遺伝子の解明は宿題として残ったが、良好な遺伝子ライブラリーが作製できたため、スクリーニングを継続する予定である。また、土壤のバイオレメディエーションを想定して、T-RFLP, PFGE, Real-time PCR などの基礎技術の検討を行ない、本試験の目処がたった。今後は、実際に、取得した分解菌を使用して土壤の浄化をモニタリングする予定である。

本研究を実施するにあたり、多大なる支援を頂きました文部科学省並びに日本学術振興会に厚く御礼申し上げます。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① M. Takeo, M. Murakami, S. Niihara, K. Yamamoto, M. Nishimura, D. Kato, and S. Negoro: Mechanism of 4-nitrophenol oxidation in *Rhodococcus* sp. strain PN1: Characterization of the two-component 4-nitrophenol hydroxylase and regulation of its expression. *J. Bacteriol.*, 190, 7367-7374 (2008) 査読有

〔学会発表〕 (計 4 件)

① M. Takeo, D. Kato, S. Negoro, and R. K. Jain: Bacterial metabolisms of soil contaminants, nitrophenols. The 13<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium (IBS2008), Abstracts S11, IL-90, 16<sup>th</sup>, Oct., 2008, Dalian, China. (*J. Biotechnology*, 136S, S11 (2008)) (招待講演)

② 山本健太、貞弘建、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司: *Rhodococcus* sp. PN1 株の 4-ニトロフェノール分解における二つの酸化酵素系の役割、第 60 回日本生物工学会大会、要旨集、p85 (2008)

③ 山本健太、西村崇弘、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司: *Rhodococcus* sp. PN1 株の 4-ニトロフェノール酸化酵素の機能解析、第 59 回日本生物工学会大会、要旨集、p185 (2007)

④ 西村崇弘、柴田直樹、山本健太、樋口芳樹、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司: *Rhodococcus* sp. PN1 株の 4-ニトロフェノールモノキシゲナーゼ (*NphA1*) の X 線結晶構造解析、第 59 回日本生物工学会大会、要旨集、p185 (2007)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

武尾 正弘 (TAKEO MASAHIRO)

兵庫県立大学大学院・工学研究科・准教授  
研究者番号: 40236334

#### (2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

根来 誠司 (NEGORO SEIJI)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90156159

加藤 太一郎 (KATO DAI-ICHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60423901