

平成22年6月14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780240
 研究課題名（和文） 内分泌かく乱物質アルキルフェノール類の無毒化技術の開発に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） Basic Research on the Development of Detoxification Techniques of Endocrine Disrupting Chemicals, Short Ethoxy Chain-Alkylphenols
 研究代表者
 田崎 裕二（TASAKI YUJI）
 長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授
 研究者番号：90390434

研究成果の概要（和文）：非イオン系界面活性剤アルキルフェノールポリエトキシレート（APEO）は、微生物により分解されると外因性内分泌かく乱作用を有するアルキルフェノール（AP）類が生成される。本研究では、APEOの生分解機構を解明するため、APEOの一種であるオクチルフェノールポリエトキシレート（OPEO）分解菌 *Pseudomonas putida* S-5 の OPEO 分解遺伝子をトランスポゾン（Tn）タギング法で単離し、DNA 配列解析を行った。*P. putida* S-5 から作成した Tn 挿入変異株（約 11,000 株）の中から、OPEO 分解遺伝子破壊株 17 株を選択した。それらの 17 遺伝子の DNA 配列を決定して相同性検索を行い、それらがアシル CoA シンターゼ、シャペロンタンパク質、NADH キノン酸化還元酵素等と相同性を示すことを見出した。また、炭素源に OPEO またはグルコースを用いて培養した *P. putida* S-5 における、9 遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。その結果、T424 遺伝子のみが OPEO の場合のみ発現され、残り 8 つは OPEO とグルコースの場合ともに発現された。

研究成果の概要（英文）：Alkylphenol polyethoxylates (APEOs) belonging to a group of nonionic surfactants are biodegraded by bacteria and then short ethoxy chain-alkylphenols which are potential endocrine disrupters are produced. In this study, to elucidate the biodegradation mechanism of APEOs, we isolated genes that were involved in biodegradation of octylphenol polyethoxylate (OPEO), a kind of APEOs, from OPEO degrader *Pseudomonas putida* S-5 by transposon tagging and analyzed their DNA sequences. Approximately 11,000 transposon mutants were constructed by insertion of transposon Tn5 into *P. putida* S-5. Seventeen mutants that are not able to metabolize OPEO, namely OPEO-degradation gene disruptants, were isolated. DNA sequences of the genes disrupted by insertion of transposon were determined. A similarity search showed that 17 proteins encoded by the genes have high amino acid sequence similarity to acyl-CoA synthetase, chaperone protein, NADH quinone oxidoreductase, etc. Gene expression of 9 genes in *P. putida* S-5 cells grown on different carbon source (OPEO or glucose) was analyzed by RT-PCR. T424 gene was expressed only in cells grown on OPEO, while the other genes were expressed in cells grown on glucose as well as on OPEO.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 2008年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |

| | | | |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,400,000 | 420,000 | 2,820,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境，水資源，遺伝子，応用微生物，酵素，バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

我国は、アルキルフェノール (AP) 類，なかでもオクチルフェノールとノニルフェノールを世界に先駆けて外因性内分泌かく乱物質として認定した。一方，それ以降も AP にポリエチレンオキシド (PEO) 鎖が付加重合した非イオン系界面活性剤 AP ポリエトキシレート (APEO) は，工業や農業の分野で洗浄剤や乳化剤等として多用されてきた。しかし，使用後下水処理場，河川，海洋など様々な水環境に流出された APEO は，それらの環境中における PEO 鎖の選択的な微生物分解により，外因性内分泌かく乱作用を発現する低重合度 AP 類まで分解されることが明らかにされた。そこで，低重合度 AP 類の水環境中に生息する野生生物に与える影響が懸念され，近年ヨーロッパ諸国においては徐々に APEO の使用が規制されて始めている。

APEO は農薬の性能を調節する目的で，農薬補助剤として農耕地で多用されてきた。そのため，農耕地には多量の低重合度 AP 類が残留・濃縮している可能性が指摘されてきたが，農耕地での APEO の動態は全く解明されていなかった。そこで，西尾ら (Biosci. Biotechnol. Biochem., 66: 1792, 2002) は，水田土壌より APEO の一種オクチルフェノールポリエトキシレート (OPEO) 分解菌 11 株を分離し，16S rDNA RFLP 解析によりその中の 1 種を *Pseudomonas putida* S-5 と同定した。その後，佐藤ら (Polym. Degrad. Stab., 74: 69, 2001) は MALDI-MS を用いた機器分析により *P. putida* S-5 の OPEO 分解中間産物 (OPEO の PEO 鎖の末端水酸基側がカルボキシル基に酸化された成分) を同定し，OPEO 分解経路を提案した (図 1)。OPEO 分解は，その PEO 鎖末端のカルボン酸中間体を経る酸化とエーテル結合の加水分解 (グリオキシル酸の生成) の繰り返しによる exo 型であり，エチレンオキシド (EO) 単位が 2 または 3 のところで停止することが明らかにされた。これより，農耕地が APEO 由来の外因性内分泌かく乱物質の発生源の一つとなっていることが明らかにされた。よって現在，農耕地を起

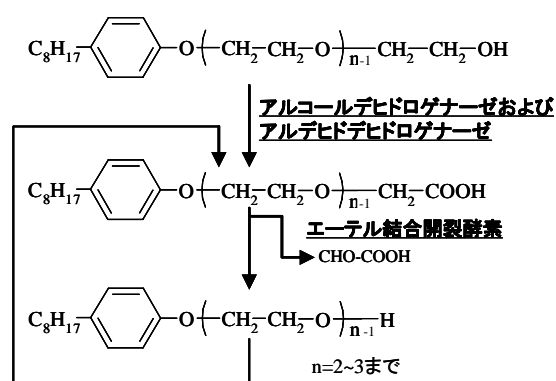


図1. *Pseudomonas putida* S-5のOPEO分解経路

源とする水循環系および農作物の安全性を確保する上で，環境負荷の少ない微生物機能を利用した残留性 AP 類の無毒化技術の開発が期待されている。

国内外において，様々な水環境中で低重合度 AP 類が検出されていることがいくつか報告されている。これより，様々な水環境中において，APEO の PEO 鎖を不完全に分解する APEO 分解菌が存在し，低重合度 AP 類が蓄積していると想像できる。現在のところ，我々は AP を分解する土壌中の糸状菌 (AP 分解菌) を分離し，その分解酵素 (ラッカーゼ) について詳細に把握している。しかし，低重合度 AP 類を PEO 鎖が完全に分解された AP まで分解する微生物は分離できていない。よって，*P. putida* S-5 の分解酵素タンパク質を改変することにより，APEO の様々な長さの PEO 鎖を完全に分解して AP を生成できる APEO 分解菌を分子育種することができれば，この APEO 分解菌と AP 分解菌を利用した APEO 由来の残留性 AP 類の速やかな無毒化が可能になる。そのため，既存する APEO 分解菌の分解能力を向上させて，低重合度の残留性 AP 類を AP まで分解することが期待される。そこではじめに，内分泌かく乱物質 AP 類の無毒化技術の開発のために，既存の APEO 分解菌による PEO 鎖分解が途中で止まり，低重合度 AP 類が生成される要因を詳細に把握することが必要となる。しかし，現在のところ APEO 分解酵素に関する知見は，田崎ら (Biosci.

Biotechnol. Biochem., 70: 1855, 2006) により報告されたアルコールデヒドロゲナーゼのみであり、それも複数存在する同酵素の一種のみである。よって、APEO 分解の詳細なメカニズムについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、既に分離された APEO の一種オクチルフェノールポリエトキシレート

(OPEO) 不完全分解菌 *Pseudomonas putida* S-5 の OPEO 分解酵素遺伝子をトランスポゾン (Tn) タグging法を用いて網羅的に単離する。そして、それらの構造・機能を明らかにして APEO 生分解機構を解明することにより、APEO の PEO 鎖完全分解菌の分子育種のための基礎データ蓄積を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株・化合物と培養条件

供試菌株には、水田土壌より分離された OPEO 分解菌 *Pseudomonas putida* S-5 を用いた。OPEO として平均 PEO 鎖が 9.5 の Triton X-100 (TX) を用いた。*P. putida* S-5 と形質転換用大腸菌の培養には、それぞれ、1.0% TX 培地と LB 培地を用いて 30°C と 37°C で行った。

(2) Tn 挿入変異株の作成と OPEO 分解遺伝子破壊株の選択

P. putida S-5 由来の Tn 挿入変異株は、EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2> Tnp Transposome Kit (EPICENTRE) を使用し、エレクトロポレーション法により作成した。その後、作成した Tn 挿入変異株を、唯一の炭素源を OPEO とする選択培地 (TX 寒天培地) で培養し、生長が著しく低下した株、すなわち OPEO 分解遺伝子破壊株を選択した。

(3) OPEO 分解産物の GC-MS 分析

OPEO 分解遺伝子破壊株及び *P. putida* S-5 を TX 液体培地で 30°C, 72 時間振とう培養した。その後、酢酸エチル抽出により得られた酢酸エチル層を GC-MS で分析した。GC-MS 分析には、GC-2010 及び GCMS-QP2010 (島津製作所) と SPB1 カラム (Supelco) を使用した。また、GC-MS 分析においては、西尾ら (Biosci. Biotechnol. Biochem., 66: 1792, 2002) の方法に従って行った。

(4) 挿入 Tn の局在性の決定

P. putida S-5 には、約 70 kb のプラスミド pOP が一つ存在し、この pOP が除去されるとそのプラスミド除去株の OPEO 分解能が著しく低下することが明らかにされている (未発表データ)。よって、*P. putida* S-5 の OPEO 分解には、pOP 上の遺伝子が関与している。そこで、選択した OPEO 分解遺伝子破壊株から染色体およびプラスミドの DNA をそれぞれ抽出し、PCR 法により挿入 Tn の局在 (染色体

またはプラスミド) を確かめた。PCR は、Tn 上のカナマイシン耐性遺伝子の一部を増幅した。

(5) DNA 配列解析

適当な制限酵素で処理した OPEO 分解遺伝子破壊株の染色体 DNA から、プラスミドレスキュー法により Tn 周辺領域を含む DNA 断片を得た。そして、Tn の挿入により破壊された遺伝子の DNA 配列を決定した。DNA 配列の決定は、秋田県立大学バイオテクノロジーセンター

(秋田市) に委託した。決定した遺伝子の DNA 配列より推定されるアミノ酸配列を用いて、相同性検索を行い、遺伝子の機能の推定を行なった。相同性検索は、BLAST プログラムを用いて行った。

(6) 遺伝子発現解析

P. putida S-5 を TX (終濃度 1%) またはグルコース (終濃度 0.5%) を唯一の炭素源とする液体培地 (TX 培地, Glc 培地) で培養した。その後、それらの細胞からトータル RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) OPEO 分解遺伝子破壊株の作出

OPEO 分解遺伝子を網羅的に単離するため、*P. putida* S-5 から約 11,000 株の Tn 挿入変異株を作成した。それらを選択培地 (TX 寒天培地) で培養し、生長が著しく低下した 17 株を選択し、これらを OPEO 分解遺伝子破壊株とした。その後の実験には、これら 17 株を用いた。

(2) OPEO 分解遺伝子破壊株の OPEO 分解挙動

OPEO 分解遺伝子破壊株及び *P. putida* S-5 における OPEO の分解産物の分子量分布および化学構造を GC-MS で分析し、その分解挙動を調べた。はじめに、S-5 の分解産物を分析した結果、OPEO (平均重合度 9.5) が低重合化され、OPEO₂ と OPEO₃ の 2 つのピークが検出された。次に、OPEO 分解遺伝子破壊株 T424 株について、同様に分析した。その結果、OPEO の低重合化はみられたが、OPEO₂、OPEO₃ 以外にも OPEO₄、OPEO₅ のピークが検出され、OPEO の分解が S-5 よりゆっくりであることが推測された。また、今回の条件では、低重合度 OPEO の検出は比較的可能であるが、高重合度の OPEO (EO 鎖 5 以上) の検出が難しいことが分かった。現在、条件の再検討を行っている。

(3) OPEO 分解遺伝子破壊株の挿入 Tn の局在性

OPEO 分解遺伝子破壊株の染色体とプラスミドの DNA を用いて、Tn 上のカナマイシン耐性遺伝子を PCR により増幅した。その結果、全株において、染色体 DNA を用いた場合のみ PCR バンドが検出された。これより、Tn は OPEO 分解遺伝子破壊株の染色体 DNA に局在することが明らかにされた。

(4) OPEO 分解遺伝子の DNA 配列解析と機能の推定

17 株の OPEO 分解遺伝子破壊株において、Tn 挿入で破壊された遺伝子の DNA 配列を決定し、相同性検索を行った。その結果、T424 遺伝子がアミノ酸トランスポーター、T3179 遺伝子がアシル CoA シンターゼ、T3305、T10681 遺伝子が同一遺伝子でシャペロンタンパク質、T3640 遺伝子が NADH キノン酸化還元酵素、T3835 遺伝子がグリコシルトランスフェラーゼ、T4102、T5631、T7586 遺伝子が同一ではないが未知タンパク質、T6803、T8021 遺伝子が同一ではないがペプチダーゼ、T7662、T10072 遺伝子が同一遺伝子でタンパク質分解酵素、T7862 遺伝子がグリコーゲントランスフェラーゼ、T8363 遺伝子がギ酸アセチルトランスフェラーゼ、T9166 遺伝子がグルタチオントランスフェラーゼ、T9555 遺伝子が転写因子をコードしていると推測された。これらのタンパク質の機能より、今回単離した遺伝子のほとんどは、直接 OPEO の分解に関与するのではなく、間接的に関与していることが明らかにされた。

(5) OPEO 分解遺伝子の発現解析

17 遺伝子中、9 つの遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。TX 培地または Glc 培地を用いて培養した *P. putida* S-5 における遺伝子の発現を解析した結果、T424 遺伝子のみが TX 培地においてのみ RT-PCR バンドが検出された。よって、T424 遺伝子は OPEO により誘導されることが明らかにされた。これに対して、残り 8 遺伝子は TX 培地と Glc 培地においてともに RT-PCR バンドが検出された。よって、これらの遺伝子は、構成的に発現されることが明らかにされた。これより、OPEO 分解に関与する遺伝子の多くは、OPEO により誘導されるのではなく、構成的に発現していることが明らかにされた。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①小栗まゆみ, 松尾賀津代, 細田晃文, 田崎裕二, 吉川博道, 田村廣人, 非イオン系界面活性剤分解菌モニタリングのためのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を指標とした分子デバイスの設計, 日本農芸化学会 2008 年度大会, pp. 37, 2008, 3

②田崎裕二, 高野慎也, 志田哲史, 長井隆, 吉川博道, 田村廣人, *Pseudomonas putida* S-5 のオクチルフェノールポリエトキシレート分解遺伝子の塩基配列と発現の解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会, pp. 247, 2008, 3

③高橋一也, 山谷真也, 大山雄輝, 長井隆, 田崎裕二, *Pseudomonas putida* S5 株のアルキルフェノールポリエトキシレート分解遺伝子の単離と解析, 第 15 回高専シンポジウム in いわき, pp. 298, 2010, 1

[図書] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

<http://www.nagaoka-ct.ac.jp/mb/index.files/Page1444.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田崎 裕二 (TASAKI YUJI)

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号: 90390434

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: