

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780296

研究課題名（和文） 白色腐朽菌による環境ホルモン分解機構の解明及び汚染土壌完全浄化菌の育種

研究課題名（英文） Studies on degradation of endocrine disruptors by white-rot fungi and molecular breeding of hyper endocrine disruptors-degrading fungi in contaminated soils

研究代表者

平井 浩文 (HIRAI HIROFUMI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：70322138

研究成果の概要（和文）：

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株を用いて、環境ホルモンの一種であるビスフェノール A (BPA) の分解を試みた。リグニン分解酵素産生培地において BPA を処理すると、BPA は酸化重合された。一方、リグニン分解酵素非産生培地で BPA を処理すると、主たる代謝産物として BPA の水酸化物を与えた。また本反応にシトクロム P450 が関与していることが予想された。また、BPA 混入土壌 (100 µg/g) をマンガンペルオキシダーゼ高生産株で処理したところ、培養 5 日間にて BPA の約 90% が消失した。

研究成果の概要（英文）：

The degradation of bisphenol A (BPA) was demonstrated with hyper lignin-degrading white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. BPA was oxidatively polymerized under ligninolytic condition. On the other hand, BPA was hydroxylated under non-ligninolytic condition. It is suggested that cytochrome P450 is involved in this hydroxylation. High manganese peroxidase-producing transformant was able to eliminate BPA-contaminated soil by approximately 90% for 5 day-incubation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：環境浄化、白色腐朽菌

## 1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱物質（環境ホルモン；EDs）による環境汚染が現在大きな社会問題となっている。特に、環境省がまとめた ExTEND2005 では、4-ノニルフェノール(分岐型、NP)、4-t-オクチルフェノール (OP)

及びビスフェノール A (BPA) は、メダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察されており、さらに平成 14 年度内分泌攪乱化学物質における環境実態調査結果では、これらの化合物が底質において最高 7.5 mg/kg 検出されている。つまりこれらの化合

物の除去・無毒化は緊急性の高い問題である。EDsの分解には化学的・物理的処理法が開発されているが、EDsの場合、低濃度で広範囲に分布しているため、上記処理はコスト的に不適応である。

これまでに、*Streptomyces* 属、*Bacillus* 属、*Sphingomonas* 属といった細菌類や *Irpex lacteus* といった担子菌まで、各種微生物による EDs の分解が報告されているものの、全て微生物の生育に適した「液体培地」での分解を観察しており、さらに最も重要である「無毒化」については言及していない。

白色腐朽菌による環境汚染物質の分解は、1985年に Bumpus らによって初めて報告されてから、これまでに数多くの研究が行われてきている。例えば、Kamei ら及び Xiao らは白色腐朽菌 *Phlebia brevispora* が PCB 及び DDT を分解可能であり、その代謝産物についても報告している。さらに白色腐朽菌、及びそれらが産生するリグニン分解酵素であるリグニンペルオキシターゼ、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)、ラッカーゼによる EDs 分解報告例も数多くある。中でも BPA に関して、Hirano らはヒラタケ由来 MnP で BPA を処理し、フェノールを始め、数種の分解産物が生成することを報告している。しかし、この過程で生成する hexestrol は BPA より強いエストロゲン活性を示すことが報告されている。また Tsutsumi らは、*P. chrysosporium* 由来の MnP で BPA を処理すると、BPA の重合が起こり無毒化されることを報告している。しかし、この重合体が自然環境下において何らかの作用で解重合されると、エストロゲン活性を有する化合物が生成してくる可能性がある。このように、現状のリグニン分解酵素による EDs の処理では完全に無毒化されない可能性があり、さらなる EDs 処理法の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株を用いて、

(1) 環境ホルモン類分解機構の解明及び分解関連酵素遺伝子のクローニング

(2) EDs 汚染土壌を完全に浄化可能な分解菌のセルフクローニング

を行い、上記分解菌を用いて底質において検出されている濃度である 10 mg/kg 環境ホルモン (NP、OP、BPA) 含有土壌を 1 週間で完全浄化するシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

(1) リグニン分解酵素産生条件下における BPA の分解

供試菌として *P. sordida* YK-624 株(ATCC 90872) を使用した。ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地で 3 日間培養し、コルクボ

ーラーで打ち抜いた *P. sordida* YK-624 株の菌体ディスク 2 個を、Kirk 液体培地 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに添加して、30°C で静置培養を行った。4 日間培養後、最終濃度 0.01 mM, 0.1 mM, 1.0 mM になるように BPA を添加し、さらに培養した。経時的に培養液を回収し、HPLC 分析に供した。

本培地において生成する BPA 代謝産物を同定するため、上記培養系の大量培養を行い、培養液酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、単離・精製した。得られた代謝産物は各種機器分析により構造を決定した。

(2) 非リグニン分解酵素産生条件下における BPA の分解

PDA 培地で 3 日間培養し、コルクボーラーで打ち抜いた *P. sordida* YK-624 株菌体ディスク 2 個を potato dextrose (PD) 液体培地 10 ml 溶液を含む 100 ml 容三角フラスコに添加し、30 °C で静置培養を行った。3 日間培養後採集濃度が 1 mM になるように BPA を添加し、さらに 30 °C で静置培養を行った。経時的にフラスコを回収し、培養液の HPLC 分析を行った。

本培地において生成する BPA 代謝産物を同定するため、上記培養系の大量培養を行い、培養液酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、単離・精製した。得られた代謝産物は各種機器分析により構造を決定した。

(3) BPA 模擬汚染土壌の菌処理

供試菌として、木材腐朽時に MnP を高生産する形質転換株 BM-65 株を使用した。本菌株は、木材腐朽時特異的発現プロモーター *bee2-pro* に MnP 遺伝子 *mnp4* を連結した発現プラスミドを、*P. sordida* YK-624 株由来ウラシル要求性変異株である UV-64 株に導入して得られた株である。1.0 g のブナ木粉に H<sub>2</sub>O 2.5 ml を添加し、オートクレーブにて滅菌処理を行い、そこへ前培養した供試菌をコルクボーラー (内径 10 mm) で打ちぬき、その菌体ディスク 1 個を接種し、30°C で 7 日間培養した。その後、4380 μM BPA/アセトン溶液を 100 μl 添加した汚染土壌 (乾燥重量 1.0 g、含水率 70%) と混合し、30°C で静置培養を行った。培養後、ソックスレー抽出 (溶媒: アセトン) により BPA を回収し、アセトンを減圧留去後、HPLC 分析に供した。

## 4. 研究成果

(1) リグニン分解酵素産生条件下における BPA の分解

リグニン分解酵素産生条件下における *P. sordida* YK-624 株による BPA の分解を行った。その結果、実際の汚染環境下の濃度に比較的近い 0.01 mM では培養 24 時間後で 100% 減少し、10 倍濃度の 0.1 mM でも 100%

減少した。さらに高濃度 1 mM では培養 24 時間後に 60.6 %減少し、72 時間後に 66.1 %減少した (Fig. 1)。

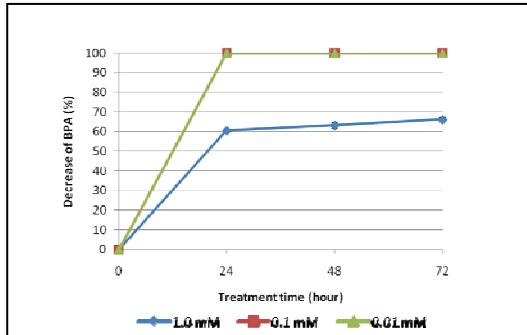


Fig. 1 リグニン分解酵素産生条件下における BPA の減少.

これまでの報告で、ヒラタケが 0.4 mM BPA を 80%分解するのに 12 日培養を要するという報告や、*P. chrysosporium* や *Trametes versicolor* は 0.044 mM BPA を完全に除去するのに 7 日間も要するという報告がある。上記の報告は本研究で使用した培地組成が異なるが、24 時間で 0.1 mM BPA を完全に除去でき、1.0 mM BPA を 60 %除去可能な *P. sordida* YK-624 株はフェノール性環境汚染物質の除去に有効であると考えられる。

BPA 代謝後の培養系より得られた酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、代謝産物 2 種類を単離・精製した。これを各種機器分析に供した結果、Fig. 2 に示すような BPA 二量体が生成していることが判明した。つまり、リグニン分解酵素産生条件下では BPA は瞬時に酸化され、Fig. 2 の様な二量体を経て酸化重合されていることが推定された。

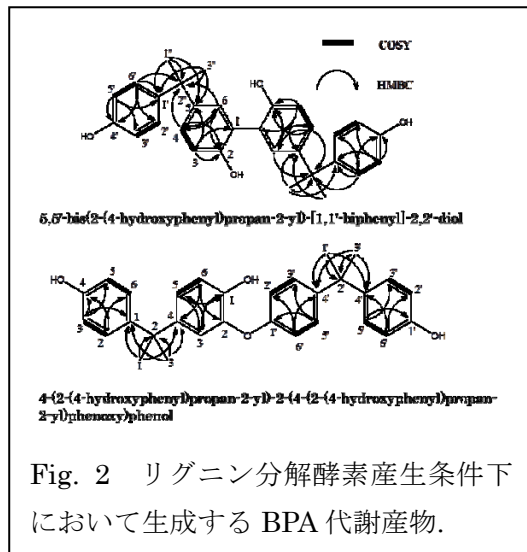


Fig. 2 リグニン分解酵素産生条件下において生成する BPA 代謝産物.

(2) 非リグニン分解酵素産生条件下における BPA の分解

リグニン分解酵素産生条件下では BPA は酸化重合することが判明したが、本項では BPA の完全分解を目指し、リグニン分解酵素が産生されない条件における BPA の分解を試みた。

その結果、処理 24 時間後で約 50 %の減少が見られ、96 時間後には約 70 %、168 時間後には約 80 %の減少が見られた (Fig. 3)。

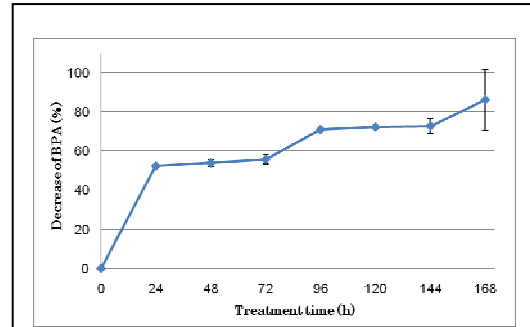


Fig. 3 非リグニン分解酵素産生条件下における BPA の減少.

そこで、本培養系で生成している BPA 代謝物の構造を決定すべく、代謝物の単離・精製を行い、各種機器分析に供した結果、Fig. 4 に示すように BPA の水酸化物であった。

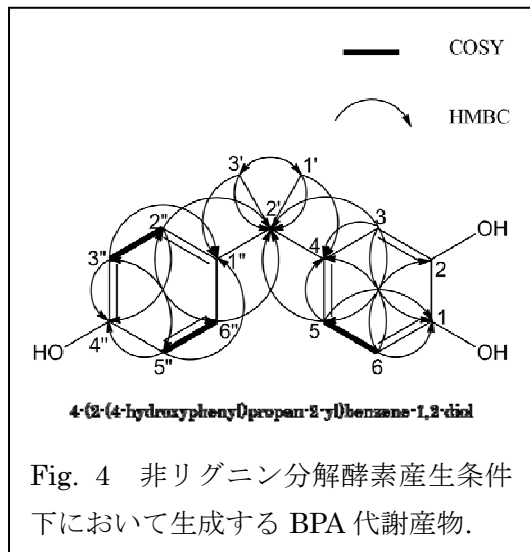


Fig. 4 非リグニン分解酵素産生条件下において生成する BPA 代謝産物.

そこで、この水酸化反応にシトクロム P450 が関与しているかどうか確認するため、シトクロム P450 阻害剤である piperonyl butoxide (PB) により *P. sordida* YK-624 株による BPA 除去が阻害されるかどうか検討した。その結果、PB 無添加系では 96 時間処理後に BPA は 70.1 %減少したのに対して、0.1 mM PB 添加系では 63.4 %の減少を示し、さらに 1 mM PB 添加系では 38.1 %の減少にとどまった (Fig. 5)。この結果より、*P*

*sordida* YK-624 株の PD 液体培地における BPA の代謝にはシトクロム P450 が関与していることが示唆された。

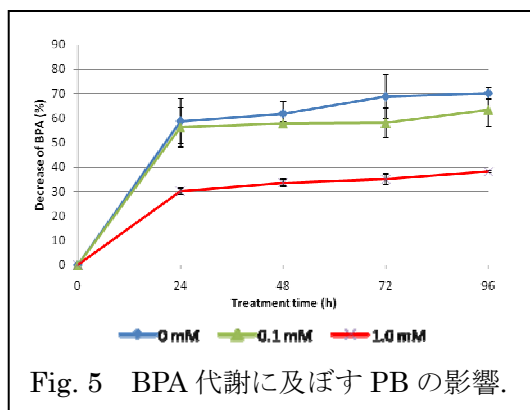


Fig. 5 BPA 代謝に及ぼす PB の影響.

### (3) 白色腐朽菌による模擬汚染土壌浄化の試み

これまでの結果において、高活性リグニン分解菌 *P. sordida* YK-624 株は BPA 除去能が高い事が判明している。*P. sordida* YK-624 株の様な白色腐朽菌を用いて汚染土壌の浄化を行う際、間伐材などの木質系廃材に供試菌を生育させ、この廃材と汚染土壌を混合することにより、土壌中でも供試菌の生育が可能となることが考えられる。

これまでに当グループでは木材腐朽時に高生産されるタンパク質 BUNA2 の解析を行い、BUNA2 遺伝子 (*bee2*) 及びそのプロモーター領域 (*bee2-pro*) の取得に成功している。さらに、*bee2-pro* 制御下にて *mnp4* を発現する BM-65 株を取得している。そこで本研究では BM-65 株をブナ木粉に生育させ(この過程で MnP を高生産させる)、本木粉と模擬 BPA 汚染土壌 (100 µg/g soil、現在までに見つかっている汚染土壌において検出されている環境ホルモンの 10 倍濃度) を混合することにより、BPA が除去可能かどうか検討した。その結果、培養 1 日目から大きく減少し、培養 3 日目には 15.3%、培養 5 日目には 7.7% しか BPA が残存していなかった (Fig. 6)。

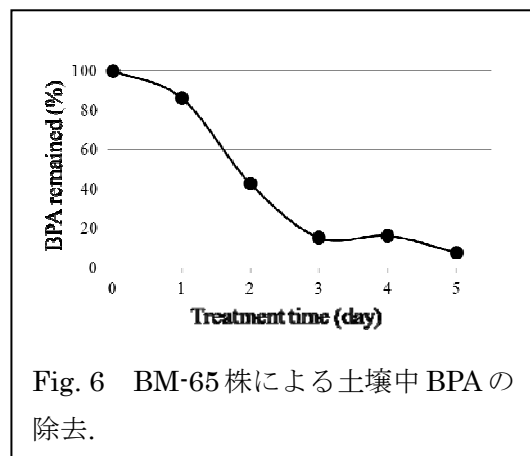


Fig. 6 BM-65 株による土壌中 BPA の除去.

よって、BM-65 株のように、木材中にてリグニン分解酵素を高生産する菌を用いれば、BPA 汚染土壌の浄化も可能であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- 1) Jianqiao Wang, Nayumi Majima, Hirofumi Hirai, Hirokazu Kawagishi: Effective Removal of Endocrine-Disrupting Compounds by Lignin Peroxidase from the White-Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, Current Microbiology, 64, 2012, 300-303.

〔学会発表〕 (計 3 件)

- 1) 王劍橋、河岸洋和、山本陽太郎、山本涼子、平井浩文：高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によるビスフェノール A の分解、第 62 回日本木材学会大会、札幌、2012 年 3 月 16 日。
- 2) 山本陽太郎、平井浩文、河岸洋和：高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による環境ホルモン類分解機構の解明、日本農芸化学会 2011 年度大会、7、京都女子大学 (京都市)、2011 年 3 月 26 日。
- 3) 山本陽太郎、真島奈弓、平井浩文、河岸洋和：高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による環境ホルモン類分解機構の解明、第 60 回日本木材学会大会、宮崎市、2010 年 3 月 19 日。

〔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.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 浩文 (HIRAI HIROFUMI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：70322138