

令和 7 年 6 月 18 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K05941

研究課題名（和文）大環状ラクトン分解菌の活用による医薬品及び生活関連物質（PPCPs）の浄化

研究課題名（英文）Remediation of PPCPs by macromolecular lactone degrading bacteria

研究代表者

松井 徹（matsui, toru）

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：90372812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、医薬品及び生活関連物質（PPCPs）として懸念される合成ムスクの一種である大環状ラクトン分解微生物の探索とその性質を解明することを目的とする。これまで、ほとんど報告のなかった当該化合物分解微生物の探索と分解メカニズムの検討を行った結果、プロテオバクテリア、放線菌、ファーミキューテスに広く存在すること、エステル加水分解を初発反応とするが、基質特異性が異なることを明らかにした。また、耐塩性分解細菌を見出し、海洋環境下での大環状合成ムスク分解の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大環状合成ムスクは生分解性が高いと評価されてきたが、その分解微生物、分解メカニズムについての知見はほとんどなかった。本研究において、さまざまな分解微生物の探索と特性を明らかにすることで、自然環境の浄化やバイオレメディエーション技術の開発が可能になると期待される。また、分解微生物の多様性を明らかにすることで生態系の機能や相互作用の理解が深まるとともに、分解経路を解明することで、代謝工学や合成生物学への応用が期待される。分解関連候補遺伝子も明らかになっており、環境ゲノミクスやメタゲノミクスの手法を用いることで、環境中の微生物群集の機能解析が進み、微生物の役割をより精密に把握できるようになる。

研究成果の概要（英文）：This research aims to discover and characterize microorganisms capable of degrading macrocyclic lactones, a type of synthetic musk considered to be pharmaceutical and personal care products (PPCPs) of concern. We conducted a search for microorganisms that degrade these compounds, which have been scarcely reported on previously, and investigated their degradation mechanisms. Our findings revealed that these microorganisms are widely distributed among Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes, and that ester hydrolysis is the initial reaction, although with differing substrate specificities. Furthermore, we identified salt-tolerant degrading bacteria, suggesting the potential for macrocyclic synthetic musk degradation in marine environments.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物分解 エステル化合物 PPCPs 環境浄化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

近年、医薬品及び生活関連物質（PPCPs）による水環境汚染が深刻化し、人々の健康や生態系への影響が懸念されている。PPCPsは多種多様な化学物質を含み、その生分解性も様々である。一部のPPCPsは比較的容易に分解されるものの、難分解性のものも多く存在し、下水処理や排水処理システムにおける分解過程や、生成される分解物が環境に与える影響についても十分な知見が得られていない（Yang et al., Sci Total Env., 2017）。そのため、個々のPPCPs化合物に対する微生物分解メカニズムの詳細な理解が不可欠となっている。特に、比較的生分解性が高いとされる大環状ラクトン化合物においても、その分解に関与する微生物の菌学的性質や培養特性に関する研究は十分に進んでいない。既存の研究の多くは、排水処理システムにおける活性汚泥のような複合微生物系による分解性を評価したものが中心であり、個々の分解微生物に着目した基礎的な知見の集積が遅れているのが現状である。一方、大環状ラクトン化合物は、エリスロマイシンやイベルメクチンといった医薬品としても広く利用されている。また、エリスロマイシン自体も環境中に検出されるPPCPsの一種とみなされており、本研究で得られる分解菌に関する知見は、これらの医薬品を含む広範な大環状ラクトン化合物の環境浄化への応用可能性を示唆する。さらに、ラクトンの分解の初期段階には、リパーゼなどの酵素が関与すると考えられている。これまで検討されてこなかった特定の大環状ラクトン（例えば、本研究で対象とする合成ムスク香料など）を分解する微生物が持つリパーゼは、既存のリパーゼとは異なるユニークな位置選択性や立体選択性を有する可能性があり、医薬品中間体などの高付加価値な化学物質の生産プロセスへの応用も期待される。このように、環境浄化のみならず、産業応用への潜在的な可能性を秘めているにもかかわらず、大環状ラクトン分解微生物に関する基礎研究は立ち遅れており、その解明が急務となっている。

2．研究の目的

本研究は、医薬品及び生活関連物質（PPCPs: Pharmaceuticals & Personal Care Products）として懸念される合成ムスクの一種である大環状ラクトン分解微生物の探索とその性質を解明することにより、大環状ラクトン化合物の微生物分解の多様性、PPCPs分解プロセスの向上、医薬中間体等の機能性化学品生産への応用の基盤を構築することを目的とする。

3．研究の方法

(1) 培養方法および使用菌株

培養は、MM合成培地（表1）を基本培地として、30℃、振とう培養により行った。

八王子、高尾山周辺の土壌、植物試料120点を用いて、エチレンブラシレート（EB、長谷川香料より供与）を唯一の炭素源とする集積培養物について純粋分離を行ったのち、EB資化性細菌を選抜した。長鎖アルカン資化性細菌として、研究室保存のn-テトラコサン資化性細菌および耐塩性n-テトラデカン資化性細菌を用いた。

(2) 分析方法

EBを唯一の炭素源とした培養液あるいは休止菌体反応液を用いて、酸性条件下酢酸エチル抽出を行い、GC-MSにより分解産物の検出と化合物の同定を行った。

(3) ゲノム解析

EB分解性の認められた細菌の一部は、Pacbioシーケンシングシステムを用いてテクノスルガラボ（株）に依頼分析を行った。

表1 MM培地組成

Carbon source		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	g
Yeast Extract	0.2	g
Metal sol.	10	mL
NaCl	0	200 g
D.W.	Up to 1 L	
pH	7.2	

4．研究成果

(1) エチレンブラシレート資化性菌のスクリーニング

八王子市高尾山周辺地域より土壌、植物等の環境試料を採取し、EBを炭素源とした集積培養によりEB分解菌のスクリーニングを行った。EBを唯一の炭素源として、120の土壌試

料から 50 株程度の候補株を分離した。さらに、安定な生育を示す菌を選抜し、16SrRNA 遺伝子全長解析し、DDBJ/NCBI/EMBL 登録を行った。(それぞれ、EB4h, EB10e, EB10f, EB10h, EB11a, EB11i, EB11j, EB11k, EB11L (accession number LC756462~756471)として登録)。同定の結果、-proteobacteria (*Xenophilus* sp., *Comamonas* sp., *Cupriavidus* sp.), -proteobacteria (*Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp.), Actinomycetes (*Rhodococcus* sp.), Firmicutes (*Bacillus* sp.) と多様な細菌が得られた。

(2) 耐塩性エチレンブラシレート (EB) 分解菌のスクリーニング

海洋中に拡散した汚染物の分解を目的として高塩濃度下での分解菌スクリーニングを行った。大学周辺土壌を用いた集積培養によるスクリーニングを 2 回行った結果、1 回目は、4 株の候補株が分離され、*Klebsiella* sp., *Pantoea* sp. と同定された。しかし、いずれも 5%NaCl 存在下での資化性が認められず、非耐塩性であった。2 回目のスクリーニングでは、4 株が分離され、耐塩性 EB 分解菌は 2 株 (EBHa および EBHc 株) であった。16SrRNA 配列による分類から、いずれも *Bacillus cereus* と同定された (表 2)。

表2 16SrRNA配列による分離株の分類同定結果

No.	Top match(Accession No.)	Homology(%)	EB生育
EBHa	<i>Bacillus cereus</i> (EF690422.1)	97.2	○
EBHb	<i>B. marisflavi</i> (MT605418.1)	100	×
EBHc	<i>Bacillus cereus</i> (EF690422.1)	-	○
EBHd	<i>B. thuringiensis</i> (MN700189.1)	93.2	×

得られた耐塩性 EB 分解菌 2 株について生育に及ぼす塩濃度の影響を検討した結果、表 3 に示すようにこれまでに分離した EB 資化性細菌である EB3d, EB11L はいずれも NaCl 濃度 50g/L でも生育しなかったのに対して、EBHa は NaCl 濃度 100g/L まで、EBHc 株は 50g/L までそれぞれ生育を示した。EBHa 株についてはさらに、EB 以外の大環状合成ムスクを唯一の炭素源とした場合の生育を検討した。その結果、エステル化合物である EB, HDEL, HDNL, PDL には良好な生育を示したが、ラクトン化合物である CPD には生育を示さなかった。

以上の結果から、耐塩性 EB 資化性細菌を分離することができ、幅広い分解スペクトルを示すことが明らかとなったが、いずれも BSL(Bio-Safety Level)2 に属する *Bacillus cereus* と同定されたことから、開放系での浄化処理においては安全性の懸念が示唆された。

表 3 EB分解菌の耐塩性比較

No.	分類	NaCl (g/L)			
		BSL * 0	50	100	
EB3d	<i>Xenophilus</i> sp.	1 ○	×	×	×
EB11L	<i>Bacillus cereus</i>	2 ○	×	×	×
EBHa	<i>B. cereus</i>	2 ○	○	×	×
EBHd	<i>B. cereus</i>	2 ○	○	×	×

* Biosafety Level

(3) EB 分解経路の解析

EB 資化性細菌による EB 分解経路を明らかにするために、培養抽出液からの分解代謝物検出を試みた結果、良好な生育が見られた培養抽出液から GCMS によりピークがほとんど認められなかったことから、速やかな分解が起こっていると考えられた。そこで、休止菌体反応により EB 分解反応を行い、酸性条件下酢酸エチルによる抽出を行い、さらにエステル化誘導体試薬トリメチルシリルジアゾメタン (TMSD) 処理後、GC MS 分析を行った。その結果、エステル化処理試料に大きな分解代謝物ピークが認められ、ブラシル酸 (DC13) 標準物質の TMSD 処理により得られるジメチルエステルと保持時間、質量スペクトルともに同一であることから、分解産物はブラシル酸と同定された。また、反応液上清を水層分析用 GC カラム (Sunpak A) により分析したところ、エチレングリコール (EG) と同じ保持時間にピークが認められた。以上より、分離株は EB をリパーゼ等のエステル分解酵素により DC13 と EG に分解していることが明らかとなった。

さらに EB の分解産物である DC13、EG に対して資化性を示すかについてそれぞれの化合物とブラシル酸のベータ酸化分解物と推定される脂肪酸 (DC3; プロパン二酸 (マロン酸)、DC2; エタン二酸 (シュウ酸)) などに対する生育を 3 株について検討した結果、EG に対する生育を示したものは 2 株、DC3 に生育を示したものが 2 株であった。DC13 の分解中間体と思われる DC11、DC9 などの対する生育はいずれも認められたことから、ブラシル酸がベータ酸化により分解され、生育していると考えられた。

以上の結果より、EB 資化性細菌の分解経路を図 1 のように推定した。すなわち、EB はリパーゼのようなエステル加水分解酵素によりブラシル酸 (DC13) とエチレングリコール

(EG)に分解され、DC13 は一般的な脂肪酸分解経路であるベータ酸化により分解、資化される。EG も同時に資化されるが、資化するかどうかは菌株によると考えられる。

(4)大環状合成ムスクの分解メカニズムに関する考察

(1)項において分離した EB 資化性細菌について各種大環状ムスクに対する生育を検討したところ、EB11a, 11i, 11k, 11L 株はラクトン化合物 CPD 以外のすべての大環状ムスクに生育したが、EB3d, 4h, 10e, 10g, 10h 株は EB のみに生育した。菌株による分解スペクトルが異なるという明確な結果であるが、この分解スペクトルの違いがどのステップにあるのか、次に検討した。

基質に対する生育の異なる EB3d と EB11L について休止菌体反応を行い、各種基質に対する分解率を比較した結果、EB3d 株は EB のみ分解が認められたのに対し、EB11L 株はエステル系大環状ムスクのすべてに高い分解率を示した。以上の結果から、分解スペクトルの違いは、初発のエステル分解の基質特異性の違いによるものと考えられた。

(5)新奇耐塩性資化性菌の探索

これまでの結果から、EB 資化性細菌が広く存在し、耐塩性 EB 資化性細菌についても分離することができたが、後者は分解浄化を目的とした応用においては安全性に懸念があることが示唆された。そこで、EB 分解経路の結果をもとに新たな EB 資化性細菌について検討することにした。図 1 に長鎖アルカン資化性細菌の EB 資化性の可能性に関する考えを示した。すなわち、(3)項における結果から、広く長鎖脂肪酸に対する資化性を有する長鎖アルカン資化性細菌に EB エステルを加水分解できるリパーゼがあれば、EB 分解性を示すと考えられる。研究代表者はこれまで、広く長鎖アルカン資化性細菌の探索を行っていることから、多様な EB 資化性細菌の探索を目的に保存菌株からの EB 資化性細菌の探索を行うこととした。

その結果、いくつかの n-アルカン資化性細菌が EB に高い生育を示した。これら菌株から高い生育を示した 4 株 (49A, 48B, 30A, MHA5a) について EB の生育に及ぼす塩濃度の影響を測定し、EB11L との比較を行った。その結果、MHA5a 株が高塩濃度においても安定した生育を示した。塩濃度の生育上限は 50g/L だった。MHA5a 株は、*Brevibacterium* sp. と高い相同性を示し、*Brevibacterium linens* strain WRS4 と 99.47% の相同性を示した。*Brevibacterium* sp. は BSL 1 に属しており、開放系における使用においても問題ないと考えられる。図 2 に本研究における分離株の系統解析結果を示した。MHA5a 株について各種大環状ムスクに対する生育に及ぼす塩濃度の影響を検討したが、海洋条件の NaCl 3% においてもエステル系大環状ムスク (EB, HDEL, HDNL, PDL) に対して高い生育を示した (図 3)。

以上の結果より、海洋塩濃度条件でもエステル系大環状ムスクのバイオレメディエーションの可能性が示唆された。今後は、ゲノム解析による分解関連遺伝子の発現、培養条件の最適化による分解効率の向上を進めていく予定である。

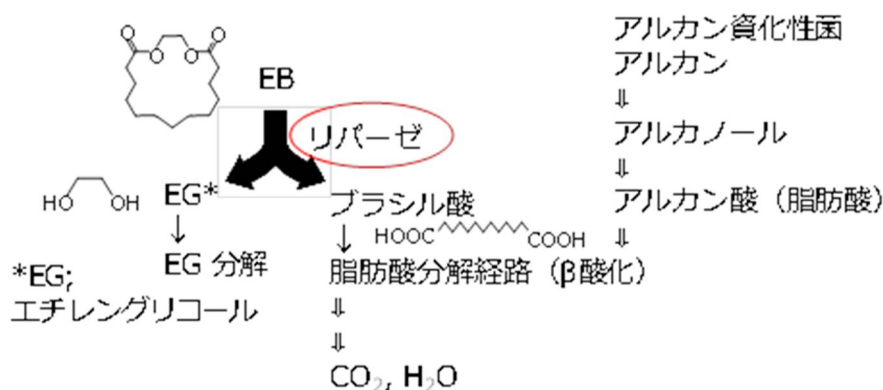


図 1 EB 分解経路と長鎖アルカン資化性細菌による EB 分解の可能性

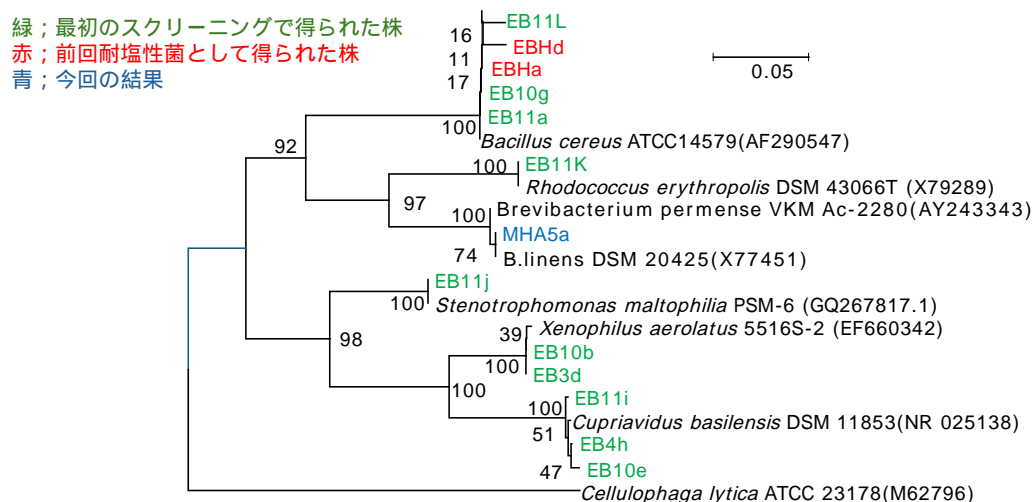
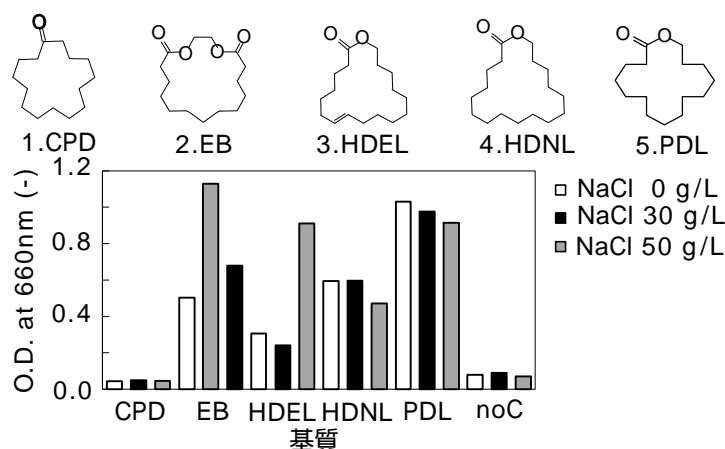


図2 16SrRNA 配列による EB 分解菌の系統解析



3 MHA5a 株の各種ムスク生育におよぼす塩濃度の影響

<引用文献>

- T.Matsui, and K.Furuhashi, Asymmetric oxidation of isopropyl moieties of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Rhodococcus* sp. 11B. Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1342-1344(1995)
- T.Matsui, T.Onaka, Y.Tanaka, T.Tezuka, M.Suzuki, and R.Kurane, Alkylated benzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain T09. Biosci. Biotech. Biochem. 64,596-599 (2000)
- T. Matsui and K. Maruhashi, Isolation of catotenoid deficient mutant from alkylated dibenzothiophene desulfurizing nocardioform bacteria, *Gordonia* sp. TM414. Curr. Microbiol. 48 130-134 (2004)
- T. Matsui, T. Yamamoto, N.Shinzato, T.Mitsuta, K.Nakano, T.Namihira, Degradation of oil tank sludge using long chain alkane degrading bacteria. Annals Microbiol., 64, 391-395 (2014)
- Yi Yang, Yong Sik, Ki-Hyun Kim, Eilhann E. Kwon, Yiu Fai Tsang, Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review, Sci Total Env.596, 303-320 (2017)
- T.Matsui, M.Asano, L. El Bassi, Alkane biodegradation under saline conditions., Exploratory Environmental Science Research, 2, 127-132 (2021)

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 張君行，浅野美穂，藤田良太，Leila El-Bassi，磯田博子，浦瀬太郎，後藤早希，松井徹
2．発表標題 長鎖アルカン資化性菌による香粧品類変換と新奇アルカン資化性菌の探索
3．学会等名 農芸化学会北海道支部大会
4．発表年 2024年

1．発表者名 藤原吏玖
2．発表標題 合成ムスク化合物の微生物分解
3．学会等名 八王子コンソーシアム学生発表会
4．発表年 2022年

1．発表者名 山本遥菜，加畑星二，藤原莉玖，張君行，松井 徹
2．発表標題 耐塩性合成ムスク分解菌の探索
3．学会等名 生物工学会北日本支部大会
4．発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------