

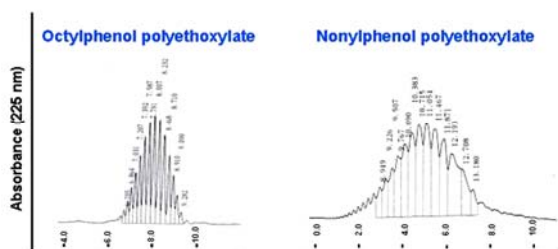
環境負荷物質の高度有効利用と生物的 原位置処理技術に関する研究

機能材料工学専攻 吉川博道

本課題では、二つの研究テーマを設定している。一つは焼酎蒸留廃液の有効利用法の開発であり、今一つは非イオン系界面活性剤であるアルキルフェノールポリエトキシレート (APEO) の原位置分解コンソーシアの構築である。本年度は APEO 分解微生物に関する研究の展開につき報告する。

1. Alkylphenol polyethoxylate の長鎖単一鎖長 ホモログ合成法の開発

APEO の環境動態あるいは微生物分解についての報告は数多く存在するが、長鎖単一鎖長ホモログを用いた報告は、我々の *Biomacromolecules*, 4, 46-51 (2003) 以外には存在しない。この報告においては、実験を市販の界面活性剤 Triton X-100 からエチレングリコールユニット (EO unit) 8 個を持つホモログを分取して行っているが、分取は極めて困難である。



Column: Unison UK-C18 Eluent: AcN:H₂O=3:1

Fig. 1 HPLC chromatograms of commercial surfactants

しかしながら Fig. 1 に示すように、市販の APEO は種々の EO unit からなる混合物であるため、これらを使用するかぎり、初期の分解を解析するのは不可能に近い。従って、長鎖単一鎖長ホモログ合成法を確立し、最初のスクリーニング試験から単一鎖長のホモログが使える研究基盤づくりを目的とした。

1-1 Stepwise elongation method

昨年度、AP(1~3)EO の定量的合成法は確立していたので、今年度はこれらを原料とした合成を試みた。Fig. 2 に示すように、AP(1~3)EO を THF 中でトリフェニルフォスフィン、4 臭化炭素で処理すると、対応するブロマイドが 80% 程度の収率で得られた。得られたブロマイド

と tetraethylene glycol の混合液に PTC 触媒として

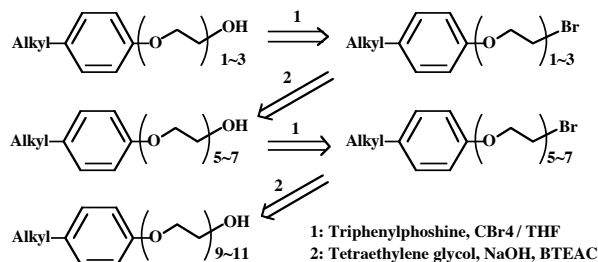


Fig. 2 Stepwise elongation synthesis of APEOs

benzyltriethylammonium chloride を添加した後、粉碎した NaOH を加え室温で攪拌した。この反応で 4EO unit 鎖長の伸びた化合物 AP(5-7)EO をそれぞれ 40% 程度の収率で得ることができた。同じ反応を繰り返すことで AP(9-11)EO の合成も可能であった。この合成法は、アルキル基に多くの異性が存在するノニルフェノール由来のホモログ合成に有効であった。

1-2 One-pot elongation method

アルキルハライドによるアルコールのアルキル化は通常起こらないが、強アルカリを用いた相間移動触媒条件下では起こる場合がある。そこで、AP3EO と過剰量の 8-chloro-3, 6-dioxo-1-octanol を、アルカリとして NaOH を用い benzyltriethylammonium chloride 存在下に反応させることにより、一連のホモログ [AP(3+3k)EO] の one-pot 合成に成功した。生成物は 3EO ユニットずつ鎖長が異なるためオープンカラムで分離可能であった。

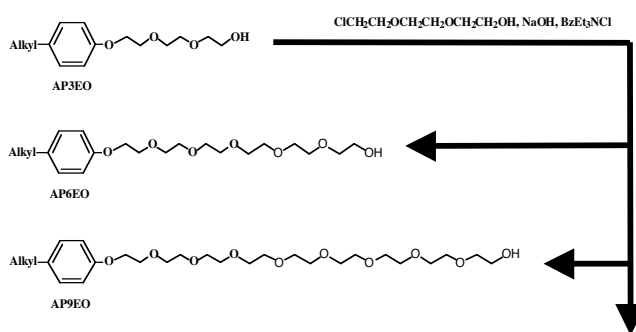


Fig. 3 One pot synthesis of AP3kEO series by using phase transfer catalyst

この反応において 5-chloro-3-oxapentanol を用いた場合、5-chloro-3-oxapentanol の自己縮合によるジオキサンのみが生成し、目的とする AP(3+2k)EO は得られなかった。この one-pot 合成法は、AP に対して行っても有効であり、オクチルフェノール由来のホモログ合成に有効であった。

この二つの方法を組み合わせて使用することで、望みの長さのホモログ合成が可能になった。

2. MALDI-MS を利用した環境微生物単離方法の効率化

今年度は佐賀県に広がるクリークを微生物探索のフィールドとし、その表層水と土壌を用いたスクリーニングを行い、APEO 分解微生物の探索を行った。微生物の分離は集積培養後の培養液を選択培地上に広げ、出現してくるコロニーを拾うことで行われる。しかしながら、培地上でよく似たコロニーを形成する菌は多数存在するため、見た目の指標だけで完全な選別は不可能である。そこで我々は、ハイスループットな処理能力をもつ MALDI-MS 装置を一次スクリーニング用機器として用いる実験系の構築を行った。

2-1 単離菌の MALDI-MS による分類

単離菌をマトリックス剤で処理し得られた抽出液の MALDI-MS 測定を行った。各菌のマススペクトルパターンから菌の分類を行った。

2-2 RFLP による分類

単離した菌の 16S rDNA の一部を PCR で増幅したあと、制限酵素で切断した。得られた RFLP パターンから菌の分類と菌種の推定を行った。

2-3 シークエンス解析

単離菌の同定のため 16S rDNA 部分の約 500 塩基を増幅し塩基配列を決定し、BLAST を用いて分解菌の同定を試みた。

2.4 結果

Fig. 4 に第一地点のクリーク表層水から単離された微生物の MALDI-MS 分析の結果を示す。

選択培地上に現れた 24 コロニーは、下記に示す MS を示す 5 グループとグループに入らない 7 コロニーに

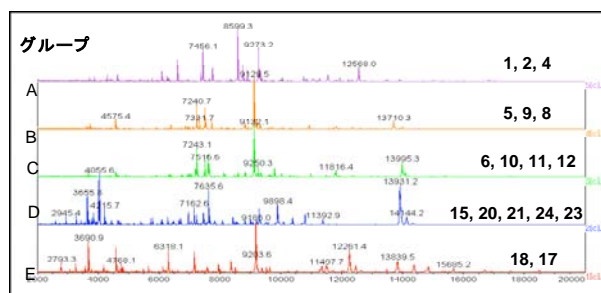


Fig. 4 MALDI-MS spectra of isolated bacteria from creek surface water

分類できた。このグルーピングは Fig. 5 に示すように RFLP によるグルーピングと良い一致を示したのみならず、塩基配列からの分類とも良い一致を示した。したがって、単離したコロニーに対し MALDI-MS を用いてプロファイリングを行い、対象を絞った単離菌について遺伝子側からの解析を行う方法が有効であろう。BLAST によ

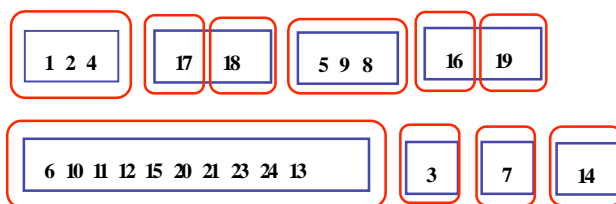


Fig. 5 The comparison of grouping results by MALDI-MS and RFLP analyses.

(red frame: MALDI-MS profiling, Blue frame: RFLP profiling)

る解析結果は、分解菌が、*Acinetbacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alkaligenes* 属など、グラム陰性の γ -プロテオバクテリアに属する菌であることを示している。単離菌の分解能と MALDI-MS や RFLP による分類が完全に一致しない場合も数例存在したが、これは分解に関与する遺伝子がプラスミド上に乗っていること、ならびに分解に関与する酵素を検出できていないことが原因であると推定している。また、単離した分解菌から 2 次元電気泳動によりリボゾームタンパクを分離し、この部分の MALDI-MS を type strain の MS と比較した場合の一致率と、*gyrB* 遺伝子の配列を比較した結果を Fig. 6 に示す。この結果も非

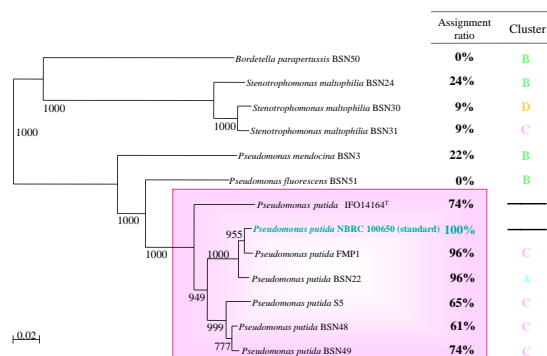


Fig. 6 Phylogenetic tree of APEO degrading bacteria by *gyrB* gene sequence and assignment of the peaks from ribosomal proteins by MALDI-MS.

常によい一致を示し、微生物スクリーニングとプロファイリングにおける MALDI-MS の有効性を支持する結果となった。現在、引き続き APEO 分解微生物の探索を続けるとともに、微生物の迅速同定を目的とした、MALDI-MS データベース構築を目指している。

このプロジェクトを通して研究基盤となる機器が整い、大学院生を含む学生の研究意欲の向上が著しい。機器もフル稼働の状況にある。この状況は非常に喜ばしく、プロジェクト立ち上げにご協力いただいた関係各位に心より感謝する次第である。同時に、本研究遂行にあたり協力して頂いた、大学院生の市来弥生、石澤夏希、谷 昭幸、荒巻 忍、石本淑恵の各位、生物有機化学研究室所属の学生諸君、並びに名城大学の田村廣人博士、産総研の佐藤浩昭博士に感謝致します。