

学位被授与者氏名	石澤 夏希 (Natsuki Ishizawa)
学位の名称	博士 (工学)
学位番号	博 (一) 第 20 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 20 日
論文題目	非イオン系界面活性剤の環境動態解析法と環境微生物学への MALDI-TOF MS の 応用研究
論文題目 (英訳または和訳)	Environmental fate analysis of alkylphenol surfactants and application of MALDI-TOF MS to environmental microbiology
論文審査委員	論文審査委員会 委員主査 : 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 吉川 博道 同審査委員: 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 三田 肇 同審査委員: 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 川上 満泰 同審査委員: 福岡工業大学大学院知能情報システム工学専攻教授 赤木 文男
論文審査機関	福岡工業大学大学院工学研究科
論文内容の要旨 (和文)	<p>20 世紀の終わり頃から内分泌かく乱化学物質 (通称: 環境ホルモン) 問題が、人類の将来に大きな影響を与えかねない問題として提起され、世の中の大きな注目を集めた。本研究は環境ホルモンの、人あるいは野生生物に与えるリスクがまだ定かではなかった 2004 年頃に開始したものである。我々が日常、洗浄剤、乳化剤、保湿剤などとして使用する界面活性剤の 1 種であるアルキルフェノール系界面活性剤 (APEO) は、環境中で生物分解を受け、水棲生物に対しエストロゲン様活性を持つ有害中間体を生成蓄積する。本研究では、佐賀県クリークを対象に、有害中間体を生成蓄積する微生物の分布を調べるとともに、単一鎖長のポリエチレングリコール (PEG) 側鎖を持つ APEO を使用して、分解に関与する細菌を単離することなく分解微生物の持つ分解メカニズムを知る手法を確立した。また、環境中からある特性を持つ微生物を分離する過程に MALDI-TOF MS を導入することにより、迅速かつ正確な微生物の選抜が可能になることを、APEO 分解微生物をモデルとした実験系で証明した。さらに、数種の微生物について、マスプロファイルの数値化とこれを基礎とするクラスター解析を行い、迅速同定の可能性を検討した。</p> <p>第 1 章では、APEO による淘汰圧を受けていると予想される佐賀県のクリークを対象として、土壌及び表層水を合わせて 80 サンプルを採取し、その分解活性を検討した。APEO の一種である 4-<i>t</i>-Octylphenol polyethoxylate (OPEO) を単一炭素源として培養を行った結果、土壌 30 サンプル、表層水 6 サンプルに、APEO の PEG 側鎖を短鎖化する活性がみられ、培養液中に内分泌かく乱活性を持つ 4-<i>t</i>-Octylphenol diethoxylate (OP2EO) と 4-<i>t</i>-Octylphenol monoethoxylate (OP1EO) を集積した。他のサンプルは、PEG 側鎖の末端にある 1 級アルコール残基を対応するカルボン酸へと酸化した。これらの結果は、クリーク水系に内分泌かく乱活性を持つ分解中間体を蓄積する代謝毒性化を起こす微生物群が広く分布していることを強く示唆している。</p> <p>第 2 章では、APEO 分解菌を分離することなく、それらの分解メカニズムを明らかにする方法を構築した。APEO の PEG 側鎖の分解様式については、末端から順次酸化分解を受けていく <i>exo</i> 型の開裂と PEG 側鎖内で分解を起こす <i>endo</i> 型開裂が存在する。我々は、単一鎖長のポリエチレングリコール (PEG) 側鎖を持つ APEO を用いて、分解の初期段階での分解産物を MALDI-TOF MS でトレースすることにより、微生物の分離なしに <i>exo</i> 型開裂が起こっていることを確認することができた。</p> <p>第 3 章では、APEO 分解能を示した集積培養液から、APEO 分解菌の単離、分解能の検定を行うと同時に、<i>gyrB</i> 遺伝子、16S rDNA 遺伝子の塩基配列を決定し、分解菌の同定を行った。その結果、集積培養液からは <i>Acinetobacter</i>, <i>Ochrobactrum</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Sinorhizobium</i> 属などの <math>\gamma</math>-プロテオバクテリアに属する細菌が分解活性を持つことが明らかになった。</p>

第4章では、得られた単離菌に対して whole-cell extract の マススペクトルを測定し、マススペクトルのピークパターンからのタイピング (Visual MS typing) を行った。このタイピング結果を 16S rDNA 約 1,000 bp を用いた PCR-RFLP の結果と比較すると同時に、3章で得られた遺伝子による同定結果と比較した。Visual MS typing の結果は、PCR-RFLP による typing 結果が矛盾無く一致しただけでなく、*gyrB* 遺伝子、16S rDNA 遺伝子の塩基配列からの同定結果とも良い一致を示した。また、得られた MS プロファイルをピーク相同性指数 (PSI) として数値化した後、クラスター解析によって *gyrB* 遺伝子の塩基配列からの系統樹と同質の樹形図が得られることを明らかにした。

第5章では、4章で述べた数値解析が非常に有効であったため、*Escherichia* 属の細菌を用いて、この方法の有効性を検証した。*Escherichia coli* K12 株と *Escherichia ferugusonii* は、16S rDNA の遺伝子の塩基配列による解析では全く区別できないが、PSI に基づく解析では明確に識別できた。この識別の正当性を、*rpo* 及び *gyrB* 遺伝子を用いて検証した結果、ピーク相同性指数 (PSI) に基づくクラスター解析による識別を支持するものであった。また、*Escherichia coli* に属する 6 菌株を用いた PSI に基づく解析でも *Escherichia coli* K12 株と *Escherichia coli* B 株を区別することができた。将来的には PSI 解析が細菌の株レベルでの同定に使用できる可能性を示している。

第6章では、本論文の主たる結果について要約する。

論文内容の要旨  
(英文)

Endocrine disrupter (aka: environmental hormone) problems were posed at the end of the 20th century that might have the crucial influence in human race's future. The present study started in 2004 when the risks of the environmental hormone to human being and wildlife were not certain yet. Alkylphenol surfactants (APEOs) have been widely used as the cleaning agent, emulsifying agent, moisturizing agent and others in daily life. APEOs are biologically degraded in the environment and accumulate several estrogenic metabolites toxic to aquatic wildlife.

In the present study, the distribution of the APEO-degrading bacteria that accumulated the estrogenic metabolites was investigated in the agricultural waterway in Saga Prefecture. Further, the technique to know the degradation mechanism of the APEO-degrading bacteria was established without isolating the bacteria by using an APEO homologue with a single length polyethylene glycol (PEG) side chain.

During the execution of the previous issue, introduction of MALDI-TOF MS to the separation process of certain environmental bacteria was proved to be highly effective for the rapid and accurate isolation. In addition, the possibility of the rapid identification of was examined by the digitalization of MS profiles and the succeeding cluster analysis based on the digitalized MS profile.

In the 1<sup>st</sup> chapter, soil and surface water samples (80 samples) were collected from the agricultural waterway in Saga prefecture and were investigated their

APEO-degrading activity. Enrichment culture experiment with 4-*t*-octylphenol polyethoxylate (a kind of APEO with sole alkyl side chain) as the sole carbon source revealed 30 soil samples and 8 water samples possessed the degrading activity and left the estrogenic metabolites in the medium. Other samples only oxidize the terminal alcohol moiety to the corresponding carboxylic acid. The results indicate that the APEO degrading bacteria that accumulate the toxic metabolites distribute universally in the agricultural waterway in Saga prefecture.

In the 2<sup>nd</sup> chapter, we achieved a new method to know the degradation mechanism of the APEO-degrading bacteria without isolation. The exo type fission and the endo type fission have been reported for the degradation of PEG side chain. Enrichment culture was performed with an APEO homologue with a single length polyethylene glycol side chain. We analyzed the degradation products by MALDI-TOF MS at the early stage of degradation and could confirmed that the exo type degradation occurred.

In the 3<sup>rd</sup> chapter, the isolation of APEO-degrading bacteria were carried out from the enrichment culture media. The isolates were tested their degrading activity and were identified by 16S rDNA or *gyrB* sequences. The isolates were identified as such the gram-negative  $\gamma$ -proteobacteria as *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Sinorhizobium* and others.

In the 4<sup>th</sup> chapter, the whole-cell mass spectra were measured for the isolates, and the isolates were typed by the peak pattern of the mass spectra (Visual MS typing). The MS typing result was compared with the typing result based on the PCR-RFLP using 1,000 bp of 16S rDNA and three kinds of restriction enzymes (*Alu* I, *Hha* I and *Hae* III). These two results not only agreed with each other but also were in accord with the genetic analyses described in the 3<sup>rd</sup> chapter. Furthermore, the relationship among the MS profiles were expressed numerically by the peak similarity index (PSI). The tree diagram by the cluster analysis of PSI (PSI analysis) was in accord with the phylogenetic tree based on 16S rDNA or *gyrB* sequence.

In the 5<sup>th</sup> chapter, five strains of bacteria belonging to *Escherichia* were tested to clarify the validity of the PSI analysis. As the genetic analysis using 16S rDNA

could not distinguish *Esherichia col* K12 and *Esherichia ferugusoni* , the PSI analysis clearly discriminated the 2 strains of *Esherichia*. As the validity of this discrimination was supported by the genetic analyses using *rpo* and *gyrB* genes. The analysis based on PSI discriminated *Esherichia col* K12 and *Esherichia col* B. We think that the PSI analysis can be the promised method to identify unknown bacteria at the strain level.

In the 6<sup>th</sup> chapter, the main results of this thesis are summarized.

論文審査結果	<p>&lt;学位論文審査の結果&gt;</p> <p>この論文は、非イオン系界面活性剤の1種であるアルキルフェノールポリエトキシレート (APEO) の、環境中での動態について化学的・生物的側面から研究を進めると同時に、APEOの環境動態に關与する微生物を対象として、MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) による微生物のスクリーニングと株レベルでの迅速同定の可能性を追求したものである。この研究は、APEOに關連する化合物群が環境省により「いわゆる環境ホルモンである」と判断され社会的に大きな関心を引き起こしたこと、さらにAPEOが農薬補助剤として世界的に使用されていることを受け、農林水産省が立案した「有害化学物質リスク管理プロジェクト」の一環として遂行されたものである。</p> <p>本研究で得られた主要な成果は以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 佐賀平野のクリーク周辺に、APEO の側鎖を短鎖化しエストロゲン活性を持つ APnEO (n=1~3) を生産する細菌が広く分布することを明らかにすると同時に、APEO の PEG 鎖の末端を酸化する微生物が短鎖を行う菌と共同して働いている可能性を明らかにした。</li> <li>2. 単一鎖長の APEO を単一炭素源として使用することにより、集積培養液中に生息している微生物群の分解メカニズムを、分解微生物を単離することなく明らかにする手法を確立した。</li> <li>3. APEO の側鎖を内分泌かく乱活性のある代謝物群まで短鎖化する細菌として、<i>Pseudomonas</i> 属や <i>Sphingomonas</i> 属細菌が知られていたが、今回新たに <i>Acinetobacter</i> 属、<i>Aeromonas</i> 属、<i>Ochrobactrum</i> 属細菌、あるいは <i>Pseudomonas</i> 属の中でも <i>Pseudomonas stutzeri</i>、<i>Pseudomonas fluorescens</i> に側鎖の短鎖化能があることを明らかにした。</li> <li>4. 各微生物の MALDI-TOF マススペクトルから PSI (ピーク相同性指数) を求め、これに基づくクラスター解析を行った結果、微生物の種間の区別が完全にできるだけでなく、株間の識別さえも可能であることを明らかにした。この方法は、自動化が可能であるため、微生物を迅速に識別・同定する画期的な手法になりえると思われる。</li> </ol> <p>以上の研究成果は、国内外の雑誌における査読つき論文2編 (第1著者1編)、紀要等1編 (第1著者0編)、国際学会3編 (第1著者1編) にまとめられ、国内学会での発表は13編である。4<sup>th</sup> Pan Pacific Conference on Pesticide Science (2008) においては、彼女のグループの発表がポスター賞 (学生の部、2位) を獲得している。</p> <p>学位審査委員会は、この論文が学位論文として適切な内容であると判断した。</p> <p>&lt;学位論文公聴会&gt;</p> <p>学位論文公聴会は、2010年1月26日の16時30分より約35人の参加者のもとに開催された。この公聴会においては、論文内容に關連する種々の科学的及び技術的な質問があったが、いずれも適切な回答を行うことができた。</p> <p>&lt;最終試験&gt;</p> <p>最終試験においては、学位論文に關連する分野の学識を有し、今後研究を進めていく</p>
--------	--

	<p>ための研究能力を備えていることを確認した。また、国際学会で第1著者として発表していることから、英語論文作成能力も十分にあると判断した。</p> <p>&lt;総合判定&gt;</p> <p>以上の結果から、学位審査委員会は、この論文が博士（工学）の学位に適格であると判定した。</p>
<p>主な研究業績</p>	<p>&lt;査読つき論文&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>「佐賀県クリーク水系におけるアルキルフェノール系界面活性剤分解微生物の分解メカニズムの解明」、 用水と廃水、Vol. 51, No. 6, pp. 48-57 (2009) 著者：石澤夏希、石本淑恵、市来弥生、田村廣人、吉川博道.、</li> <li>“Environmental distribution and a novel high-throughput screening method of APEO degrading bacteria using matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-MS).”, J. Pestic. Sci., Vol. 33, No. 2, pp. 122-127 (2008) Authors : Ichiki Y., <b>Ishizawa N.</b>, Tamura H., Teramoto K., Sato H., Yoshikawa H.</li> </ol> <p>&lt;査読なし論文&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>“Study on extracellular secretion of phenolic substances from living brown algae.”, 福岡工業大学環境科学研究所報、1巻、pp. 15-18 (2007) 著者：Toshiyuki Shibata., <b>Natsuki Ishizawa.</b>, Yayoi Ichiki., Hiromichi Yoshikawa.</li> </ol> <p>&lt;国際学会&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>“Environmental Distribution of APEO Degrading Bacteria and a Novel High-throughput Screening Method of the Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS).”, 4th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, 2008, Hawaii. Authors : <b>Natsuki Ishizawa.</b>, Yayoi Ichiki., Hiroto Tamura., Kanae Teramoto., Hiroaki Sato., Hiromichi Yoshikawa</li> <li>“Effective syntheses of alkylphenol polyethoxylate derivatives with long and single length PEG chain and their application to microbial degradation assay.”, 4th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, 2008, Hawaii Authors: Toshie Ishimoto., Yayoi Ichiki., <b>Natsuki Ishizawa.</b>, Hiroto Tamura., Hiromichi Yoshikawa</li> <li>“Search of Antibiotic-resistant Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) to the Grouping of the Isolated Bacteria.” 4th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, 2008, Hawaii Authors: Yasuto Takashima., Tomohiro Aoki., Yayoi Ichiki., <b>Natsuki Ishizawa.</b>, Kanae Teramoto., Hiroaki Sato., Hiroto Tamura., Hiromichi Yoshikawa</li> </ol> <p>&lt;国内学会&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>「MALDI-TOF MSスペクトルに基づく微生物同定の試み (IV)」 日本農芸化学会3支部合同大会、那覇市、2009年 著者：石澤夏希、高島泰斗、青木智宏、田村廣人、吉川博道</li> <li>「MALDI-TOF MSスペクトルに基づく微生物同定の試み (I)」 第46回化学関連支部合同九州大会、北九州市、2009年 著者：高島泰斗、青木智宏、石澤夏希、田村廣人、吉川博道</li> <li>「MALDI-TOF MSスペクトルに基づく微生物同定の試み (II)」 第46回化学関連支部合同九州大会、北九州市、2009年 著者：石澤夏希、高島泰斗、青木智宏、田村廣人、吉川博道</li> </ol>

4. 「環境中の微生物スクリーニングへのMALDI-TOF MS法の適用 (II)」  
日本農芸学会2009年大会, 福岡市, 2009年  
著者: 石澤夏希、寺本華奈江、佐藤浩昭、田村廣人、荻秀和、吉川博道
5. 「環境微生物のスクリーニングへのMALDI-MSの適用」  
第45回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2008年  
著者: 石澤夏希、市来 弥生、寺本 華奈江、佐藤 浩明、田村 廣人、吉川 博道
6. 「環境中の微生物スクリーニングへのMALDI-TOF MS法の適用」  
日本農芸化学会西日本支部大会, 長崎市, 2008年  
著者: 石澤夏希、市来 弥生、寺本 華奈江、佐藤 浩明、田村 廣人、吉川 博道
7. 「MALDI-TOF MSを用いた微生物分類の試み」  
第15回日本生物工学会九州支部大会, 熊本市, 2008年  
著者: 石澤夏希、市来弥生、田村廣人、荻秀和、吉川博道
8. 「MALDI-MSを用いたアルキルフェノールポリエトキシレート分解微生物のスクリーニング (3)」  
第17回環境化学討論会, 北九州市, 2007年  
著者: 石澤夏希、市来弥生、寺本華奈江、佐藤浩昭、田村廣人、吉川博道
9. 「MALDI-MSを用いたアルキルフェノールポリエトキシレート分解微生物のスクリーニング (4)」  
第17回環境化学討論会, 北九州市, 2007年  
著者: 市来弥生、石澤夏希、荒巻忍、寺本華奈江、佐藤浩昭、田村廣人、吉川博道
10. 「MALDI-MSを用いたアルキルフェノールポリエトキシレート分解微生物のスクリーニング (5)」  
第44回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2007年  
著者: 石澤夏希、市来弥生、寺本華奈江、佐藤浩昭、田村廣人、吉川博道
11. 「MALDI-MSを用いたアルキルフェノールポリエトキシレート分解微生物のスクリーニング (6)」  
第44回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2007年  
著者: 市来弥生、石澤夏希、石本淑恵、寺本華奈江、佐藤浩昭、田村廣人、吉川博道
12. 「MALDI-MSを用いたアルキルフェノールポリエトキシレート分解微生物のスクリーニング(1)」  
日本生物工学会第13回九州支部大会, 鹿児島市, 2006年  
著者: 石澤夏希、市来弥生、寺本華奈江、佐藤浩昭、田村廣人、吉川博道
13. 「MALDI-MSを用いたアルキルフェノールポリエトキシレート分解微生物のスクリーニング (2)」  
日本生物工学会第13回九州支部大会, 鹿児島市, 2006年  
著者: 市来 弥生、石澤夏希、寺本 華奈江、佐藤 浩昭、田村 廣人、吉川 博道