

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580227

研究課題名(和文) リグニン分解酵素による抗生物質と紫外線吸収剤の毒性除去

研究課題名(英文) Detoxification of antibiotics and UV absorbers by ligninolytic enzymes

研究代表者

西田 友昭 (NISHIDA, Tomoaki)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10252165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼとラッカーゼは、テトラサイクリン系抗生物質(Tetracycline、Chlortetracycline、Doxycycline、Oxytetracycline)、アントラサイクリン系抗生物質(Doxorubicin)、マクロライド系抗生物質(Tylosin)およびベンゾフェノン系紫外線吸収剤の分解と毒性除去に有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ligninolytic enzymes from white rot fungi, such as manganese peroxidase and laccase, were effective in degrading and detoxifying tetracycline antibiotics (tetracycline, chlortetracycline, doxycycline and oxytetracycline), anthracycline antibiotics (doxorubicin), macrolide antibiotic (tylosin), and benzophenone-type UV absorbers.

研究分野：木質生化学

科研費の分科・細目：森林学・木質化学

キーワード：リグニン分解酵素 有害化学物質 抗生物質 紫外線吸収剤

1. 研究開始当初の背景

現代社会においては、医療や畜産あるいは生活の場で、医薬品やシャンプー・消毒剤・化粧品などの身体ケア製品 (Pharmaceuticals and Personal Care Products; PPCPs) が多量に使用されている。これまで、PPCPs が使用された後の環境動態については注意が払われてこなかったが、近年、水環境中や下水中での存在実態や、低濃度での慢性的な暴露による生態系への影響や細菌叢の薬剤耐性化などが明らかとなり、水環境中に存在する新たな汚染物質として PPCPs が注目されるに至っている。

現在、水環境中より多くのPPCPsが検出されており、世界的に普及している現行の生物的水処理 (活性汚泥処理) では顕著な除去が認められていない。この事実は、これらのPPCPsが活性汚泥中に存在する複合微生物では生分解を受けにくいことを強く示唆しており、PPCPs起源の化学物質を高度に分解・無毒化する新規な生物的水処理法を開発することは、環境保全を図る上で大きな意義を有する。

このような背景から、木材主要成分の一つであり芳香族性の高分子であるために難生分解性を示すリグニンを、白色腐朽菌と称される担子菌が特異的に酸化分解しうることに着目して、白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素による医薬品類 (抗炎症剤: ジクロフェナクとメフェナム酸、抗てんかん剤: カルバマゼピン、抗菌剤: トリクロサン) の処理を試み、水生生物や細菌類に対する毒性除去が可能なことを明らかにした。さらには、環境ホルモン類 (ビスフェノールA、ノニルフェノール、17β-エストラジオール、エストロン、経口避妊薬ピルの主成分: エチニルエストラジオール、防腐剤: パラベン類、農薬: メトキシクロル、植物エストロゲン: ゲニステイン) についても、内分泌攪乱作用 (エストロゲン様活性) の除去が可能なことを見いだしている。

2. 研究の目的

近年、PPCPsは水環境中に存在する新たな汚染物質として注目されており、国内外の水環境における実態調査、水処理プロセスにおける除去挙動、生態毒性に関する影響評価などに関する研究が活発に行われている。しかしながら、これらの取り組みの中で、活性汚泥処理では分解・除去されにくいことが明らかにされているにもかかわらず、活性汚泥中に生育する複合微生物 (主として細菌類) 以外の微生物を用いてPPCPsを生分解しようとする研究はほとんどなされていない。

そこで本研究では、細菌叢の薬剤耐性化をもたらすことが懸念されている抗生物質と、エストロゲン様活性を有することから内分泌攪乱作用が懸念されているベンゾフェノン系紫外線吸収剤を取り上げ、リグニン分解酵素による分解と毒性除去を図るものであ

る。

3. 研究の方法

(1) 供試化合物

テトラサイクリン系抗生物質として、Tetracycline (TC)、Chlortetracycline (CTC)、Doxycycline (DC) および Oxytetracycline (OTC) を、アントラサイクリン系抗生物質として Doxorubicin (DX) を、マクロライド系抗生物質として Tylosin (TY) を供試した。また、ベンゾフェノン系紫外線吸収剤として 2,4-Dihydroxybenzophenone (BP1)、2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3)、2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP8) および 2,3,4-Trihydroxybenzophenone (THBP) を用いた。

(2) リグニン分解酵素処理

各種抗生物質およびベンゾフェノン系紫外線吸収剤を、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) あるいはラッカーゼ (Lac) を用いて処理した。

MnP 処理は、供試化合物を 10^{-4} M 含有する 50 mM マロン酸バッファー (pH 4.5) に MnP (10 nkat/ml)、硫酸マンガン、グルコース、グルコースオキシダーゼを加えて、30、150 rpm で所定時間反応を行った。Lac 処理は、供試化合物を 10^{-4} M 含有する 50 mM マロン酸バッファーに Lac (10 nkat/ml) を添加し、30、150 rpm で所定時間反応を行った。Lac 処理については、メディエータとして 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) を 0.2 mM 添加した系でも処理を行った。次いで、経時的に反応液をサンプリングして HPLC 分析に供し、残存率を求めた。なお、テトラサイクリン系抗生物質とマクロライド系抗生物質の Lac-HBT 処理においては、反応液を細菌増殖阻害試験および藻類増殖阻害試験に供し、毒性除去効果を確認した。また、ベンゾフェノン系抗生物質の Lac-HBT 処理においては、組換え体酵母を用いる Two-Hybrid 法によって、エストロゲン様活性の除去挙動を追跡した。

4. 研究成果

(1) テトラサイクリン系抗生物質 (TCs)

MnP 処理を行った結果、反応 1 時間後において、TC は 80%、OTC は 93% 減少し、CTC および DC については完全な除去が認められた (Fig. 1)。これに対して、Lac 単独処理による TC、CTC、DC および OTC の減少はそれぞれ 16%、48%、34% および 14% にとどまった (Fig. 1)。Lac はフェノール性化合物あるいは酸化還元電位の低い化合物しか酸化分解できないとされてきたが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) のようなメディエータを共存させると、Lac の基質特異性を拡大しうるということが知られている。そこで、HBT を共存させる系 (Lac-HBT) によっても TCs を処理した。その結果、HBT

を 2 mM 共存させた Lac-HBT 処理では、TCs の効率的な除去が確認され、CTC と DC では反応 0.25 時間、TC と OTC では反応 1 時間で完全な消失が認められた (Fig. 1)。

なお、MnP 処理と Lac-HBT 処理を比較すると、Lac-HBT 処理の方が、MnP 処理よりも短時間で効率的な TCs 除去が可能であった (Fig. 1)。よって、本研究で供試した 4 種の TCs の分解には、Lac-HBT 処理が最も有効と判断された。

次に、Lac-HBT 処理によって TCs の細菌

および緑藻に対する増殖阻害 (毒性) も除去されるのかを確認した。Lac-HBT 処理した TCs の反応液を細菌類と緑藻の増殖阻害試験に供した結果、CTC と DC については処理 0.25 時間で、TC と OTC については処理 1 時間で、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) および緑藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する増殖阻害が完全に除去された (Table 1)。このことから、Lac-HBT 処理による TCs の無毒化が明らかとなった。

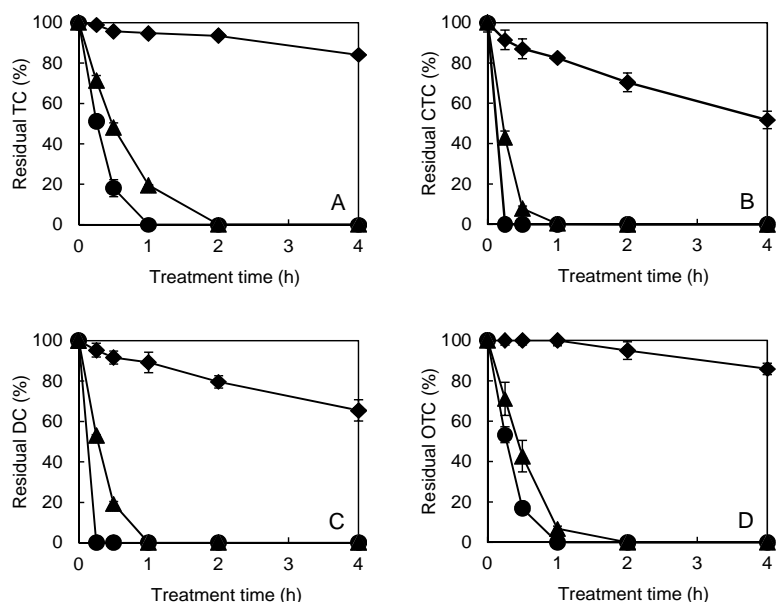


Fig. 1 リグニン分解酵素処理によるTC (A), CTC (B), DC (C) および OTC (D) の減少 (▲), MnP; (◆), Lac; (●), Lac-HBT

Table 1 Lac-HBT 処理によるテトラサイクリン系抗生物質の緑藻および細菌に対する増殖阻害の除去

Treatment time (h)	Growth inhibition (%)		
	<i>P. subcapitata</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
0	87.1 ± 3.7	94.5 ± 0.9	100.0 ± 0.0
0.25	55.6 ± 9.4	35.6 ± 4.3	44.1 ± 7.2
0.5	6.5 ± 7.1	7.1 ± 1.1	6.8 ± 5.5
1.0	0	0	0
2.0	0	0	0
4.0	0	0	0
0	80.1 ± 8.7	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
0.25	0	0	0
0.5	0	0	0
1.0	0	0	0
2.0	0	0	0
4.0	0	0	0
0	93.7 ± 5.8	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
0.25	0	0	0
0.5	0	0	0
1.0	0	0	0
2.0	0	0	0
4.0	0	0	0
0	73.0 ± 6.7	89.5 ± 2.8	100.0 ± 0.0
0.25	40.8 ± 3.4	12.4 ± 1.6	20.0 ± 4.8
0.5	12.4 ± 4.5	6.2 ± 1.1	11.0 ± 4.7
1.0	0	0	0
2.0	0	0	0
4.0	0	0	0

(2) アントラサイクリン系抗生物質

Doxorubicin (DX) をリグニン分解酵素で処理した結果、Lac 単独処理では処理 4 時間後においても 47% の DX 減少を示すにとどまった。一方、Lac-HBT 処理においては反応 30 分間で約 60% の除去、2 時間で完全な除去が認められ、Lac 単独処理の場合よりも DX の除去効率は大きく向上した。一方、MnP 処理においては、反応 30 分間で DX の完全な除去が認められた (Fig. 2)。このことから、MnP 処理が Lac および Lac-HBT 処理よりも DX の除去に有利と判断された。なお、DX はオレンジ色を呈しているが、30 分間の MnP 処理を行うと無色となった (Fig. 3) よって、DX のアントラキノン骨格が MnP で変化を受けたことが示唆された。

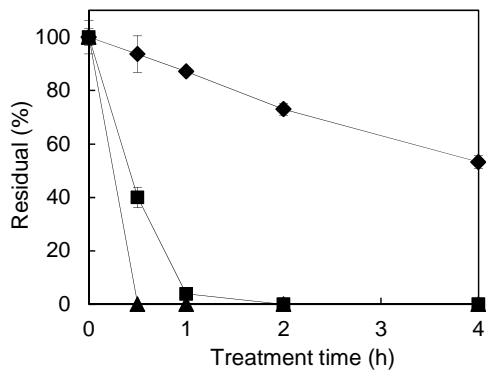


Fig. 2 リグニン分解酵素処理による DX の減少 (▲), MnP; (◆), Lac; (■), Lac-HBT

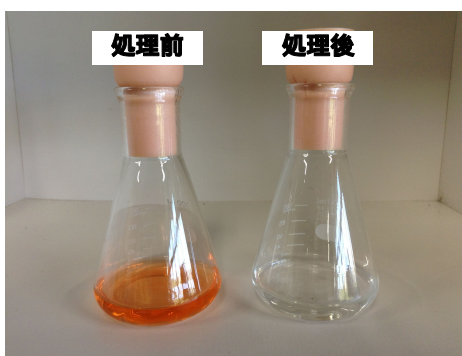


Fig. 3 MnP 処理による DX の脱色

(3) マクロライド系抗生物質

リグニン分解酵素を用いて、マクロライド系の代表的な抗生物質の一つである Tylosin (TY) を処理した。その結果、Lac 単独処理では処理 4 時間後においても約 5% の TY 減少を示すにとどまった。これに対して、

Lac-HBT 処理においては反応 1 時間で約 40%、反応 2 時間で約 75% の TY 除去が認められ、反応 4 時間後には完全に消失した (Fig. 4)。一方、MnP 処理においては反応 4 時間後でも約 15% の TY 除去であったことから、Lac-HBT 処理の方が MnP 処理よりも TY の除去に有利と判断された (Fig. 4)。

次に、枯草菌 (*B. subtilis*) および緑藻 (*P. subcapitata*) の増殖阻害を指標として、Lac-HBT 処理による TY の毒性除去効果を評価した。その結果、TY 濃度の減少 (Fig. 4) と枯草菌および緑藻に対する増殖阻害除去 (Fig. 5) の挙動は必ずしも一致しなかったが、反応 4 時間後において枯草菌および緑藻に対する増殖阻害は約 80% 減少しており、Lac-HBT 処理による TY の毒性除去効果が認められた (Fig. 5)。

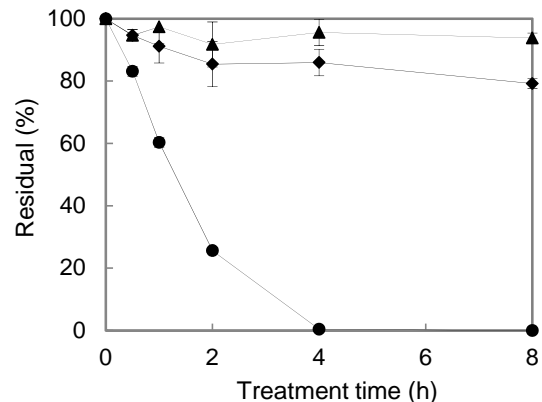


Fig. 4 リグニン分解酵素処理による TY の減少 (◆), MnP; (▲), Lac; (●), Lac-HBT

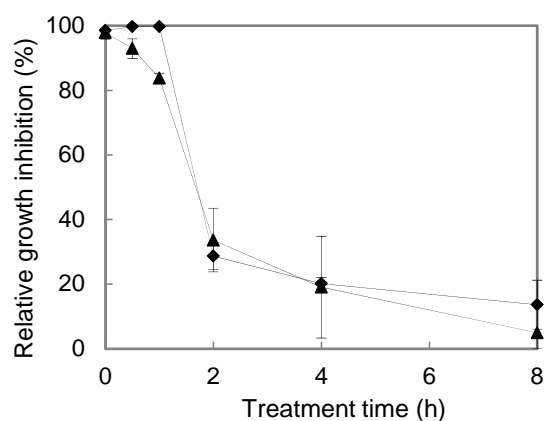


Fig. 5 MnP 処理による *B. subtilis* および *P. subcapitata* に対する増殖阻害の除去 (◆), *B. subtilis*; (▲), *P. subcapitata*

(4) ベンゾフェノン系紫外線吸収剤

エストロゲン様活性を有するとされているベンゾフェノン系紫外線吸収剤（4種）をリグニン分解酵素で処理した。その結果、THBPはMnP、LacおよびLac-HBT処理のいずれにおいても処理30分間で速やかに除去された。BP-8は、Lac単独処理では反応24時間後に57%の残存がみられたが、Lac-HBT処理では処理4時間、MnP処理では処理8時間で完全な消失が確認された。

一方、BP-1とBP-3については、Lac単独処理による減少はほとんど認められず、反応24時間後のMnP処理でもそれぞれ55%と16%の除去にとどまった。これに対して、Lac-HBT処理ではBP-1とBP-3の除去率が大幅に向上し、両者とも反応8時間で90%以上、反応24時間では完全な除去が認められた（Fig. 6）。

以上の結果から、本研究で供試したベンゾフェノン系紫外線吸収剤BP-1、BP-3、BP-8およびTHBPの分解にはLac-HBT処理が最も有効であると判断された。

次に、Two-hybrid法を用いてBP-1、BP-3、BP-8およびTHBPのβ-ガラクトシダーゼ活性（エストロゲン様活性の指標）を測定し、ビスフェノールA（BPA）の活性と比較した（Fig. 7）。なお、比較対照に用いたBPAは、濃度 10^{-4} Mにおいて最大のβ-ガラクトシダーゼ活性を示したことから、この活性値を「相

対β-ガラクトシダーゼ活性100%」と定めた。

Fig. 7に示すように、BP-1は 10^{-4} MにおいてBPAよりも約1.5倍高いエストロゲン様活性を有しており、THBPはBPAの約1/2のエストロゲン様活性を示した。なお、 10^{-4} Mよりも低濃度の 10^{-5} Mにおいて、BPAとTHBPのエストロゲン様活性は微弱であったのに対し、BP-1は 10^{-4} MにおけるBPAの約80%の活性を有していた。また 10^{-3} Mにおいて、BP-8はエストロゲン様活性を発現し、 10^{-4} MにおけるBPAのエストロゲン様活性よりも高い活性がみられた。

前述したように、 10^{-4} MにおいてBP-1のエストロゲン様活性が最も高く、THBPはBPAの約1/2のエストロゲン様活性を有していた。そこで、BP-1とTHBPを取り上げ、Lac-HBT処理によるエストロゲン様活性の除去効果をTwo-Hybrid法で確認することにした。酵素未処理液中に含有されるBP-1あるいはTHBPが示すβ-ガラクトシダーゼ活性を100%とした場合の「エストロゲン様活性の変化」をFig. 8に示す。Lac-HBT処理はTHBPおよびBP-1のエストロゲン様活性（毒性）除去に有効であり、THBPは30分間の処理によってエストロゲン様活性が完全に除去された。一方、BP-1についても処理24時間後に約90%のエストロゲン様活性が除去された。

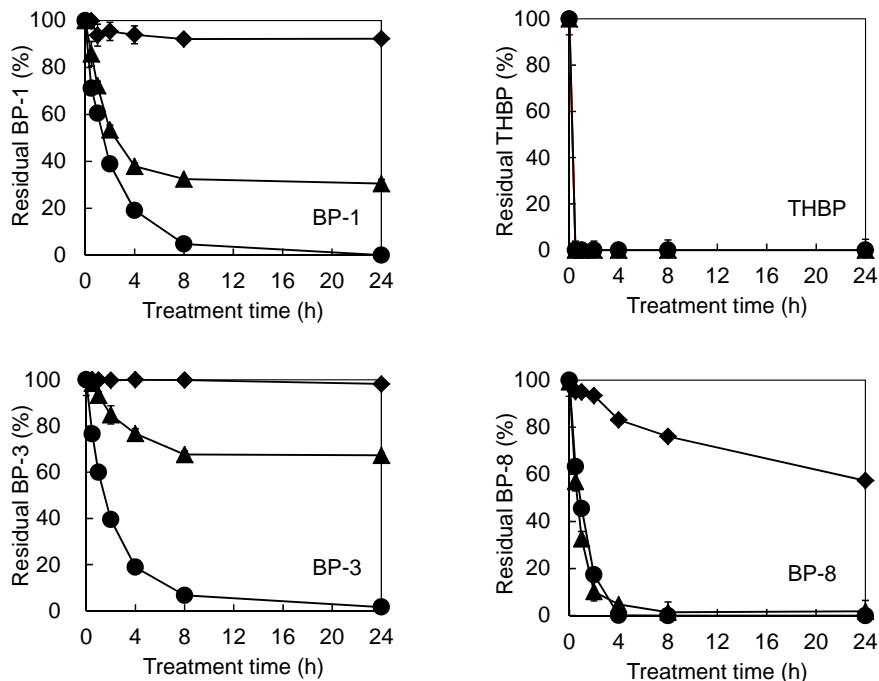


Fig. 6 リグニン分解酵素処理によるベンゾフェノン系紫外線吸収剤の減少 (▲), MnP; (◆), Lac; (●), Lac-HBT

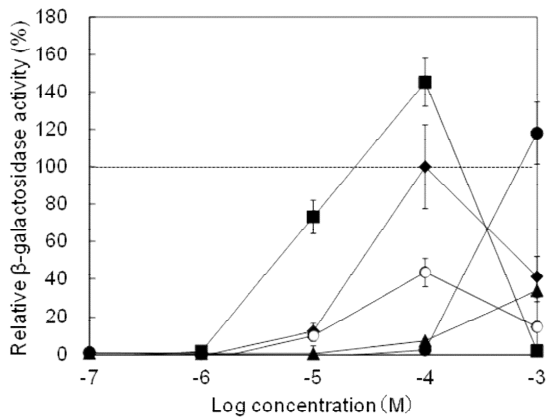


Fig. 7 Two-hybrid 法で測定したベンゾフェノン系紫外線吸収剤のエストロゲン様活性 (BPA のエストロゲン様活性を 100%として表示) (■), BP-1; (▲), BP-3; (●), BP-8; (○), THBP; (), BPA

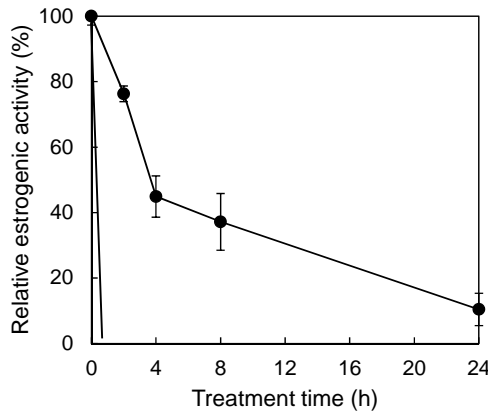


Fig. 8 Lac-HBT処理によるBP-1 および THBP のエストロゲン様活性除去 (●), BP-1; (■), THBP.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Suda, T., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T., Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource Technol.*, 査読有, 103 巻, 2012, 498-501
DOI: 10.1016/j.biortech.2011.10.041

〔学会発表〕(計2件)

須田知世, 河合真吾, 西田友昭, リグニ分解酵素による医薬品・身体ケア製品由来物質の除去, 第46回日本水環境学会年会, 2012年3月, 東洋大学(東京都)

Kawai, S. and Nishida, T., Removal of Recalcitrant Environmental Pollutants by Lignolytic Enzymes. Asian Micological Congress 2011, 2011年8月, Incheon University (Incheon, Korea)

〔図書〕(計1件)

西田友昭他, エヌ・ティー・エス, 排水汚水処理技術集成 vol. 2, 121-126

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/f/mokubake/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 友昭 (NISHIDA, Tomoaki)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号: 10252165

(2)研究分担者

河合 真吾 (KAWAI, Shingo)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号: 70192549