

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

ノニルフェノール分解微生物

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 克彦, 浦野, 直人, 木村, 茂 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/97">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/97</a>

〔 総 説 〕

## ノニルフェノール分解微生物

藤井 克彦\*・浦野 直人\*・木村 茂\*

(平成 12 年 8 月 28 日受付)

### Nonylphenol-degrading Microbe

Katsuhiko Fujii, Naoto Urano and Shigeru Kimura

**Abstract:** Nonylphenol (NP) is an important intermediate in the production of various commercial and industrial materials, but is also known as a ubiquitous pollutant in urban aquatic environments. Recently, it has been shown that NP has a certain estrogenic activity. Many studies demonstrated that NP is highly toxic and accumulative in some aquatic organisms.

To contribute to the protection of a natural aquatic environment, a main field of fisheries, we have tried to search NP-degrading microbes from natural or artificial environments, and have successfully isolated a bacterial strain S-3 with a strong NP-degrading activity. Furthermore, the strain has been identified as a novel species of the genus *Sphingomonas*, and we have named the strain *Sphingomonas cloacae*. In this paper, we introduce the biochemical and genetical aspects of the strain S-3, discuss its potential for future applications on bioremediation, and review the recent world research of NP-degrading microbes.

**Key words:** Endocrine disrupter chemicals, Nonylphenol, Aquatic Environment, Bacterium, *Sphingomonas* sp., Bioremediation

### はじめに

近頃では「内分泌攪乱化学物質 (Endocrine disrupter chemicals: EDCs)」に関する問題がテレビのニュースあるいは新聞の記事として話題に挙がらない日は無いといってもよいであろう。EDCs 自体は、実は数十年も前から多くの工業国で環境汚染物質として検出されていた。しかし、これらの物質が急激にクローズアップされ始めたのは、私達の生活において極めて身近に存在し、ごく微量濃度で動物の生理・生殖機能に影響を与え得る事が明らかになってきたという背景がある。1996 年 10 月に米国環境保護局 (EPA) によって発表されたリスト (Table 1) には約 70 種類の化合物が EDCs として掲載されたが、研究の進展に伴い、現在ではその数が 100 種類程度に及ぶともいわれている。

ホルモンは本来、動物の発生・分化、成長、恒常性、生殖等の調節において重要な役割を果たす物質であり、必要な時期に応じて内分泌器官から分泌さ

れ、血液などを介して標的組織に到達する。到達したホルモンは標的細胞内または細胞膜上のホルモン受容体に結合し、タンパク質合成や細胞分裂の引金となる。動物体内で起こるこれらの生理的事象は時間的および空間的に極めて正確に制御されている。EDCs の詳細な作用機構はまだごく一部しか明らかになっていないが、その立体構造が内在性ホルモンのそれに類似していることから、内在性ホルモンに代わって受容体に結合することで内分泌系を攪乱するのではないかと考えられている。

また、EDCs の多くは脂溶性であることから、食物連鎖を通じた生物濃縮も懸念されている。食物連鎖の上位に位置する動物ほど体内に EDCs を貯め込む危険性がある。ヒトはこの食物連鎖の最上位に位置する動物であり、中でも日本人は特に魚好きの民族である。我々は沿岸の小魚から貝、海藻、大型魚、鯨など、多くの海産物を食用として利用している。魚について考えると、魚の脂はうまみの要素として極めて大切に考えられている。マグロ、ハマチ

\* Tokyo University of Fisheries, Laboratory of Marine Biochemistry, 5-7, Konan 4-chome, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan (東京水産大学生物資源化学講座)。

Table 1. The preliminary list of endocrine disrupter chemicals (presented by EPA in 1996)

(Known)*	(Probable)†	(Suspect) ‡
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrazine</li> <li>• Chlordanes</li> <li>• Chlordecone (Kepone)</li> <li>• DDT</li> <li>• DDD</li> <li>• DDE</li> <li>• 1,2-Dibromo-3-Chloropropane</li> <li>• Dicofol (Kelthane)</li> <li>• Dieldrin</li> <li>• DES</li> <li>• Dioxin(2,3,7,8-)</li> <li>• Endosulfans</li> <li>• Furan(2.3.7.8-)</li> <li>• Lindane</li> <li>• Methoxychlor</li> <li>• Para-Nonylphenol</li> <li>• PCBs</li> <li>• Toxaphene</li> <li>• Tributyl Tin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alachlor</li> <li>• Aldrin</li> <li>• Amitrole</li> <li>• Benomyl</li> <li>• Bisphenol-A</li> <li>• Cadmium</li> <li>• 2,4-D</li> <li>• Di(2-Ethylhexyl) Phthalate</li> <li>• Endrin</li> <li>• Heptachlor</li> <li>• Heptachlor Epoxide</li> <li>• Hexachloro-benzene</li> <li>• Para-Hexachloro-cyclohexane</li> <li>• Lead</li> <li>• Manzeb</li> <li>• Maneb</li> <li>• Mercury</li> <li>• Methyl Parathion</li> <li>• Metiram</li> <li>• Mirex</li> <li>• Para-Octylphenol</li> <li>• Parathion</li> <li>• Pentachloro phenol</li> <li>• PBBs</li> <li>• Styrene</li> <li>• 2,4,5-T</li> <li>• Trifluralin</li> <li>• Vinclozolin</li> <li>• Zineb</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aldicarb</li> <li>• Butyl Benzyl Phthalate</li> <li>• tert-Butylhydroxyanisole</li> <li>• Para-sec-Butylphenol</li> <li>• Para-tert-Butylphenol</li> <li>• Carbaryl</li> <li>• Cypermethrin</li> <li>• 2,4-Dichlorophenol</li> <li>• Dicyclohexyl Phthalate</li> <li>• Di(2-Ethylhexyl) Adipate</li> <li>• Di-n-butyl Phthalate</li> <li>• Di-n-hexyl Phthalate</li> <li>• Di-n-pentyl Phthalate</li> <li>• Di-n-propyl Phthalate</li> <li>• Esfenvalerate</li> <li>• Fenvalerate</li> <li>• Malathion</li> <li>• Methomyl</li> <li>• Metribuzin</li> <li>• Nitrofen</li> <li>• Octachlorostyrene</li> <li>• PAHs</li> <li>• Para-iso-Pentylphenol</li> <li>• Para-tert-Pentylphenol</li> <li>• Permethrin</li> <li>• Ziram</li> </ul>

\* Known: Chemicals for which strong evidence suggests that endocrine-disrupting effects occur in intact animals.

† Probable: Chemicals for which the preponderance of the evidence (in both intact animals and in bio-assays) suggests that the chemicals can cause disruption of the endocrine system.

‡ Suspect: Chemicals for which only assay evidence exists.

などの脂の乗った魚は高級魚として扱われており、イワシ、サバなどの大衆魚でも、脂の乗っている時期のものは特に好んで食べられている。しかし残念なことに、EDCsの多くは脂肪組織に蓄積し易いことも事実であり、実際に魚介類からもEDCsの蓄積

が報告されている(読売新聞 1998.6.3, 朝日新聞 1999.9.25)。したがって、我々は食卓を經由して、EDCsを含む多くの脂溶性有害化学物質を摂取していると考えられる(毎日新聞 1999.2.22, 読売新聞 1999.10.29)。実際に国内の調査において、母乳中に

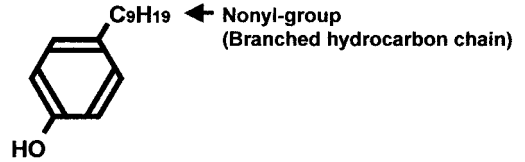
幾つかの EDCs が蓄積されていることが分かり<sup>1)</sup> (読売新聞 1998.8.19, 1998.12.1), 成人肝臓, 妊婦の羊水, 更には新生児臍帯からも EDCs が検出されている (化学工業日報 2000.1.7, 読売新聞 2000.6.21, 2000.7.15)。

私どもは, EDCs に関する問題は法律面および技術面の両方から解決する必要があると考えている。法律面では, 日本でも 2001 年より環境汚染物質排出・移動登録 (PRTR) 制度が施行される予定であり, 徐々にではあるが環境先進国への道を歩みつつある。これは, 日本の環境行政が従来の「既知の有害物質のみを規制する」から「疑わしきものについても積極的に規制を検討する」という方針へと針路変更したことも意味しており, 私どもはこの点を大きく評価している。一方で, 技術面では物理的, 化学的および微生物学的方法について多く研究がなされているが, まだ実用化できる技術は見出されていないのが現状であり, 実用化に向けた研究の進展が期待されている。私どもの研究室では後者の微生物学的処理法に関する研究を行ってきた。

## Nonylphenol

パラ - ノニルフェノール (*Para*-nonylphenol: NP) は様々な分野で利用されている有用な化合物である。化学工業日報社の「13599 の化学商品」に拠ると, 平成 9 年には 20,000 t (推定) の NP が国内で生産されている。Figure 1 に NP の化合物情報を示した。NP の主な用途としては, 非イオン系界面活性剤であるノニルフェノールポリエトキシレート (Nonylphenol polyethoxylate: NPEO) の原料である事が挙げられる。NPEO は工業用洗剤あるいは分散剤として, 繊維工業, 製紙工業, 金属工業, 農業工業等で幅広く使用されている。このほか, NP は抗酸化剤としてプラスチック製品に添加されたり, 防カビ剤や殺菌剤の原料として使用される場合もある。

この産業上有用な化学物質 NP が哺乳類に対して内分泌攪乱作用を示すことは, Soto ら<sup>2)</sup> の研究グループにより 1991 年に初めて報告された。彼女らの報告の発端となったのは, エストロゲンを添加していない培養液で MCF-7 細胞が増殖を示すことであった。MCF-7 細胞はヒト乳癌由来の培養細胞で, エストロゲンを与えないと増殖しないという性質を



### Chemical and physical properties

- CAS No. = 84852 - 15 - 3
- M.W. = 220.35
- Spec. density = 0.95 g/cm<sup>3</sup> (20°C)
- Melting point = 2°C
- Boiling point = 295°C
- Appearance : Transparent and viscous liquid.
- Solub. in water: Insoluble
- Many structural isomers through its nonyl-group exist.
- Acute toxicity : LD<sub>50</sub> = 1,620 mg/kg (rat, oral)
- *Para*-NP show estrogenic activities.

Fig. 1. A chemical structure and chemical and physical properties of NP.

持っている。原因を調べたところ, 実験に使用したプラスチック製チューブから NP が微量に溶出し, それが MCF-7 細胞の増殖を引き起こしていたことが判明した。その後, 多くの科学者が様々な生物材料を用いて検証を行い, その作用を報告している。

NP の哺乳類への影響は主にラットを用いて *in vivo* で調べられている。授乳期のラット新生児 (雄) に NP を腹腔注射すると, 輸精管の未分化, 精子の運動能低下, 精巣の萎縮などを始めとする生殖器官の発達異常が生じることが報告されている<sup>3)</sup>。また, 3 世代に渡ってラットに NP を経口投与したところ, すべての世代で腎臓障害が発生し, 雌では更に発情周期にも変化が認められた<sup>4)</sup>。

NP は魚類を始めとする水生生物に対しても強い毒性を示すことが明らかとなっている。雄ニジマスから調製した肝細胞に NP を投与すると, 投与量の増加に伴いピテロゲニンが増加することが明らかとなった<sup>5)</sup>。ピテロゲニンは本来, 体内のホルモン刺激に応じて「雌」の肝細胞で産生されるタンパク質で, 卵黄の構成成分となる。NP が雄ニジマスの肝細胞からのピテロゲニン産生を誘発したことは, 魚類に対して内分泌攪乱作用を持つことを強く示唆している。この研究ではエストラジオール受容体のアンタゴニストを共存させると NP の効果が軽減されたことから, NP は肝細胞のエストラジオール受容体に作用している可能性も考えられた。その後, NP が雄メダカの雌化を誘発することが分かり, 一部の

個体の精巣からは精卵巣 (testis-ova) が見出された<sup>6)</sup>。また、雌ニジマス稚魚を用いた解析では、NP の投与で成長阻害が起こり、全体重に対する卵巣の重量比が増加することもわかった<sup>7)</sup>。更に、NP に曝露した雄メダカと正常な雌メダカの組合せによる産卵では、孵化率が有意に低下することが報告され、NP が魚類個体の生理だけでなく、実際の生殖活動にも影響を及ぼす事も明らかにされた<sup>8)</sup>。

NP は他の多くの EDCs と同様に、その lipophilicity (親脂性) から生体濃縮の危険性も懸念されている。イガイとトゲウオを用いた実験では、NP が各々 3,400 および 1,400 倍に濃縮されて蓄積することが報告された<sup>9)</sup>。また、数種類の淡水魚でも NP の蓄積が報告されている<sup>10)</sup>。

環境庁および建設省による環境調査では、NP が日本国内の多くの河川・海水中に存在していることが分かった<sup>11,12)</sup>。環境調査で検出される NP のほとんどは、環境中に放出された NPEO の微生物分解に由来することが多くの研究から明らかになっている<sup>13-17)</sup>。Figure 2 に環境中での NPEO の分解過程を示す。NPEO の生分解は ethoxy 基の側から進行し、分解に伴って ethoxy 基が徐々に短くなって行く。一方で nonyl 基は、その分枝状構造が微生物分解を受けにくく、したがって分解はもっぱら ethoxy 基側で進行して行く。その結果、最終産物として NP、NP1EO、NP2EO 等が生成される。この分解は下水処理の過程でも起きることが知られており、実際に下水処理場の活性汚泥や放流水で NP が高濃度に検出された例が多く報告されている<sup>18-24)</sup>。

NP は水環境だけでなく、食品からも検出されている。厚生省国立医薬品食品衛生研究所が白米、魚介類、肉類、野菜を含む多くの市販食品について調査したところ、多くの食品に NP が含まれていることが明らかになった<sup>25)</sup>。更に、NP は全国の海岸に漂着しているレジンペレット (直径数 mm のプラスチック小粒子) から検出されており、ペレットを飲み込んだ野生生物への悪影響が懸念されている (日本経済新聞 98.7.15)。

## NP 分解微生物の探索

NP が哺乳類の内分泌系を攪乱しえることが初めて報告されてから約 10 年が経過する。しかし、そ

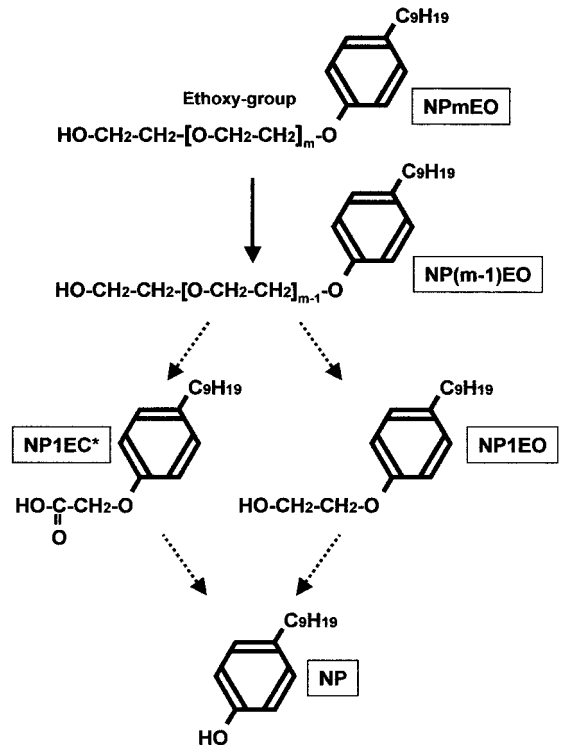


Fig. 2. Degradation of nonylphenol polyethoxylate (NPEO) by natural living microbes. \*NP1EC: Nonylphenoxy acetic acid.

の難生分解性という化学的性質により、NP 分解微生物に関する研究例は極めて少ないのが現状である。1981 年に、Sundaram & Szeto<sup>26)</sup> は実験室に持ち帰った湖沼の表層水と泥土に NP (初濃度 1.0 mg/L=1.0 ppm) を添加し、数ヶ月間に渡ってその挙動を追跡している。その結果、泥土試料中の NP が 70 日間で約 70% 消失したことを報告している。1993 年には Ekelund ら<sup>27)</sup> が、海水と海底泥に放射標識した NP (<sup>14</sup>C-NP) を添加し、同様の実験を行っている。その結果、8 週間で 10~50% 程度の <sup>14</sup>C-NP が <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> に変換されたと報告している。これらの報告を考えると、環境中には NP を分解できる微生物 (または微生物群) が確かに存在するようである。

私どもの研究室では数年前より「nonyl 基の多様な立体構造に関わらず NP を分解できる微生物の探索」を行ってきた。その結果、都内下水処理場への流入下水に著しい NP 分解活性を見出し<sup>28)</sup>、分解細菌 S-3 株の単離に成功した。

## 単離された細菌の NP 分解活性

Figure 3 に単離された S-3 の NP 分解曲線を示す。NP 生分解試験は HPLC を用いて行った。S-3 は 1,000 ppm の NP を, nonyl 基の立体構造に関わり無く, 約 10 日でほぼ分解し尽くすことが分かった。培養 2 日目には NP の分解が始まり, 10 日目の培養液に NP はほとんど残っていないかった。

本研究で炭素源として用いている NP は, 様々な分枝状 nonyl 基を持つ異性体の混合物である。したがって本研究は, 分解微生物の分離に関する従来の研究と比較して, 炭素源の立体構造が一定していないという点で極めて特殊である。

更に, S-3 が NP を炭素源として資化していることを確認するために, NP の分解に伴う S-3 のバイオマス量の変化を調べたところ, 10 日間の培養でバイオマスは有意に増加していることが判明し, S-3 単独による NP の分解・資化が明確に示された。

## 分解産物の解析

NP 分解の結果としてどのような物質が分解産物として生成しているのかについてはまだ明らかではない。一般的には, 有害な有機化合物が資化微生物に栄養源として摂取されると, より無害な低分子化合物(究極的には  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2\text{O}$ )へと変換される。しかし, 幾つかの農薬成分が微生物的作用によって更に有害な化合物へと変換されることも知られている<sup>29)</sup>。したがって, S-3 の環境保全・修復への応用を考える上で, NP が最終的にどのような化合物に変換されるのかについては, 必ず明らかにしておく必要がある重要な点である。

そこで, GC/MS および NMR を用いて NP の分解に伴って生成される分解産物の同定を行った。培養液の抽出・濃縮液を GC/MS で解析したところ, 培養日数に伴って NP が減少するとともに, 分解後には特異的なピークが出現した。Figure 4 に例として 7 日目培養液の total ion chromatogram を示す。これらのピークを質量分析計で解析したところ, ノナノールを主とするアルコール類であることが判明した。様々な保持時間のノナノールが見出されたが, これは見出された個々のノナノールの立体構造が異

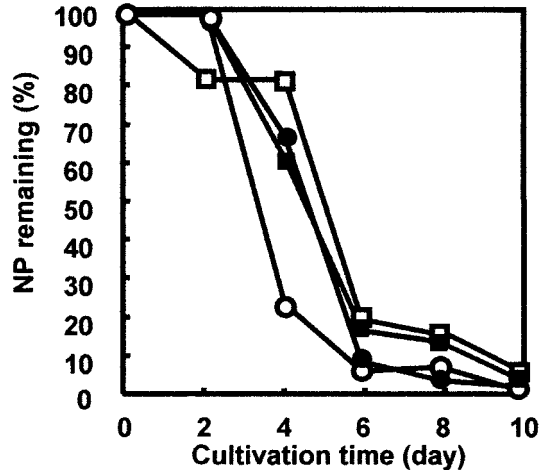


Fig. 3. Typical time courses for degradation of NP by S-3. Recovery of NP is the percentage NP remaining in solution. Results of 4 independent experiments (○, ●, □ and ■) are shown.

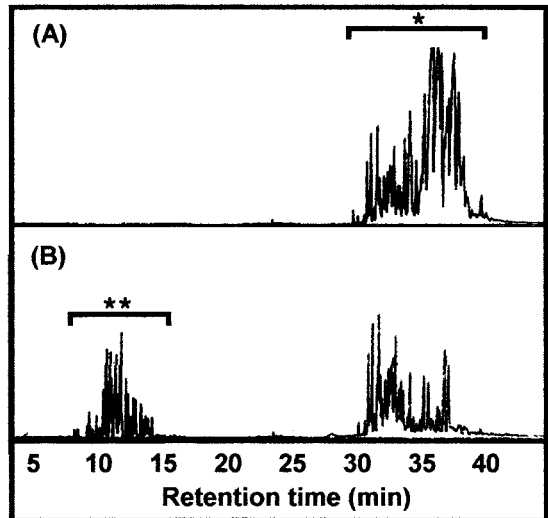


Fig. 4. GC/MS analyses of degradation products. Total ion chromatograms of hexane extracts of a 0-day-old culture (A) and a 7-days-old culture (B) are shown. Peaks of NP and degradation products are indicated by “\*” and “\*\*”, respectively.

なっている, つまりノナノールについては多くの異性体が見出されたことを示している。NP の立体構造に着目すると, その構造の中に様々な立体構造を取り得る部位 (nonyl 基) がある。このことから, ノナノールは nonyl 基由来である可能性が考えられる。

NP ( $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-C}_9\text{H}_{19}$ ) に良く似た構造を持つ化合物

にノニルベンゼン ( $C_6H_5-C_9H_{19}$ ) がある。直鎖の nonyl 基を持つノニルベンゼンは放線菌 *Nocardia* sp. によって分解されることが知られており、ノニルベンゼンは最終的には安息香酸 ( $C_6H_5-COOH$ ) と桂皮酸 ( $C_6H_5-CH=CH-COOH$ ) へと変換される<sup>30)</sup>。当初、私どもは S-3 の NP 分解でも同様の経路を辿ると推測していた。NP でも同様に nonyl 基が徐々に分解され、側鎖のより短いアルキルフェノールが中間代謝産物として検出されると考えて実験を進めていた。しかし、このような化合物は分解培養液では検出されなかった。また、プロピルフェノール ( $HO-C_6H_4-C_3H_7$ ) とヘキシルフェノール ( $HO-C_6H_4-C_6H_{13}$ ) を炭素源として培養を試みたが、S-3 は増殖せず、分解も認められなかった。S-3 による NP 分解は、*Nocardia* sp. によるノニルベンゼンの分解とは明らかに異なる経路で進行していると私どもは考えている。

芳香族化合物には、多くの生物に対して強い毒性を持つものが存在する。さらに、その内の幾つかは内分泌攪乱作用も見出されている。このような理由から、NP の芳香環が分解されたかどうかは、S-3 の環境浄化への応用を考える際に極めて重要な問題となってくる。

HPLC および GC/MS での解析では NP 以外には芳香族化合物は見出されなかった。しかし、これらの機器で検出されなくても、クロマトグラフィーの分離条件が適さないことから「培養液中に存在するが、今回の実験条件ではピークとして検出されなかった」芳香族化合物の存在を見落としている危険性がある。そこで、 $^1H$ -NMR を用いて、培養液中の芳香環由来の総シグナル (aromatic proton) を解析し、芳香環が培養液中から確かに消失しているのかどうかについて検討した。植菌後 20 日目の培養液を NMR で分析したところ、分解後の培養液では aromatic proton のシグナルが激減していることが示された (Fig. 5)。この「芳香環」由来のシグナルには、培養液中に存在するすべての芳香族化合物が寄与している。したがって、NP の芳香環は分解を受けており、生じた分解産物も芳香環を有していないことが強く示唆された。

以上の結果は、S-3 が環境保全・修復への応用に強い期待を持てる分解菌であることを示している。

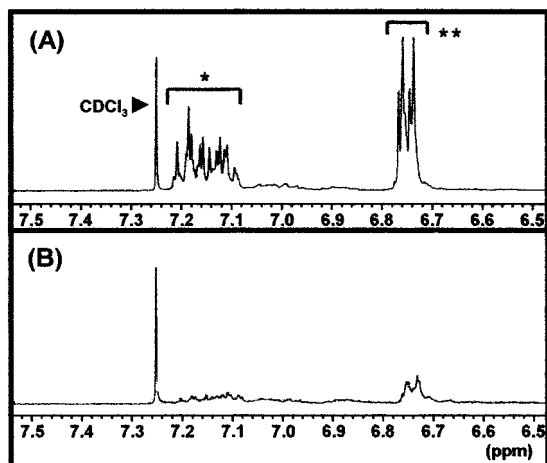


Fig. 5.  $^1H$ -NMR spectra of 0-day-old culture (A) and a 20-days-old culture (B) are shown. The signals corresponding to the aromatic proton are indicated by "\*" and "\*\*".



Fig. 6. A transmission electron micrograph of S-3 cells (magnification, 8,000 $\times$ ). Bar length=1  $\mu m$ .

## S-3 の生化学的・分子生物学的解析

Figure 6 に S-3 の電子顕微鏡写真を示す。S-3 はグラム陰性の好気性桿菌 (長さ 2.0~3.1  $\mu m$   $\times$  直径 1.1~1.4  $\mu m$ ) であった。普通寒天 (Nutrient agar) 上では S-3 のコロニーはクリーム色 (creamy-white) を呈した。また、普通寒天で培養しても S-3 の NP 分解活性は喪失しないことが分かった。

NP 分解細菌 S-3 株が既存種のいずれに該当するのか、あるいは新種なのかは、極めて興味深い点である。

まず、S-3 の全長 16S-rDNA の塩基配列を決定し、系統解析を行った。Figure 7 に構築した系統樹 (近隣結合法) を示す。S-3 は既存の 6 種 (*S. yanoikuyae*, *S. paucimobilis*, *S. chlorophenolica*, *Sphingomonas* sp. RA2, *S. herbicidovorans*, *Sphingomonas* sp. HV3) と同一の cluster に位置し、これらと極めて近縁であることが分かった。また、S-3 のゲノム DNA の G+C 含量は 63 mol% と算出された。この値は、既存の *Sphingomonas* sp. で得られている G+C 含量値 (62~68 mol%) の範囲内であった。*Sphingomonas* では、*S. yanoikuyae*, *S. chlorophenolica*, *Sphingomonas* sp. RA2 株, *S. subarctica*, *S. herbicidovorans*, *S. aromaticivorans*, *S. subterranea*, *S. stygia*, *S. xenophaga* 等、難分解性化合物を炭素源として資化できる種が数多く知られている<sup>31-42)</sup>。

しかし、最も近縁であると推定される *S. yanoikuyae* との 16S-rDNA homology は 96% であった。一般に、同一種では 97~99% 以上のホモロジーが得られる。このような理由から、「S-3 は上記の 6 種と確かに近縁ではあるが、別種である (即ち新種である)」可能性が考えられた。そこで、S-3 が既存種なのか新種なのかについて決定的な結論を出すために、既存種との DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。系統解析の結果 (Fig. 7) を基に近縁の 6 種と、任意に選抜した遠縁の 4 種 (合計 10 種) を比較株として用いた。DNA-DNA ハイブリダイゼー

ションの結果を Table 2 に示す。実験の結果、S-3 と比較株との交雑度は最高でも 20% 程度に留まり、いずれの近縁種にも該当しない新種であることが明らかとなった (70% 以上の値が得られることが同一種と認める際の判断基準の 1 つとなっている)。

S-3 の脂質・キノン分析も行った。見出された非極性脂肪酸の中で主要なものは 18:1 と 16:0 であ

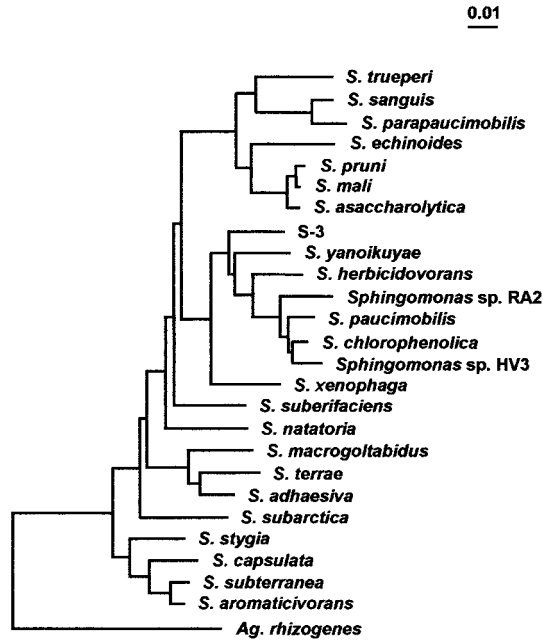


Fig. 7. A phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on 16S-rDNA sequences of S-3 and related bacteria. The scale bar represents evolutionary distance ( $K_{nuc}$ ) of 0.01.

Table 2. Levels of DNA-DNA reassociation for S-3 and other *Sphingomonas* strains

Strain	G+C content (mol%)	% Reassociation with labeled DNA from:										
		S-3	yan	pau	chl	hrb	HV3	RA2	sng	cap	nat	asc
S-3	63	100	17	10	20	16	16	18	5	3	1	0
<i>S. yanoikuyae</i> (yan)	62	19	100	8	19	17	15	16	6	5	4	3
<i>S. paucimobilis</i> (pau)	64	13	10	100	9	7	5	8	40	6	5	7
<i>S. chlorophenolica</i> (chl)	65	27	23	11	100	23	31	66	9	6	4	2
<i>S. herbicidovorans</i> (hrb)	16	15	7	17	100	18	15	5	5	4	2	
<i>Sphingomonas</i> sp. HV3 (HV3)	64	18	19	7	31	23	100	35	7	5	5	4
<i>Sphingomonas</i> sp. RA2 (RA2)	23	21	9	69	23	36	100	8	6	6	5	
<i>S. sanguis</i> (sng)	62	9	9	42	9	6	5	5	100	4	3	5
<i>S. capsulata</i> (cap)	64	9	9	6	8	6	5	4	4	100	3	0
<i>S. natoria</i> (nat)	65	5	7	6	6	6	6	6	5	5	100	5
<i>S. asaccharolytica</i> (asc)	65	3	4	7	4	3	3	3	6	1	3	100



り、検出された水酸化脂肪酸の中で主要なものは2-ヒドロキシミリスチン酸 (14:0 2-OH) であった。一方で、3-OHの水酸化脂肪酸は検出されなかった。これらは既存の *Sphingomonas* の特徴に一致する。また、*Sphingomonas* は他の細菌でほとんど見出されない脂質であるスフィンゴ糖脂質を持つことが知られている。TLCによる解析からは、S-3でもスフィンゴ糖脂質の存在が確認され、S-3が確かに *Sphingomonas* に属する種であることが強く示唆された。

S-3のキノン組成について解析したところ、Q-10を主要とするユビキノンの存在が確認された。ユビキノン Q-10が主要なイソプレノイドキノンとして存在することは *Sphingomonas* sp. の典型的な特徴の1つである。

### S-3の生理学的特徴

生理学的試験の結果を Table 3 に示す。4°C、25°C、および40°CにおけるS-3の生育を観察したところ、25°Cでは生育できるが、4°Cと40°Cでは生育できないことが分かった。また、オキシダーゼ・テスト、カタラーゼ・テストおよび硝酸還元能はともに陽性を示し、インドール産生試験は陰性であった。これらの性状は、多くの既存近縁種のそれに一致している。S-3の炭素源資化能を検討したところ、S-3は調べた約50種類の糖類を全く資化しなかった。一方で、S-3は幾つかのアミノ酸に対しては資化能を示すことが分かった。S-3は糖類を資化できないが、アミノ酸は炭素源として利用できるようである。各種酵素活性も検討したところ、S-3はアミノ酸代謝に関連する酵素を含む幾つかの酵素活性について陽性を示したが、糖代謝に関連する酵素群はいずれも陰性であった。これは炭素源資化試験のデータとも一致する結果である。

NP以外のアルキルフェノールの幾つかについても分解能を検討したが、それらは分解しなかった。しかし見方を変えると、これらの結果は「雑多な成分組成の排水の中においてS-3がNPを選択的にかつ特異的に分解できる」可能性を示唆している。

### 他研究グループの動向

環境浄化への応用を目指したNP分解微生物の探

索は1990年代半ばから盛んになってきた。まず、1995年にCortiら<sup>43)</sup>の研究グループ(イタリア)によって、NP分解酵母の分離が報告された。しかし、この酵母は直鎖状の nonyl 基を持つNP (*n*-NP)の分解が認められただけで、一般的に様々な異性体が検出される汚染水域の浄化に応用することは困難であると考えられた。実際に、この酵母を用いた環境浄化に関する研究は発見以降、未だに報告されていない。

このような事情から、環境浄化に「使える」微生物探しを巡って、私どもを含む幾つかの研究グループの間で激しい競争が展開されてきた。その結果、1999年にTangheら<sup>44)</sup>の研究グループ(ベルギー)が分枝状NPを分解できる細菌の分離を報告した。これは、私どもが下水からS-3株を単離した時期にほぼ一致する。彼らの株は初濃度670ppmのNPを16日間で完全に分解する。実験系が異なるので直接比較は困難であるが、単純に考えると $\{(1,000\text{ ppm}/10\text{ days})/(670\text{ ppm}/16\text{ days})=2.38\}$ でS-3株の方が2倍以上も強力な分解活性を備えていることが分かる。しかし驚いたことに、彼らの分離株がS-3株と同じく *Sphingomonas* に属することも明らかになった。今日では、細胞形態、色素産生能(によるコロニー色)および炭素源資化能の違いから彼らの分離株とS-3株は「同属ではあるが、異なる種」であることが強く示唆されているが、当時の私どもは「Tangheらの株とS-3株は同一種ではないか」という厳しい批判を受けた。

先程まで述べてきたように、S-3株が新種であることを受け、私どもはS-3株を *Sphingomonas cloacae* (cloaca: ラテン語で下水道の意)と命名し、その系統解析のデータ(「S-3の生化学的・分子生物学的解析」および「S-3の生理学的特徴」において紹介した内容)を国際細菌分類命名委員会の機関誌 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* に投稿した<sup>45)</sup>。その結果、平成12年8月末に、編集者から受理の知らせを受け、*S. cloacae*の新奇性が国際的に認知された(上記の機関誌に論文が受理・発表されることが、新種であると公認される際の必須条件となっている)。一方で、NP分解活性についてのデータ(「単離された細菌のNP分解活性」および「分解産物の解析」において紹介した内容)は *Journal of Biochemistry* に受理された<sup>46)</sup>。Tangheらの

Table 3. Characteristics which differentiate S-3 and other *Sphingomonas* species

Characteristic	S-3	pau	yan	chl	hrb	HV3	RA2	SRB	cps	nat	asc
Growth in 4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from glucose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilation tests <sup>a)</sup> :											
L-Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl glucosamine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Gentiobiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Methyl-D-glucoside	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Characteristic											
n-Caprato	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adipate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenyl acetate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoleucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptophan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Threonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asparagine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aspartic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Enzyme activities <sup>b)</sup> :											
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystine arylamidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trypsin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chymotrypsin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Galactosidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Glucuronidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Glucosidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Glucosidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-β-glucosaminidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Abbreviations: pau, *paucimobilis*; yan, *yanokuyae*; chl, *chlorophenolica*; hrb, *herbicidovorans*; HV3, *Sphingomonas* sp. HV3.; RA2, *Sphingomonas* sp. RA2; sng, *sanguis*; cps, *capsulata*; nat, *nataforis*; asc, *asaccharolytica*.

a) Tests for which all strains gave negative results: D-Arabinose, L-Arabitol, L-Xylose, L-Sorbose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Arabitol, β-Methyl-xylose, Ribose, Inositol, Inuline, Erythritol, Adonitol, Dulcitol, Xylitol, Mannitol, Sorbitol, Glycogen, α-Methyl-D-mannose, Gluconate, 2-keto-Gluconate, 5-keto-Gluconate, Alanine, Methionine, Glycine, Cysteine.

b) Tests for which all strains gave positive results: phosphatase, Alkaline phosphatase, Leucine arylamidase, and Naphthol-AS-Bi-phosphohydrazase. Tests for which all strains gave negative results: α-Mannosidase, α-Fucosidase.

分離株が新種なのかどうかは私どもの最も知りたいところでもあるが、彼らの株の同定に関する論文はまだ発表されておらず、彼らの株が新種では無いことが判明したのか、あるいは何らかの事情で研究がストップしているのかも知れない。

最近では日本でも、複数の研究機関によって NP (および NPEO) 分解微生物の探索競争が激しくなりつつある。NP 関連の話題は、NP が魚介類に対して深刻な影響を及ぼすことから、日本水産学会において多くの興味深いデータが毎回発表されている。魚類に対する NP の生体毒性に関しては、神戸女学院大学、酪農学園大学、および瀬戸内海区水産研究所の各グループによる発表を聴くことができる。分解微生物に関しては、平成 11 年度および 12 年度の春季大会で私どもが発表を行ったが、平成 11 年度秋季大会では三重大学のグループが分解細菌の分離を報告し(分離株は *Pseudomonas* 属とのことである)、福井県で開催される平成 12 年度秋季大会では水産大学校のグループが研究成果を発表する予定である。

## おわりに

ここまで紹介してきたように今回、学問的にはもちろんであるが、環境浄化という応用的見地から見ても大変興味深い性質を持つ NP 分解細菌が得られた。私どもが見出した新知見は順調に学術雑誌 (*Fisheries Sci., Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* および *J. Biochem.*) に受理され、多くの科学者から関心が寄せられている。

今後解決して行かねばならない課題の 1 つは、どのような方法で *S. cloacae* を応用するのか、についてである。水環境で検出される NP は一般に ppb オーダーであり、分解菌の炭素源・基質としては極めて低い濃度である。また、検出される全国の水域に散布することは極めて非効率・非現実的である。これらの理由から、石油分解菌に代表されるような微生物製剤としての利用はあまり効果を挙げられないのではないかと、私どもは考えている。それよりもむしろ、NP が最も高い濃度で見出される場所(即ち、NP 排出源)である工場排水の処理システムに *S. cloacae* を用いたバイオリクターを組み込むことが効果的ではないかと思われる。私どもは、汚

染の最上流において NP を分解・除去することで環境中の濃度も付随的に下げられるのではないかと考えており、現在、*S. cloacae* 固定化キトサンビーズを用いた NP 分解バイオリクターを構築して試験稼働を行っているところである。このリアクターは良好な分解効率を維持しており、1,000 ppm の NP を 5 日間でほぼ完全に分解できる。

今回得られた分解細菌については、更なる実用的研究を念頭に特許出願も行っている。幾つかの企業が本菌に興味を示しており、企業との共同研究に発展する可能性もある。一方で、本菌は「NP 検出バイオセンサー」への応用(他研究室との共同研究)も検討されている。

有害化合物を分解できる微生物は数多く見つっている。しかし、それらがバイオレメディエーションに実際に応用された例は極めて少ない。*S. cloacae* が水環境で普遍的に見出される NP の検出・除去に「実際に」貢献できるよう、今後とも精力的に研究を進めて行きたい。

## 文 献

- 1) T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda, S. Takenaka, and J. Nagayama: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds in breast milk of Japanese primiparas and multiparas. *Chemosphere*, 38, 2461–2466 (1999).
- 2) A. M. Soto, H. Justica, J. W. Wray, and C. Sonnenschein: Para-nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.*, 92, 167–173 (1991).
- 3) P. C. Lee, P. Arndt, and K. C. Nickels: Testicular abnormalities in male rats after lactational exposure to nonylphenol. *Endocrine*, 11, 61–68 (1999).
- 4) R. E. Chapin, J. Delaney, Y. Wang, L. Lanning, B. Davis, B. Collins, N. Mintz, and G. Wolfe: The effects of 4-nonylphenol in rats: Multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci.*, 52, 80–91 (1999).
- 5) S. Jobling and J. P. Sumpter: Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicol.*, 27, 361–372 (1993).
- 6) M. A. Gray and C. D. Metcalfe: Induction of testis-ova in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1082–1086 (1997).
- 7) L. A. Ashfield, T. G. Pottinger, and J. P. Sumpter: Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modification to growth and ovosomatic index. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 679–686 (1998).
- 8) T. Shioda and M. Wakabayashi: Effect of certain chemi-

- cals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 40, 239–243 (2000).
- 9) R. Ekelund, A. Bergman, A. Granmo, and M. Berggren: Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals. A re-evaluation. *Environ. Pollut.*, 64, 107–120 (1990).
  - 10) M. Ahel, J. McEvoy, and W. Giger: Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollut.*, 79, 243–248 (1993).
  - 11) 建設省河川局: 河川における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(前期調査). *環境化学*, 4, 965–995 (1998).
  - 12) 環境庁水質保全局: 「水環境中の内分泌攪乱化学物質の実態概況調査(夏季)結果(速報)」について. *環境化学*, 1, 160–206 (1999).
  - 13) M. Ahel, D. Hrsak, and W. Giger: Aerobic transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, 540–548 (1994).
  - 14) H. Maki, N. Masuda, Y. Fujiwara, M. Ike, and M. Fujita: Degradation of alkylphenol ethoxylates by *Pseudomonas* sp. strain TR01. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2265–2271 (1994).
  - 15) R. Kvestak and M. Ahel: Biotransformation of nonylphenol polyethoxylate surfactants by estuarine mixed bacterial cultures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29, 551–556 (1995).
  - 16) S. Frassinetti, A. Isoppo, A. Corti, and G. Vallini: Bacterial attack of non-ionic aromatic surfactants: Comparison of degradative capabilities of new isolates from nonylphenol polyethoxylate polluted wastewater. *Environ. Technol.*, 17, 199–213 (1996).
  - 17) D. M. John and G. F. White: Mechanism for biotransformation of nonylphenol polyethoxylates to xenoestrogens in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 180, 4332–4338 (1998).
  - 18) W. Giger, E. Stephanou, and W. Schaffner: Persistent organic chemicals in sewage effluents: Identifications of nonylphenols and nonylphenoethoxylates by glass capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Chemosphere*, 10, 1253–1263 (1981).
  - 19) W. Giger, P. H. Brunner, and W. Schaffner: 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, 225, 623–625 (1984).
  - 20) M. Ahel and W. Giger: Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 57, 1577–1583 (1985).
  - 21) P. H. Brunner, S. Capli, A. Marcomini, and W. Giger: Occurrence and behavior of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Res.*, 22, 1465–1472 (1988).
  - 22) J. Ejlertsson, M. L. Nilsson, H. Kylin, A. Bergman, L. Karlson, M. Oquist, and H. Svensson: Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates in digester sludge, landfilled municipal solid waste, and landfilled sludge. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 301–306 (1999).
  - 23) 小島節子, 渡辺正敏: 名古屋市内の水環境中のアルキルフェノールポリエトキシレート(APE)及び分解生成物の分布. *水環境学会誌*, 21, 302–309 (1998).
  - 24) 磯部友彦, 高田秀重: 水環境におけるノニルフェノールの挙動と環境影響. *水環境学会誌*, 21, 203–208 (1998).
  - 25) 佐々木久美子, 高附 巧, 根本 了, 今中雅章, 衛藤修一, 村上恵美子, 豊田正武: 食品中のアルキルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールの分析. *食品衛生学雑誌*, 40, 460–472 (1999).
  - 26) K. M. S. Sundaram and S. Szeto: The dissipation of nonylphenol in stream and pond water under simulated field conditions. *J. Environ. Sci. Health*, B16, 767–776 (1981).
  - 27) R. Ekelund, A. Granmo, K. Magnusson, and M. Berggren: Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environ. Pollut.* 79, 59–61 (1993).
  - 28) K. Fujii, N. Urano, S. Kimura, Y. Nomura, and I. Karube: Microbial Degradation of Nonylphenol in Some Aquatic Environments. *Fisheries Sci.*, 66, 44–48 (2000).
  - 29) M. Alexander: Activation, in 「Biodegradation and Bioremediation (2nd edn)」, Academic Press, Massachusetts, 51–72 (1999).
  - 30) F. S. Sariaslani, D. B. Harper, and I. J. Higgins: Microbial Degradation of Hydrocarbons. *Biochem. J.*, 140, 31–45 (1974).
  - 31) A. A. Kahn, R. F. Wang, W. W. Cao, W. Franklin, and C. E. Cerniglia: Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp., strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 466–469 (1996).
  - 32) S. L. Eaton, S. M. Resnick, and D. T. Gibson: Initial reactions in the oxidation of 1,2-dihydronaphthalene by *Sphingomonas yanoikuyae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4388–4394 (1996).
  - 33) Y. Wang and P. C. K. Lau: Sequence and expression of an isocitrate dehydrogenase-encoding gene from a polycyclic aromatic hydrocarbon oxidizer, *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Gene*, 168, 15–21 (1996).
  - 34) E. Kim, G. J. Zylstra, J. P. Freeman, T. M. Heinze, J. Deck, and C. E. Cerniglia: Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 153, 479–484 (1997).
  - 35) U. Karlson, F. Rojo, J. D. van Elsas, and E. Moore: Genetic and serological evidence for the recognition of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as a species of the genus *Sphingomonas*. *System. Appl. Microbiol.*, 18, 539–548 (1995).
  - 36) Y. Ohtsubo, K. Miyauchi, K. Kanda, T. Hatta, H. Kiyohara, T. Senda, Y. Nagata, Y. Mitsui, and M. Takagi: PcpA, which is involved in the degradation of pentachlorophenol in *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC39723, is a novel type of ring-cleavage dioxygenase. *FEBS Lett.*, 459, 395–398 (1999).

- 37) D. L. McCarthy, A. A. Claude, and S. D. Copley: In vivo levels of chlorinated hydroquinones in a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1883–1888 (1997).
- 38) C. Zipper, K. Nickel, W. Angst, and H. P. E. Kohler: Complete microbial degradation of both enantiomers of the chiral herbicide mecoprop [(RS)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy) propionic acid] in an enantioselective manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4318–4322 (1996).
- 39) C. Zipper, M. Bunk, A. J. B. Zehnder, and H. P. E. Kohler: Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide dichloprop [(RS)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy) propionic acid] by *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *J. Bacteriol.*, 180, 3368–3374 (1998).
- 40) L. J. Nohynek, E. L. Nurmiäho-Lassila, E. L. Suhonen, H. J. Busse, M. Mohammadi, J. Hantula, F. Rainey, and M. S. Salkinoja-Salonen: Description of chlorophenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains KF1, KF3, and NKF1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 1042–1055 (1996).
- 41) A. Stolz, C. Schmidt-Maag, E. B. W. Denner, H. J. Busse, T. Egli, and P. Kampfer: Description of *Sphingomonas xenophaga* sp. nov. for strains BN6 and N,N which degrade xenobiotic aromatic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 50, 35–41 (2000).
- 42) D. L. Balkwill, G. R. Drake, R. H. Reeves, J. K. Fredrickson, D. C. White, D. B. Ringelberg, D. P. Chandler, M. F. Romine, D. W. Kennedy, and C. M. Spadoni: Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 191–201 (1997).
- 43) A. Corti, S. Frassinetti, G. Vallini, S. D'Antone, C. Fichi, and R. Solaro: Biodegradation of nonionic surfactants. Biotransformation of 4-(1-nonyl)phenol by a *Candida maltosa* isolate. *Environ. Pollut.* 90, 83–87 (1995).
- 44) T. Tanghe, W. Dhooge, and W. Verstraete: Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 746–751 (1999).
- 45) K. Fujii, N. Urano, H. Ushio, M. Satomi, and S. Kimura: *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from waste water of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press).
- 46) K. Fujii, N. Urano, H. Ushio, M. Satomi, H. Iida, N. Ushio-Sata, and S. Kimura: Profile of a nonylphenol-degrading microflora and its potential for bioremediation applications. *J. Biochem.* 128, 909–916 (2000).

## ノニルフェノール分解微生物

藤井克彦・浦野直人・木村 茂

(東京水産大学生物資源化学講座)

バラ - ノニルフェノール (Nonylphenol: NP) は様々な産業分野で利用されている有用な化合物である。しかし近年、NP には内分泌攪乱作用があることが分かってきた。特に、魚介類をはじめとする水生生物に対して毒性が強いことが多くの研究から明らかとなっている。

数年前より私どもは、水産の場である海洋・河川の環境保全に貢献するために、NP 分解微生物の探索を行ってきた。そして最近になって、NP を極めて効率良く分解できる細菌 S-3 株の分離に成功した。本稿では、まず私どもの研究で得られた S-3 株が生化学的および系統的解析データから新種 (*Sphingomonas cloacae* と命名) であることを紹介し、次に本種を用いた環境浄化の可能性について考察した。またそれに併せて、世界の研究グループの動向を基に、競争が激しくなりつつある NP 分解微生物探索の現状についても解説する。

キーワード：内分泌攪乱化学物質，ノニルフェノール，水環境，細菌，*Sphingomonas* 属，環境修復