

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	細菌のビスフェノール A 分解経路の解析	
研究者所属・氏名	研究代表者：森 美穂 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

内分泌かく乱化学物質の疑いがあるビスフェノール A (以下 BPA) は、環境中で主に細菌によって分解されていると考えられており、細菌のみが BPA を炭素源にまで分解することが知られている。しかしながら、細菌による BPA 分解に関する知見は少なく、分解に関与する遺伝子は一段階目しか明らかになっていない。本申請課題では、新たに自然界からの BPA 分解菌の単離と同定を行うとともに、環境中での細菌の BPA 分解における役割を考察し、浄化技術への応用を目指す。

2. 研究経過及び成果

これまでに多くの場所から BPA 分解菌の単離が報告されているが、単離された多くの菌で、分解が不安定である、分解速度が遅い、BPA の代謝産物が蓄積してしまうといった問題点が挙げられていた。また、これらの菌の単離方法は、従来の難分解性物質分解菌の単離方法と同様に、継代培養による馴化によるものであった。そこで本研究では始めに、単離した BPA 分解菌を汚染地域のバイオオーギュメンテーションに応用することを想定し、BPA 分解菌の効率の良い単離方法の検討を行なった。

1. BPA 分解菌の単離方法の検討

BPA 分解菌の増殖には、栄養培地として SCD 寒天培地 (15 g/L Casein Peptone, 5 g/L Soybean Peptone, 5 g/L NaCl, 15 g/L Agar; pH7.1~7.5 に調整) を、無機塩培地として 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0.05 g/L NaCl, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g/L FeCl₃, 0.05 g/L CaCl₂ (pH 7.2 に調整) に単一炭素源として 100 µg/mL の BPA を添加した BSMB 培地を使用した。BPA 分解菌の単離は、SCD 寒天培地を用いた方法 (方法 1) と BSMB 培地を用いた継代培養法による方法 (方法 2) の 2 種類で検討を行なった。試料は、近畿大学農学部キャンパス内のカスミサンショウウオ・ビオトープと調整池から採取した水を使用した。方法 1 で SCD 寒天培地上に増殖した菌を、形態的特徴を基に出現数が少ないものから 50 コロニー選択し、BSMB 寒天培地に植菌した結果、調整池試料から 37 コロニー、カスミサンショウウオ・ビオトープ試料からは 33 コロニーの形成が確認された。さらにコロニーの形状・色からそれぞれ 5 株ずつ選択した単離菌株の BPA 分解試験を行なった結果、調整池試料は 5 株中全株、カスミサンショウウオ・ビオトープ試料は 5 株中 2 株が 1 週間後に 100 µg/mL の BPA を完全分解した。一方、方法 2 では微生物叢で BPA 分解が確認できた試料から、BPA 分解菌の単離を試みた結果、BSMB 寒天培地でコロニーの形成が認められず単離出来なかった。これらの結果から、本研究の単離方法が従来の方法よりも優れており、自然界から BPA 分解菌株の単離を効率よく行なうことができ、バイオオーギュメンテーションの発展に貢献できると考える。

2. 16S rRNA シーケンス解析による BPA 分解菌の同定

方法 1 により単離し、完全分解を示した 2 つの菌株 (C5 株と K5 株) について、16S rRNA 塩基配列に基づく同定を試みた。C5 株と K5 株の配列の相同検索の結果、それぞれ *Pseudomonas* 属細菌に 99% (Identity ; 806/807)、*Serratia* 属細菌に 99% (Identity ; 483/485) の相同性を示した。K5 株はこれまでに分解経路が報告されていない菌であることから、新規の分解特性、分解経路を有している可能性が示唆された。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

これまでに BPA 分解経路が報告されている細菌は *Psuedomonas* 属細菌と *Sphingomonas* 属細菌のみであり、分解経路に関与している遺伝子は *Sphingomonas* 属細菌の一段階目しか明らかになっていない。本申請課題で得られた *Psuedomonas* 属細菌と *Serratia* 属細菌の分解特性や分解経路をさらに解析していくことで、BPA 分解の一段階目以降の経路に関与する遺伝子の同定を進めていく予定である。また、BPA 分解菌株の効率の良い単離方法が、他の場所でも適用できるかどうかについても検討を行ない、環境中での細菌の BPA 分解における役割を考察するとともに、BPA のバイオレメディエーションへ応用していきたい。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
日本防菌防黴学会	ポスター発表	平成 24 年 9 月 12 日