

微生物によるテトラヒドロフランの分解

Biodegradation of Tetrahydrofuran by Microorganisms

林田 直樹, 松村 楽, 大久保俊克, 加藤 純一*

NAOKI HAYASHIDA, GAKU MATSUMURA, TOSHIKATSU OHKUBO and JUNICHI KATO

広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1

* TEL: 082-424-7757 FAX: 082-424-7047

* E-mail: jun@hiroshima-u.ac.jp

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Higashi-Hiroshima,
Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: テトラヒドロフラン, 微生物分解, *Rhodococcus ruber*, *Rhinoctadiella similis*

Key words: tetrahydrofuran, biodegradation, *Rhodococcus ruber*, *Rhinoctadiella similis*

(原稿受付 2009年10月7日/原稿受理 2009年10月15日)

1. はじめに

テトラヒドロフランは、ひとつのエーテル結合を有する5員環の環状エーテルである。テトラヒドロフランは、最も極性の高いエーテルのひとつであり、そのため、極性物質の有機溶剤として広範かつ大量に用いられている。水溶性に富んでおり、環境中に放出されると容易に地下水の汚染を引き起こす。しかも、テトラヒドロフランは中枢神経障害、麻痺、浮腫および慢性的筋肉痙攣を引き起こすとともに⁶⁾、発癌性であるので²⁾、テトラヒドロフランによる地下水汚染は、深刻な健康問題を引き起こす。テトラヒドロフランのエーテル結合は化学的に非常に安定であり、強い酸を用いないとこのエーテル結合は解裂しない(それほど安定であるので、有機溶剤として用いられているのである)。それを反映して、テトラヒドロフランを分解する微生物として報告されている例は極限られている^{1,3,4,5,8)}。本記事では、新たに分離されたテトラヒドロフラン分解微生物について紹介する。

2. テトラヒドロフラン資化性真菌

Rhinoctadiella similis

2.1. *R. similis* の単離

日本各地の土壌、化学工場の活性汚泥を用いた水処理施設の余剰汚泥などを分離源としてテトラヒドロフランを資化する微生物のスクリーニングを行った。結果から先に述べると、後述する *Rhodococcus ruber* も含め、我々が行ったスクリーニングでは化学工場の水処理施設の余剰汚泥からテトラヒドロフラン資化性菌が分離された。

当初、テトラヒドロフランを唯一炭素源とした回分培養による集積によりテトラヒドロフラン資化性微生物のスクリーニングを行ったが、はかばかしい結果は得られ

なかった。そこで、活性汚泥による水処理システムを参考に、半連続的な集積システムを組み立てた(図1)。このシステムは、タイマーにより制御された2台のペリスタポンプを用いて、培養槽(攪拌可能な三角フラスコ)への新鮮培地の流入→攪拌培養→攪拌停止→上澄みの抜き取り→新鮮培地の流入を繰り返した。種菌には化学工場由来の余剰汚泥を用い、集積用の培地は25mM テトラヒドロフランを添加した人口下水(ペプトン, 0.05 g/l; 酵母エキス, 0.005 g/l; NaCl, 0.025 g/l; KH_2PO_4 , 0.113 g/l; NaHCO_3 , 0.0375 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0375 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0125 g/l)を用いた。培養は室温で行った。5基の半連続集積システムを数ヶ月運転したが、いずれにおいても wash out は起きなかった。そこで、培養槽中の培養液を種菌として、10 mM テトラヒドロフランを唯一炭素源とした MSB 最少培地¹⁾による回分集積培養を行った。その結果、いずれの分離源を用いた回分集積培養でも濁度の増加が見られた。完全栄養寒天培地

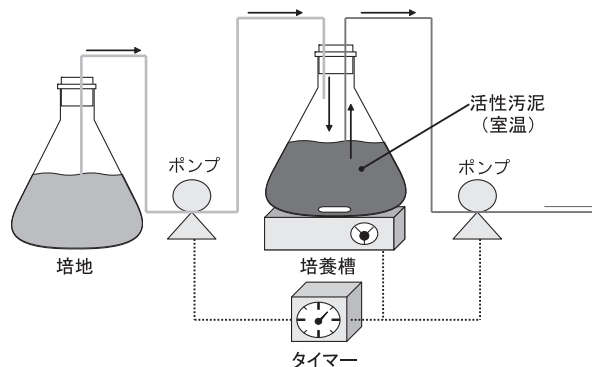


図1. テトラヒドロフラン分解微生物スクリーニングのための半連続集積培養システム

(tryptic soy broth agar) を用いた平板希釈法で菌の単離を行ったところ、いずれの試料でも細菌様のコロニーとかび様のコロニーが検出された。このうち最少培地でのテトラヒドロフランの資化を再現できたのはかび様のコロニーの方であったので、このコロニーについて実験を進めた。

単離されたテトラヒドロフラン資化性菌は黒色のかび様コロニーを形成し、原核生物より明らかに大きい酵母様の細胞形態を呈した (図2)。形態観察、28S rRNA 遺伝子および ITS1-5.8S-ITS2 遺伝子の配列を解析した結果、単離株は *Rhinocladiella similis* と分類された。*Rhinocladiella* は真核微生物で不完全真菌類である。*R. anceps1* は植物病原微生物、またある種の *Rhinocladiella* 属はヒトの皮膚感染症菌であるが、*R. similis* については病原性は認められていない。Nakamiya らは1,4-ジオキサンを分解するかびとして *Cordyceps sinensis* を庭土壌から分離した³⁾。このかびは、1,4-ジオキサンのエーテル結合を加水分解してエチレングリコールを生成することが示唆されている。また、*C. sinensis* は1,4-ジオキサンだけでなく、テトラヒドロフランやテトラヒドロピランも分解することが知られている。今回単離された *R. similis* は2例目のテトラヒドロフラン分解性真核生物の報告となる。

2.2. *R. similis* の培養特性とテトラヒドロフラン分解経路

R. similis のテトラヒドロフランを唯一炭素源とした

ときの培養特性について検討した。至適培養温度は28~32°Cで、pH 4~8の範囲で同等の増殖速度を示した。添加するテトラヒドロフランの濃度を変えて培養を行ったところ、*R. similis* のラグタイムはほぼテトラヒドロフランの初期濃度に依存して増加した (図3)。かなりラグタイムは増加するものの、25 mM テトラヒドロフラン存在下でも増殖を示すことがわかった。*R. similis* は20 mM までのテトラヒドロフランであれば、完全に分解することが可能であった。

R. similis はテトラヒドロフランの他に、1,4-ブタンジオール、ジエチルエーテル、ブタノール、酪酸を資化するものの、 γ -ブチロラクトン、フラン、1,4-ジオキサンは資化しなかった。テトラヒドロフランの化学構造を考えた場合、

1. エーテル結合の加水分解。それによって生じる1,4-ブタンジオールの資化。
2. 酸素の付加、それに次ぐ酸化反応による γ -ブチロラクトンの生成。そして γ -ブチロラクトンのエステル結合の分解によって生じる4-ヒドロキシ酪酸の資化。

の2通りの資化経路が想定される (図4)。*R. similis* はジエチルエーテルおよび1,4-ブタンジオールを資化できること、その一方で γ -ブチロラクトンを資化できないことから、1の経路でテトラヒドロフランを資化していると予想される。

R. similis の資化経路を検証するために、休止菌体を用いたテトラヒドロフランの生物変換試験、無細胞抽出

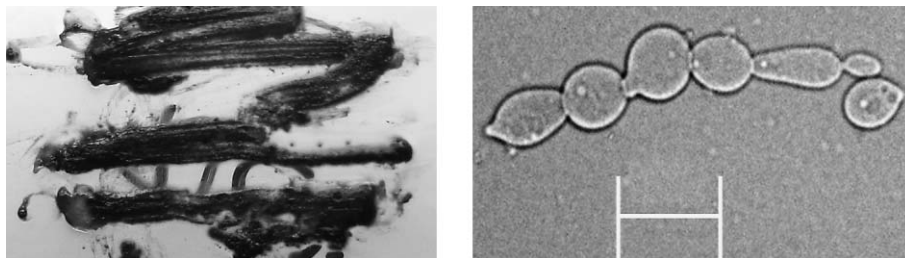


図2. *R. similis* のコロニー (左) と顕微鏡画像 (右)
右図中のバーは10 μ m。

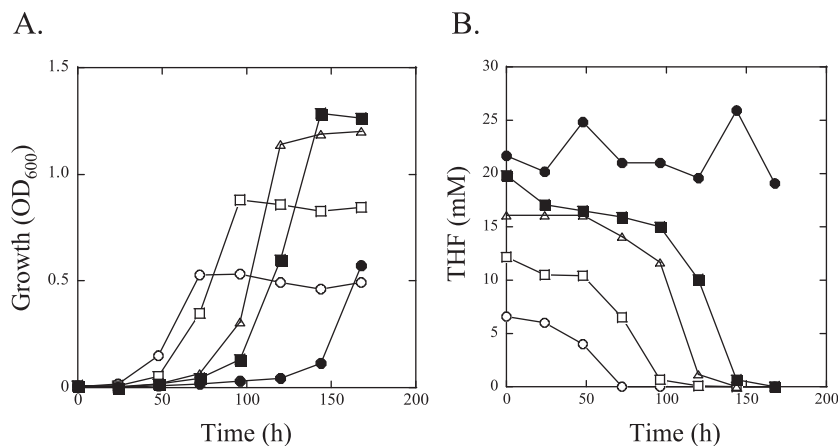


図3. テトラヒドロフランの初発濃度が *R. similis* の増殖 (A) とテトラヒドロフラン分解 (B) に及ぼす影響
R. similis を初発濃度 5 mM (○), 10 mM (□), 15 mM (△), 20 mM (■), 25 mM (●) のテトラヒドロフランを含む最少培地で培養した。

液を用いたテトラヒドロフランの変換試験を行ったが、有意な反応産物は得られなかった。これは、テトラヒドロフラン分解の速度が速く反応中間体が検出できなかった（休止菌体による生物変換反応試験）、テトラヒドロフラン加水分解酵素が不安定である（無細胞抽出液による変換試験）ことが理由ではないかと考えている。*R. similis* のテトラヒドロフラン分解の解明には、いろいろな工夫が必要であると考えられる。

3. テトラヒドロフラン資化性細菌 *Rhodococcus ruber* M8 株

3.1. *R. ruber* M8 株の単離

前節の実験では、テトラヒドロフラン資化性微生物として不完全真菌類の *R. similis* の単離に成功したが、テトラヒドロフラン資化性の原核生物は単離できなかった。しかし、テトラヒドロフランを分解・資化する原核生物は必ず存在すると考え、スクリーニングを続行することにした。まず、*R. similis* が 37°C では増殖が悪くなることを勘案し、前節で紹介した半連続集積培養を 37°C で行った。また、テトラヒドロフラン資化性菌が取得できなかった回分集積培養を 28°C で再び行った。分離源として、化学工場の水処理施設由来の余剰汚泥を用いた。

この時のスクリーニングでは、かび様のコロニーは得られず、細菌様コロニーのみが得られた。それらコロニーのうち、テトラヒドロフラン資化性が確認できたものについて 16S rRNA 遺伝子配列による簡易分類を行ったところ、いずれも *R. ruber* と分類された。このうち、回

分集積培養で得られた *R. ruber* M8 株が最もよい増殖を示したので、以降の実験には *R. ruber* M8 株を用いた（図 5）。

3.2. *R. ruber* M8 株の増殖特性とテトラヒドロフラン分解経路

テトラヒドロフランを炭素源としたとき、*R. ruber* M8 株は 28–37°C で良好な増殖を示したが、16°C および 45°C では増殖しなかった。また、良好な増殖を示す pH は 6 ~ 9 の範囲であった。*R. ruber* M8 株の増殖はテトラヒドロフランの初期濃度と負の相関があり、25 mM の濃度になるとラグタイムが大幅に延長し、増殖速度、到達最大菌体濃度はともに低下した（図 5）。これは、テトラヒドロフランの生物毒性に起因する現象であろう。*R. ruber* M8 株はテトラヒドロフランの他にジエチルエーテル、1,4-ブタンジオール、エタノール、 γ -ブチロラクトン、酪酸を炭素源として利用できる。しかし、フラン、1,4-ジオキサソラン、*t*-ブチルメチルエーテルは資化できない。*R. ruber* M8 株の資化パターンからテトラヒドロフランの分解経路を考えると、図 4 に示す 2 通りの分解経路いずれの可能性も考えられる。

R. ruber M8 株のテトラヒドロフラン分解経路の解明を行うために、*R. ruber* M8 株のテトラヒドロフランの分解に関与する遺伝子のクローニングを行った。テトラヒドロフラン分解遺伝子が取得できればテトラヒドロフラン分解活性の向上も可能になるし、また、テトラヒドロフランを原料とした有用化学品の生産も可能になろう。

テトラヒドロフラン分解遺伝子の取得は、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 を宿主としたショットガンクロー

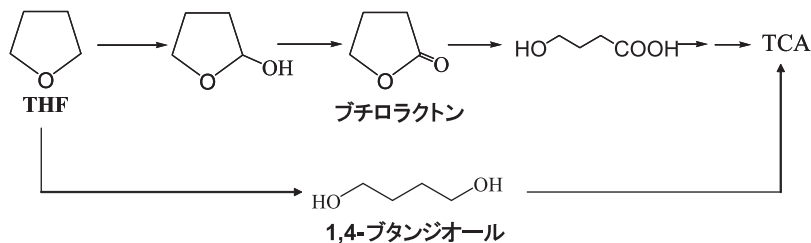


図 4. 提案されている微生物によるテトラヒドロフランの分解経路

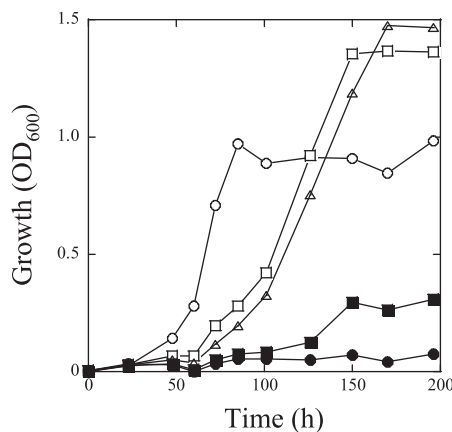
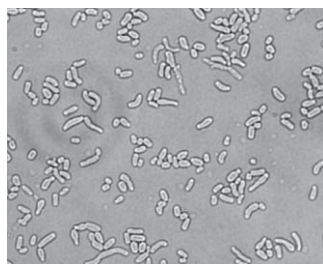


図 5. *R. ruber* M8 株の顕微画像 (左) と種々のテトラヒドロフラン初発濃度での増殖 (右) *R. ruber* M8 株を初発濃度 5 mM (○), 10 mM (□), 15 mM (△), 25 mM (■), and 50 mM (●), のテトラヒドロフランを含む最少培地で培養した。

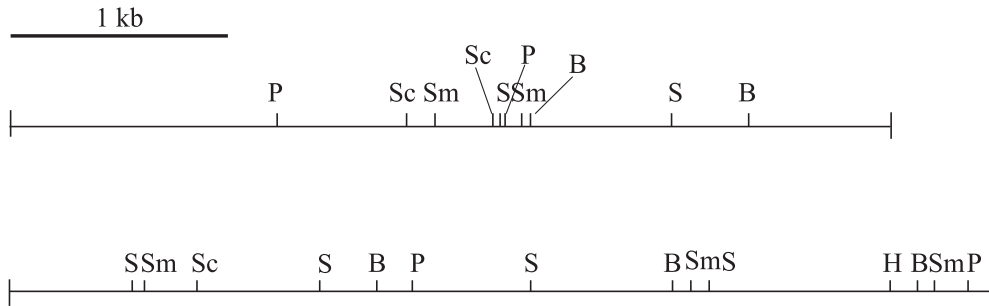


図6. *P. aeruginosa* PAO1 にテトラヒドロフラン資化能を付与する *R. ruber* M8 株のゲノム領域
シンボル: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I; Sc, *Sac*I; Sm, *Sma*I。

ニングにより行った。*P. aeruginosa* PAO1 は 1,4-ブタンジオールを資化するものの、テトラヒドロフランは資化できない。したがって、テトラヒドロフラン→1,4-ブタンジオールの反応を触媒する酵素遺伝子の導入で、テトラヒドロフラン資化能を獲得できると予想される。これが、*P. aeruginosa* PAO1 を宿主とした理由である。

まず、*R. ruber* M8 株のゲノム DNA を *Sau*3AI で部分分解した後アガロースゲル電気泳動でサイズ分画し、4~8 kb の *Sau*3AI ゲノム断片を回収した。そして、広宿主域プラスミドベクターである pUCP18⁹⁾ と *Escherichia coli* DH5 α を用い、*R. ruber* M8 株のゲノムライブラリーを作成した。このゲノムライブラリーを用い、エレクトロポレーションにより *P. aeruginosa* PAO1 を形質転換した。そして、テトラヒドロフランを唯一炭素源とした選択培地で培養を行うことにより、テトラヒドロフラン資化性を獲得した形質転換株を選抜した。その結果、6 つの形質転換株が得られた。

得られた形質転換株からプラスミドを回収して制限酵素解析を行ったところ、5 株が重なるゲノム領域を含むプラスミドを有していた。この 5 株のうち 1 株を選抜して、その株が有するプラスミドの挿入断片の DNA 塩基配列を決定した。また、それとは異なる制限酵素サイトパターンを示す 1 プラスミドについても、挿入断片の DNA 塩基配列を部分的に決定した。制限酵素解析からも、DNA 塩基配列の比較からも、解析した 2 つのプラスミドは *R. ruber* M8 株の異なるゲノム領域を有していた。代謝中間体候補物質 (1,4-ブタンジオールと γ -ブチロラクトン) の資化パターンから、*R. ruber* M8 株は図 4 に示した 2 筋の代謝経路双方を有していることも考えられる。今回クローニングされた *R. ruber* M8 株のゲノム断片は、あるいはそれぞれの経路に関与する遺伝子をコードしているかもしれない。今後、*E. coli*、*Rhodococcus*、*Pseudomonas* 属細菌にクローニングしたゲノム断片を導入した形質転換株を用いた物質変換試験を行い、*R. ruber* M8 株のテトラヒドロフラン分解経路を明らかにしていきたい。

4. おわりに

テトラヒドロフラン分解微生物のスクリーニングを行って感じたことは、確かに環境中にはテトラヒドロフラン分解微生物が少ない、ということである。しかし、

最近、テトラヒドロフランの生物分解には培地成分の検討が重要であるとの報告がなされている¹⁰⁾。もしかすると、培地の工夫でテトラヒドロフラン分解微生物のスクリーニング効率を大幅に向上できるのかもしれない。いずれにしても、我々は今回取得した *R. similis* と *R. ruber* を研究対象にして、微生物によるテトラヒドロフラン分解の生化学について、詳細な検討を加えていきたいと考えている。

文 献

- Bernhardt, D., and H. Diekmann. 1991. Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 120-123.
- Hermida, S.A., E.P. Possari, D.B. Souza, I.P. a Arruda Campos, O.F. Gomes, P. Di Mascio, M.H. Medeiros, and A.P. Loureiro. 2006. 20-Deoxyguanosine, 20-deoxycytidine, and 20-deoxyadenosine adducts resulting from the reaction of tetrahydrofuran with DNA bases. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 927-936.
- Kanamiya, K., S. Hashimoto, H. Ito, J.S. Edmonds, and M. Morita. 2005. Degradation of 1,4-dioxane and cyclic ethers by an isolated fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1254-1258.
- Kohlweyer, U., B. Thiemer, T. Schrader, and J.R. Andreesen. 2000. Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 301-306.
- Mahendra, S., and L. Alvarez-Cohen. 2005. *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 593-598.
- Malley, L.A., G.R. Christoph, J.C. Stadler, J.F. Hansen, J.A. Biesemeier, and S.L. Jasti. 2001. Acute and subchronic neurotoxicological evaluation of tetrahydrofuran by inhalation in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 24: 201-219.
- Na, K.-S., A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Ikeda, H. Ohtake, and J. Kato. 2005. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 378-382.
- Parales, R.E., J.E. Adamus, N. White, and H.D. May. 1994. Degradation of 1,4-Dioxane by an actinomycete in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4527-4530.
- Schweizer, H.P. 1991. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97: 109-121.
- Yao, Y., Z. Lv, H. Min, Z. Lv, and H. Jiao. 2009. Isolation, identification and characterization of a novel *Rhodococcus* sp. strain in biodegradation of tetrahydrofuran and its medium optimization using sequential statistics-based experimental design. *Bioresour. Technol.* 100: 2762-2769.