学会賞受賞論文

(業績賞・研究)

農薬補助剤の機能と環境科学に関する研究

田 村 廣 人 *

名城大学 農学部

(平成 23 年 2 月 14 日受理)

Keywords: alkylphenol polyethoxylates, environmental fate, MALDI TOF MS, phylogenetic tree, ribosomal protein, endocrine disruptor.

は じ め に

化学物質は、我々の発展に多大な貢献をしてきたが、その反面、製造、流通、使用および廃棄の各段階で適切な管理が行われない場合には、環境汚染を引き起こし、ヒトの健康や生態系に有害な影響を及ぼすことがある。したがって、化学物質に対するライフサイクル環境影響評価 (Life Cycle Impact Assessment; LCIA) は、環境調和型物質循環社会の構築のために、極めて重要度を増している。農薬の有効成分は、化学物質の LCIA の各過程で適切な管理が行われている好例である。しかし、農薬補助剤は、有効成分以上に多量に使用される場合が多いにもかかわらず、特に、その使用 (効果・機能) と廃棄 (環境動態) の過程に関する LCIA の概念は未成熟であった。そこで、筆者らは、科学的知見に基づいた農薬補助剤の機能解明と環境科学の確立を目指して研究してきた。

農薬補助剤の機能においては、農薬補助剤が有効成分の植物体内への浸透移行性に大きな影響を与えていることは認識されていた。しかし、その機能の科学的解明は、不十分であり、特に、農薬補助剤が植物と農薬のインターフェイスである植物表面のエピクチクラワックスを可溶化するか否かという最も基本的な課題についても、未解決であった。そこで、農薬補助剤として広く使用されていた非イオン系界面活性剤のエピクチクラワックスへの作用を物質レベルで解明した。このことにより、化学物質の LCIA にとって最も重要な過程である農薬補助剤が果たす機能を科学的に証明することができた。

一方、農耕地は、土圏、水圏および大気と通じており、

いわゆる、農薬と環境とのインターフェイスである。したがって、農薬は、農耕地を起源として、河川や地下水を経由して水循環系に大きな影響を及ぼす可能性があり、これらの物質循環機構を解明することは、安全な水循環系の確保のために必要不可欠である。農薬の有効成分は、特に、土圏および水圏において詳細にその環境動態が研究されているが、農薬補助剤の環境動態に関する研究は、国内外において極めて少ない。

そこで、農耕地を起源とする環境への負荷低減という環境科学の観点から、多用されていた非イオン系界面活性剤アルキルフェノールポリエトキシレート (APEO_n) の環境動態に関する研究に挑んだ。特に、化学物質の環境影響は、環境微生物による無毒化作用に依存する。しかしながら、無毒な化学物質が環境微生物による代謝・分解により毒性化 (代謝・毒性化) することが明らかとなり、環境微生物による化学物質の分解がむしろ環境への負荷増大になっていた。正しく、農薬補助剤の LCA の最終過程で生じた課題を一つ一つ克服することにより、農薬補助剤の環境科学という領域が出来上がってきた。本稿でその成果を紹介する。

1. 農薬補助剤の機能

界面活性剤は、農薬の葉茎処理において有効成分の浸透移行性を調節する必須の補助剤として広く使用されてきた^{1,2)}。研究を着手した 1990 年頃はこの界面活性剤の浸透移行性調節機構は、外界へのインターフェイスとして植物表面を被覆しているエピクチクラワックス (ECW) の「可溶化説」と「構造変化説」が議論されていた。界面活性剤が ECW の微細構造を変化させるという現象は、走査電子顕微鏡を用いた研究により報告されていたが (Fig. 1)、この現象がどのようにして農薬の浸透移行性の調節につながるのかは依然として未解決であった^{3,4)}。一方、「可溶化説」

* 〒 468-8502 名古屋市天白区塩釜口 1-501
E-mail: hiroto@meijo-u.ac.jp
© Pesticide Science Society of Japan

Fig. 1. Surfactant modify the fine-structure of epicuticular wax: (a) nontreated control; (b) deformed epicuticular wax by treatment of TX-100. Reprinted with permission from ref. 6. Copyright 2011 American Chemical Society.

では、界面活性剤がECWを可溶化しないという否定的な研究成果が報告されたとき⁵⁾、筆者らは、界面活性剤がECWを可溶化するのであれば、その物質を検出・同定できるはずであるとの信念で、トマト果実からクロロホルム抽出したECWを用いたモデル系にて研究の詰めを行っていた。界面活性剤は、広く使用されていた非イオン系界面活性剤のオクチルフェノールポリエトキシレート(OPEO_n)を

用いた。OPEO_nは、農薬補助剤として使用している濃度では、ミセルを形成している。したがって、OPEO_nがECWの構成成分を可溶化すれば、ミセルは混合ミセルとなり、物理化学的性状が変化するはずである。そこで、蛍光プローブ等を用いた分光学的手法によるミセルの性状を解析した結果、ECWを可溶化したOPEO_nのミセルは、対照区のみセルに比べ、より疎水的になっていた⁶⁾。ECWの可溶化は、処理後12時間以内に急激に促進され、可溶化量(*S*)と時間(*h*)の間には $S=1.01-0.03h$, $r^2=0.951$ の相間式が成り立っていた。さらに、この可溶化は、エチレンオキシド鎖(EO鎖)が短いより疎水性のOPEO_nにより促進され($S=1.20-0.22\text{HLB}+0.10\text{HLB}^2$, $r^2=0.938$)、また、温度上昇(22–32°C)により直線的に増加した($S=1.40-0.037T$, $r^2=0.985$)。ミシガン州立大学のM. J. Bukovac教授より、処理温度を葉の表面と裏面の温度に設定する様に助言されたのは目から鱗がとれる思いであった。

次に、OPEO_nが可溶化したECWの構成成分をGCMSにより定量・同定した(Table 1)⁷⁾。その結果、OPEO_nは、炭素数が32のドトリアコンタン(C₃₂H₆₆)以上の飽和炭化水素は可溶化しなかったが、トリトリアコンタジエン(C₃₃H₆₄)

Table 1a. Solubilized saturated hydrocarbon constituents of tomato fruit epicuticular wax. Modification from ref. 7

Triton X-100 concentration (w/v%)	C ₂₉ H ₆₀ (<i>m/z</i> =408)	C ₃₀ H ₆₂ (<i>m/z</i> =422)	C ₃₁ H ₆₄ (<i>m/z</i> =436)	C ₃₂ H ₆₆ (<i>m/z</i> =450)	C ₃₃ H ₆₈ (<i>m/z</i> =464)
1	0.54 ^{a)}	0.87	0.18	nd ^{b)}	nd
0.3	0.32	0.37	0.1	nd	nd
0.1	0.17	nd	0.05	nd	nd
0.03	nd	nd	nd	nd	nd
0.01	nd	nd	nd	nd	nd
0	nd	nd	nd	nd	nd

^{a)} Relative ratio (w/w%) based on CHCl₃ extract. ^{b)} not detected.

Table 1b. Solubilized unsaturated constituents of tomato fruit epicuticular wax. Modification from ref. 7

Triton X-100 concentration (w/v%)	C ₂₆ H ₅₂ (<i>m/z</i> =364)	C ₃₃ H ₆₄ (<i>m/z</i> =460)	α-amyrin (<i>m/z</i> =426)	β-amyrin (<i>m/z</i> =426)
1	4.13 ^{a)}	7.67	7.88	6.1
0.3	2.3	4.33	12.25	8.42
0.1	1.08	1.6	6.92	4.34
0.03	nd ^{b)}	0.28	3.57	2.03
0.01	nd	nd	0.16	0.07
0	nd	nd	nd	nd

^{a)} relative ratio (w/w%) based on CHCl₃ extract. ^{b)} not detected.

のような不飽和炭化水素や amyrin のようなテルペン類をより多く可溶化した。つまり、OPEO_n は、不飽和化合物を認識し、より選択的に可溶化していることが示唆された。可溶化量は、使用した OPEO_n 系界面活性剤 TX-100 の CMC (0.019%) 以上で濃度依存的に上昇していることが示唆された。この結果より、非イオン系界面活性剤が ECW を可溶化することが物質レベルで初めて解明された。そこで、OPEO_n の選択的可溶化機構を解明するため、可溶性物質として不飽和化合物 amyrin のモデルであるコレステロールおよび不溶性物質として飽和炭化水素のドトリアコンタンを用いて、EO 鎖長とコレステロールの可溶化量との関係を検討した⁸⁾。その結果、OPEO_n は、コレステロール単独より、コレステロールとドトリアコンタンが共存する状態で、より多くのコレステロールを可溶化し、その可溶化量は、EO 鎖長が短くなるほど増加した。このことは、これまでの結果とは矛盾せず、OPEO_n の選択的可溶化機構は、アルキルフェノール基が可溶化対象物質を認識し、EO 鎖の疎水性が可溶化量を左右していることが示唆された。

本研究の知見より、非イオン系界面活性剤による植物 ECW の物質選択的可溶化が、有効成分の植物体内への浸透移行性の調節に重要な要因であることがわかってきた。直言すれば、界面活性剤による有効成分の浸透移行性の制御は、対象作物の ECW 組成に応じて界面活性剤を選択することにより可能になるであろう。このように、化学物質の LCIA にとって最も重要な過程であるその物質が果たす機能を科学的に証明することができた。

2. 農薬補助剤の環境科学

2.1. 農薬補助剤アルキルフェノールポリエトキシレート の環境動態

農薬のライフサイクルにおいてその最終過程は、環境微生物による分解・無機化である。特に、農耕地における農薬の環境動態は、河川や地下水を経由して水循環系に大きな影響を及ぼす。健全な水循環系の確保は、安全な飲料水の確保や河川・海洋の生態系の保護等の観点から、米国の Safty Drinking Water Act にも唱われているように世界的な最重要課題の一つである。したがって、農耕地を起源とする農薬補助剤の物質循環機構を解明することは、安全で安心な水循環系の確保のために必要不可欠であり、環境調和型物質循環社会の構築にとって重要な課題である。APEO_n は、世界で最も使用されていた有用な農薬補助剤であった。しかし、APEO_n の原料であるアルキルフェノール類、特に、ノニルフェノール (NP) やオクチルフェノール (OP)、さらに、エチレングリコール鎖長 (EO 鎖) が異なる短鎖誘導体 (APEO_n, $n=1-3$) やそれらの末端が酸化されたカルボン酸誘導体 (APEC_n, $n=1-3$) がエストロゲンアゴニストとして作用することが判明した⁹⁻¹¹⁾。そこで、筆者らは、水田土壌より APEO_n 分解菌 (*Pseudomonas putida* S5 株) を単離し、APEO_n の水田土壌中での環境動態について研究した結果、*P. putida* S5 株は、APEO_n の末端水酸基をカルボン酸へ酸化後、エーテル結合を開裂し、この反応を *exo* 型に繰返すことにより、エチレングリコール鎖 (EO 鎖) が 2 個の APEO₂ まで短鎖化していることを明らかにした^{12,13)}。APEO_n の分解機構は、非酸化的な末端水酸基のシフトによる分解モデル^{14,15)} と末端水酸基の酸化およびその後のエーテル結

Fig. 2. Biodegradation mechanisms of OPEO_n: (a) non-oxidative model; (b) terminal oxidation model. Printed from H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa, H. Tamura: *Polym. Degrad. Stab.*, **74**, 69–75 (2011), with permission from Elsevier.

合の開裂による *exo*-型の分解反応による分解モデル¹⁶⁻¹⁸⁾ が提唱されていた (Fig. 2). そこで, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) と重酸素水を用いた詳細な分解機構の解明により, *exo*-型の酸化反応が関与する分解モデルの鍵中間体であるカルボン酸体を同定し, *P. putida* S5 株による APEO_n の分解機構を確定した¹³⁾. さらに, *P. putida* S5 株による種々のポリエトキシレート系界面活性剤の分解を解析した結果, アルキルフェノールや分岐アルキル鎖のように立体障害が大きい疎水基をもつポリエトキシレートは, EO 鎖長が 2 から 3 で分解が停止したが, 直鎖状のアルキル基のように立体障害が小さい疎水基をもつポリエトキシレートは EO 鎖長が 1 まで分解された¹⁹⁾. また, 酸素同位体の交換反応により疎水基の効果を解析した結果, 立体障害が大きい疎水基ほど酸素交換反応が起こり難いことが明らかになった (Fig. 3)¹⁹⁾. つまり, *P. putida* S5 株によるポリエトキシレート系界面活性剤の最終分解物は, 疎水基の立体障害が大きな要因となり異なってくることが判明した.

2.2. アルキルフェノールポリエトキシレートの微生物分解に対する環境因子の影響

水圏では, NP や OP のみならず, 短鎖 EO 誘導体 (APEO_n, $n=1-3$) やそれらの末端が酸化されたカルボン酸誘導体 (APEC_n, $n=1-3$) が検出され, それらのエストロゲン作用の程度は, EO 鎖長が短くなるにつれ上昇し OP が最も高い. しかし, どのようにしてこのように多様な分解物が発生するのか, その発生起源の解明に関する研究は, 河川生態系の保護や水質浄化等の面で喫緊の課題であるにもかかわらず, ほとんど実施されていなかった.

そこで, 分解機構における環境要因の効果に焦点を当て, 環境要因による本分解菌の分解特性の変化について詳細に

解明した. その結果, *P. putida* S5 株による OPEO_n 分解は, カルシウム (Ca^{2+}) およびマグネシウムイオン (Mg^{2+}) のような環境要因に依存して変化することが示された²⁰⁾. つまり, Ca^{2+} が豊富な条件下では, OPEC_n ($n=2-3$) が多く生成し, その生成量は Ca^{2+} 濃度 (0.5 mM まで) 依存的に増加した. 一方, Mg^{2+} が豊富な条件下では, OPEO_n ($n=2$) が主要分解物として生成した. このことは, 微生物と分解物が, 一対一に対応しておらず OPEO_n の分解物は微生物の周辺環境により異なることが明らかになった. そこで, 環境要因によって OPEO_n の分解様式を変化させる分解菌の単離をさらに試み, OPEO_n を OP まで好氣的に分解する *Sphingomonas* sp. BSN22 株を農耕地から単離した²¹⁾. 本菌株による分解メカニズムは, OPEO₆ を用いて化学量論的に解析した結果, 特徴的な 2 段階の分解メカニズム, 1) *exo*-酸化型の分解による OPEO₆ から OPEO₃ への分解, 2) 酸化的分解による OPEO₃ から OPEO₂ を蓄積しない OP への分解, であった. そこで, OPEO₂ が蓄積しない理由を検討した結果, OP は, OPEO₁ 由来の分解中間体 (X) の蓄積後に生成することが明らかになった (Fig. 4). 本分解中間体 (X) は, 同定の結果 OPEC₁ (4-*tert*-octylphenoxy acetic acid) であった. このことより, 本菌株による OPEO₃ から OP への分解過程で OPEO₂ が蓄積しない理由は, OPEO₃ から OPEC₁ への速やかな分解によることが明らかになった.

本研究では, 長期間の分解実験に適用可能な水分蒸発のない新規ミクロスケール法の確立により, 重酸素水のような安定同位体を用いて中間体の同定と分解機構の解明が可能になった.

Sphingomonas sp. BSN22 株の 2 段階の OPEO_n 分解における無機イオンの影響を確認した結果, Mg^{2+} , Ca^{2+} および Fe^{3+} それぞれのイオンは, 単独では OPEO_n 分解に影響を与えなかった. しかし, Mg^{2+} と Ca^{2+} の共存培地では OPEO_n

Fig. 3. Effect of hydrophobic moiety (a) and EO chain length (b) on biodegradation of surfactants: rate of oxygen change was calculated as follows; $(-\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}/[-\text{CO}^{18}\text{OH} + -\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}]) \times 100$. Modification from ref. 19.

Fig. 4. Quantitative analysis of OPEO₆ biodegradation after the incubation for 14 days (a) without and (b) with Fe³⁺. X was identified as OPEC₁. Reprinted with permission from ref. 21. Copyright 2011 American Chemical Society.

の分解が進行し、さらに、Fe³⁺ が共存することにより OPEO_n の分解は促進した。Fe³⁺ による OPEO_n 分解活性の促進効果は、Mg²⁺ または Ca²⁺ 非存在下では認められなかった。本分解促進効果は、細胞増殖とは関係なく、細胞数が少ない状態でも Fe³⁺ が存在すれば OPEO_n 分解は促進された。つまり、環境中での *Sphingomonas* sp. BSN22 株による OPEO_n の分解速度と分解物の種類およびその濃度が、環境中の無機物質 (Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺) の種類とその濃度に著しく左右されることが明らかになった²¹⁾。

本研究により、環境中の化学物質の微生物的分解を、以下の主要な 3 つのタイプに分類した；1) 炭素およびエネルギー源のような有機物質によってもたらされた細胞増殖による分解率の上昇、2) 無機物質によってもたらされた細胞増殖による分解率の上昇、3) 無機物質により誘導される酵素活性等の生理的变化による分解の促進。

本知見は、環境中に存在する無機物質等が化学物質の分解に関与する特異的微生物の群集サイズの調整のみならず、微生物群集の特異的な反応をも調節可能であることを意味しており、今後期待される分子レベルでの解明は、化学物

質のライフサイクル環境影響評価と環境微生物学の発展にも貢献するであろう。

2.3. 分解酵素の特徴付け

P. putida S5 株の APEO_n 分解機構は、末端水酸基の酸化およびその後のエーテル結合の開裂による *exo*-型の分解であった。本研究により、その鍵中間体のカルボン酸体を同定したが、アルデヒド体は同定できなかった。一方、ポリエチレングリコール (PEG) の分解では、PEG 末端水酸基が、アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼによるカルボン酸体への 2 段階の酸化を受けることが報告され、PEG 水酸基を酸化するアルコールデヒドロゲナーゼが単離精製されている²²⁾。そこで、*P. putida* S5 株より、APEO_n の末端水酸基の酸化に関与する酵素の遺伝子をクローニングし、組換え大腸菌を用いて APEO_n の酸化活性を確認した。その結果、組換え大腸菌は、*P. putida* S5 株と同様に APEO_n の末端水酸基を直接カルボン酸体へ酸化した。本酵素 (ADH1) は、アルコールおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの両方の活性を有する推定分子量 57 kDa の

Type III FAD 依存性アルコールデヒドロゲナーゼであり、PEG の分解に関与するアルコールデヒドロゲナーゼとは異なっていた²³⁾。ADH1 は、種々のアルコールのみならず、脂肪族および芳香族アルデヒド類も対応するカルボン酸に酸化するユニークな酸化酵素であることが明らかになった。

2.4. 分解微生物のモニタリングと新規微生物同定法の確立

APEO_n の分解物は、国内外の河川海洋で検出され、その分解菌は、グラム陰性菌を中心に多様な菌種が報告されている； α -proteobacteria: *Sphingomonas* 属^{24,25)}、*Ensifer* 属²⁶⁾ および *Sphingobium* 属²⁵⁾； β -proteobacteria²⁵⁾: *Achromobacter* 属、*Ralstonia* 属および *Cupriavidus* 属； γ -proteobacteria: *Pseudomonas* 属。特に、*Pseudomonas* 属細菌では、*P. putida*^{14,27)}、*P. nitroreducens*、*P. fluorescens*²⁸⁾、*P. mendocina*²⁹⁾。また、グラム陽性菌の *Bacillus* 属³⁰⁾ および *Staphylococcus* 属²⁵⁾ も単離されている。

筆者らは、特に *P. putida* が、日本の水田に広く存在することを報告している²⁷⁾。さらに、環境微生物生態学の観点から化学物質曝露による微生物群集の自然適応について理解するため、三重県の岩田川をモデルとして APEO_n 分解能と微生物群集との相互関係を、16S rRNA 遺伝子に基づく変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) と機能遺伝子 (*adh1*) のコピー数の定量を用いて解析した (Fig. 5)。APEO_n 分解能を有する細菌は、河川全域に普遍的に存在し、微生物群集の主要な細菌でない場合においても、APEO_n の選択圧により微生物群集の優占菌として選択されてくることが明らかになった³¹⁾。

したがって、APEO_n の環境動態の解明には、分解菌の迅速・簡便同定法の確立が必要になってきた。微生物の同定には、16S rRNA 遺伝子が最も一般的に使用されているが、16S rRNA 遺伝子は、進化速度が遅いため、近縁な菌種間での比較が困難である。つまり、APEO_n 分解菌として報告が多い *Pseudomonas* 属細菌の同定には、種および株レベルの

迅速な同定が必要であり、16S rRNA 塩基配列情報に基づく手法は適していない。

筆者らは、微生物の迅速・簡便同定法として、リボソームタンパク質をバイオマーカーとした MALDI-TOF MS による微生物同定法に着目した。つまり、ゲノム解読株である *P. putida* KT2440 株のリボソームタンパク質の中から選択した 43 種類のバイオマーカータンパク質の質量と各菌株のマススペクトル上のピーク質量が一致したものを 1、一致しなかったものを 0 として、2 成分 (1/0) 形式のプロファイルを作成し、このプロファイルを用いた系統解析法を提案した³²⁾。しかし、この方法は、*P. putida* の株レベルでの識別が可能であったが、ゲノム解読情報に依存していた。現在、*Pseudomonas* 属は、わずか 21 菌株 (ドラフト 4) のゲノム解読情報が存在するのみであり、この方法における理論値の算出に適用可能な菌種に限りがある。つまり、バイオインフォマティクスに基づいた MALDI-TOF MS による微生物同定は、株レベルの識別の可能性を有するにもかかわらず、データベースが不足しているために、株レベルの詳細な識別だけでなく、種レベルの同定も困難となる場合がある。さらに、正確な系統解析を行うためには、該当する種の基準となる Type strain のゲノム解読株情報が必須となる。現在、*Pseudomonas* 属細菌における Type strain はゲノム解読されておらず、今後、それらの細菌がゲノム解読されるには時間を要する。

筆者らは、Type strain を基準とした MALDI-TOF MS による微生物同定法を確立するため、*S10-spc-alpha* オペロンを用いたデータベース構築法を考案した³³⁾。*S10-spc-alpha* オペロンは、約半数のリボソームタンパク質と数種のハウスキーピング遺伝子をコードしており、細菌に共通に存在する³⁴⁻³⁷⁾。つまり、このオペロンの配列を決定するだけで、約半数のリボソームタンパク質情報を獲得することができる。はじめに、*S10-spc-alpha* オペロン中のリボソームタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、その配列に基づき理論質量を算出した。次に、それらの *P. putida* の

Fig. 5. Monitoring of TX-100 biodegrading bacteria based on changes in (a) *adh1* gene and (b) 16S rRNA gene copy number in the sediment as estimated by qPCR. Reproduced from ref. 31 with kind permission from Pesticide Science Society of Japan.

Fig. 6. Proposed procedure of phylogenetic analysis by *S10*-GERMS method using MALDI-TOF MS. Reprinted with permission from ref. 33. Copyright 2011 American Chemical Society.

リボソームタンパク質をMALDI-TOF MSで測定し、そのマススペクトルにおいて、選択した14種類のリボソームタンパク質全てが、観測されていることを確認した。さらに、*P. putida*において、リボソームタンパク質のサブユニットS14、L24およびS13が、それぞれの菌株によって異なる質量を示し、これらのリボソームタンパク質が、株間の識別に重要なバイオマーカーとなり得ることが判明した。そこで、14種のリボソームタンパク質を用いたMALDI-TOF MSによる微生物同定法における株レベルの系統解析を検証した結果、*Pseudomonas* 属の系統解析に用いられる *gyrB* に基づく系統解析と同様の系統解析能を示した³³⁾。本手法は、*S10*-*spc-alpha* オペロンにコードされた14種のリボソームタンパク質をバイオマーカーとして用いることにより、株レベルの迅速な識別が可能な理論的根拠に基づいた同定法であることが明らかとなり、筆者らは本手法を *S10*-GERMS 法 (*S10*-*spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) と命名した。

S10-GERMS 法は、1) ゲノム解読されている属の菌株情報に基づくプライマーの作成、2) *S10*-*spc-alpha* オペロンの塩基配列の決定、3) それらの属に含まれる Type strain のリボソームタンパク質データベースの構築、により微生物の迅速同定を可能にする (Fig. 6)³³⁾。*S10*-GERMS 法は、研究者が独自のデータベースを構築することもできるが、それらを集合すれば現在の 16S rRNA 塩基配列情報に基づく手法より優れた迅速・簡便な微生物同定サーチエンジンとして発展する可能性がある。

2.5. 分解物の毒性評価

これまでの研究より、微生物と APEO_n の分解物は、1対1に対応しておらず、また、分解様式は、微生物の周辺環境により異なり、その結果生じる代謝物による野生生物への環境毒性は、環境要因によって影響を受けることが明らかになった。つまり、無毒な APEO_n は、エストロゲン様活性を示す AP, APEO_{1,2} および APEC_{1,2} のような多様な化学構

Table 2. Antiandrogenic activities of biodegraded compounds

	$n=0$	$n=1$	$n=2$	$n=3$	$m=0$	$m=1$	$m=2$
IC ₅₀ (μM) ^{a)}	6.10±3.77	32.0±19.4	175.9±46.2	+ ^{b)}	— ^{c)}	—	—
Cytotoxicity (μM)	—	—	—	100	300	3	3

^{a)} Values were shown as means±SD based on at least three different experiments. ^{b)} Estimated value extrapolated from the calibration curve was not detected because of weak AR antagonist activity and cytotoxicity. ^{c)} Not detected even at any treated concentrations. With kind permission from Springer Science+Business Media: A. Shibata, Y. Ishimoto, Y. Nishizaki, A. Hosoda, H. Yoshikawa, H. Tamura: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 195–201 (2007), Table 1.

造の代謝物に分解される（代謝・毒性化）^{17,18,38,39)}。筆者らは、ヒト培養細胞を用いたレポーター遺伝子評価系で、種々の化学物質のアンドロゲン受容体（AR）への作用を解析してきた^{40–44)}。化学物質の LCIA において、環境中で分解された代謝物の毒性評価は最も重要である。そこで、OPEO_n の微生物分解物である OPEO₁, OPEO₂, OPEC₁, OPEC₂ の AR かく乱活性を評価した（Table 2）²⁰⁾。OPEO₁ および OPEO₂ は AR アンタゴニスト活性を示し、EO 鎖が長くなるにつれその活性が低下した。一方、末端カルボン酸体の OPEC₁ および OPEC₂ は AR アンタゴニスト活性を示さなかった。OP, OPEO₁ および OPEO₂ の AR アンタゴニスト活性における IC₅₀ 値は、既知の AR アンタゴニストであるフルタミド（IC₅₀=2 μM）の 1/3, 1/16 および 1/88 倍であった。このことは、OP およびその代謝物がエストロゲンのみならず、アンドロゲンにおいても野生生物の内分泌系をかく乱し、その生態系に潜在的により大きな影響を与えることが示唆された。

したがって、化学物質の LCIA において、環境中で検出される多様な分解物の詳細な分解機構と分解物の毒性を評価することは、化学物質の環境毒性を理解するために重要である。

おわりに

化学物質は、我々の発展に多大な貢献をしてきたが、適切な管理が行われない場合、ヒトの健康や生態系に有害な影響を及ぼすことがある。APEO_n は、農薬補助剤のみならず合成洗剤、乳化剤、およびプラスチックの可塑剤として広く使用され、我々はその恩恵を享受してきた。本研究は、農薬補助剤 APEO_n が果たす有効成分の植物体内への浸透移行性調節機能を、エピッククラワックスの可溶化という物質レベルで解明した。

APEO_n の原料である NP や OP が内分泌かく乱化学物質として作用することが明らかになると^{9–11)}、我国の APEO_n の月次生産量は、1999 年（平成 11 年）末の 4,500t をピー

クに、2000 年（平成 13 年）の第 3 次自主削減対策強化からは急速に減少し、2004 年（平成 16 年）10 月には月次生産量約 2,000t レベルまで半減したと日本界面活性剤工業会は報告している。本研究は、APEO_n の環境動態を解析し、環境微生物による分解がむしろ環境への負荷増大になっていることを明らかにした。しかし、APEO_n のライフサイクルの最終過程で生じた課題を一つ一つ解析することにより環境微生物学、分子生物学、分析化学、毒性学さらにコンピュータサイエンス等の学問領域を融合した環境科学という新しい領域を開拓することができた。

このように化学物質のライフサイクル環境影響評価なかでも環境科学は、環境調和型物質循環社会の構築のために、極めて重要度を増しており、今後、益々発展しなければならない領域である。化学物質の環境科学の進展に役立つよう多くの学問領域の最先端の知見を融合し、多角的な視点から情報を提供できるよう今後も力を尽くしたい。

謝 辞

本研究は塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズおよび名城大学農学部において実施された成果です。特に、研究全体を通じて中心的な役割を果たしてくれた名城大学農学部応用生物化学科農薬化学研究室および生物環境科学科環境微生物学研究室の卒業生、特に、柴田敦司博士および堀田雄大博士に心から感謝の意を表するとともに、今回の受賞の喜びを分かち合いたいと思います。本研究の機会を与えて頂きました元塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ長林幸之博士に厚くお礼申し上げます。界面活性剤の機能に関する研究では、その基礎をご指導頂きましたミシガン州立大学 M. J. Bukovac 教授に深謝致します。界面活性剤の環境科学に関する共同研究において、前福岡工業大学教授吉川博道先生には、多くの示唆に富む議論を通して多角的な視点から学ぶことの重要性をご教授頂き、衷心よりお礼申し上げます。（独）産業技術総合研究所の佐藤浩昭博士には、本研究の重要な研究手法である MALDI-TOF MS を

用いた研究展開にご尽力頂くとともに、多くのご助言を賜り深謝致します。京都大学准教授赤松美紀先生にはモデリングでご指導頂きました。環境毒性では、米国FDAのK. W. Gaido 博士にその基礎をご指導頂きました。名城大学准教授細田晃文先生には、環境微生物の分析でご協力頂きました。これらの先生方に厚くお礼申し上げます。筆者に対し暖かい励ましの言葉をかけて頂きました諸先生方に厚くお礼申し上げます。

本研究の基本姿勢は、終始一貫して物質レベルで現象を理解するという我国の伝統である「農芸化学の考え方」であり、農芸化学的思考を教育して頂きました九州大学名誉教授江藤守総先生、谷口栄二先生ならびに桑野榮一先生にあらためて深甚の謝意を表します。

引用文献

- 1) M. Knoche, H. Tamura and M. J. Bukovac: *J. Agric. Food Chem.* **39**, 202–206 (1991).
- 2) M. Knoche, H. Tamura and M. J. Bukovac: *Hort. Sci.* **26**, 1498–1500 (1991).
- 3) I. J. Kuzych and W. F. Meggitt: *Micron. Microsc. Acta* **14**, 279–280 (1983).
- 4) M. J. Bukovac, D. L. Reichard and R. E. Whitmoyer: *Acta Hort.* **179**, 33–45 (1986).
- 5) M. Riederer and J. Schonherr: *Pestic. Sci.* **29**, 85–94 (1990).
- 6) H. Tamura, M. Knoche and M. J. Bukovac: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1809–1816 (2001).
- 7) H. Tamura, M. Knoche, Y. Hayashi and M. J. Bukovac: *J. Pestic. Sci.* **26**, 16–20 (2001).
- 8) H. Tamura, K. Yamasaki, K. Isomoto and H. Yoshikawa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 293–297 (2002).
- 9) A. M. Soto, H. Justicia, J. W. Wray and C. Sonnenschein: *Environ. Health Perspect.* **92**, 167–173 (1991).
- 10) S. J. Jobling and J. P. Sumpter: *Aquat. Toxicol.* **27**, 361–372 (1993).
- 11) R. Renner: *Environ. Sci. Technol.* **31**, 316A–320A (1997).
- 12) H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa and H. Tamura: *Polym. Degrad. Stab.* **74**, 69–75 (2001).
- 13) H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa and H. Tamura: *Biomacromolecules* **4**, 46–51 (2003).
- 14) D. M. John and White: *J. Bacteriol.* **180**, 4332–4338 (1998).
- 15) M. Huber, U. Meyer and P. Rys: *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1737–1741 (2000).
- 16) G. F. White: *Pestic. Sci.* **37**, 159–166 (1993).
- 17) M. Ahel, W. Giger and M. Koch: *Water Res.* **28**, 1131–1142 (1994).
- 18) M. Ahel, C. Schaffner and W. Giger: *Water Res.* **30**, 37–46 (1996).
- 19) A. Shibata, H. Sato, H. Yoshikawa and H. Tamura: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **51**, 256–259 (2003).
- 20) A. Shibata, Y. Ishimoto, Y. Nishizaki, A. Hosoda, H. Yoshikawa and H. Tamura: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 195–201 (2007).
- 21) Y. Hotta, A. Hosoda, F. Sano, M. Wakayama, K. Niwa, H. Yoshikawa and H. Tamura: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1062–1067 (2010).
- 22) F. Kawai: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 30–38 (2002).
- 23) Y. Tasaki, H. Yoshikawa and H. Tamura: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1855–1863 (2006).
- 24) E. Nishio, H. Yoshikawa, M. Wakayama, H. Tamura, S. Morita and Y. Tomita: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1226–1231 (2005).
- 25) X. Gu, Y. Zhang, J. Zhang, M. Yang, H. Tamaki and Y. Kamagata: *J. Environ. Sci.* **20**, 1025–1027 (2008).
- 26) X. Liu, A. Tani, K. Kimbara and F. Kawai: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1414–1422 (2006).
- 27) E. Nishio, Y. Ichiki, H. Tamura, S. Morita, K. Watanabe and H. Yoshikawa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1792–1798 (2002).
- 28) H. J. Chen, D. H. Tseng and S. L. Huang: *Bioresour. Technol.* **96**, 1483–1491 (2005).
- 29) Y. Ichiki, N. Ishizawa, H. Tamura, K. Teramoto, H. Sato and H. Yoshikawa: *J. Pestic. Sci.* **33**, 122–127 (2008).
- 30) J. Lu, Q. Jin, Y. He, J. Wu and J. Zhao: *Sci. Total Environ.* **399**, 121–127 (2008).
- 31) A. Hosoda, Y. Hotta, T. Isoi, S. Amao, A. Ito, K. Ueno, H. Yoshikawa and H. Tamura: *J. Pestic. Sci.* **35**, 470–478 (2010).
- 32) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda and H. Tamura: *Anal. Chem.* **79**, 8712–8719 (2007).
- 33) Y. Hotta, K. Teramoto, H. Sato, H. Yoshikawa, A. Hosoda and H. Tamura: *J. Proteome Res.* **9**, 6722–6728 (2010).
- 34) H. Watanabe, H. Mori, T. Itoh and T. Gojobori: *J. Mol. Evol.* **44**, S57–S64 (1997).
- 35) T. Itoh, K. Takemoto, H. Mori and T. Gojobori: *Mol. Biol. Evol.* **16**, 332–346 (1999).
- 36) T. Coenye and P. Vandamme: *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 117–126 (2005).
- 37) B. Victoria, A. Ahmed, R. L. Zuerner, N. Ahmed, D. M. Bulach, J. Quinteiro and R. A. Hartskeerl: *PLoS One* **3**, e2752 (2008).
- 38) G. Ying, B. Williams and R. Kookana: *Environ. Int.* **28**, 215–226 (2002).
- 39) S. Y. Yuan, C. H. Yu and B. V. Chang: *Environ. Pollution* **127**, 425–430 (2004).
- 40) H. Tamura, S. C. Maness, K. Reischmann, D. C. Dorman, E. Gray Jr. and K. W. Gaido: *Tox. Sci.* **60**, 56–62 (2001).
- 41) H. Tamura, H. Yoshikawa, K. W. Gaido, S. C. Ross, R. K. DeLisle, W. J. Welsh, and A. M. Richard: *Environ. Health Perspect.* **111**, 545–552 (2003).
- 42) H. Tamura, Y. Ishimoto, T. Fujikawa, H. Aoyama, H. Yoshikawa and M. Akamatsu: *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 7160–7174 (2006).
- 43) H. Tamura, A. Hosoda and M. Akamatsu: *J. Pestic. Sci.* **33**, 33–39 (2008).
- 44) Y. Nishizaki, Y. Ishimoto, Y. Hotta, A. Hosoda, H. Yoshikawa, M. Akamatsu and H. Tamura: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 4706–4710 (2009).
- 45) Y. Ogawa, M. Akamatsu, Y. Hotta, A. Hosoda and H. Tamura: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2111–2114 (2010).

略歴

生年月日：1955年4月21日

最終学歴：1981年3月九州大学大学院農学研究科修士課程修了（農薬薬剤化学研究室）

研究テーマ：化学物質のライフサイクルアセスメント