

29

助成番号 0029

海洋性微細藻類を用いる内分泌攪乱物質(環境ホルモン)の機能改変と海洋汚染物質の除去に関する研究

助成研究者：中島 伸佳(岡山県立大学 保健福祉学研究科)
共同研究者：石原 浩二(京都教育大学 理学科生物有機化学)
内村 祐之(愛媛県水産試験場 主任研究員)

我々はこれまでに、多様な化学物質や環境毒性物質に対する、各種微生物や微細藻類の、細胞、あるいは、酵素レベルでの酸化還元反応における変換効率や立体選択性を「指標」とした物質変換能力に関する研究を重ねてきた。

本研究は、我々の長年に渡る研究データを応用して、特に、海洋性微細藻類の物質変換能力を巧みに利用することにより、環境汚染関連物質の効率的な分解や回収を可能にし、海洋環境汚染防止に貢献しえる「環境浄化への新たな道」を切り開くことを目的として検討を行った。

研究に用いた微細藻類は、瀬戸内海沿岸海域から単離された株(*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri*)を使用し、環境汚染物質(内分泌攪乱関連物質)としては、フタル酸ジエチルヘキシル(DOP), *p*-tert-オクチルフェノール(*t*OP), *p*-*n*-オクチルオキシフェノール(4-OoP)の3種類を使用した。海洋性微細藻類の培養は人工海水中、蛍光灯による照射下(1000 lx), 2週間, 20 °C で通気(2 L / 分)培養を行った。培養液(微細藻類懸濁液)50 ml に、環境ホルモン物質 1.2 μmol (アセトン溶液)を加え、蛍光灯光照射下(1000 lx), 20 °C, 好気的条件下にて6日間インキュベートし、ガスクロマトグラフにて分析し基質の回収率を求めた。

DOP については時間経過とともに、微細藻類による分解が観測されたが、分解よりも細胞内への蓄積が主として起こっていた。*t*OP と 4-OoP については、時間経過とともに培養液中の基質残量は減少していったが、微細藻類細胞内では、ほとんど検出されなかったことから考えて、微細藻類内へ取り込まれ分解されていると考えられた。

以上の結果から、海洋性微細藻類に環境ホルモン関連物質分解能力、細胞内への蓄積能力が存在することがわかった。

29

助成番号 0029

海洋性微細藻類を用いる内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の機能改変と海洋汚染物質の除去に関する研究

助成研究者：中島 伸佳（岡山県立大学 保健福祉学研究科）
共同研究者：石原 浩二（京都教育大学 理学科生物有機化学）
内村 祐之（愛媛県水産試験場 主任研究員）

1. 研究目的

我々人類は、これまでに様々な活動において多種多様な化学物質を作り出し、それらによって生活を豊かにしてきた。しかしながら、人類は豊かさを追い求めるあまり、周辺環境への影響を軽視し、同時に様々な環境汚染物質をも生み出し、自然環境を破壊してきた。特に最近、環境ホルモンと称されている外因性内分泌攪乱化学物質が、我々の環境を汚染し、人類だけでなく数多くの野生生物の活動に多大な影響を及ぼし、深刻な社会問題となっている。ダイオキシンやフタル酸エステルなどの環境ホルモン物質は、地上で発生したり使用されたりしているが、これらの化合物は大気や水の流れを通じて、最終的には海洋に流れ込むことになる。従って、海洋における拡散や移動が環境ホルモンの残留に大きな影響を及ぼすことは容易に推察できる。しかしながら、このような環境ホルモン関連物質の分解や除去に関する研究のほとんどが内陸地で行われており、海洋に流れ込んだ汚染物質をターゲットとした研究はほとんど行われていない。

我々はこれまでに、多様な化学物質や環境毒性物質に対する、各種微生物（酵母、カビ、細菌、ラン藻類など）や微細藻類（クロレラ、珪藻類など）の、細胞、あるいは、酵素レベルでの酸化還元反応における変換効率や立体選択性を「指標」とした物質変換能力に関する研究を重ねてきた¹⁾¹⁾。

そこで本研究では、我々の長年に渡る研究データを応用して、特に、海洋性微細藻類や原生動物の物質変換能力を巧みに利用することにより、内海や沿岸海域に流れ込む環境汚染関連物質の効率的な分解や無毒化（機能改変）を可能にし、沿岸海域の海洋環境汚染防止に貢献しえる「環境浄化への新たな道」を切り開くことを主目的として検討を行った。

研究に用いた微細藻類などの海洋生物は、瀬戸内海沿岸海域から単離されたものを使用し、環境汚染物質（内分泌攪乱関連物質）としては、フタル酸エステル類やアルキルフェノール類を研究対象とした。

2. 実験方法

1. 実験に使用した海洋性微細藻類と基質

Chaetoceros gracilis, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri* の4種類の海洋性微細藻類を以下の実験に使用した。これらの微細藻類は愛媛県水産試験場のタイプカルチャーである。環境ホルモン物質としては、フタル酸ジエチルヘキシル（DOP）[Bis(2-ethylhexyl)phthalate]、*p-tert*-オクチルフェノール（*t*-OP）[*p*-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol]、*p-n*-オクチルオキシフェノール（4-OoP）[*p-n*-Octyloxyphenol]の3種類を使用した。

2. 海洋性微細藻類の培養条件

微細藻類は、蛍光灯による照射下（1000 lx）、2週間、20℃で通気（2 L / 分）集積培養を行った。培地組成は以下通りである。蒸留水 1 L に、塩化ナトリウム（NaCl）20.747 g、塩化マンガン四水和物（MnCl₂•4H₂O）0.8 μg、塩化マグネシウム六水和物（MgCl₂•6H₂O）9.474 g、塩化カルシウム二水和物（CaCl₂•2H₂O）1.326 g、硫酸ナトリウム（Na₂SO₄）3.505 g、塩化カリウム（KCl）

597 mg, 炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 171 mg, 臭化カリウム (KBr) 85 mg, 硼酸ナトリウム十水和物 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 34 mg, 塩化ストロンチウム (SrCl_2) 12 mg, 弗化ナトリウム (NaF) 3 mg, 塩化リチウム (LiCl) 1 mg, ヨウ化カリウム (KI) 0.07 mg, 塩化コバルト六水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.2 μg , 三塩化アルミニウム六水和物 ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 8 μg , 三塩化鉄六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5 μg , タングステン酸ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.2 μg , モリブデン酸アンモニウム ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) 0.02 mg, NM 溶液 1.0 ml を加えたものを培地とした。NM 溶液とは、蒸留水 1L に、硝酸ナトリウム (NaNO_3) 150 g, リン酸水素ナトリウム (Na_2HPO_4) 10 g, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA-2Na) 0.9 g, ビタミン B_{12} 1.5 mg, チアミン塩酸塩 75 mg, ビオチン 1 mg, エチレンジアミン四酢酸鉄 (EDTA-2Fe) 2.5 g, トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 5 g を加えたものである。 *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp. については培地中に 0.0045% のケイ酸ナトリウムを加えて培養した。

3. 海洋性微細藻類による環境ホルモン物質の分解・回収実験

2. で培養した培養液 (微細藻類懸濁液) 50 ml に、環境ホルモン物質 1.2 μmol (アセトン溶液) を加え、蛍光灯照射下 (1000 lx), 20 °C, 好氣的条件にて6日間インキュベートした。反応終了後、ガラスフィルターでろ過し、培養液と微細藻類とを分離した。微細藻類については、新鮮な培地で3回洗浄し、その洗浄液はろ過培養液 (使用済み培養液) と一緒にした。ろ過培養液については、ジエチルエーテルで3回抽出後、無水硫酸ナトリウムで有機層を乾燥させ、減圧下で溶媒を留去後、ガスクロマトグラフ分析により基質の回収率を求めた (Frac-B)。ろ過後の微細藻類についてもジエチルエーテルで洗浄、抽出し、同様の操作を行い、ガスクロマトグラフ分析により基質の回収率を求めた (Frac-A)。基質の回収率は、GC分析における標準物質との比較により、検

量線を用いて算出した。なお、上の実験とは別に、ブランク実験（微細藻類を使用しない実験）を行い、実験操作上での基質の損失を考慮することにした。実験のフローチャートを図1に示した。

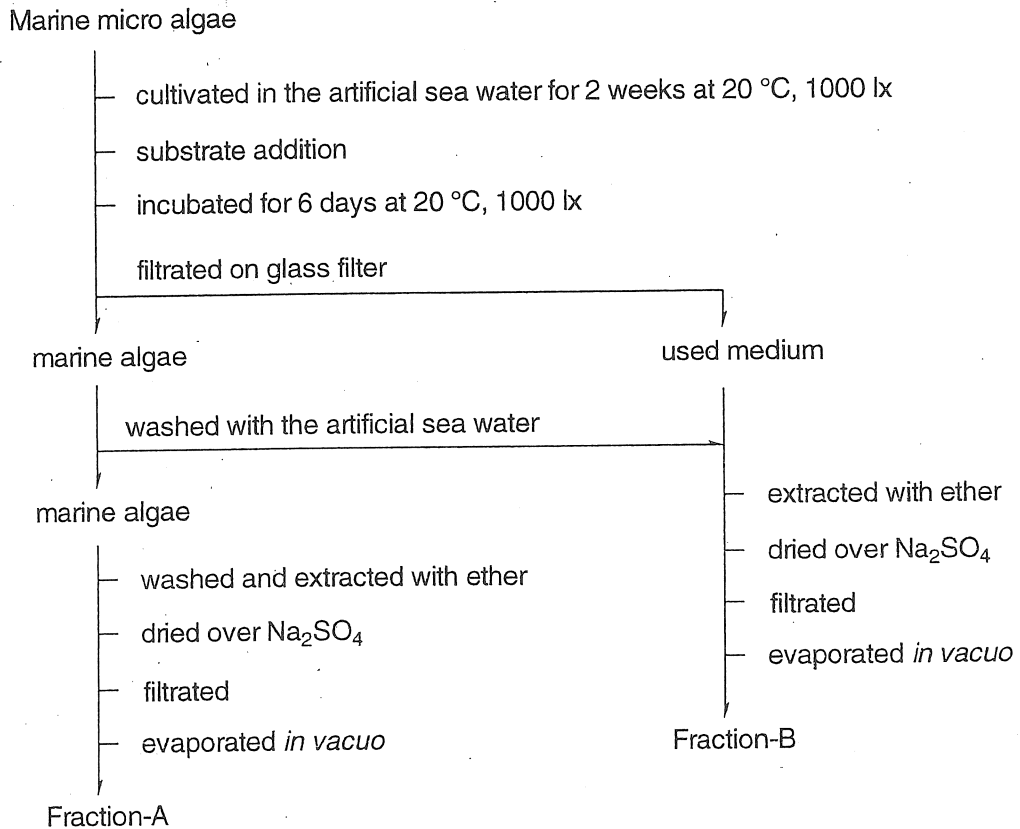


Fig. 1. Flow chart of the experiment.

3. 研究結果および考察

1. 培養条件の検討

人工海水に微量元素を溶かした培地中、通気・蛍光灯照射下での集積培養を行った結果、2～3週間で生育は最大（濁度が最大）に達した。愛媛県沖（宇

和島湾) 海水, および岡山県牛窓沖海水をろ過滅菌後, 原海水として利用しても同様に培養が可能であった。これらの結果から, 培地を使い分けることにより, 研究室での小スケール培養から実用的スケールでの大量培養まで, 効率的な培養が可能であることがわかった。

Chaetoceros の培養については, 人工海水利用時, ケイ酸ナトリウムなしの条件下では, 培養速度が遅くなり, 良好な生育は見られなかった。

スクリーニングした4種類の海洋性微細藻類の中で, *Chaetoceros gracillis* と *Nannochloropsis* sp. の培養速度が速く, 2週間で集積培養が可能であったので, 以下の実験には, *Chaetoceros gracillis* と *Nannochloropsis* sp. の2種類の海洋性微細藻類を用いることにした。

2. 海洋性微細藻類による環境ホルモン物質の分解・回収

○フタル酸ジエチルヘキシル (DOP)

Chaetoceros gracillis と *Nannochloropsis* sp. の培養液に DOP を添加し, 培養液中の DOP の残量と微細藻類細胞内 (細胞への付着も含む) の DOP 量をガスクロマトグラフ分析により経時的に調べた。その結果を表1に示した。

Table 1. The reaction of DOP with marine micro algae.

Marine Algae	0 day		3 days		6 days	
	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B
<i>Nannochloropsis</i> sp.	11.8	60.6	19.3	43.8	26.1	33.2
<i>Chaetoceros gracillis</i>	37.9	57.4	38.2	32.6	37.9	13.7

Nannochloropsis, *Chaetoceros* とともに, 時間の経過につれ, 培地中の DOP

残量 (Frac.-B) が減少していることがわかった。その一方で、Frac.-A 中の DOP 量が増加していた。この結果は、添加基質である DOP が微細藻類細胞表面へ吸着しているか、もしくは微細藻類の細胞内へ取り込まれたためではないかと考えられる。しかしながら、DOP の総回収量を考慮すると、時間経過に伴う減少傾向が認められることから、DOP は細胞表面ではなく、微細藻類の細胞内へ取り込まれ、分解されていることが予想される。微細藻類細胞内のプロテアーゼなどの酵素により、DOP のエステル結合が切断されたているのではないかと推定される。

○*p-tert*-オクチルフェノール (*t*-OP)

Chaetoceros gracillis と *Nannochloropsis* sp. の培養液に *t*-OP を添加し、培養液中の *t*-OP の残量と微細藻類の細胞内 (細胞への付着も含む) *t*-OP 量をガスクロマトグラフ分析により経時的に調べた。その結果を表 2 に示した。

Table 2. The reaction of *t*-OP with marine micro algae.

Marine Algae	0 day		3 days		6 days	
	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B
<i>Nannochloropsis</i> sp.	2.4	34.1	3.0	23.5	4.1	14.7
<i>Chaetoceros gracillis</i>	2.4	20.9	3.6	16.7	5.3	10.8

Nannochloropsis, *Chaetoceros* とともに、時間の経過につれ、培地中の *t*-OP 残量 (Frac.-B) が減少していることがわかった。その一方で、Frac.-A 中の *t*-OP 量がほとんど増加していなかったため、細胞内への蓄積はほとんどないと思われる。ブランク実験では、基質である *t*-OP の回収率が 85% と高い値を示

した(データは示していない)こと、*t*-OP 総回収量が低いことを考慮すると、*t*-OP は微細藻類細胞へと取り込まれると、すみやかに細胞内で分解されていると考えられる。この分解反応は、微細藻類細胞内のオキシゲナーゼなどの酸化酵素により、*t*-OP のアルキル鎖、もしくは芳香環が直接分解されたためではないかと考えられる。

○*p*-*n*-オクチルオキシフェノール (4-OoP)

Chaetoceros gracillis と *Nannochloropsis* sp. の培養液に 4-OoP を添加し、培養液中の 4-OoP の残量と微細藻類の細胞内(細胞への付着も含む) 4-OoP 量をガスクロマトグラフ分析により経時的に調べた。その結果を表 3 に示した。

Table 3. The reaction of 4-OoP with marine micro algae.

Marine Algae	0 day		3 days		6 days	
	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B
<i>Nannochloropsis</i> sp.	22.7	16.8	18.9	13.3	4.07	10.5
<i>Chaetoceros gracilis</i>	66.4	15.4	19.0	13.1	5.40	9.39

Nannochloropsis, *Chaetoceros* ともに、時間の経過につれ、培地中の 4-OoP 残量 (Frac.-B) Frac.-A 中の 4-OoP 量ともに減少していることがわかった。4-OoP も *t*-OP と同様に、微細藻類細胞内へ取り込まれて分解されていると考えられる。この分解反応も、微細藻類細胞内のオキシゲナーゼなどの酸化酵素により、分解されたためではないかと思われる。分解速度については、4-OoP の方が *t*-OP よりも遅いと推定される。また、4-OoP については、ブランク実験において基質の回収率が約 35% と低い値を示したので、海水中での自発

的な分解が起こっている可能性も考えられる。

4. 結 論

内分泌攪乱作用があると考えられているフタル酸ジエチルヘキシル（DOP），*p-tert*-オクチルフェノール（*t*-OP），*p-n*-オクチルオキシフェノール（4-OoP）の3種の基質が，海洋性微細藻類の物質変換能力により分解されるかどうかについて調査した結果，基質の種類による数値的な差はあるものの，海水中に添加した内分泌攪乱物質の量が，明らかに減少することがわかった。これらの環境ホルモン関連物質は，細胞内へ取り込まれ，分解，もしくは，細胞内へ蓄積されていると考えられる。

4-OoP や *t*-OP のように，海洋性微細藻類によって分解される場合は，微細藻類そのものを分解触媒として利用することが可能である。

また，DOP のように分解されにくく，蓄積されやすい環境ホルモン物質では，一旦，海洋性微細藻類に蓄積させ，その後，より高等な動物プランクトン（ワムシ，アルテミアなど）に捕食させることにより，最終的にはその動物プランクトンを回収することで，生物濃縮を繰り返しながら，海洋中に広範囲に希釈された汚染物質を効率的に回収できる可能性が期待できる。

今後は，このような「生物濃縮型」の環境汚染物質回収法についても研究を進めていく予定である。さらに，実際に沿岸海洋域に溶け込んでいる微量な環境ホルモン関連物質に対する，モデルタイプの「海水循環型のバイオリアクター」を設計し，海洋汚染物質回収・除去に関する実地的な検討を試みたいと考えている。

5. 参考文献

- 1) N. Nakajima, K. Nakamura, A. Matsuyama, N. Esaki, and K. Soda,
Purification and Characterization of Aldehyde Reductase from *Leuconostoc dextranicum*,
Biosci. Biotech. Biochem., **57**(1), 160-161 (1993).
- 2) N. Nakajima, K. Ishihara, S. Kondo, S. Tsuboi, M. Utaka, and K. Nakamura,
Differences in Protein Structure and Similarities in Catalytic Function of Two L-Stereoselective
Carbonyl Reductases from Bakers' Yeast, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(11), 2080-2081 (1994).
- 3) K. Ishihara, N. Nakajima, S. Tsuboi, and M. Utaka,
Asymmetric Reduction of 1-Acetoxy-2-alkanones with Bakers' Yeast: Purification and
Characterization of α -Acetoxy Ketone Reductase, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**(12), 3314-3319
(1994).
- 4) K. Ishihara, Y. Higashi, N. Nakajima, M. Utaka, and K. Nakamura,
Enzymatic Production of (*S*)-1-Acetoxy-2-alkanol with Bakers' Yeast Cell-Free Extract in a
Membrane Reactor, *J. Ferment. Bioeng.*, **81**(3), 266-268 (1996).
- 5) K. Ishihara, S. Kondo, K. Nakamura, and N. Nakajima,
Protein Sequences of Two Keto Esters Reductases: Possible Identity as Hypothetical Proteins,
Biosci. Biotech. Biochem., **60**(9), 1538-1539 (1996).
- 6) K. Ishihara, K. Iwai, H. Yamaguchi, N. Nakajima, and K. Nakamura,
Stereoselective Reduction of α - and β -Keto Esters with Aerobic Thermophiles, *Bacillus* Strains,
Biosci. Biotech. Biochem., **60**(11), 1896-1898 (1996).
- 7) K. Ishihara, M. Nishitani, H. Yamaguchi, N. Nakajima, T. Ohshima, and K. Nakamura,
Preparation of Optically Active α -Hydroxy Esters: Asymmetric Reduction of α -Keto Esters
with Thermophilic Actinomycetes, *J. Ferment. Bioeng.*, **84**(3), 268-270 (1997).
- 8) K. Ishihara, H. Yamaguchi, H. Hamada, K. Nakamura, and N. Nakajima,
Asymmetric Reduction of α -Keto Esters with Thermophilic Actinomycete:
Purification and Characterization of α -Keto Ester Reductase from *Streptomyces*
thermocyaneoviolaceus IFO 14271. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, **10**(4), 419-428 (2000).
- 9) K. Ishihara, H. Yamaguchi, H. Hamada, N. Nakajima, and K. Nakamura,
Stereocontrolled Reduction of α -Keto Esters with Thermophilic Actinomycete, *Streptomyces*
thermocyaneoviolaceus IFO 14271. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, **10**(4), 429-434 (2000).
- 10) K. Ishihara, H. Yamaguchi, N. Adachi, H. Hamada, and N. Nakajima,
Stereocontrolled Reduction of α -Keto Esters with Micro Green Algae, *Chlorella* Strains. *Biosci.*
Biotechnol. Biochem., **64**(10), 2099-2103 (2000)
- 11) K. Ishihara, N. Nakajima, H. Yamaguchi, H. Hamada, and Y. Uchimura,
Stereoselective Reduction of Keto Esters with Marine Micro Algae. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*,
15 (2001) in press.

Modification and Elimination of Ocean Pollutants with Marine Micro Algae

Nobuyoshi Nakajima ^a, Kohji Ishihara ^b, and Yu-ushi Uchimura ^c

^a Graduate School of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University.

^b Department of Chemistry, Kyoto University of Education.

^c Ehime Prefectural Fisheries Experimental Station.

To date, we have been investigated that the biotransformation (stereoselective reduction, regioselective glucosylation, acylation, hydrolysis, and so on) of various compounds with microorganisms such as yeast, thermophilic bacteria, fungi, and micro algae. Recently, we reported the functional modification of naturally occurring endocrine disruption related substances via enzymatic glucosylation. In this study, the functional modification and elimination of ocean pollutants, mainly synthetic endocrine disruption related substances, using marine micro algae was investigated as an improvement method of the ocean environment by the bioremediation.

The marine algae (*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., and *Pavlova lutheri*) were photoautotrophically cultivated in an artificial seawater (1 liter) for 2 weeks at 20°C with constant aeration by air with illumination by white fluorescent light (1000 lx). The substrate (dioctyl phthalate, *p*-*tert*-octylphenol, and *p*-*n*-octyloxyphenol; each 1.2 μmol) were added in the growing algal suspension (50 ml) and incubated at 20°C with gently shaking under white fluorescent light (1000 lx). The reaction mixtures were filtered on glass-filter to remove the algal cells. The used medium and the filtered algal cells were extracted respectively with diethyl ether, and then concentrated under reduced pressure. The remaining amounts of substrates in the used medium and the algal cells were determined by a GLC.

Dioctyl phthalate was accumulated in the algal cells in preference to the decomposition. Small amounts of *p*-*tert*-octylphenol and *p*-*n*-octyloxyphenol were detected in both the used medium and the algal cells. These results suggest that the pollutants were decomposed immediately after the incorporation into the cells.

Thus, it was found that the endocrine disruption related substances were decomposed or accumulated with marine micro algae.