

氏名	劉欣
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3190号
学位授与の日付	平成18年3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科資源管理科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on Microbial Degradation of Xenoestrogenic Short Ethoxy Chain Nonylphenols (界面活性剤由来内分泌攪乱物質の微生物分解に関する研究)
論文審査委員	教授 河合富佐子 助教授 金原和秀 教授 青山勳

学位論文内容の要旨

This thesis is consisted of Chapters I ~ V: I, General Introduction; II, Determination of nonylphenol and short ethoxy chain nonylphenols by normal phase high performance liquid chromatography (HPLC); III, Metabolic pathway of xenoestrogenic short ethoxy (EO) chain nonylphenol to nonylphenol (NP) by aerobic bacteria, *Ensifer* sp. strain AS08 and *Pseudomonas* sp. strain AS90; IV, Purification and characterization of short EO chain NP dehydrogenase from *Ensifer* sp. strain AS08; and V, Cloning and expression of a gene encoding short EO chain NP dehydrogenase from *Ensifer* sp. strain AS08.

Chapter I describes general information on nonylphenol polyethoxylates (NPEOs) and summarizes the historical outline of researches on microbial degradation of the compounds and short EO chain NPs, which are known to accumulate in environments as metabolites from NPEOs. Chapter II includes rapid and simple determination of NP and short EO chain NPs, NPnEO (n=1~4), by normal phase HPLC. Gas chromatography (GC), GC-mass spectrometry, reversed-phase HPLC and normal-phase HPLC with gradient elution have been employed for the separation of short EO chain NPs, but all of them was time-consuming and less reproducible. One aim of this study is to establish a normal phase HPLC method that can determine NP and NP1EO to NP4EO with complete separation of them in a short time. The purpose of Chapter III is to confirm the biodegradability of these short EO chain-NPs, especially of NP1EO and NP2EO (They are dead end-products and estrogenic) and to verify the possible metabolic pathway for them under aerobic conditions. NPEO_{av2} was used as a sole carbon source in the screening of aerobic bacteria capable of assimilating short EO chain-NPs in this study. The enrichment culture procedure, modification of degradation condition, identification of metabolites and proposal of metabolic pathway for a short EO chain NP to NP by aerobic bacteria are described in Chapter III. Based on a proposed metabolic pathway, oxidative enzyme activity were examined, showing the existence of a dehydrogenase toward NPEO_{av2} coupled with artificial electron acceptors. The enzyme was purified and characterized in Chapter IV. The enzyme acted both on short EO chain NPs and high molecular weights of polyethylene glycol (PEG)s. Further the gene encoding the enzyme was cloned and expressed in *E. coli* (Chapter V). The recombinant enzyme had the same N-terminal amino acid sequence, molecular size and substrate specificity as the purified enzyme, which had homology with PEG-DHs from various bacteria.

論文審査結果の要旨

本研究は世界的に中性洗剤として広範に使用されているノニルフェノールポリエトキシレートから派生され、環境中（自然水系及びその底泥）に蓄積が報告されている短鎖エトキシノニルフェノールの微生物分解に関するものである。特にノニルフェノールジエトキシレート(NP2EO)及びノニルフェノールモノエトキシレート(NP1EO)の効率的な分解菌や代謝経路に関してはこれまで報告されていなかった。これらの短鎖エトキシノニルフェノールは細胞毒性と内分泌攪乱性が指摘されている。また、これらから分解して派生するノニルフェノールについても内分泌攪乱性が指摘され、疎水性であるため底泥などに吸着して蓄積されることが知られている。申請者は短鎖エトキシノニルフェノールの分解菌をえるため、これらの元であるノニルフェノールポリエトキシレートが流入している活性汚泥を本物質の存在下で半年以上馴養し、馴養汚泥から分解菌を単離することに成功した。特に分解能の高いと考えられた2菌株を同定し、*Ensifer* sp.及び*Pseudomonas* sp.であることを明らかにしたが、前者による分解は初めての報告である。本菌を用いて分解特性を調べ、代謝中間体を分析し、代謝経路を同定するに至った。また、分解酵素を精製して、短鎖エトキシが短縮される過程には長鎖エトキシ(PEG)脱水素酵素は作用せず、短鎖エトキシを認識する新規酵素が存在することを明らかにした。また、研究に当たって、本物質及び中間代謝物質の簡便・迅速な分析方法を液体クロマトグラフィーで確立した。成果は分析が中国国内誌1報に掲載され、微生物分解が国際誌1報が受理されonline publicationに至っている。また、分解酵素の精製とクローニングに関しては国際誌に投稿予定である。

本研究は研究全体の緻密な実験計画に基づいて粘り強く実施された成果であって、計画、実行力、成果ともに申し分なく、英語力を含めて国際誌に投稿する実力を備えている。これらの結果から博士（学術）（Ph. D.）に十分値すると考える。