

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 4 月 30 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 公立鳥取環境大学
職 名 准教授
研究代表者名 山本 敦史

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:291003)

1. 共同利用研究 課題名	難分解性有機フッ素化合物の微生物分解			
2. 共同利用研究 目的	環境汚染を引き起こしている難分解性の有機フッ素化合物の浄化を目指して、これを分解する微生物を取得する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 山本 敦史	公立鳥取環境大学	講師	代謝物の探索	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答研究 部門・環境物質応答研究 分野	氏 名	乾 秀之

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:291003)

6. 共同利用研究計画

1) PFASs 分解微生物のスクリーニング(担当:神戸大・乾)

兵庫県内の複数の河川から PFASs 長期汚染底質をすでに採取している。これに、PFOA およびその同族体を添加した液体培地において微生物の集積培養を行う。これにより、PFOA 同族体存在下でも生育できる微生物叢(PFASs 分解菌を含む)を調製する。次に、PFOA 同族体添加寒天培地により独立した菌を単離する。単離した菌の 16S リボゾーム RNA 遺伝子の配列を解析することにより菌の同定を行う。同定した菌を PFOA 同族体添加液体培地で培養し、培地中に残存する PFOA 同族体・代謝物を PFASs 測定用前処理カラムを用いて培養液から抽出・精製する。

2) PFOS・PFOA 残存濃度の測定と代謝産物の構造決定(担当:鳥取環境大・山本)

高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS/MS)には四重極飛行時間型ハイブリッドタンデム質量分析計を用いる。一般的に飛行時間型の質量分析計は定量分析には不向きであるが、用いる LC/MS/MS は定量分析にも対応可能な装置である。LC/MS/MS により、PFOA 同族体濃度を定量するとともに、ノンターゲット分析によって網羅的にイオンを検出する。ノンターゲット分析は分析対象に関する情報が事前にないため、クロマトグラフィーやイオン化の条件を物質に合わせて事前に最適化することができない。そのため、オクタデシル基で修飾された固定相を持つ一般的な逆相クロマトグラフィー条件に加えて、ジヒドロキシプロピル基等の親水性の官能基で修飾された固定相を持つ親水性相互作用を利用したクロマトグラフィー条件を検討する。代謝産物と考えられるイオンをコントロール試料のデータを比較することにより抽出し、代謝産物関連イオンの断片化を行う。断片化して得られたイオンの精密質量及び特徴的な断片化反応の解析や MassBank 等の高分解能マススペクトルデータベースを利用することにより PFOA 代謝産物の構造を決定する。

7. 共同利用研究の成果

本共同利用研究では、*Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 モノオキシダーゼによる PFASs の代謝等を行い、代謝物の探索も行った。PFASs のアルキル鎖長が 8, 9, 10, 11, 12, 14 であるものを用い、P450 および NADPH の有無についてそれぞれ行った試験後の試料から観測されるイオンを LC/MS/MS により調べた。炭素原子数が 8 である PFOA より長いフッ素化アルキル基を持つ同族体について、酵素処理試料から、一部代謝物の可能性ある精密質量にして 65.991 (COF₂ に相当)小さいイオンが見られた。COF₂ 分質量の小さいイオンの他にも F₂ 分質量の小さいイオンも見られた。PFOA 同族体の質量分析における分子の断片化は CO₂ の脱離やフッ素化アルキル基の断片生成が主なものであり、COF₂ や F₂ で脱離したイオンが質量分析計での測定の過程で生じているとは考えにくい。PFASs の中でも PFOA 等の鎖長ではこれらの成分は検出されていなかった。この P450 モノオキシダーゼは比較的アルキル鎖長の長い同族体について活性を示すと考えられるものであり、実験結果は新規の代謝物を見いだせた可能性を示している。C-F 結合は結合エネルギーが非常に高く、切断するために多くのエネルギーを必要とするため、C-F 結合に作用する酵素反応を見いだせた可能性があり、この酵素反応の解明は医薬品や農薬に留まらず、産業上有用な機能性材料の合成に多大なインパクトを与えると期待できる。

PFASs 長期汚染底質から採取した微生物を用いた PFASs の代謝試験を共同研究として行って来ているが、別途で新規の含フッ素代謝物の可能性のある物質を検出しており、これらについてまとめた論文が先日受理されたところである。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくと記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

2017 年度日本質量分析学会奨励賞