

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

2020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2019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	2019年7月1日 ~ 2020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	准教授	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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9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

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (Perfluorooctane sulfonate、PFOS) やペルフルオロオクタン酸 (Perfluorooctanoate、PFOA) を含む有機フッ素化合物は、撥水・撥油性という産業的に極めて有用な性質を持つため、泡消火剤、カーペット、衣服などの防汚・保護剤等に広く用いられ、直近では沖縄の米軍基地からの泡消火剤が 2020 年 4 月 10 日に大量流出し問題となった。本研究課題では高分解能質量分析計と ESI を整備し、環境ノンターゲット分析による研究手法が可能な山本と PFAS 分解菌の探索を行っている乾が連携する。

### 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

本共同利用研究は 3 年目であり、これまでも *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, *Klebsiella variicola* による PFASs 代謝等を行い、代謝物の探索を行ってきた。一部の条件において特異的な代謝物が検出されている。これは微生物が PFASs を炭素源として利用できている可能性を示している。本年は *Bacillus megaterium* 由来のシクローム P450 モノオキシゲナーゼ BM3 の有無、アルキル基の炭素数が 8 から 14 のものについてそれぞれ有るもの、無いものについて試料を作成し分解反応後の試料から固相抽出により、PFASs 成分を抽出し、ノンターゲット分析を行った。BM3 も PFASs も両方含む試料からの抽出液と PFASs を含まない BM3 からの抽出液の分析結果を比較したが、今回の分析結果からは BM3 による PFASs 代謝物を見いだすことはできなかった。通常の逆相 HPLC 条件に加え、極性物質の探索のためにポリマー系アミノカラムも使い、順相 HPLC 条件を最適化し、極性物質の探索も行ったが、極性物質にも特異的な代謝物を見いだせなかった。

## 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の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。)

A. Yamamoto, C. Matsumura, Y. Haga, R. Yoshiki, Data analysis of non-target environmental monitoring by a universal program, MS-DIAL. 8<sup>th</sup> Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference, Macau, China, 5-8, Jan. 2020.

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。