

研究成果報告書

作成年月日 2025年9月12日

一般財団法人加藤育英基金 御中

研究機関(大学)名 神戸大学

研究代表者 乾 秀之

貴財団から給付を受けた助成金を活用し、下記のとおり研究を行いましたのでその成果を報告します。

記

1 研究課題: 環境汚染から食品汚染へと広がる有機フッ素化合物の微生物分解機構の解明

2 研究期間: 自 2024年4月 ~ 至 2025年9月

3 助成金額: 100 万円

4 共同研究者:

なし

5 研究報告:(研究内容(概要)を1,500~2,000文字程度で)

有機フッ素化合物は、化学的に非常に安定なC-F結合を有しているため、「永遠の化学物質」とも呼ばれるほど環境中で分解されにくい。そのため、水資源を広く、長期にわたって汚染し、飲料水や作物の汚染を引き起こしている。汚染食品の摂取を介して人の体内に高濃度に蓄積すると、免疫毒性や生殖毒性を示すことが知られている。しかし、世界的な規制にもかかわらず、代替品への転換が難しく、

いため、産業製品に有機フッ素化合物は依然として含まれ、環境汚染は現在も進行している。近年、生物機能による汚染物質の浄化能力を利用した環境浄化方法（バイオレメディエーション）は低成本で汚染の浄化が達成できることから注目されている。しかし、有機フッ素化合物の中でも毒性の高いペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)やペルフルオロオクタン酸(PFOA)の代謝・分解に関する生物機能（分解細菌や代謝・分解酵素）の報告は数例しかなく、バイオレメディエーションに応用した例はない。そこで我々は、PFOS/PFOA のバイオレメディエーションを目標とし、PFOS/PFOA 分解細菌が持つ代謝・分解関連酵素の取得、分解メカニズムの解明を試みることで、安全・安心な食品の提供に資する研究を行う。

a. PFOS/PFOA分解関連酵素の取得

これまでの研究で、有機フッ素化合物の一種で環境中で高濃度・高頻度に検出されるPFOAの濃度を減少させる細菌を、PFOAで汚染した河川底質から複数種単離している。その中でも減少率が高い2種の細菌PpHとPgnをPFOA添加無機塩培地で1週間培養し、これらから総RNAを抽出した。総RNA に対してRNA-sequencingを行ったところ、PFOA無添加条件に比べてPFOA添加条件で発現が誘導される遺伝子は200種以上存在していることが明らかとなった。

b. 分解関連酵素の同定

RNA-sequencingにより明らかにした発現上昇遺伝子のうち、PFOA分解に関わる可能性のある遺伝子として発現上昇率が高い遺伝子から2種選抜した。また、これまでの報告で、PFOAから遊離のフッ素イオンを放出させると報告のある遺伝子を1種選抜した。PFOA濃度減少細菌PpHとPgnにおける、これら3種の遺伝子のPFOA処理による発現誘導を、当遺伝子のqRT-PCRを行うことにより確認した。さらに、3種の組換えタンパク質を合成するために、それぞれの遺伝子を持つ発現プラスミドを合成し、大腸菌に導入したところ、組換え酵素の生成を検出することができた。

c. PFOS/PFOA分解機構の解明

PFOAを分解する可能性のある3種の酵素が、PFOAと反応するためにはPFOAと結合する必要がある。そこで、酵素のアミノ酸配列を用いてAlphaFold2によりその立体構造を予測した。この立体構造に対して、AutoDoc Vinaソフトを用いて、炭素鎖数が6から7のペルフルオロアルキルカルボン酸(PFCA)とのドッキングモデルを構築した。結合親和性の指標として結合自由エネルギーを算出したところ、選抜した酵素により結合の程度が異なることが明らかとなった。3種のうち、1種の酵素は反応するのに十分な結合親和性を有する可能性があることが明らかとなった。また、PFCAの炭素鎖が長くなるにつれ、結合自由エネルギーが低下したことから、この酵素は長鎖のPFCAと結合しやすいことが明らかとなった。

今後は、大腸菌で合成した組換え酵素がPFOA の濃度減少に関わるような酵素活性を示すことを明らかにする必要がある。さらに、PFOA 分解効率が向上するようなアミノ酸の変異の導入を行う。これには、酵素と PFCA のドッキングモデルから、相互作用する酵素のアミノ酸配列を特定する必要がある。これら研究により、代謝・分解酵素を固定化したカラム等を用いることで、浄水施設にお

ける安全な飲料水の製造、安心・安全な作物の栽培につながるバイオレメディエーション技術に応用できる。

6 具体的な成果:

- ① PFOA処理により発現誘導する細菌の遺伝子を明らかにした。
- ② PFOAの分解に関わる可能性のある酵素を組換え大腸菌で合成した。
- ③ 長鎖のPFCAほど、PFOAの分解に関わる可能性のある酵素との結合親和性が高くなった。

7 発表論文、著書、講演など:(予定を含む)

- (1) Hideyuki Inui, Chisa Tanaka, Takuya Kakoi, Hiroshi Kameoka, Junko Ono, Yoshinori Yabuki, Yutaka Kobayashi, Chisato Matsumura, Vladimir Beškoski, Takeshi Nakano, Reduction of Perfluoroalkyl Acids in Leachate from Industrial Waste Disposal Sites by Bacteria Isolated from Contaminated River Sediments, SETAC Europe 34th Annual Meeting, Seville, Spain, 2024(5)
- (2) Hideyuki Inui, Environmental remediation and safe crop production using the biological functions of bacteria and plants, Instituto de Química Orgánica General Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, 2024(5)
- (3) Hideyuki Inui, Chisa Tanaka, Miyune Nakamura, Takuya Kakoi, Hiroshi Kameoka, Junko Ono, Yoshinori Yabuki, Yutaka Kobayashi, Shunsuke Azuma, Chisato Matsumura, Takeshi Nakano, Potential Bioremediation of PFAS using Bacteria isolated from River Sediments, 44th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Singapore, Singapore, 2024(9-10)
- (4) Hideyuki Inui, Can biological functions of bacteria and plants contribute to safe crop production?, 19th International Conference on Chemistry and the Environment, Belgrade, Serbia, 2025(6)
- (5) 東駿介、田中稚紗、大西章博、松谷峰之介、梅拓也、松村千里、中野武、乾秀之、ペルフルオロオクタンスルホン酸の代謝・分解に関わる細菌由来酵素の探索、第41回農薬環境科学・第47回農薬残留分析合同研究会、徳島、2024(11)
- (6) Aristide Laurel Mokale Kognou, Chisa Tanaka, Takuya Kakoi, Hiroshi Kameoka, Junko Ono, Yoshinori Yabuki, Yutaka Kobayashi, Chisato Matsumura, Vladimir Beškoski, Takeshi Nakano, Hideyuki Inui, Reduction of

perfluoroalkyl acids in leachate from industrial waste disposal sites by bacteria isolated from contaminated river sediments, Science and Environmental Studies Biotechnology and Allied Sciences Symposium, Thunder Bay, Canada, 2025(5)

- (7) 井和丸萌夏、中村水音、梅拓也、大西章博、松谷峰之介、松村千里、東駿介、中野武、乾秀之、PFOA分解に関わる細菌由来酵素の探索、第4回環境化学物質合同大会、山形、2025(7)
- (8) Aristide Laurel Mokale Kognou, Takuya Kakoi, Vladimir Beškoski, Chisato Matsumura, Takeshi Nakano, Hideyuki Inui, Potential of bacterial communities from contaminated river ecosystems in reducing per- and polyfluoroalkyl substances、第4回環境化学物質合同大会、山形、2025(7)

以上