

COMMENTARY

MALDI-MS による非イオン系界面活性剤の生分解機構の解析

Biodegradation Mechanisms of Non-Ionic Surfactants
Evaluated by MALDI-MS佐藤浩昭^{*a)}・柴田敦司^{b)}・吉川博道^{c)}・田村廣人^{b), d)}

Hiroaki SATO, Atsushi SHIBATA, Hiromichi YOSHIKAWA, and Hiroto TAMURA

(Received November 28, 2002; Accepted January 14, 2003)

Bacterial biodegradation mechanisms of non-ionic surfactants under aerobic conditions were studied by means of matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). First, biodegradation intermediates of octylphenol polyethoxylate (OPEO) were characterized by MALDI-MS. Since the formation of carboxylated OPEO (OPEC) and the changes in molecular weight distribution during biodegradation test were observed, it was proposed that the biodegradation of OPEO was proceeded mainly according to the *exo*-scission of EO chain accompanied with oxidation of the hydroxyl terminal side. Then, to clarify the mechanisms of the oxidative biodegradation in detail, biodegradation test was carried out using ¹⁸O-labeled water as a incubation medium. The incorporation behavior of ¹⁸O into OPEC molecules suggested that the formation of an enzyme (or coenzyme)-substrate complex linked *via* a covalent bond might be formed as a reaction intermediate. Finally, biodegradation profiles of non-ionic surfactants with a variety of hydrophobic moieties were investigated using ¹⁸O-labeled water. The incorporation rates of ¹⁸O into corresponding carboxylated intermediates were correlated with the hydrophobicity of the surfactants.

1. はじめに

アルキルフェノールポリエトキシレート (APEO) は、アルキルフェノールとポリエチレンオキシド (PEO) が結合した代表的な非イオン性界面活性剤であり、工業用洗剤や農薬補助剤などの素材として多量に使用されている。APEO が環境中に漏出すると、微生物の作用により PEO 鎖部分が選択的に生分解され、その結果、アルキルフェノール類 (AP) や短鎖の APEO およびその酸化物が環境中に残存することが知られている (Fig. 1)。これらは、内分泌かく乱作用が強く疑われている、いわゆる「環境ホルモン」の一種である。

すでに APEO の生分解機構の概要については、PEO 鎖

の末端水酸基側から生分解反応が進行するモデル (*exo* 型分解) が広く受け入れられている。しかしながら、なぜ環境中で PEO 鎖の末端がカルボン酸に酸化された成分や、EO 単位の数が 2 や 3 の成分も多く検出されるのか、末端から EO 単位が切断・遊離する単純な *exo* 型モデルでは説明がつかないことが多く、詳細な生分解機構は十分に理解されているとはいいがたい。そのため、生分解過程における分子構造の変化を詳細に解析することが重要であるが、界面活性剤などの合成高分子は、高分子鎖の長さや末端化学構造などが異なる分子の集合体であるため、クロマトグラフィーや分光分析法などの方法でキャラクタリゼーションを行うのは、一般に困難である。

一方、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析法 (MALDI-MS) は、生体関連物質のみならず、合成高分子の分子量分布および化学構造に関する情報を、ごく微量の試料で比較的容易に解析しうる手法として、高分子キャラクタリゼーションの分野でも注目されている¹⁾。そこで、筆者らは、APEO の一種である、オクチルフェノールポリエトキシレート (OPEO) の微生物分解試験を行い、その過程で生分解して生じた中間物質の分子量分布および化学構造を MALDI-MS によって解析することを試みた。本稿では、重酸素水を培養液に用いる安定同位体ラベル法の開発などの分析化学的な方法論も交えながら、MALDI-MS による OPEO の生分解挙動の観測結果から、OPEO の生分解機構を解析し、さらに分解酵素の構造・機能を推定した内容を紹介する。

*a) 独立行政法人産業技術総合研究所環境管理研究部門 (〒305-8569 つくば市小野川 16-1)

Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (Tsukuba 305-8569, Japan)

b) 名城大学農学部 (〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口 1-501)

Faculty of Agriculture, Meijo University (Nagoya 468-8502, Japan)

c) 九州共立大学工学部 (〒807-8585 北九州市八幡西区自由が丘 1-8)

Faculty of Engineering, Kyushu Kyoritsu University (Kitakyushu 807-8585, Japan)

d) 名城大学農学ハイテクリサーチセンター (〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口 1-501)

Agricultural High-Tech Research Center, Meijo University (Nagoya 468-8502, Japan)

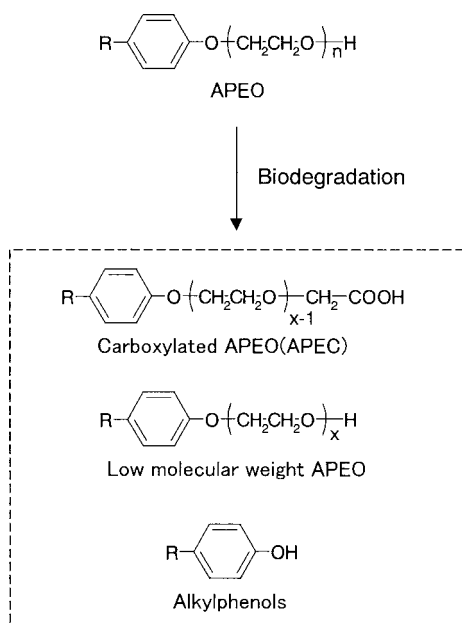


Fig. 1. Formation of biodegradation products of APEOs with estrogenic activity.

2. オクチルフェノールポリエトキシレート (OPEO) の生分解挙動²⁾

OPEO は, Fig. 2 に示すような構造をもつ Triton X-100 (Aldrich, 数平均分子量: $M_n = 620$, 多分散度: $PDI = 1.04$) を用いた. 生分解試験は, 水田土壌から単離されたバクテリア (*Pseudomonas putida* S-5)³⁾ を, OPEO 試料 (0.1 vol%) および栄養源を加えたリン酸緩衝溶液 (5 mL) 中で, 30°C の好気性条件下で振とう培養して行った. そして, 所定の時間が経過後, 培養液を乾燥し, 酢酸エチルを加えて, 抽出して得られた酢酸エチル層を測定試料とした.

合成高分子の MALDI-MS 測定は, タンパク質などを測定する場合は異なった独特の試料調製法が必要になる. ここでは, マトリックス剤には 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) を用い, さらにカチオン化剤としてヨウ化ナトリウムを微量加えた. そのため, マスペクトル上には, 主として試料分子のナトリウムカチオン付加体 $[M+Na]^+$ が主に観測される. マスペクトルは, Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) のリフレクターモードを使用して観測した.

Fig. 3 に, 生分解試験前の試料 (a) と, 生分解試験を 48 時間行った試料 (b) に対して観測された MALDI マスペクトルを比較して示す. まず, 生分解試験前の試料のマスペクトル (Fig. 3a) を見ると, 質量数 400 から 1000 付近にかけて, エチレンオキド (EO) 単位の質量数に相当する 44 質量単位間隔で, OPEO のナトリウムカチオン付加体 $[M+Na]^+$ が観測されており (図中○印), これらは, 10 量体付近に分布の極大をもち, 3 から 17 量体までの範囲に分布していることがわかる. これに対して, 48 時間生分解試験を行った試料のマスペクトル (Fig. 3b) を見ると, 分子量分布は低質量数側へシフトしており, 生分解試

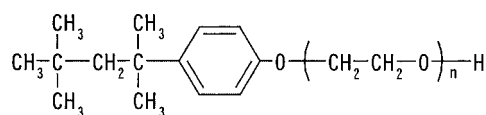


Fig. 2. Structure of OPEO.

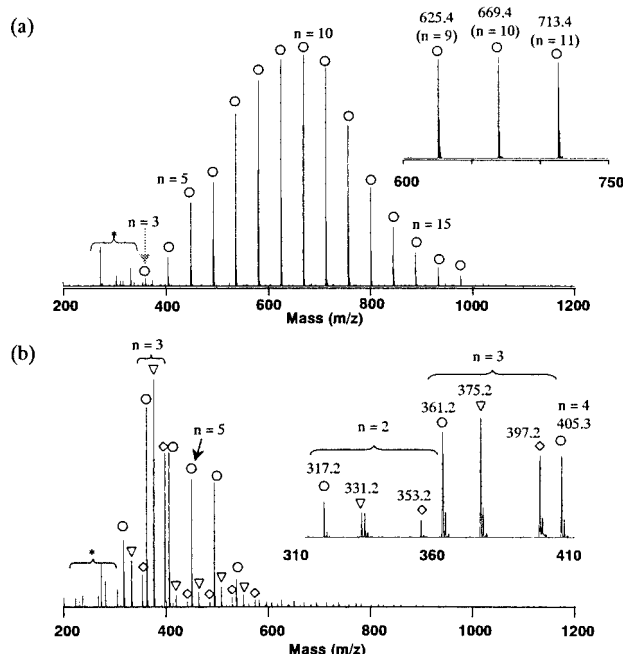
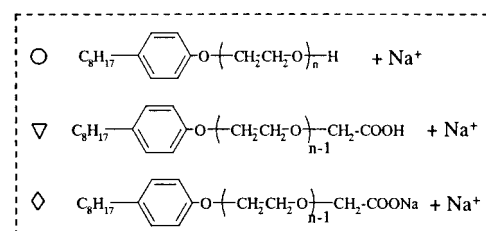


Fig. 3. Typical MALDI mass spectra of OPEO. (a) original sample; (b) the sample recovered after the incubation for 48 h. * Corresponding to impurities and/or matrix peaks.

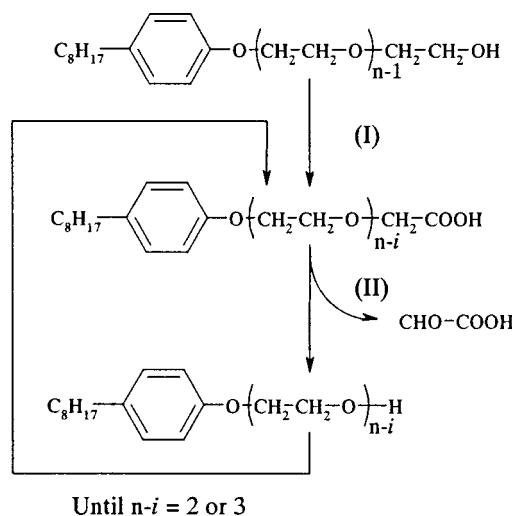


Fig. 4. Proposed biodegradation mechanism of OPEO.

験前の試料にはあまり存在していなかった 3 量体付近に分布の極大が観測されている一方で, 8 量体以上の成分は

ほとんど観測されておらず、明らかにEO鎖の分解が進行したことがわかる。さらに、図中▽および◇印で示した新たなピーク系列が現れており、観測された質量数から、これらは試料分子のEO鎖の末端水酸基側がカルボキシル基に酸化された成分(OPEC)およびそのナトリウム塩(OPECNa)のナトリウムカチオン付加体であると帰属された。

Fig. 4に、本実験で得られた観測結果を基に考察した、OPEOの生分解モデルを示す。すでに、好気性条件下でのポリエチレングリコール(PEG)の生分解機構は、水酸基末端側の酸化とそれに続くエーテル結合の加水分解を繰り返していく exo 型の分解モデル⁴⁾が提案されている。しかし、このモデルは代謝物であるグリオキシル酸の生成から推測されたものであり、反応中間物の化学構造は確認されていなかった。これに対して、本実験では、MALDI-MS測定によりカルボン酸誘導体の生成に基づいて、 exo 型の酸化・加水分解モデルを実証することができた。

3. 重酸素水($H_2^{18}O$)を用いたOPEOの生分解機構の解析⁵⁾

前項で述べた酸化的な生分解機構をさらに詳細に解析するために、重酸素(^{18}O)でラベル化した水($H_2^{18}O$)を用いた生分解試験を行い、酸化物に ^{18}O 原子が導入される過程を観測することを試みた。

ここでは、貴重な重酸素水の使用量を低減するために、200 μ Lの重酸素水培養液を用いた生分解試験法および分解中間物の抽出法を開発した⁶⁾。まず、通常の水を用いて調製した試料を含む無機塩培地を小容積のバイアル瓶(内径11.7 mm×高さ32 mm)に200 μ L加え、凍結乾燥した後に、200 μ Lの重酸素水(Cambridge Isotope Laboratories Inc., 純度95~98 atom%)を加えて無機塩類を再溶解することによって培養液を調製した。そこへ前培養液4 μ Lを添加して、30°Cで振とう培養した。

Fig. 5に、普通の水($H_2^{16}O$)および重酸素水($H_2^{18}O$)中で生分解試験を行った試料のMALDIマススペクトルの拡大図を示す。重酸素水中で生分解試験を行った試料では、OPEO(○)の質量数は変化していないが、OPEC(▽)およびそのナトリウム塩であるOPECNa(◇)の質量数が2および4 Da増加していることがわかる。この結果は、 ^{18}O が一つあるいは二つ導入されたことを示している。バクテリアが存在しないコントロール実験では、OPECの生成は観測されず、また合成したOPECを重酸素水中に加えても ^{18}O は導入されなかったため、本実験の条件下では、バクテリアが水を利用してOPEOの水酸基末端側を酸化していることが明らかになり、Fig. 4の分解機構をより確実に支持することができた。

なぜ ^{18}O が一つのみならず二つ導入された成分も混在するのであろうか。この理由は、エステル酸素交換反応⁷⁾によって説明することができる。遊離のカルボキシル基の酸素原子は、通常は溶媒である水分子の酸素と交換することはないが、エステル化合物のカルボニル酸素は、水

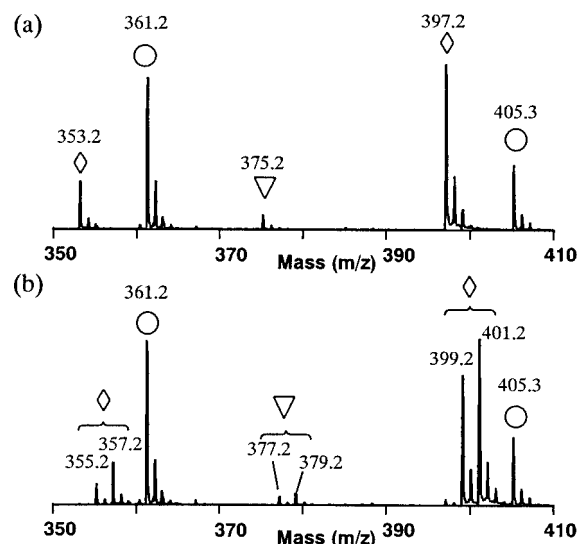


Fig. 5. Enlarged MALDI mass spectra (trimer region) of the biodegraded OPEO recovered after 48 h incubation using normal water (a) and ^{18}O -labeled water (b).

分子の酸素との交換反応が起こりうる。本実験の場合では、Fig. 6に示すように、OPEO分子が脱水素化される過程で、おそらくアルデヒド中間体を経由した後に、バクテリアの酵素(あるいは補酵素)との間にエステル中間体(酵素-基質複合体)が形成され、そこでカルボニル酸素の一部が、溶媒である重酸素水の ^{18}O と交換したと考えられる。そして、2種類の酵素-基質複合体(I)および(II)から遊離のOPEC分子が生じる過程で必ず ^{18}O が一つ導入され、結果として ^{18}O が一つあるいは二つ導入されたOPECが混在すると考えられる。

一方、OPECからグリオキシル酸が遊離して低分子量のOPEOが生じる過程(Fig. 4)で新たに生じる末端水酸基の酸素は、エーテル酸素が保存されたものであるのか、あるいは水の酸素原子が導入されたものなのだろうか。本実験の結果では、低分子量化したOPEOへの ^{18}O の導入が認められなかったことから、エーテル酸素が保存される分解機構を推定することができる。すなわち、Fig. 7に示すように、末端カルボキシル基に隣接するメチレン基が酸化されてヘミアセタール中間体が形成され、そこで電子の収受が起こることによって、エーテル酸素がOPEOに保存されるように結合が切断し、グリオキシル酸が放出されたと考えられる。

4. 界面活性剤の疎水基の化学構造と生分解性の関係⁸⁾

これまで述べたように、APEOの生分解の主な舞台が親水性PEO鎖の末端側であるのは間違いのないようである。それでは、界面活性剤の疎水基の化学構造は生分解性に影響しないのであろうか。興味深いことに、本研究で用いたバクテリア(*P. putida* S-5)は、分子全体の親水性が高いPEO(M_n =約1,500)をほとんど生分解しなかったことから、PEO鎖をもつ界面活性剤の生分解には、疎水性部分が重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、疎

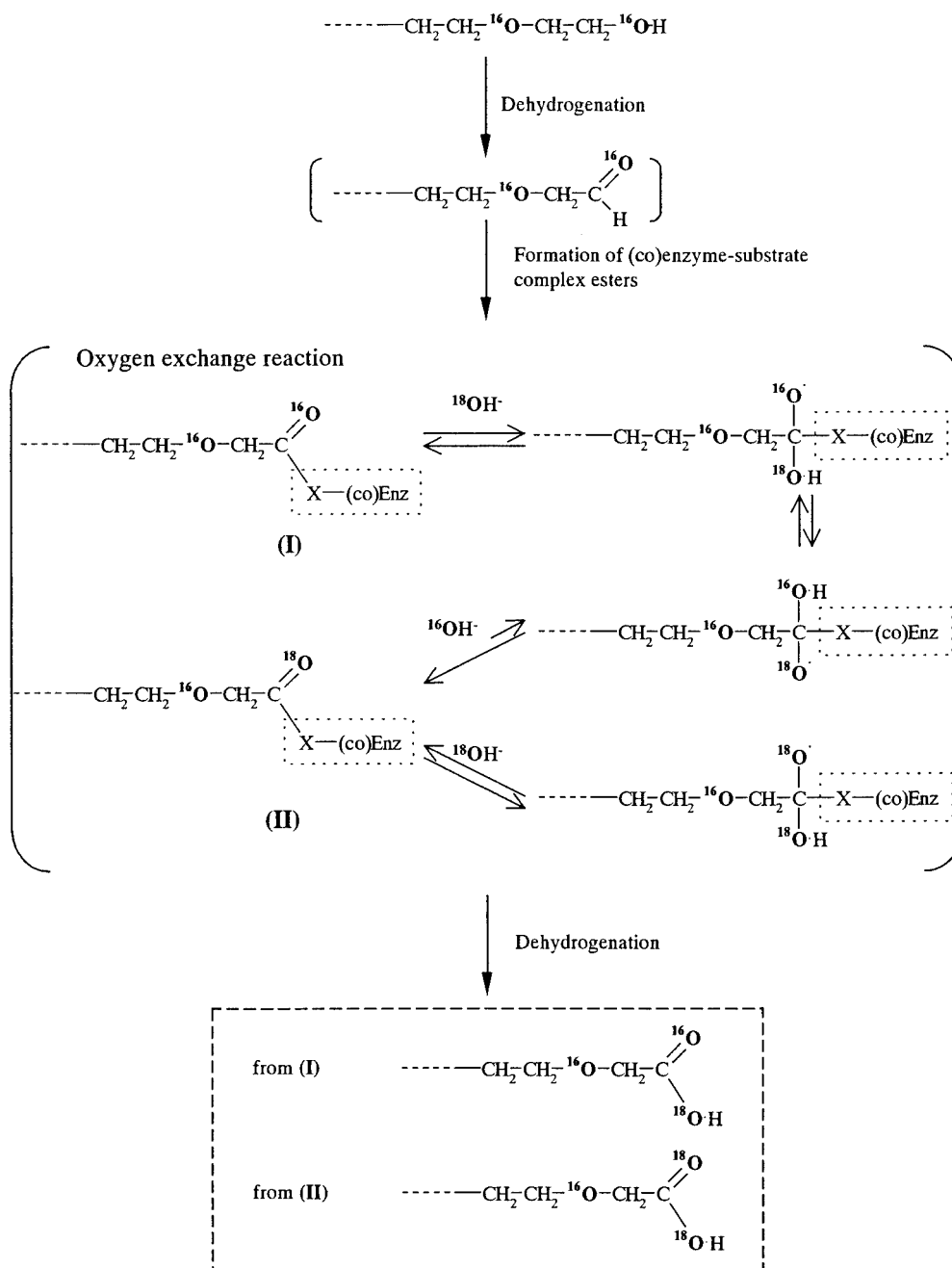


Fig. 6. Possible formation pathways of OPEC molecules. X represents heteroatoms such as O, N, and S.

水基の化学構造が異なる界面活性剤を用いて、それらの生分解性を比較した。

Table 1 に、本実験で用いた界面活性剤をまとめて示す。ここでは、APEO 試料として OPEO とノニルフェノールポリエトキシレート (NPEO) を、またアルキルエーテルポリエトキシレート (AEO) 試料として、脂肪族鎖の長さが異なる 2 種の直鎖 AEO (A_{12} EO および A_{14} EO) および分岐構造をもつ AEO (分岐 A_8 EO) を用いた。PEO 鎖の鎖長を同一にするために、シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにより 8 量体 (オクタエトキシレート) 成分を分取・精製した。また、MALDI-MS 測定では、低分子量成分のピークを明瞭に観測するために、 m/z 700 以下の領域にマトリックス剤由来の妨害ピークがほとんど観測されない特徴をもつ、5,10,15,20-テトラキス(ペンタフル

オロフェニル)ポルフィリン (F20TPP, $M_w = 974.6$)⁹⁾ (Fig. 8) をマトリックス剤として用いた。

Fig. 9 に、生分解試験を 96 時間行った各試料の MALDI マススペクトルを示す。いずれの試料においても、末端がカルボン酸に酸化された成分が主で、EO 単位が 8 から低分子量側に分布していることがわかる。しかしながら、APEO 類 (OPEO および NPEO) と分岐 A_8 EO では、EO 単位 $n=2$ あるいは 3 まで低分子量化して分解が停止しているが、直鎖 AEO 類 (A_{12} EO および A_{14} EO) では、 $n=1$ まで分解が進行している。この結果は、PEO 鎖の生分解の進行度には、界面活性剤の疎水基の化学構造が影響することを示唆している。APEO 類のみならず分岐 A_8 EO でも $n=3$ で分解反応が停止したことから、PEO 鎖の分解を阻害する要因は、芳香環の存在ではなく、疎水基の立体障害

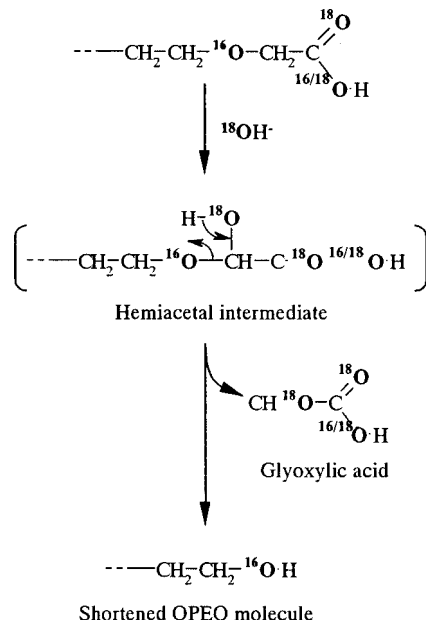


Fig. 7. Possible formation pathways of shortened OPEO molecules.

Table 1. Chemical Structures of Surfactant Samples and Their Monoisotopic Mass

Sample (code)	Chemical structure	Monoisotopic mass
Octylphenol octaethoxylate (OPEO)		558.4
Nonylphenol octaethoxylate (NPEO)		572.4
2-Ethylhexylether octaethoxylate (branched A ₈ EO)		482.3
Laurylether octaethoxylate (A ₁₂ EO)		538.4
Myristylether octaethoxylate (A ₁₄ EO)		566.4

* Hydrophobic moiety of NPEO has various branched structure.

によるものである可能性が考えられる。APEOあるいはAEO系界面活性剤のPEO鎖のエーテル結合の切断に関する酵素の活性中心付近はポケット状になっており、疎水基部分がかさ高い分子は進入しにくい構造をもっていることが考えられる。

次に、PEO鎖の酸化過程における疎水基の影響を調べた。前項で述べたように、重酸素水を用いた生分解試験の結果、PEO鎖の末端基の酸化過程において酸素交換反応が起こることが明らかとなり、エステル結合で結ばれた酵素-基質複合体が中間体として形成されることが考えられた。この過程で、疎水基の構造が酵素-基質複合体の形成に影響するのであれば、¹⁸Oの導入率に変化が生じることが考えられる。そこで、¹⁸Oが2原子導入された酸化物の相

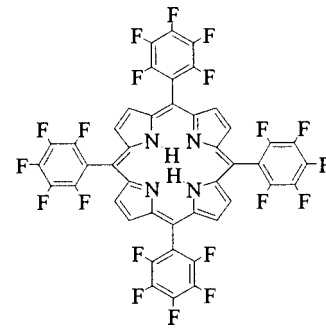


Fig. 8. Structure of F20TPP matrix.

対ピーク強度を指標にして、酸素交換反応の効率 ($I\%$) を次式により見積もった。

$$I = \frac{P^{18}O_2}{P^{18}O_1 + P^{18}O_2} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 $P^{18}O_2$ は酸化物の末端カルボキシル基に¹⁸Oが1原子導入された成分のピーク強度で、これは酸素交換反応を受けていないものであり、一方、 $P^{18}O_1$ は¹⁸Oが2原子導入された成分のピーク強度で、酵素-基質複合体が形成されたときに酸素交換反応を受けたものである。

Fig. 10に、各界面活性剤試料の8量体の酸化物に対して観測された酸素交換反応の効率を示す。PEO鎖の長さは同一であるにもかかわらず、酸素交換反応の効率は、明らかに界面活性剤の疎水基の構造の違いによって異なっており、疎水基が大きいほど酸素交換反応が起こりやすくなっている。さらに、それぞれの試料において、重合度と酸素交換反応の効率の関係についても調べたところ、いずれの試料でも重合度が低下するほど（すなわち相対的に疎水性が高いほど）酸素交換反応が起こりやすくなっていることがわかった。酸素交換反応は、酵素-基質複合体を形成している時間（寿命）が長いほど起こりやすいと考えられるので、これらの結果は、この分解酵素の活性中心には反応部位以外に疎水相互作用による基質認識部位があり、酵素-基質複合体の安定化が図られていることを示唆している。本酵素の活性中心はポケット状になっており、その入口付近が疎水相互作用による基質認識部位となっているのではないだろうか。

5. まとめ

以上、筆者らが行ってきたMALDI-MSによる非イオン系界面活性剤の生分解機構の解析に関する研究例を述べた。これまでも、薬物などの低分子量化合物の代謝機構を解明するために、同位体ラベル法とGC-MSやLC-MSを組み合わせた解析は行われてきたが、本研究で用いた界面活性剤試料のような高分子化合物の構造変化を、従来のMSで解析することは困難あるいは不可能であった。MALDI-MSは、試料の分離、抽出あるいは精製などの前処理をほとんど行うことなく、数 μ Lの試料で高分子化合物の分子量関連ピークを同位体レベルで明瞭に分離して観測することができるため、こうした研究を進める上で非常

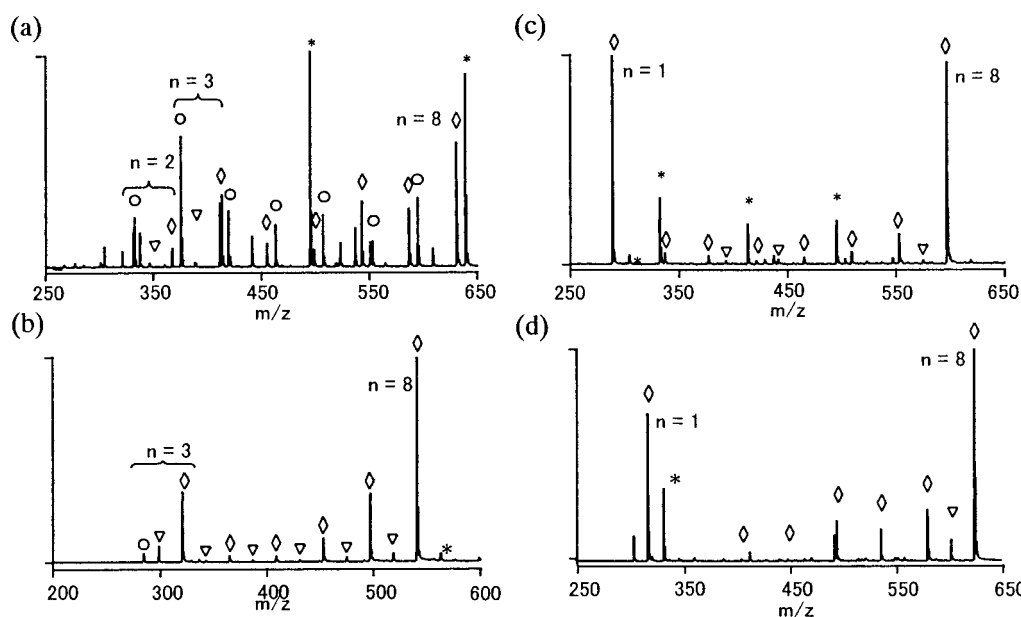


Fig. 9. Typical MALDI mass spectra of the biodegraded surfactants. (a) NPEO; (b) branched A_8EO ; (c) $A_{12}EO$; (d) $A_{14}EO$.

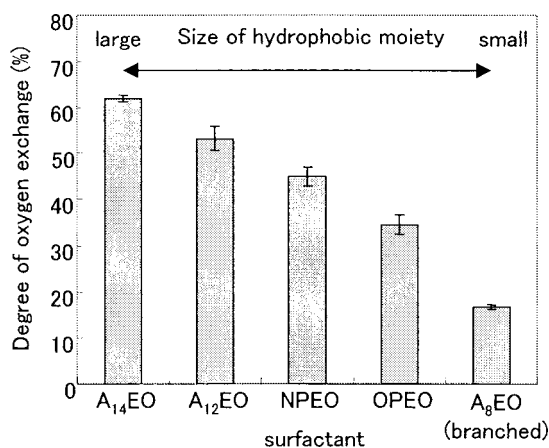


Fig. 10. Relationship between the size of hydrophobic moiety of the surfactants and the degree of oxygen exchange of carboxylated intermediates.

に魅力的である。

第4節では、界面活性剤の分子構造の変化に止まらず、さらに生分解に関する酵素の機能・特徴まで推定した内容について述べた。現在のところ、この酸化・加水分解に関与する酵素に関する知見は乏しく、膜タンパク質である可能性が挙げられているが、その構造、機能および特徴の

詳細については研究中である。それに対して、基質の生分解機構と分解に関する酵素の機能・特徴に関する知見を関連づけることができるMALDI-MSは、界面活性剤のみならず、生分解性高分子材料の分解機構を解析するための重要な解析手段に発展していくものと考えられる。

文 献

- 1) 佐藤浩昭, 大谷 肇, ぶんせき, 467 (2001).
- 2) H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa, and H. Tamura, *Polym. Degrad. Stab.*, **74**, 69 (2001).
- 3) E. Nishio, Y. Ichiki, H. Tamura, S. Morita, K. Watanabe, and H. Yoshikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1792 (2002).
- 4) F. Kawai, *Spec. Publ.—R. Soc. Chem.*, **109**, 20 (1992).
- 5) H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa, and H. Tamura, *Biomacromolecules*, **4**, 46 (2003).
- 6) A. Shibata, H. Sato, Y. Wang, H. Yoshikawa, and H. Tamura, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 256 (2003).
- 7) M. L. Bender, *Chem. Rev.*, **60**, 53 (1960).
- 8) 佐藤浩昭, 柴田敦司, 王 艶, 吉川博道, 田村廣人, 第50回質量分析総合討論会講演要旨集, p. 132 (2002).
- 9) F. O. Ayorinde and E. Elhilo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2166 (1999).

Keywords: MALDI, Surfactant, Biodegradation, Octylphenol polyethoxylate