特集・生物利用新技術研究シンポジウム (第4回) より

土壌細菌による

有機塩素系除草剤からの脱ハロゲン

大河内由美子*・越川 博元*・西嶋 真幸*・尾崎 博明*・寺島 泰*

1. はじめに

近年環境汚染性の非生物物質が多量に生産されるにつれて、遺伝子クローニング技術を応用した微生物の基質分解領域・分解活性の面から改良・育種による汚染物質除去が着目されている。本研究では難分解性汚染物質の一例として、芳香族ハロゲン化合物である除草剤2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) や MCPA (4-クロロ-2-メチルフェノキシ酢酸) をとりあげ、汚染物質の無害化という観点から、分解経路において重要な役割を果たしている脱ハロゲン反応に主眼をおいている。脱ハロゲン反応を触媒する酵素では、直鎖ではハロゲン化アルカンやハロゲン化カルボン酸(以下ハロ酸と表記)、芳香族ではペンタクロロフェノール (PCP) や4-クロロ安息香酸、1,2,4-トリクロロベンゼン等に作用するものが報告されている¹⁾。本研究では、土壌中より単離した2,4-Dを分解資化する微生物で発現しているデハロゲナーゼに着目してその精製を行い、特性を調べることで有用な酵素の探索を行った。将来的には酵素遺伝子のクローニングを予定しており、精製したデハロゲナーゼから酵素遺伝子に関する情報を得ることも可能である。

2. 有用菌株のスクリーニング

今回使用したハロゲン化合物の構造式を図-1に示す。

まず2,4-DおよびMCPAを唯一の炭素源として土壌中より有用菌株のスクリーニングを行った。培地は表1の組成のものを使用し、30℃で数週間振とう培養した結果、2,4-D炭素源により1菌株、

図-1 使用した有機ハロゲン化合物の構造式

表1 使用した培地の組成

硫酸アンモニウム	0.5 %
リン酸二水素カリウム	0.1 %
リン酸水素二ナトリウム	0.1 %
硫酸マグネシウム	0.01 %
2,4-D	0.1 %
(pH : 7.0)	

MCPA炭素源により3菌株を単離した。また各菌株の生育に伴い2,4-DおよびMCPAが分解され、培地中に基質量に対応した塩素イオンが遊離することを確認した。このうち最も生育の早かった2,4-D分解菌は同定の結果、*Burkholderia cepacia*に属することがわかった。

3. 実験方法

3.1 活性染色によるデハロゲナーゼの検出とデハロゲナーゼの精製

2,4-Dを唯一の炭素源とする表1の培地を用いて*B. cepacia*の培養を行い、遠心分離により集菌・洗菌した菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に再懸濁し、超音波による破碎を行った。細胞膜等の不溶画分を遠心分離により除去して得た上清を粗酵素液とした。

この粗酵素液を用いてHardmanらの方法²⁾により活性染色を行った。ポリアクリルアミドゲル電気泳動により粗酵素液中のタンパクを分離し、泳動後

* 京都大学大学院工学研究科

Yumiko OKOCHI, Hiromoto KOSHIKAWA, Masaki NISHIJIMA, Hiroaki OZAKI, Yutaka TERASHIMA

のゲルを DL-2-CPA・D-2-CPA・L-2-CPA それぞれの溶液と反応させた後、硝酸銀溶液に浸してデハロゲナーゼ作用により遊離した塩素イオンを AgCl のスポットとして確認した。

続いて、上記方法で抽出した粗酵素液を材料としてデハロゲナーゼの精製を行った。精製には 4 種のカラム、DEAE-TOYOPEARL, BUTYL-TOYOPEARL, Mono Q, Superdex 75 HR を装着した FPLC (Pharmacia Biotech) を使用し、各ステップで得られたフラクションに対して Iwasaki らの方法³⁾によりデハロゲナーゼ活性を確認するとともに、活性の確認されたフラクションに対して Laemmli 法⁴⁾に従い SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) を行うことで、デハロゲナーゼの精製・濃縮の程度を確認した。

3.2 デハロゲナーゼの特性

精製したデハロゲナーゼの基本的特性を以下の観点から調べた。ここで、各反応溶液中のデハロゲナーゼ量は 0.04U に統一した。なお、1U は 1 分間に 1 μ mol の塩素イオンを遊離する反応を触媒する酵素量と定義する。

①活性の最適温度

デハロゲナーゼを 100mM Tris/H₂SO₄ (pH9.5) 中で反応温度 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70°C で 25mM DL-2-CPA と反応させ、遊離した塩素イオン量を Iwasaki 法により測定することで活性の最適温度を決定した。

②活性の至適 pH

デハロゲナーゼを pH6-11 の緩衝液中で 25mM DL-2-CPA と反応させた。用いた緩衝液は pH6-9.5 の範囲が 50mM Bis-tris Propane 緩衝液⁵⁾, pH9-10.0 では 50mM CHES 緩衝液, pH10.0-11.0 は 50mM CAPS 緩衝液である。反応温度 30°C, 反応時間 10 分間で遊離した塩素イオン濃度を測定した。

③デハロゲナーゼの基質特異性

直鎖のハロ酸 9 種類 (炭素数 2 から 5) と、2,4-D 分解経路において代謝物となりうる芳香族ハロゲン化合物 3 種類を対象に、各基質の最終濃度 25mM, 反応温度 30°C, 反応時間 10 分間としてデハロゲナーゼ活性を測定した。

4. 結果と考察

4.1 デハロゲナーゼの精製

B. cepacia から抽出した粗酵素液を用いて、DL-2-

CPA に対する活性染色により菌体内で発現しているデハロゲナーゼの検出を行った結果を図-2 に示す。各レーンにつき出現した AgCl のスポットが 1 種類のみであることから、*B. cepacia* 菌体内では DL-2-CPA に対して作用するデハロゲナーゼは 1 種類のみ発現していることが明らかになった。

また D-2-CPA, L-2-CPA それぞれに対して同様に活性染色を行った結果を図-3 に示す。

D 体・L 体共に AgCl のスポットが同じ位置に形成されたことから、*B. cepacia* が生産するデハロゲナーゼは DL 両光学異性体に作用することが明らかになった。ここでは DL-2-CPA を唯一の炭素源として培養した *B. cepacia* から抽出した粗酵素液を用いた活性染色の結果も合わせて示したが、この場合も同様に粗酵素液中のデハロゲナーゼは DL 両光学異性体に対する活性を示した。なお従来報告されている 2-ハロ酸デハロゲナーゼでは、L-2-CPA に

アブライした酵素量

A : 0.03U B : 0.065U C : 0.085U D : 0.110U

図-2 DL-2-クロロプロピオン酸に対する活性染色の結果

1 : DL-2-CPA で培養した *B. cepacia* から抽出した粗酵素液
2 : 2,4-D で培養した *B. cepacia* から抽出した粗酵素液
3 : DL-2-CPA で培養した *B. cepacia* から抽出した粗酵素液
4 : 2,4-D で培養した *B. cepacia* から抽出した粗酵素液
(デハロゲナーゼ酵素量はすべて 0.02U)

図-3 活性染色によるデハロゲナーゼの立体特異性

図-4 精製各段階試料の SDS-PAGE による比較
(各レーンのタンパク質量: 5mg)

対してのみ特異的に作用するものが圧倒的に多い¹⁾。

次にこの CPA デハロゲナーゼを精製する際の各段階における試料を、SDS-PAGE により比較した結果を図-4 に示す。左から順に精製のステップが進むにつれて、粗酵素液中に多数含有されるタンパクによるバンドが減少し、デハロゲナーゼが精製・濃縮されている様子が確認された。精製前の粗酵素液では比活性0.025U/mg であったのに対して、比活性19.4U/mg の最終標品を得ることができた。ここでこのデハロゲナーゼの精製倍率が776倍と非常に高い点から、菌体内での CPA デハロゲナーゼ発現量が非常に少ないことが考えられる。

4.2 デハロゲナーゼの特性

最も活性の高かった45°Cにおけるデハロゲナーゼ活性を100とした相対活性により活性の最適温度を

図-5 デハロゲナーゼ活性に及ぼす温度の影響

図-6 デハロゲナーゼ活性に及ぼす pH の影響

図-5 に示す。この結果からデハロゲナーゼ活性の最適温度は45-50°Cで、50°C以上においては急激に活性が低下することがわかった。

また、図-6 にデハロゲナーゼ活性の pH による影響を示す。ここでは各 pH 範囲で使用した3種の緩衝液によるバックグラウンドを補正するため、あらかじめ3M H_2SO_4 で失活させた酵素をコントロールとして用い、吸光度の差で結果を表している。これらの結果からデハロゲナーゼ活性の最適 pH は pH9-10の範囲にあることがわかった。

また表2には DL-2-CPA に対するデハロゲナーゼ活性を100とした相対活性により、各基質に対する相対活性として基質特異性の結果を表している。炭素数3以下のハロ酸に対しては良好な活性を示したが、モノクロロ酢酸・ジクロロ酢酸・2,2-ジクロロプロピオン酸に対しては活性が低下した。

さらに炭素数4以上の基質に対してはほとんど作用せず、芳香族ハロゲン化合物に対してはまったく

表2 デハロゲナーゼの基質特異性

基質	相対活性(%)
モノクロロ酢酸	14.9
モノプロモ酢酸	480
モノヨード酢酸	239
ジクロロ酢酸	2.5
2-クロロプロピオン酸	100
2,2-ジクロロプロピオン酸	23.0
2,3-ジクロロプロピオン酸	80.5
2-クロロ- <i>n</i> -酪酸	1.4
5-クロロ吉草酸	0
2,4-ジクロロフェノール	0
<i>p</i> -クロロフェノキシ酢酸	0
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	0

作用しなかった。これらの結果から、*B. cepacia* が生産しているデハロゲナーゼは、炭素数3以下の2-ハロ酸に特異的に作用していると考えられる。

5. ま と め

本研究では芳香族ハロゲン化合物である、除草剤 2,4-D を分解する土壌細菌、*Burkholderia cepacia* が生産するデハロゲナーゼに焦点をあてて、酵素の精製を行った。また精製したデハロゲナーゼの特性を調べた結果、このデハロゲナーゼは炭素数3までの2-ハロ酸に対して良好な活性を示すことが明らかになった。この結果から、*B. cepacia* による2,4-D 分解においては芳香環開裂を経た後、種々の酵素反応により低分子化された後で脱ハロゲン反応が起こっているものと推測される。なお、活性染色による結果から、このデハロゲナーゼは DL 両光学異性体に対する活性を有することがわかった。

しかし *B. cepacia* の生産するデハロゲナーゼは菌体内での発現量が非常に少ないうえ、生育速度も

比較的遅く、得られる菌体量も少ないことからデハロゲナーゼ活性を強化した組換え菌を構築することが望ましいと考えられる。現在、この2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングを継続して行っている。

参 考 文 献

- 1) D. B. Janssen *et al.*, (1994) Genetics and Biochemistry of Dehalogenating Enzymes., *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, p.163-191
- 2) D. J. Hardman *et al.*, (1981) Dehalogenases in Soil Bacteria., *J. Gen. Microbiol.*, 123, p.117-128
- 3) I. Iwasaki *et al.*, (1956) A New Spectrophotometric Method for the Determination of Small Amounts of Chloride Using the Mercuric Thiocyanate Method., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 29(6), p.860-864.
- 4) 日本生物工学会編(1992) 生物学実験書, 培風館, 東京
- 5) J. Q. Liu *et al.*, (1994) Purification and Characterization of Thermostable and Nonthermostable 2-Haloacid dehalogenases with Different Stereospecificities from *Pseudomonas* sp. Strain YL., *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(7), p.2389-2393

製品ニュース

携帯型 pH メータ D-20シリーズ

(全5機種) 発売

㈱堀場製作所はユーザーの立場に立った、携帯型 pH メータの新型 (D-20シリーズ) を発売する。

〈主な特長〉

1. 本体・電極共に完全防水、現場測定に最適
JIS C 0920保護等級 7 (IEC529: IP67) 準拠。
2. 堅牢型の pH 電極をオプションで用意
従来比 5 倍の強度で扱いやすさが向上。
3. pH に加えて導電率、溶存酸素、イオン濃度の同時 2 項目測定可能機種など全 5 機種。
4. 標準 pH 電極は応答時間 1/6 の高速応答有機溶媒や低導電率の試料も迅速測定。

〈お問い合わせ先〉

㈱堀場製作所 カスタマーサポートセンター
TEL. 0120-37-6045(フリーダイヤル)
(本リリース内容については広報室まで)