海藻と微生物が生産するハロゲン化酵素

大城 隆*
和泉好計

近年、マリンバイオテクノロジーが世界的に大きな注目を集めている。海洋環境中には多種のハロゲン化有機化合物の存在が知られており、また含ハロゲン抗生物質を生産する微生物も存在する。ハロゲン化を触媒するハロペルオキシダーゼは海藻由来の酵素の中で最も研究が進展しており、一方、含ハロゲン抗生物質生産菌については酵素化学的研究のみならず分子遺伝学的研究も活発に行なわれている。

自然界において、ハロゲンの有機化合物への導入を触媒する反応は、過酸化水素に依存して起こることが 30 数年前に明らかにされた。この反応に関与する酵素は、一般にハロペルオキシダーゼと呼ばれ、次の反応を触媒する⁽¹⁾。

過酸化水素に依存せずハロゲン化を触媒する酵素は、現在までのところ S-アデノシルメチオン依存性のメチルクロライドトランスフェラーゼが知られているのみであり⁽²⁾、その活性は非常に微弱である。したがって、天然に存在するほとんどの含ハロゲン化合物の生合成にはハロペルオキシダーゼが関与しているものと考えられている。

天然には数多くの有機ハロゲン化合物が存在しており、特に海藻からは様々な構造をもつ含ハロゲン化合物が見いだされている。海藻は紅藻、褐藻、緑藻に分類されるが、ハロペルオキシダーゼはいずれの種類の海藻中にも活性が検出されている。その中には著量のハロペルオキシダーゼを生産する海藻も存在することより、ハロペルオキシダーゼは、海藻由来の酵素では最も研究が進んでいる酵素の一つである。また、クロラムフェニコール、ピロールニトリンなどのハロゲンを含む抗生物質を微生物が生産することはよく知られているが、それぞれの抗生物質生産菌からは、最近になってようやくハロペルオキシダーゼが検出され

精製されたばかりである。これらを含めた微生物由来のハロペルオキシダーゼの遺伝子の解析が、ここ 4~5 年の間に急速に進んでいる。

ハロペルオキシダーゼの応用研究については、様々な合成基質を用いて本酵素による種々のハロゲン化物質の合成例が知られている^(3~5)。なかでもアルケンからハロペルオキシダーゼによりハロヒドリンを合成し、さらにこれをエポキシドへ導く方法はシータスプロセスと呼ばれる有名な方法である⁽⁶⁾。また、漂白剤としての利用についても最近研究が進められており、応用の範囲が広がりつつある。

本稿においては、海藻および微生物が生産するハロゲン化酵素の基礎と応用に関する最近の研究について紹介する。

ハロゲン化酵素の分布と生理的意義

天然に存在する有機ハロゲン化合物は、大なり小なり生理活性を有している。ハロゲン化酵素をもつ生物は、このような有機ハロゲン化合物を生合成することにより自己を防御しているものと考えられる。代表的な有機ハロゲン化合物といえば、微生物が生産するクロラムフェニコール、ピロールニトリン、7-クロロテトラサイクリンなどの抗生物質がある(図 1)。また、多くの海藻類がきわめて多種多様の有機ハロゲン化合物を有していることが知られている⁽¹⁾。さらに後述するように、最近、海藻が生産していると考えられる揮発性含ハロゲン炭化水素も地球環境の観点から非常に注目を集めている。

Structure and Function of Halogenating Enzymes Produced by Algae and Microorganisms

* Takashi OHSHIRO, Yoshikazu IZUMI, 鳥取大学工学部 生物応用工学科

図 1 ■微生物が生産する代表的な含ハロゲン抗生物質

30 数年前に、塩素を含む抗生物質カルダリオマイシンの生産菌である *Caldariomyces fumago* より微生物からは初めてハロペルオキシダーゼが検出された⁽⁷⁾。しかし、クロラムフェニコールやピロールニトリンなどの生産菌にハロペルオキシダーゼが検出されたのは、それから 20 年以上もたった 1980 年代半ばのことであった⁽⁸⁾。容易にハロペルオキシダーゼ活性が検出できなかった原因は、これらの菌株が強いカタラーゼ活性ももちあわせているため、粗酵素の状態では酵素活性測定の際に加える過酸化水素がすべて分解されていたためである。したがって、これらの菌株由来のハロペルオキシダーゼは、粗抽出液を硫酸分画、さらにはイオン交換クロマトを行なった後でないとその活性を検出することができない(遺伝子が増幅された菌株はその限りではない)。

さて、ハロペルオキシダーゼは、酸化できるハライドイオンに基づいてクロロペルオキシダーゼ (Cl^- , Br^- , I^-)、ブロモペルオキシダーゼ (Br^- , I^-)、ヨードペルオキシダーゼ (I^-) に分類される。通常、単にペルオキシダーゼと呼ばれている西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼもヨウ素化を触媒することができる。

クロラムフェニコールや 7-クロロテトラサイクリンには塩素原子が含まれているが、これらの抗生物質の生産菌 *Streptomyces phaeochromogenes* および *S. aureofaciens* に見いだされている活性は、クロロペルオキシダーゼではなく、ブロモペルオキシダーゼである^(9,10)。通常、ハロペル

図 2 ■モノクロロジメドン (MCD) を用いたハロペルオキシダーゼの活性測定

オキシダーゼは人工基質モノクロロジメドン (MCD) を用いて 290 nm の吸光度の減少により活性測定を行なう (図 2)。しかし、これらの菌株の酵素は MCD のブロモ化はできるが、クロロ化はできない。一方、ピロールニトリンも塩素原子を含んでおり、その生産菌である *Pseudomonas pyrrocinia* からはクロロペルオキシダーゼが精製されている⁽¹¹⁾。実は、この酵素も MCD をブロモ化はできるものの、クロロ化はできない。しかし、得られた精製酵素標品はピロールニトリンの直接の前駆体 (4-(2-アミノ-3-クロロフェニル)ピロール) のクロロ化を触媒できることから⁽¹¹⁾、クロロペルオキシダーゼとされている。これらとは異なり、*C. fumago*⁽¹²⁾ や同じくカビの *Curvularia inaequalis*⁽¹³⁾ のクロロペルオキシダーゼは MCD のブロモ化もクロロ化も触媒することができる。

以上の事実から、MCD を基質として用いて活性測定を行なった時にブロモ化活性しか検出できない場合、*P. pyrrocinia* の例が示すように、適当な基質と反応させるとクロロ化が起こる可能性は充分にある。クロラムフェニコール生産菌 *S. phaeochromogenes* および 7-クロロテトラサイクリン生産菌 *S. aureofaciens* のブロモペルオキシダーゼとも、今の時点で見いだされている酵素がそれぞれの抗生物質の生合成においてクロロ化反応に関与している可能性が高い。

さて、応用酵素学の分野では、有用酵素を見いだすために主として微生物のスクリーニングが頻繁に行なわれることから、微生物由来の酵素を材

図 3 ■ *Corallina pilulifera* (左) と *Ascophyllum nodosum* (右)

料として研究されている場合がほとんどである。しかし、ハロペルオキシダーゼに関しては、海藻由来の酵素の研究例が微生物由来のものに匹敵するほど多いのが特徴である。

1980 年, Hager らは 72 種の海藻のうち 55 種がハロペルオキシダーゼ活性を有することを見いだした⁽¹⁴⁾。また筆者らも、日本沿岸で採取した約 60 種の海藻のうち 18 種の海藻に高いプロモペルオキシダーゼ活性が存在することを見いだした^(15,16)。なかでも、紅藻サンゴモ科のピリヒバ (*Corallina pilulifera*) はプロモペルオキシダーゼを総タンパク質の 3% も生産していた^(17,18)。これらの報告以外にも褐藻、緑藻、紅藻を問わず、数多くの海藻からハロペルオキシダーゼが均一にまで精製され、その諸性質が明らかにされている。特に、筆者らが見いだした紅藻 *Corallina pilulifera*、およびヨーロッパの研究グループによって見いだされた褐藻 *Ascophyllum nodosum* の酵素については詳細な研究がなされている (図 3)。

このように、多くの海藻がハロペルオキシダーゼを生産し、またきわめて多種類のハロゲン化合物を含有していることが知られており、これらの生理的意義は海洋生態学の観点からのみならず、応用的な観点から大変興味のある問題であ

る。まず、ハロゲン化合物は抗菌性が強いいため自己防御物質あるいは忌避物質として、すなわち海藻の生存戦略としての重要な意義をもっていると考えられる。また、生産されたハロゲン化合物が他の生物に対する何らかのシグナルとして作用している可能性もある。たとえば、ごく最近、プロモメタンがウニやアワビなどの海洋性植食動物幼生の着底、変態を誘起する現象が見いだされ注目されている^(19,20)。

一方、海藻類のハロペルオキシダーゼの研究の進展に伴って、地球環境の面における海藻類の役割についての研究が行なわれつつある。すなわち、大気中での大きな環境問題となる揮発性ハロゲン化炭化水素 (ジプロモメタン、ジプロモノクロロメタン、プロモホルム) の海藻による生成が確認された⁽²¹⁾。その生成量は工業的に生産される量に比べて無視できる量ではない。フロンに代表される揮発性ハロゲン化炭化水素がオゾン層の破壊の原因となるため、世界的にフロンの使用は禁止される方向にある。もちろん、フロンは主に冷媒を用途として化学的に合成されたものであるが、近年自然界でも、生物が揮発性ハロゲン化炭化水素を生産することが知られてきた。

海藻によって生産される揮発性プロモ化合物は、 $\sim 10^{10}$ g/年にも及ぶとされ⁽²²⁾、臭素を含む揮

発性ハロゲン化炭化水素に限っては海藻が主な生産者ではないかと考えられている。事実、ある海藻の粗抽出液とケト酸からプロモホルムの生成が確かめられている⁽²³⁾。ハロゲン化されたケト酸は不安定であるため、プロモホルムにまで分解されると推定されている。真のハロゲン受容体がケト酸であるかどうかは不明確であるが、この場合、ハロゲン化を触媒するのはハロペルオキシダーゼであると考えられる。また、大気中の揮発性ハロゲン化炭化水素の量は、1年を通じて一定ではなく、たとえば大気中のプロモホルムは2～5月の間に最高値を示す⁽²⁴⁾。

興味深いことに、紅藻 *A. nodosum* のプロモペルオキシダーゼも冬から春にかけて最大活性を示し、夏はほとんど活性を示さない。さらに、北極上空のオゾン層の破壊も3月頃最大となる。しかし、オゾン層の破壊に海藻が役買っているのかどうかは、まだまだ議論の分かれるところであろう。

塩化メチルはさらに多量に存在する揮発性ハロゲン化合物であり、この生合成については、S-アデノシルメチオニンに依存して塩素がメチル化されて塩化メチルが生成することが、紅藻や白色腐朽菌の抽出液を用いて証明されている⁽²⁾。また、塩化メチルがリグニンの分解を促進する、つまりリグニンペルオキシダーゼの生産を誘導するという興味深い現象も発見されつつある⁽²⁵⁻²⁷⁾。

ハロゲン化酵素の補欠分子族

ハロペルオキシダーゼは補欠分子族としてヘムを含むもの、バナジウムを含むもの、その両方とも含まないものに大別できる。表1に海藻と微生物由来のハロペルオキシダーゼの起源と補欠分子族ならびにハロゲンに対する反応性を示す。この表の中で、*P. pyrrocinia* はピロールニトリン生産

表 1 ■ 海藻と微生物が生産するハロペルオキシダーゼとその補欠分子族

酵素源	補欠分子族	ハライド 特異性	文献
海藻			
褐藻			
<i>Ascophyllum nodosum</i>	バナジウム	Br, I	28
<i>Fucus distichus</i>	バナシウム	Br, I	29
<i>Laminaria saccharina</i>	バナジウム	Br, I	30
<i>Macrocystis pyrifera</i>	バナシウム	Br, I	29
紅藻			
<i>Corallina pilulifera</i>	バナシウム	Br, I	31
緑藻			
<i>Penicillus capitatus</i>	フェリプロトポルフィリンIX	Cl, Br, I	32
微生物			
カビ			
<i>Caldariomyces fumago</i>	フェリプロトポルフィリンIX	Cl, Br, I	33
<i>Curvularia inaequalis</i>	バナジウム	Cl, Br, I	13
細菌			
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	フェリプロトポルフィリンIX	Br, I	34
<i>P. pyrrocinia</i>	フェリプロトポルフィリンIX	Br, I	35
<i>P. pyrrocinia</i>	亜鉛, 鉄	Cl, Br, I	11
放線菌			
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	不明	Br, I	10
<i>S. phaeochromogenes</i>	不明	Br, I	9

菌^(11,35)、*S. aureofaciens* は7-クロロテトラサイクリン生産菌⁽¹⁰⁾、*S. phaeochromogenes* はクロラムフェニコール生産菌⁽⁹⁾であり、*P. aureofaciens* も抗菌性を示すハロゲン化合物を生産する⁽³⁴⁾。バナジウムを補欠分子族とするハロペルオキシダーゼは、海藻由来の酵素に多い。現在、ハロペルオキシダーゼ以外にバナジウムを補欠分子族とする酵素は、その後に発見された *Azotobacter* 属細菌のニトロゲナーゼが知られているのみである。

1984年、Vilter は *A. nodosum* からハロペルオキシダーゼを精製し、この酵素がバナジウムを含むことを初めて示した⁽³⁶⁾。彼はその際、酵素はEDTAを含むpH3.8の緩衝液で透析すると失活するが、バナジウム塩を加えると活性が回復することを見いだした。この現象は他のバナジウムを含むハロペルオキシダーゼでも観察されている⁽¹⁸⁾。Vilterの報告以降、種々の海藻からバナジウムを含むハロペルオキシダーゼが発見され^(30,37)、筆者らが見いだした非ヘム型の紅藻サンゴモ科の *C. pilulifera* のハロペルオキシダーゼもバナジウムを含んでいることがESRを用いて証明された⁽³¹⁾。そしてごく最近、カビ (*Curvularia inaequalis*) にもバナジウム依存型のクロロペルオキ

シダーゼが見いだされた⁽¹³⁾。バナジウムを含む微生物ハロペルオキシダーゼの最初の例である。このカビの酵素も当初は非ヘム型であると報告されていた⁽³⁸⁾。また、緑藻 *Penicillus capitatus* のプロモペルオキシダーゼは当初 Cl^- には働かないとされていたが⁽³⁹⁾、数年前、酸性下においてクロロ化反応が起こることが示された⁽³²⁾。そして、ハロペルオキシダーゼの中では最も研究が進んでいる褐藻 *A. nodosum* のプロモペルオキシダーゼも、 Br^- に対するより活性は 500 倍低いが、 Cl^- に対しても活性を有していることが明らかになった⁽⁴⁰⁾。先述したように、*P. pyrrocinia* のクロロペルオキシダーゼも通常の MCD を用いる方法ではクロロ化活性が検出できなかったように、反応条件や基質を変えることにより潜在しているクロロ化活性を見いだすことができるかも知れない。

ハロペルオキシダーゼの基質特異性と反応機構

ハロペルオキシダーゼの基質特異性については、カビ *C. fumago* のクロロペルオキシダーゼと、紅藻 *C. pilulifera* のプロモペルオキシダーゼを用いて系統的に調べられている^(41,42)。表 2 に基質となる主な化合物とその生成物を示す。ハロペルオキシダーゼは、ケト酸、フェノール、アニソールなどの置換フェノール類、アルケン、アルキン、複素環を有する芳香族化合物など、多種多様の化合物を基質とすることができ、複数の生成物を与える場合もある。現在までのところ、立体選択的なハロゲン化を触媒する酵素は発見されていない。

一方、ハロペルオキシダーゼが触媒する反応の機構については、まず Hager らがカビ *C.*

fumago のクロロペルオキシダーゼを用いて研究を行ない⁽⁴³⁾、ついで筆者らも紅藻 *C. pilulifera* のプロモペルオキシダーゼを用いた実験データよりその反応機構を提唱した^(18,44)。さらに、Wever らは褐藻 *A. nodosum* のプロモペルオキシダーゼの反応機構をストップフロー法を用いて詳細に解析した⁽⁴⁵⁾。その結果、図 4 に示すように酵素 (E) はまず過酸化水素と結合して $[\text{E} \cdot \text{H}_2\text{O}_2]$ 複合体を形成し、ついでハライドイオン (X^-) と結合して $[\text{E} \cdot \text{HOX}]$ 複合体となり、速やかに次亜ハロゲン酸 (HOX) が生成する。この時、過剰のハライドイオンの存在は $[\text{E} \cdot \text{H}^+ \cdot \text{X}^-]$ 複合体の形成をひき起こし、酵素反応を阻害するという興味深い現象が観察されている。次亜ハロゲン酸の生成までが酵素反応であり、ハロゲン化される基質はこの段

表 2 ■ハロペルオキシダーゼの種々の化合物に対する反応例

基質	ハライド	反応生成物
$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ β -ケトアジピン酸	Cl^-	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{Cl}$ δ -クロロレブリン酸
フェノール	Br^-	2,4,6-トリブロモフェノール
アニソール	Br^-	p -ブロモアニソール
$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_3$ プロピレン	Cl^-	$\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{Cl}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}}-\text{CH}_3$ 1-クロロ-2-ブロパノール
メチルシクロプロパン	Cl^-	$\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{Cl}}{\text{CH}_2}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_3$ 1-クロロ-3-ブタノール
ウラシル	Br^-	5-ブロモウラシル
チオフェン	Br^-	2-ブロモチオフェン

図 4 ■ ハロペルオキシダーゼの反応機構⁽⁴⁵⁾

階では反応に関与しない。生成した次亜ハロゲン酸は、分子状ハロゲン、トリハライドイオンの3者の平衡状態で存在する。次亜ハロゲン酸は親核性の基質(AH)と反応し、ハロゲン化生成物を与える(図4-a)。この際、基質非存在下では次亜ハロゲン酸は過酸化水素と反応し、酸素を生成する(図4-b)。このカタラーゼ様の反応はハライドイオン非存在下では起こらない。ハロペルオキシダーゼの反応生成物は次亜ハロゲン酸であり、有機物のハロゲン化反応は生成した次亜ハロゲン酸により化学的に起こるといのが結論である。

A. nodosum のブロモペルオキシダーゼのバナジウムを含んだ活性中心については、最近数多くの研究がなされている⁽⁴⁶⁾。バナジウムは遷移金属で、3, 4, 5 価の電荷状態をとりうるが、この酵素の活性中心においては最大の酸化状態(5 価)で存在しており、反応中もその価数は5 価のまま変わらない⁽⁴⁷⁾。そして、バナジウム原子の近辺にヒスチジンの窒素原子⁽⁴⁵⁾や酸性アミノ酸⁽⁴⁸⁾が存在し、さらにバナジウムに結合している酸素原子のうちの1つはバナジウム原子と二重結合を形成している⁽⁴⁹⁾。これらのことを総合して提唱されている活性中心の構造が図5である⁽⁵⁰⁾。しかし、過酸化水素やハライドイオンがどのようにこの部位

図 5 ■ バナジウムを含むハロペルオキシダーゼの活性部位⁽⁵⁰⁾

に結合するのかなど、詳細な点についてはまだ不明な点が多い。

ハロペルオキシダーゼの構造と遺伝子

ハロペルオキシダーゼは生産する生物によって、複数のアイソザイムが知られている(表3)。カビ *C. fumago* のクロロペルオキシダーゼは2種のアイソザイムで存在することが発見され⁽⁵¹⁾、また10種の *Caldariomyces* 属の菌株の培養液から異なるクロロペルオキシダーゼが検出された⁽⁵²⁾。*C. fumago* の酵素は分子量が約42 kDaの糖タンパクであり、その糖含量は30%近くにもなる⁽⁵³⁾。数種のアイソザイムが生成するのは転写後の糖の結合の仕方の違いによるものと考えられている⁽⁵³⁾。

放線菌 *S. griseus* ではヘム型の酵素1つと非ヘム型の酵素3つが同時生産される⁽⁵⁴⁾。これらのアイソザイムのうち、非ヘム型の3つのアイソザイムについてはサブユニット構造などに若干の違いがあり、4つのアイソザイムの生産される比率も培養時間により異なる。また、7-クロロテトラサイクリン生産菌である放線菌 *S. aureofaciens* から2種の非ヘム型の酵素が均一にまで精製されている⁽⁵⁵⁾。これらのアイソザイムはサブユニットの分子量はほぼ同一で、一方が二量体、もう一方が三量体であり、熱安定性に多少違いがある。ごく最近、この菌株より本酵素の遺伝子がクローニングされ⁽⁵⁶⁾、その遺伝子を *S. lividans* を宿主として発現させたところ、生産された酵素は三量体であることが明らかになった。このことは、本菌株にハロペルオキシダーゼをコードする遺伝子が

表 3■ハロペルオキシダーゼのアイソザイムとその酵素化学的性質

酵素源	ハロペルオキシダーゼの種類	アイソザイム	補欠分子族	分子量 (Da)	サブユニットの構造	pI
<i>Caldariomyces fumago</i>	クロロペルオキシダーゼ	A	ヘム	46k	—	3.85
		B	ヘム	40k	—	3.57
<i>Streptomyces griseus</i>	プロモペルオキシダーゼ	1 a	非ヘム	70k+10k	34k×2	4.6
		1 b	非ヘム	90k+5k	43k×2	4.7
		2	ヘム	—	—	—
		3	非ヘム	90k+5k	31k×3	3.6
<i>S. aureofaciens</i>	プロモペルオキシダーゼ	1	非ヘム	65k	31k×2	4.5
		2	非ヘム	90k	31k×3	3.5
<i>Ascophyllum nodosum</i>	プロモペルオキシダーゼ	I	バナジウム	97k	—	5.0
		II	バナシウム	106k	—	5.0

2つ存在していることを示している。クローニングされたほうの酵素は結晶化され、そのX線解析も行なわれている⁽⁵⁷⁾。

海藻由来の酵素では、*A. nodosum* が2種のアイソザイムを生産する⁽⁵⁸⁾。これらのアイソザイムは両方ともバナジウムを含んでいるが、分子量に違いがみられ、さらに一方は組織内部に、もう一方は組織の表面に局在していた。一般に、ペルオキシダーゼには数種のアイソザイムが存在しているといわれ、このように多くのハロペルオキシダーゼにアイソザイムの存在が認められてもそれは当然のことかもしれない。しかし、これらアイソザイムの生理的意義についてはまだ不明な点が多い。

ハロペルオキシダーゼの遺伝子に関しては、まずカビ *C. fumago* からはヘム型のクロロペルオキシダーゼの cDNA がクローニングされ⁽⁵⁹⁾、さらに全 DNA 配列も決定された⁽⁶⁰⁾。cDNA と全 DNA 配列の比較より、この遺伝子にはイントロンが存在せず、またアミノ酸配列の解析の結果、この酵素は3つの Asn-X-Thr/Ser からなる糖鎖結合部位や21残基からなるシグナルペプチドを有していることが明らかになっている。また、3つの Cys 残基のうちの1つはヘムとの結合の関与が示唆されている。非ヘム型のハロペルオキシダーゼについては、*S. aureofaciens* のプロモペルオキシダーゼ遺伝子がクローニングされている⁽⁵⁶⁾。この遺伝子は他の *Streptomyces* 属の遺伝子と同様 GC 含量が高く、典型的なリボソーム結合部位も有していた。*C. fumago* と *S. aureofaciens* の酵素遺伝子の相同性はあまり高くない。

一方、バナジウムを含む酵素や海藻由来の酵素遺伝子については、まだクローニングに関する報告はない。特に、海藻については組織中に糖を多く含むため、核酸の抽出さえ非常に困難であるのが現状である⁽⁶¹⁾。

ハロペルオキシダーゼの新機能

ハロペルオキシダーゼの基質特異性についてはすでにくわしく研究が行なわれてきており⁽⁴¹⁾、前述のようにこれらの酵素では立体特異的なハロゲン化は起こらないと結論された。しかし、ごく最近 *C. fumago* のクロロペルオキシダーゼが、ハロゲン化以外の反応において立体特異的に働くことが報告された。その一例として *C. fumago* の酵素がスルフィドを立体特異的に酸化してスルホキシドを生成できることが見いだされている⁽⁶²⁾。図6に示すように、この酵素を種々のスルフィドを基質として反応させた場合、生成するスルホキシドはすべてR体であった。また、この酵素反応は過酸化水素を酸化剤として進行するだけでなく、たとえば1-フェニルエチルヒドロペルオキシドなどの有機過酸化物をも酸化剤として進行し、しかもラセミ体過酸化物のうちR体しか利用しなかった。つまり、この酵素反応によって、スルフィドとラセミ体の過酸化物とから、R体のスルホキシド、S体のアルコール、R体の未反応の過酸化物が生成することとなり、1つの酵素反応で2つの不斉が誘起できることになる。しかし、この酵素反応では反応条件をうまくコントロールする必要があり、反応温度は4℃、基質であるスルフィドや過酸化物の濃度を mM オーダー以下

図 6 ■ クロロペルオキシダーゼによるスルフィドの立体選択的酸化⁽⁶²⁾

に保たなければならない。

もう一つの例は、*C. fumago* の酵素による不斉エポキシ化である⁽⁶³⁾。種々のアルケンを基質としてこの酵素と反応させると、非常に高い光学純度でエポキシドが生成した。シトクロム P-450 関与のエポキシ化反応とは異なり、NADH を要求することもなかった。しかし先の反応例と同様、この反応においても過酸化水素を低濃度に抑えるためポンプを用いて少しずつ供給している。過剰の過酸化水素はこの酵素を失活させる上、非酵素的な酸化反応をもひき起こしてしまうのである。一方、アセトンなどの溶媒の添加は、この酵素的エポキシ化反応の収率を向上させた。

さて、従来の酵素的合成法でもみられるように、ハロペルオキシダーゼの酵素的合成への利用を考える場合にも、溶媒耐性が問題となる可能性がある。各種溶媒に対する安定性は、*A. nodosum* のブロモペルオキシダーゼを用いて調べられている⁽⁶⁴⁾。この酵素は 40% のアセトン、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール中で 1 カ月間室温で放置してもほとんど失活はみられない。さらに、この酵素はこれらの溶媒に容易に溶解するため、60% エタノールによる抽出ステップが有力な精製方法となっている。酵素としては異常なこの安定性は、この酵素を実用的に用いる際に大きなメリットとなるであろう。

*

本稿では、海藻および微生物が生産するハロゲ

ン化酵素について、なかでもハロペルオキシダーゼに関する現在までの知見を中心に紹介した。Hager らが MCD をハロペルオキシダーゼの人工基質として開発して以来、本酵素の活性測定はもっぱら MCD を用いて行なわれてきているが、塩素をもつ抗生物質の生産菌にクロロペルオキシダーゼが検出できなかったり、塩素イオンが大量に存在する海洋環境に棲息する海藻からクロロペルオキシダーゼが検出できないことなどを勘案すると、別の構造をもつ人工基質が開発されれば、ハライドイオンに対する反応性の評価も、また違ったものになるに違いない。さらに、最後の項で述べたように、バナジウムを含む非ヘム型のハロペルオキシダーゼは溶媒存在下においても安定であり、しかも酵素は溶媒中においてその特異性が水中の時と比べて変化する場合があることを考えると、バナジウムを含むハロペルオキシダーゼは酵素化学的にも有機化学的にも魅力のある酵素であると思われる。

文献

- 1) S.L. Neidleman & J. Geigert : "Biohalogenation; Principles, Basic Roles and Applications", Ellis Horward Ltd., Chichester, 1986.
- 2) A.M. Wuosmaa & L.P. Hager: *Science*, **249**, 160(1990).
- 3) H. Yamada, N. Itoh & Y. Izumi: *J. Biol. Chem.*, **260**, 11962 (1985).
- 4) N. Itoh, Y. Izumi & H. Yamada: *Biochemistry*, **26**, 282 (1987).
- 5) N. Itoh, A.K.M.Q. Hasan, Y. Izumi & H. Yamada: *Eur. J. Biochem.*, **172**, 477 (1988).
- 6) J. Geigert, S.L. Neidleman, D.J. Daliotos & S.K. Dewitt: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 366 (1983).
- 7) P.D. Shaw & L.P. Hager: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1626 (1961).
- 8) K.-H. van Pee & F. Lingens: *FEBS Lett.*, **173**, 5 (1984).
- 9) K.-H. van Pee & F. Lingens: *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1911 (1985).
- 10) K.-H. van Pee, G. Sury & F. Lingens: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **368**, 1225 (1987).
- 11) W. Wiesner, K.-H. van Pee & F. Lingens: *J. Biol. Chem.*, **263**, 13725 (1988).
- 12) L.P. Hager, D.R. Morris, F.S. Brown & H. Eberwein: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1769 (1966).
- 13) J.W.P.M. van Schijndel, E.G.M. Vollenbroek & R. Wever: *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**, 249 (1993).
- 14) W.D. Hewson & L.P. Hager: *J. Phycol.*, **16**, 340 (1980).
- 15) H. Yamada, N. Itoh, S. Murakami & Y. Izumi: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2961 (1985).
- 16) N. Itoh, A.K.M.Q. Hasan, Y. Izumi & H. Yamada:

- Biochem. Int.*, 15, 27 (1987).
- 17) NIttoh, Y. Izumi & H. Yamada : *Biochem Biophys. Res Commun.*, 131, 428 (1985).
 - 18) 和泉好計, 大城 隆, 嶋尾正行, B. Krenn, M. Tromp, R. Wever : *Biomed. Res. Trace Elements*, 3, 105 (1992).
 - 19) 蔵多一哉, 谷口和也, 丸添隆義, 鈴木 稔 : 第2回マリンバイオテクノロジー研究発表会講演要旨集, 1993, p. 125.
 - 20) 鈴木 稔 : 私信.
 - 21) P. Gschwend, J. K. MacFarlane & K. A. Newman : *Science*, 227, 1033 (1985).
 - 22) R. Wever : "Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases : Methane, Nitrogen Oxides and Halomethane", American Society for Microbiology, Washington, 1991, p. 277.
 - 23) R. Theiler, J. C. Cook & L. P. Hager : *Science*, 202, 1094 (1978).
 - 24) R. Wever : *Nature*, 335, 501 (1988).
 - 25) B. D. Faison, T. K. Kirk & R. L. Farrell : *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 251 (1986).
 - 26) F. Tonon & E. Odier : *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 466 (1988).
 - 27) D. B. Harper, J. A. Buswell, J. T. Kennedv & J. T. G. Hamilton : *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3450 (1990).
 - 28) E. de Boer, Y. van Kooyk, M. G. M. Tromp, H. Plat & R. Wever : *Biochim. Biophys. Acta*, 869, 48 (1986).
 - 29) H. S. Soedjak & A. Butler : *Biochemistry*, 29, 7974 (1990).
 - 30) E. de Boer, M. G. M. Tromp, H. Plat, G. E. Krenn & R. Wever : *Biochim. Biophys. Acta*, 872, 104 (1986).
 - 31) B. E. Krenn, Y. Izumi, H. Yamada & R. Wever : *Biochim. Biophys. Acta*, 998, 63 (1989).
 - 32) J. A. Manthey & L. P. Hager : *Biochemistry*, 28, 3052 (1989).
 - 33) D. R. Morris & L. P. Hager : *J. Biol. Chem.*, 241, 1763 (1966).
 - 34) W. Wiesner, K.-H. van Pee & F. Lingens : *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 366, 1085 (1985).
 - 35) K.-H. van Pee & F. Lingens : *J. Bacteriol.*, 161, 1171 (1985).
 - 36) H. Vilter : *Phytochemistry*, 23, 1387 (1984).
 - 37) B. E. Krenn, H. Plat & R. Wever : *Biochim. Biophys. Acta*, 912, 287 (1987).
 - 38) T.-N. E. Liu, T. Timkulu, J. Geigert, R. Wolf, S. L. Neidleman, D. Silva & J. C. Hunter-Cevera : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 329 (1987).
 - 39) J. A. Manthey & L. P. Hager : *J. Biol. Chem.*, 256, 11232 (1981).
 - 40) H. S. Soedjak & A. Butler : *Inorg. Chem.*, 29, 5015 (1990).
 - 41) 伊藤伸哉, 和泉好計, 山田秀明 : 発酵と工業, 45, 665 (1987).
 - 42) M. C. R. Franssen & H. C. van der Plas : *Adv. Appl. Microbiol.*, 37, 41 (1992).
 - 43) R. D. Libby, J. A. Thomas, L. W. Kaiser & L. P. Hager : *J. Biol. Chem.*, 257, 5030 (1982).
 - 44) N. Itoh, Y. Izumi & H. Yamada : *J. Biol. Chem.*, 262, 11982 (1987).
 - 45) E. de Boer & R. Wever : *J. Biol. Chem.*, 263, 12326 (1998).
 - 46) R. Wever & B. Krenn : "Vanadium in Biological Systems ; Physiology and Biochemistry", Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1990, p. 81.
 - 47) R. Wever, B. E. Krenn, E. de Boer, H. Offenberger & H. Plat : "Oxidases and Related Redox Systems", Alan R. Liss, Inc., New York, 1988, p. 477.
 - 48) D. Rehder, H. Holst, W. Pribsch & H. Vilter : *J. Inorg. Biochem.*, 41, 171 (1991).
 - 49) R. Wever & K. Kustin : *Adv. Inorg. Chem.*, 35, 81 (1990).
 - 50) K. Knüttel, A. Muller, D. Rehder, H. Vilter & V. Wittneben : *FEBS Lett.*, 302, 11 (1992).
 - 51) A. S. W. Sae & B. A. Cunningham : *Phytochemistry*, 18, 1785 (1979).
 - 52) A. Hashimoto & M. A. Pickard : *J. Gen. Microbiol.*, 130, 2051 (1984).
 - 53) P. Kenigsberg, G.-H. Fang & L. P. Hager : *Arch. Biochem. Biophys.*, 254, 409 (1987).
 - 54) R. Zeiner, K.-H. van Pee & F. Lingens : *J. Gen. Microbiol.*, 134, 3141 (1988).
 - 55) M. Weng, O. Pfeifer, S. Krauss, F. Lingens & K.-H. van Pee : *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2539 (1991).
 - 56) O. Pfeifer, I. Pelletier, J. Altenbuchner & K.-H. van Pee : *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1123 (1992).
 - 57) H. Sobek, T. Haag, O. Pfeifer, D. Schomburg, F. Lingens & K.-H. van Pee : *J. Mol. Biol.*, 221, 35 (1991).
 - 58) B. E. Krenn, M. G. M. Tromp & R. Wever : *J. Biol. Chem.*, 264, 19287 (1989).
 - 59) G.-H. Fang, P. Kenigsberg, M. J. Axley, M. J. Nuell & L. P. Hager : *Nucleic Acids Res.*, 14, 8061 (1986).
 - 60) M. J. Nuell, G.-H. Fang, M. J. Axley, P. Kenigsberg & L. P. Hager : *J. Bacteriol.*, 170, 1001 (1988).
 - 61) 御園生 拓 : 第2回マリンバイオテクノロジー研究発表会講演要旨集, 1993, p. 32.
 - 62) H. Fu, H. Kondo, Y. Ichikawa, G. C. Cook & C.-H. Wong : *J. Org. Chem.*, 57, 7265 (1992).
 - 63) E. J. Allain, L. P. Hager, L. Deng & E. N. Jacobson : *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 4415 (1993).
 - 64) E. de Boer, H. Plat, M. G. M. Tromp, R. Wever, M. C. R. Franssen, H. C. van der Plas, E. M. Meijer & H. E. Schoemaker : *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 607 (1987).