ナノ分子集合体を利用した有機溶媒中における マンガンペルオキシダーゼの機能発現と環境汚染物質の分解

道添純二¹⁾・小谷貴浩¹⁾・富永 譲¹⁾・丸山達生¹⁾・一瀬博文²⁾・神谷典穂¹⁾・
後藤雅宏^{1,2)*}

1) 九州大学大学院 工学研究院応用化学部門 2) 科技団さきがけ21
〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

Degradation of environmental pollutants by manganese peroxidase hosted in reverse micelles

Junji Michizoe¹⁾, Takahiro Kotani¹⁾, Jo Tominaga¹⁾, Tatsuo Maruyama¹⁾,
Hirofumi Ichinose²⁾, Noriho Kamiya¹⁾, and Masahiro Goto^{1,2)*}

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University¹⁾ and PRESTO JST²⁾,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

We have investigated the oxidation of phenolic compounds by manganese peroxidase (MnP) hosted in aerosol OT/isooctane reverse micelles. The MnP hosted in reverse micelles exhibited high peroxidase activity in isooctane, while the dry powder of lyophilized MnP suspended in isooctane did not exhibit peroxidase activity at all. Factors affecting the MnP activity in the reverse micellar solution were studied and it appeared that MnP in reverse micelles showed the highest activity under the following conditions: pH 3.0, $W_o=20$, 0.5 mM peroxidase and reaction temperature of 40°C. Under the optimized conditions, the oxidation of hydrophobic phenolic compounds, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and bisphenol A was carried out in organic solvents. After the 6 h reaction, these compounds were oxidized with the conversion ratio of 22, 24 and 52%, respectively. Furthermore, the addition of 1-hydroxybenzotriazole (HBT) to the reaction medium improved the oxidation rates of all the substrates, indicating that HBT served as a mediator in the MnP-catalyzed oxidation in reverse micelles.

Key words : biodegradation / enzyme reaction / environmental pollutant / molecular assembly / organic solvent

緒 言

殺虫剤や農薬等に利用されてきた、ペンタクロ

ロフェノール (PCP), 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP), 2,4,6-トリクロロフェノール (2,4,6-TCP) のようなクロロフェノール類は, ほとんど自然分解を受けず, 生体内に蓄積されていくことになる. クロロフェノール類は米国のEPA (Environmental Protection Agency) やEuropean

*Corresponding Author
Tel / fax : 092-642-3575
e-mail :

Fig. 1 Reverse micellar system.

Commissionによって優先汚染物質として扱われており、これらの国ではその使用が全面的に禁止されている。

マンガンペルオキシダーゼ（分子量46,000 Da）は活性中心にプロトポルフィリンIX鉄錯体を含むヘム酵素であり、そのアミノ酸配列は他のペルオキシダーゼに類似している。特にリグニンペルオキシダーゼ（LiP）と相同性が高く、43%のアミノ酸残基の配列が同じである。MnPの触媒機構は一般的なペルオキシダーゼ類とほぼ類似している¹⁾。一般的なペルオキシダーゼの反応機構はH₂O₂によって酵素が二電子酸化されcompound Iと呼ばれる触媒中間体が生成し、これが基質を一電子酸化することによってcompound IIと呼ばれる触媒中間体になり、二つ目の基質を一電子酸化することによりnative状態へと戻る。MnPの触媒機構において最も特徴的な点は、compound IあるいはIIがMnを酸化する、つまりMn²⁺イオンをMn³⁺へ特異的に酸化する酵素である。

白色腐朽菌である*Phanerochaete chrysosporium*から細胞外に分泌されるMnPを用いた環境汚染物質の分解反応が水系において研究されている^{2,3)}。一般に環境汚染物質は疎水性であるために、水系での高濃度・大量処理が難しい。有機溶媒は、これら疎水性環境汚染物質を高濃度で溶解することが可能なため、水系での問題点を克服できると考えられている。しかしながら一般に、酵素をそのまま有機溶媒中に添加しても十分に機能しない。MnPもまた例外ではなく、有機溶媒中に直接投入しても、活性はほとんど発現しない。有機溶媒中

Fig. 2 Oxidation of 2,4-dichlorophenol catalyzed by MnP hosted in reverse micelles and by lyophilized MnP directly suspended in isooctane. The reactions were conducted using 3 μ M of MnP concentration, 10 mM of 2,4-DCP, 30 mM of 4-AAP, 0.5 mM of H₂O₂ and 0.5 mM of Mn²⁺ at 25°C. In the reverse micellar system, other conditions were 200 mM of AOT, W₀ = 20, and pH 3.0.

において酵素機能を発現させる手法としては、適当な界面活性剤分子によって酵素を被覆する界面活性剤-酵素複合法^{4,5)}やナノ集合体である逆ミセル中に酵素を包括させる逆ミセル法 (Fig. 1)^{6,7)}などがある。

本研究では、逆ミセル法を用いることで有機溶媒中においてMnPの酵素機能を発現させ、これによる環境汚染物質の分解反応を試みた。酵素活性に大きな影響をおよぼすwater poolのpH、W₀値(=[H₂O]/[surfactant])、反応温度、過酸化水素濃度について検討した。さらに酸化還元酵素の一般的なメディエーターである1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) が、有機溶媒中においてもメディエーターとして機能するかについても検討した。

2. 実験条件および測定方法

2.1 試薬

2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP), 2,4,6-トリ

Fig. 3 Effect of pH on the catalytic activity of MnP hosted in reverse micelles in isooctane and of native MnP in aqueous buffer. (Reverse micellar system: [MnP] = 3 μ M, [2,4-DCP] = 10 mM, [4-AAP] = 30 mM, [H₂O₂] = 0.5 mM, [Mn²⁺] = 0.5 mM, [AOT] = 200 mM, W₀ = 20, pH 2.0~6.0, solvent: isooctane, reaction temperature: 25°C; Aqueous buffer system: [MnP] = 0.3 μ M, [2,4-DCP] = 1 mM, [4-AAP] = 3 mM, [H₂O₂] = 0.5 mM, [Mn²⁺] = 0.5 mM, pH 2.0~6.0)

クロロフェノール (2,4,6-TCP), ビスフェノール A は東京化成 (株) から, 4-アミノアンチピリン (4-AAP), ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT), イソオクタンはキシダ化学 (株) から, 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールは Sigma 社から市販品をそれぞれ購入した。

2.2 実験操作

2.2.1 マンガンペルオキシダーゼ (MnP) の調製

白色腐朽菌 *P. chrysosporium* を 37°C で振盪培養を行い, MnP を菌体外へ産出させ, イオン交換クロマトグラフィー, 限外濾過, ゲル濾過により精製を行った。単離精製した MnP の酵素水溶液 (50 mM コハク酸緩衝液 pH 4.5) を実験に供した⁸⁾。

2.2.2 イソオクタン中での MnP による酸化反応

逆ミセル溶液は, 界面活性剤であるジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) を溶解させたイソオクタンに, 酵素水溶液を微量注入

することにより調製した。基質として 2,4-DCP と 4-AAP を用いた。測定は 2,4-DCP と 4-AAP との反応生成物⁹⁾ を 510 nm の波長で UV-vis 分光光度計 (Jasco V560, 日本分光) により追跡し, 反応初速度を決定した。対照実験として, 酵素水溶液 (pH 4.5) を凍結乾燥し, 得られた粉末酵素を直接イソオクタンに分散させ, 同様に酸化反応を行った。

2.2.2 MnP/メディエーター系における環境汚染物質の酸化反応

酸化還元酵素/メディエーターシステムの一般的なメディエーター¹⁰⁾ である 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) を添加した系についても検討を行い, 環境汚染物質 (2,4-DCP, 2,4,6-TCP, ビスフェノール A) の酸化反応についても検討を行った。基本的な実験条件は界面活性剤 (AOT) 濃度が 200 mM, 酵素濃度 3 μ M, 20 mM マロン酸緩衝液 (pH 3.0), 10 mM 2,4-DCP, 30 mM 4-AAP, W₀ = 20, 反応温度 25°C とした。

3. 実験結果および考察

3.1 イソオクタン中における MnP の機能発現

MnP を, AOT 逆ミセルの内水相中に封入することでイソオクタンに可溶化し, 2,4-DCP の酸化反応を行った。対照実験として凍結乾燥した粉末酵素を直接イソオクタンに分散させ, 2,4-DCP の酸化反応を行った。結果を Fig. 2 に示す。AOT/イソオクタン逆ミセル系を用いた場合, 2,4-DCP の酸化反応が進行し, MnP の触媒活性が保持されていることが明らかとなった。一方, 凍結乾燥酵素を直接イソオクタンに分散させた場合は全く反応が進行しなかった。一般に凍結乾燥酵素を有機溶媒中に直接添加すると, 少なからず酵素機能が発現することが知られている¹¹⁾。しかしながら, MnP はペルオキシダーゼ群の中でも不安定な酵素であるため, イソオクタン中では容易に変性・失活してしまったと考えられる。AOT/イソオクタン逆ミセル系では, MnP 分子が water pool に溶解した状態で存在しており, 有機溶媒中でも活性発現に必要な分子構造が維持され, 酵素活性が発現したものと推察される。

Fig. 4 Effect of W_o ($= [H_2O]/[AOT]$) on the catalytic activity of MnP hosted in reverse micelles. ($[MnP] = 3 \mu M$, $[2,4\text{-DCP}] = 10 \text{ mM}$, $[4\text{-AAP}] = 30 \text{ mM}$, $[H_2O_2] = 0.5 \text{ mM}$, $[Mn^{2+}] = 0.5 \text{ mM}$, $[AOT] = 200 \text{ mM}$, pH 3.0, solvent: isooctane, reaction temperature: $25^\circ C$)

3.2 酵素活性におよぼす種々の要因

AOT逆ミセル系においてMnPが大きな酵素活性を示すことが明らかとなった。そこで、逆ミセル系におけるMnP活性に影響をおよぼす因子について検討を行った。具体的にはwater poolのpH, W_o 値, 反応温度, 過酸化水素濃度について検討した。

3.2.1 MnP活性におよぼすpHの影響

逆ミセルのwater poolのpHがMnP活性に与える影響を検討した。pHを2.0～6.0まで変化させたとこ、至適pHが3.0となった (Fig. 3, ■)。水溶液中では至適pHが4.5であるので、逆ミセル系においては至適pHが酸性側にシフトしている (Fig. 3, ●)。一般に、逆ミセル系での酵素反応において至適pHがシフトすることが知られている¹²⁾。本研究で用いている界面活性剤のAOTはアニオン性界面活性剤であり、water pool内のオキソニウムイオンがミセル界面近傍に偏在しており、water pool中央部のpHはアルカリ側にシフトしていると考えられている¹³⁾。本実験系で最適pHがバルク水系よりも酸性側にシフトしたことから、MnP分子は実効pHがややアルカリ側にシフトする逆ミセルwater

Fig. 5 Effect of reaction temperature on the catalytic activity of MnP hosted in reversed micelles and of MnP in an aqueous solution. (Reverse micellar system: $[MnP] = 3 \mu M$, $[2,4\text{-DCP}] = 10 \text{ mM}$, $[4\text{-AAP}] = 30 \text{ mM}$, $[H_2O_2] = 0.5 \text{ mM}$, $[Mn^{2+}] = 3 \mu M$, $[AOT] = 200 \text{ mM}$, $W_o = 20$, pH 3.0, solvent: isooctane; Aqueous buffer system: $[MnP] = 0.3 \mu M$, $[2,4\text{-DCP}] = 1 \text{ mM}$, $[4\text{-AAP}] = 3 \text{ mM}$, $[H_2O_2] = 0.5 \text{ mM}$, $[Mn^{2+}] = 0.5 \text{ mM}$, pH 4.5)

poolの中心付近に存在していることが示唆される。

3.2.2 MnP活性におよぼす水分量の影響

逆ミセル溶液の水分量を示す W_o 値 ($= [H_2O]/[\text{surfactant}]$) についての検討を行った。一般に、 W_o 値は逆ミセル内水滴 (water pool) の径と比例関係にある。この W_o 値は、逆ミセル溶液中の酵素活性に大きな影響をおよぼすことが知られており、多くの酵素について、その活性- W_o プロファイルから、最大反応速度を与える W_o 値は酵素分子の径と良好な関係にあることが示されている¹⁴⁾。そこで、 W_o 値を10～40まで変化させ、 W_o 値がMnPの活性に対する影響を検討したところ、Fig. 4に示すように $W_o=20$ のときに最も高い活性を示した。逆ミセルの半径 R_w [nm]は次の式で与えられる¹⁵⁾。

$$R_w = 0.15 \times W_o$$

これより、最適条件下で逆ミセルの半径は3 nmである。逆ミセルの径が小さすぎると界面活性剤と

Fig. 6 Reaction scheme of MnP.

酵素間の相互作用の影響が大きくなり、径が大きくなりすぎると基質が難水溶性であるために内水相への移動が起こりにくく、酵素と基質の接触が律速となるため活性が低下したものと推察される。

3.2.3 反応温度の影響

反応温度を20～45℃まで変化させ、酵素活性に対する反応温度の影響について検討した。逆ミセル溶液中およびバルク水溶液中ではともに40℃で最も高い活性を示すことが明らかとなった (Fig.5)。これよりも高温になると酵素が熱変性により失活してしまうため活性が低下したと考えられる。逆ミセル溶液中およびバルク水溶液中で至適温度が同一であることから、MnPが存在する逆ミセル中の中心付近はバルク水溶液と類似の環境下にあることが示唆された。

3.2.4 過酸化水素濃度の影響

MnPは過酸化水素により活性部位のFe^{III}が2電子酸化されcompound Iとなる。そして、compound IがMn²⁺を酸化して自らはcompound IIに還元される。さらにMn²⁺を酸化して最終的にnative酵素の状態へ戻る (Fig. 6)。このように、過酸化水素はMnPの触媒サイクルの開始剤となっている。そこ

で、過酸化水素濃度の最適化について検討を行った。測定はHPLCを用いて、2,4-DCPのピークの減少を測定し、転化率を算出した。

Fig. 7より、最適な過酸化水素濃度は0.5 mMであることが明らかとなった。低濃度領域は低転化率が、過酸化水素濃度に依存して上昇するが、高濃度領域では転化率の減少が確認された。過酸化水素が過剰に存在する場合には、MnPの活性種であるcompound IIから不活性なcompound IIIになることが分かっており、これが活性低下に関与していると思われる。

3.3 逆ミセル溶液中でのMnPによるフェノール性環境汚染物質の分解

以上の実験により最適化された条件下で、環境汚染物質の分解実験を行った。本研究では、環境汚染物質として、ビスフェノール A、2,4-DCP、2,4,6-TCPを用いた。反応6時間後の転化率は、それぞれ54%、22%、24%であった (Table 1)。さらに、転化率の向上を目指し、酸化還元メディエーターと呼ばれる低分子量化合物の添加効果について検討を行った。ラッカーゼに代表される酸化還元酵素の酸化反応は、メディエーターとよばれる

Table 1 Percent degradation of environmental pollutants at 6 h of the reaction. ([MnP] = 3 μ M, [substrate] = 100 μ M, [H₂O₂] = 0.5 mM, [Mn²⁺] = 3 μ M, [AOT] = 200 mM, [HBT] = 1 mM, W_o = 20, pH 3.0, solvent: iso-octane, reaction temperature : 40 °C)

	Without HBT	With HBT
2,4-DCP	22	69
2,4,6-TCP	24	70
Bisphenol A	52	79

Fig. 7 Effect of hydrogen peroxide concentration on the catalytic activity of MnP hosted in reverse micelles. ([MnP] = 3 μ M, [2,4-DCP] = 10 mM, [4-AAP] = 30 mM, [Mn²⁺] = 3 μ M, [AOT] = 200 mM, W_o = 20, pH 3.0, solvent: iso-octane, reaction temperature: 25 °C)

低分子一次被酸化物の酸化を通して、難酸化物を効率よく酸化できることが知られている¹⁰⁾。ここではメディエーターとして1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) を用いた。HBTを添加することにより、MnPがMn²⁺を酸化し、それにより生成したMn³⁺がHBTを酸化する。結果として生じたHBT酸化物が基質を酸化すると考えられる。

HBT濃度を0.1～1.5 mMまで変化させ、2,4-DCPの酸化反応を検討した。その結果、Fig. 8から分かるように、HBTの添加により反応の顕著な促進が

Fig. 8 Effect of the 1-hydroxytribenzazole (HBT) concentration on the oxidation reaction catalyzed by MnP hosted in reverse micelles at 3 h of the reaction. ([MnP] = 3 μ M, [2,4-DCP] = 100 μ M, [H₂O₂] = 0.5 mM, [Mn²⁺] = 3 μ M, [AOT] = 200 mM, W_o = 20, pH 3.0, solvent: iso-octane, reaction temperature: 40 °C)

確認され、HBT濃度が1 mM以上のときに高い酸化率を得られた (基質に対して10等量)。また、HBTの酸化生成物であるベンゾトリアゾール (BT) や2,4-DCPの分解生成物が、反応の進行とともに増加することがHPLC分析で確認された。つまり、逆ミセル溶液中でもバルク水溶液系と同様、MnPによる酸化反応において酸化還元メディエーターが機能することを初めて示すことができた。そこ

で、HBT添加系における環境汚染物質の酸化反応について検討を行った結果、検討したフェノール性環境汚染物質全てにおいて、HBT無添加系と比較して非常に高い転化率が得られた (Table 1).

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省21世紀COEプログラムならびに九州大学P&Pプログラムの援助により行われた。ここに記して感謝致します。

文 献

- 1) Sundaramoorthy M, Kish K, Gold MH, Poulos TL : *J. Biolog. Chem.*, **269** 32759-32767 (1994)
- 2) Valli K, Gold MH : *J. Bacteriol.*, **173** 345-354(1991)
- 3) Valli K, Wariishi H, Gold MH : *J. Bacteriol.*, **174** 2131-2137(1992)
- 4) Kamiya N, Okazaki S, Goto M : *Biotechnol. Tech.*, **11** 375-378 (1997)
- 5) Michizoe J, Uchimura Y, Maruyama T, Kamiya N, Goto M : *J. Biosci. Bioeng.*, **95**(4) 425-427 (2003)
- 6) Michizoe J, Okazaki S, Goto M, Furusaki S : *Biochem. Eng. J.*, **3501** 1-6 (2001)
- 7) Michizoe J, Goto M, Furusaki S : *J. Biosci. Bioeng.*, **92**(1) 67-71 (2001)
- 8) Glenn JK, Gold MH : *Arch. Biochem. Biophys.*, **242** 329-341 (1985)
- 9) Litvinchuk AV, Savenkova MI, Metelitsa DI : *Kinet. Catal.*, **32** 474-478 (1991)
- 10) Srebotnik E, Hammel KE : *J. Biotech.*, **81** 179-188 (2000)
- 11) Klibanov AM : *Chemtech.*, **16** 354-359 (1986)
- 12) Shield JW, Ferguson HD, Bommarius AS, Hatton TA : *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **25** 603-612 (1986)
- 13) Barbaric S, Luisi PL : *J. Am. Chem. Soc.*, **103** 4239-4244 (1981)
- 14) Pileni MP, Zemb T, Petit C : *Chem. Phys. Lett.* **118** : 414-420 (1985)
- 15) Martinek K, Klyachko NL, Kabanov AV, Khmel'nitsky YL, Levashov AV : *Biochem. Biophys. Acta*, **981** 161-172 (1989)

(受付 2003年6月4日 修正稿受付 6月29日
掲載決定 7月3日)