

VII-21

2,4-D分解菌の生産するデハロゲナーゼ

京都大学工学部 学生員 大河内由美子

西嶋真幸

越川博元

正員 尾崎博明

正員 寺島泰

1. はじめに：現在、種々の人工化学物質が生産され環境中での残留が問題となっている。そこで、難分解性物質の一例として除草剤2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetate)及びMCPA(4-Chloro-2-methylphenoxyacetate)を取り上げ、これまでに各物質を唯一の炭素源として分解・資化する能力を有する微生物を土壤中よりそれぞれ1菌株、3菌株単離した。またこれら4菌株による基質分解に伴う脱ハロゲン反応を確認し、さらに休止菌体による直鎖のハロ酸(Monochloroacetate, 2-Chloropropionate)からの脱ハロゲンも確認されたことから、脱ハロゲン反応が酵素反応的に起こっていることが示された¹⁾。これらの知見に基づき、本研究では2-ハロ酸の1種である2-Chloropropionate(CPA)に対して最も高い活性を示した2,4-D分解菌のデハロゲナーゼに着目して精製を行い、その酵素特性について検討した。なお、以後では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を1(U)と定義し、タンパク1mg当たりの酵素量を比活性(Specific activity; U/mg)で表す。各物質の構造式を図-1に示す。

2. 2-ハロ酸デハロゲナーゼの精製

2-1 実験方法：2,4-Dを唯一の炭素源として培養後、集菌/洗菌した2,4-D分解菌を超音波破碎し、遠心分離により不溶画分を除去して得た粗酵素液を精製の材料とした。この粗酵素液中に存在するアイソザイムの有無を確認するため、Hardmanらの方法²⁾に従い、活性染色を行った。アイソザイムとは、同一反応を触媒するものの分子量が異なる酵素を指す。粗酵素液に対してポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動後のゲルをCPA溶液と反応させた後硝酸銀溶液に浸すことで、遊離した塩素イオンをAgClのスポットとして視覚的に確認した。また、デハロゲナーゼの精製は比活性0.025(U/mg)の粗酵素液を出発材料として、各種カラムを装着したFPLC(Pharmacia Biotech)を用いて行った。今回使用したカラムはDEAE-TOYOPEARL（弱陰イオン交換）、BUTYL-TOYOPEARL（疎水クロマトグラフィー）、MonoQ（強陰イオン交換）、Superdex（ゲル濾過）の4種類で、イオン交換と疎水クロマトグラフィーではイオン強度を変化させることにより、目的タンパクの分離を行った。さらに、得られた酵素液を用いてゲル濾過クロマトグラフィー測定により未変性タンパクの分子量を、SDS-PAGEにより構成サブユニットの分子量をそれぞれ決定した。

2-2 結果と考察：活性染色の結果を図-2に示す。各レーンに対してデハロゲナーゼによるスポットが1つのみ出現していることから、2,4-D分解菌の菌体内に発現している2-ハロ酸デハロゲナーゼは1種類のみであることが示された。またFPLCによる精製の結果、現時点で夾雑タンパクを1種類まで減らすことができ、比活性19.4(U/mg)の標品を得たが、さらに精製を進め

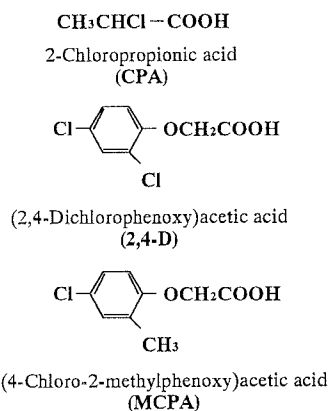


図-1 各物質の構造式

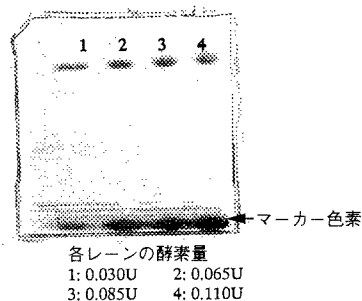


図-2 活性染色の結果

表-1 分子量測定の結果

サブユニット分子量	34.0kDa
分子量	68.5kDa

るとともに迅速な精製法の確立を目指している。なお、分子量測定の結果を表-1に示す。

3. 2-ハロ酸デハロゲナーゼの特性

3-1 実験方法：前章で得られた酵素液を用いて2-ハロ酸デハロゲナーゼの以下に挙げる基本的特性について検討した。

- ①酵素活性の最適温度：反応温度20-70℃の範囲において酵素を25mM CPAと反応させ、デハロゲナーゼ作用により遊離した塩素イオン濃度をIwasakiらの方法³⁾により活性を測定した。
- ②酵素活性の最適pH：酵素をpH6-11の3種類の緩衝液(pH6-9.25; Bis-tris Propane, pH9-10; CHES, pH10-11; CAPS)中で25mM CPAと反応させ、反応温度30℃におけるデハロゲナーゼ活性を測定した。

- ③数種の有機ハロゲン化合物に対する基質特異性：直鎖の2-ハロ酸と2,4-D分解による代謝物となりうる芳香族有機塩素化合物を対象に、各基質濃度を25mMとして反応温度30℃におけるデハロゲナーゼ活性を測定した。

3-2 結果と考察：各特性の結果を以下に示す。

- ①最適温度：結果を図-3に示す。45℃における活性を100として、各温度における相対活性で表している。45-50℃で最大活性を示したが、55℃以上では急激にその活性を失った。
- ②最適pH：結果を図-4に示す。pH9-10の範囲で最大活性を示した。
- ③基質特異性：結果を表-2に示す。CPAを基質とした場合のデハロゲナーゼ活性を100として、各基質に対する相対活性で表している。Bromoacetate、Iodoacetate、2,3-Dichloro-propionate、CPAといった炭素鎖3までの2-ハロ酸には良好な活性を示したが、炭素鎖4以上のハロ酸や芳香族ハロゲン化合物には作用しなかった。

4. まとめ：本研究で得られた結論は以下の通りである。

- 1)2,4-D分解菌から抽出した粗酵素液を用いて活性染色を行ったところ、CPAに対して作用しているデハロゲナーゼは1種類のみであった。
- 2)種々のカラムを用いて2-ハロ酸デハロゲナーゼの精製を試み、夾雑タンパクを1種類まで減少させることができた。また分子量測定の結果、本酵素は分子量68.5kDa、サブユニット34kDaのホモダイマーであった。現在さらに精製を進めている。
- 3)2-ハロ酸デハロゲナーゼの主な特性は以下の通りである。
 - ①最適温度：45-50℃で最大活性を示した。
 - ②最適pH：pH9-10の範囲で最大活性を示した。
 - ③基質特異性：直鎖の2-ハロ酸に対して特異的に作用した。

参考文献

- 1)越川博元ら，土木学会環境工学研究論文集，1995

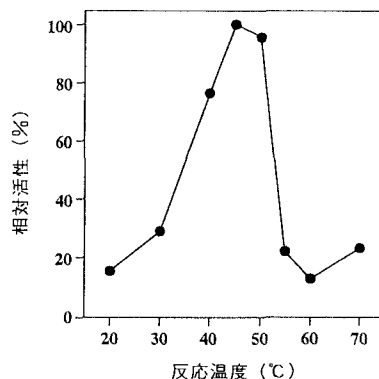


図-3 酵素活性に及ぼす温度の影響

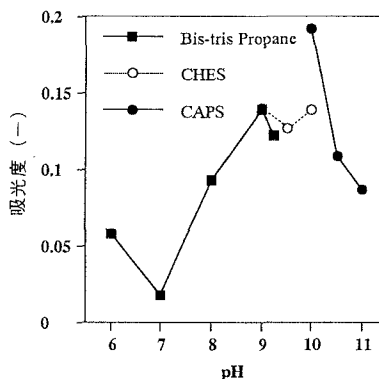


図-4 酵素活性に及ぼす pH の影響

表-2 基質特異性

基質	相対活性(%)
Monochloroacetic acid	14.9
Monobromoacetic acid	480
Monoiodoacetic acid	239
Dichloroacetic acid	2.5
2-Chloropropionic acid	100
2,2-Dichloropropionic acid	23.0
2,3-Dichloropropionic acid	80.5
2-Chloro- <i>n</i> -butyric acid	1.4
5-Chlorovaleric acid	0
2,4-Dichlorophenol	0
<i>p</i> -Chlorophenoxyacetic acid	0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0

- 2)David J.Hardman *et al.*, J. Gen. Microbiol., vol.123,1981
- 3)Iwasaki *et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, vol.29, 6, 1956