

脱ハロゲン化酵素遺伝子を導入した 大腸菌への固定化法の適用とその効果

越川博元¹・井上直子²・大河内由美子³・寺島泰⁴

¹正会員 工博 京都大学助手 工学研究科環境工学専攻 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

²正会員 工修 兵庫県生活文化環境局大気課 (〒650-8567 神戸市中央区下山手通5-10-1)

³学生会員 工修 京都大学大学院工学研究科博士後期課程 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

⁴フェロー会員 工博 京都大学教授 工学研究科環境工学専攻 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

遺伝子組換え微生物の環境工学的利用の基礎としてこれに固定化法を適用し、組換え微生物が産する脱ハロゲン化酵素の活性に対する効果について検討した結果を得た。アクリルアミドでは菌体を高濃度かつ安定して保持できた。寒天およびポリアクリルアミドによる固定化では菌体1mgあたりの活性は大きく低下するものの、本実験条件下ではpH8～10で、また反応温度についても固定化しなかった場合と比較してこれらの影響は受けにくくなる傾向が見られた。活性の持続性については、固定化した場合にはその活性が持続する期間が長くなった。以上の結果から、遺伝子組換え大腸菌に固定化法を適用することで遺伝子組換え大腸菌が有する活性のpH・温度・持続性に対する特性を改善することができるものと考えられた。

Key Words : recombinant, genetically engineered microorganism, immobilization, dehalogenase, activity, stabilization, bioremediation

1. はじめに

近年地球環境問題が大きな問題となっているが、未だ難分解性で毒性の高い有機ハロゲン化合物が農薬、殺虫剤、溶剤、染料等として大量に使用されており、これらが環境中に放出され、蓄積することで環境汚染を引き起こしているのが現状である。

一般に自然界に存在する難分解性物質分解菌は増殖速度が遅く、菌体内の酵素発現量も少ないため、野生型の微生物をそのまま実際の処理に適用することは困難を伴う。そこで、酵素あるいは微生物の固定化利用が従来から検討されているが、最近では遺伝子工学的技術を用い、大量培養が容易な大腸菌等に形質導入することにより難分解性物質の分解能を有する遺伝子組換え微生物を構築して処理に利用する研究も進められている。しかしながら一般に、遺伝子組換え微生物に導入されたプラスミドは欠落しやすいことが知られており、その安定性については培地成分によって影響を受けるりなどの報告もある。また、プラスミド欠落菌に比べプラスミド保持菌の増殖速度は小さく、プラスミド欠落菌の出現によりプラスミド保持菌の割合がさらに低下することも知られている。これらに対して培養条件の制御、組換え技術に

よる安定化因子の挿入等プラスミドの安定化を図る研究^{2),3)}もおこなわれている。このような遺伝的安定性に加え、混合培養系での遺伝子組換え微生物の生態学的安定性等、遺伝子組換え微生物の実用化に関しては多くの検討が必要である。

微生物固定化法は、菌体を担体内に包括固定化することにより、微生物が有する触媒活性を反応槽の中に高密度で保持することができ、再使用や連続操作が可能になることなどから、食品・医薬品・化成品の製造、生活排水の処理等を目的として多くの研究がされている。また、人工的に遺伝子を導入した組換え微生物へ固定化法を適用した研究^{4),5),6)}や、固定化による組換えプラスミドの安定化に関する研究⁷⁾も報告されている。

そこで本研究では遺伝子組換え微生物の環境工学的利用の基礎として、有機塩素化合物、特に本研究では除草剤としても用いられている2-クロロプロピオン酸(2-CPA)に代表される2-ハロ酸(2位の炭素原子にハロゲン原子が結合している鎖状モノカルボン酸)の完全脱塩素化による無害化を一例として遺伝子組換え大腸菌に固定化法を適用し、それが産する脱ハロゲン化酵素(デハロゲナーゼ)の活性とその遺伝子に対する効果について検討することを目的とした。

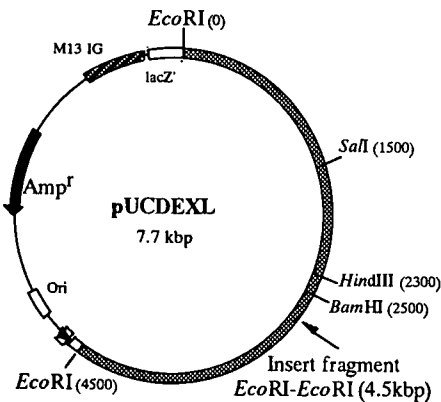


Fig.1 Structure of the recombinant plasmid, pUCDEXL for dehalogenase expression. pUCDEXL contained approx. 4.5 kbp insert fragment encoding DL-2-haloacid dehalogenase at EcoRI restriction site of pUC118.

デハロゲナーゼのうち、2-ハロ酸デハロゲナーゼは2-ハロ酸を加水分解的に脱ハロゲンすることによりヒドロキシ酸を生成する反応を触媒する酵素で、基質に対する立体特異性の異なる次の3種類の酵素が知られている。第1はL-2-ハロ酸に特異的に作用してD-2-ヒドロキシ酸を生成する反応^{10),11)}、第2はD-2-ハロ酸に特異的に作用してL-2-ヒドロキシ酸を生成する反応¹²⁾、第3は2-ハロ酸のD、L両異性体に作用してそれぞれL-2-及びD-2-ヒドロキシ酸を生成する反応を触媒する酵素である^{10),13),14),15)}。本研究で使用した2-ハロ酸デハロゲナーゼの遺伝子は*Burkholderia cepacia* KYより取得したが、この*Burkholderia cepacia* KYは第3の分類に属するデハロゲナーゼのみ1種類を発現する。モノハロ酢酸、2-ハロ酸に対して良好な活性を示す⁹⁾。

2. 実験方法

(1) 菌株

本研究で用いた、脱ハロゲン化酵素遺伝子が導入された大腸菌は、*Burkholderia cepacia* KYの2-ハロ酸を主な基質とする脱ハロゲン化酵素(2-ハロ酸デハロゲナーゼ)の遺伝子をプラスミドpUC118に組み込み、これを導入した*Escherichia coli* JM109である。*Burkholderia cepacia* KYは2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)分解菌として土壌より単離され⁸⁾、2-ハロ酸デハロゲナーゼの生産が確認されている⁹⁾。構築したプラスミドをpUCDEXLとし、その構造をFig.1に示した。

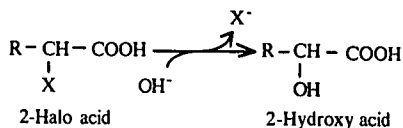


Fig.2 Reaction by the dehalogenase from *E.coli* JM109 (pUCDEXL). The dehalogenase acts on both D- and L-2-halo acid and produces 2-hydroxy acid with inversion of the C2-configuration.

pUCDEXLは次の方法に従って構築した。すなわち、*Burkholderia cepacia* KYから抽出した染色体DNAを制限酵素EcoRIで完全に消化し、得られた断片をpUC118のEcoRIサイトに組み込んだ。この組換えプラスミドを*E.coli* JM109に導入し、脱ハロゲン活性を示した株からプラスミドを抽出して得た。この株を実験に供することとし、*E.coli* JM109 (pUCDEXL)と表記した。

pUCDEXLのサイズはおよそ7.7kbpであり、このうち挿入されたDNA断片約4.5kbpの中に目的とするデハロゲナーゼ遺伝子がコードされている。発現しているデハロゲナーゼが元株の*Burkholderia cepacia* KYと同一であるかどうかについては抗原抗体反応をおこなって確認する必要があるが、設備などの制限から確認できていない。しかしながら、*E.coli* JM109 (pUCDEXL)が発現しているデハロゲナーゼはDおよびL体の2-CPAの両異性体に作用すること、分子量的に*Burkholderia cepacia* KYのそれと同等であること、さらに*Burkholderia cepacia* KYは1種のデハロゲナーゼしか発現していないことから、KY株のそれと同一である可能性が高いものと考えられる。また*E.coli* JM109 (pUCDEXL)が産するデハロゲナーゼの反応様式をFig.2に示した。2-ハロ酸のD、L両異性体に作用してそれぞれL-2-及びD-2-ヒドロキシ酸を生成する反応を触媒する。

(2) *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の調製

E.coli JM109 (pUCDEXL)の培養には、アンピシリン0.01%、プロモ酢酸0.02%を無菌的に加えたLB培地を用いた。前培養にはプレートから選択した1コロニーをLB培地5mLに植菌し、対数増殖期が過ぎる時点まで37°Cにて振とうした。引き続きLB培地を500mL入れた2Lの羽根付き三角フラスコに、前培養した*E.coli* JM109 (pUCDEXL)を1mL植菌した。37°C、150rpmの条件下で20時間培養した後、菌懸濁液を4°C下での遠心分離(8,000rpm)により集菌、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)で3回洗浄後、目的に応じた菌体濃度になるように50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に再懸濁し、固定化に供した。

(3) 固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の調製

a) 寒天による固定化

寒天3gを蒸留水100mLに懸濁し、オートクレーブにより滅菌条件下で寒天を溶解した。50°Cになった時点で *E. coli* JM109 (pUCDEXL) 懸濁液12mLを添加し、およそ30秒間均一になるよう攪拌した後、トレーに流し込んで固化した。1×1×3mm角の直方体となるよう裁断し、これを緩衝液で洗浄して寒天固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) とした。

b) ポリビニルアルコール(PVA)による固定化

ポリビニルアルコール15gに対して蒸留水85mLを加え、オートクレーブにより滅菌条件下で溶解した。室温まで放冷した後、*E. coli* JM109 (pUCDEXL) 懸濁液50mlを添加し十分攪拌した。この懸濁液をトレーに移し、-20°Cにて冷凍した。24時間後、4°Cにて解凍したのち、1×1×3mm角の直方体となるよう裁断し、これを緩衝液で洗浄してPVA固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) とした。

c) アクリルアミドによる固定化

蒸留水25mLに対してアクリルアミドモノマー9.0g、N,N'-メチレンビスアクリルアミド0.5g、N,N,N',N'-テトラエチルエチレンジアミン0.3mLを加え、3.5%硫酸を用いてpHを7.5となるよう調整した。さらに蒸留水を加えて全量を28.5mLとし、*E. coli* JM109 (pUCDEXL) 懸濁液20mLを添加して攪拌した。予め調整しておいた2.5%ペルオキソニ硫酸カリウム1mLを加えた後、トレーに入れ室温で放置して固化させた。1×1×3mm角の直方体となるよう裁断し、これを緩衝液で洗浄してアクリルアミド固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) とした。

(4) デハロゲナーゼ活性と塩素イオンの定量

デハロゲナーゼ活性は、1分間に1μmolの塩素イオンを基質から遊離させる反応を触媒する酵素量を1U (unit)と定義した。遊離した塩素イオン濃度の測定はIwasakiら¹⁶⁾の方法を用いて行った。

(5) *E. coli* JM109 (pUCDEXL) への固定化法の適用

最終菌体濃度が10, 20, 30, 50 (mg/mL-担体)となるように、固定化菌体を作製した。これらの固定化菌体3mL分をそれぞれ100mL三角フラスコに分注した100mM Tris-H₂SO₄緩衝液(pH9.5)5mLの中に入れ、最終濃度が50mMとなるように2-CPA (pH7)を添加して、これを反応系とした。2-CPA添加後、直ちに各三角フラスコを30°C下に静置し、反応液中に遊離する塩素イオン濃度を経時的に測定した。なお、2-CPAを添加した時点を実験開始とした。

また、固定化後数時間という短い時間で担体外に菌体が漏れ出る可能性が考えられることから、担体から漏出した *E. coli* JM109 (pUCDEXL) により進行した脱ハロゲン反応について次のように測定した。ある時刻でサンプリングした溶液中の塩素イオンは、「固定化菌体」および「漏出した菌体」による脱ハロゲン化反応によるものと考えられる。サンプリング時には固定化菌体が混入することのないように極力留意したため、採取した溶液(固定化菌体から分離した状態)中でさらに進行した脱ハロゲン化反応は、担体から漏出した菌体あるいはデハロゲナーゼによるものであると定義し、それぞれによる脱ハロゲン化反応を比較することを試みた。すなわち、実験開始から2時間後に採取した各三角フラスコ中の溶液を、塩素イオン濃度を測定するとともにその溶液のみを30°C下に保温した。さらに1時間(実験開始後3時間)経過した時点でこの保温していた溶液中の塩素イオン濃度を改めて測定し、その濃度の増加分を実験開始から2時間以内に担体から漏出した菌により進行した脱ハロゲン反応とした。

なお、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)のみを各担体と混合して固定化をおこない、固定化菌体と置き換えたものを対照実験とした。

(6) *E. coli* JM109 (pUCDEXL) に対する固定化の効果

a) 固定化後の残存デハロゲナーゼ活性

一般に固定化の操作により生物活性が失われることが多い。ここでは担体として寒天およびアクリルアミドを用い、固定化後の残存デハロゲナーゼ活性を明らかにすることを目的として、次の実験を行った。すなわち、固定化直後に測定した各固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の脱ハロゲン比活性を固定化に供した菌体1mgあたりに換算し、固定化前の *E. coli* JM109 (pUCDEXL) が持つ脱ハロゲン比活性と比較した。

b) 固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の脱ハロゲン化反応に対する基質濃度の影響

最終菌体濃度が寒天では8mg/mL-担体、アクリルアミドでは45mg/mL-担体となるように固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を調製した。100mL三角フラスコに5mLずつ100mM Tris-H₂SO₄緩衝液(pH9.5)を分注しておき、調製した各固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を3mL分入れた。これに基質である2-CPAを最終濃度0, 1, 20, 50, 150mMとなるように添加して、これらを反応液とした。なお、2-CPAを添加した時点を実験開始とした。

また固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の代わりに、固定化していない *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を 5mg/mL となるように投入した系を対照として用意した。

これら各系において遊離する塩素イオン濃度を経時的に測定した。

c) 固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の活性に対する pH の影響

本 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) のデハロゲナーゼの最適 pH は 9 から 10 の範囲にあることが報告されている⁸⁾が、固定化により *E. coli* JM109 (pUCDEXL) のデハロゲナーゼ活性に与える影響について検討した。

反応系の緩衝液は pH によって次のものを選択した。pH4, 5 では 50mM 酢酸緩衝液を、pH6~9 では 50mM Bis-tris Propane を、pH10, 11 では 50mM CHES を用意した。

前述の方法で寒天およびアクリルアミド固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を調製し、非固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) も併せて各 pH における脱ハロゲン活性を測定した。なお、反応温度は 30°C とし、基質は 100mM 2-CPA とした。また、各緩衝液中に 2-CPA のみを添加したものを対照とした。

非固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) では反応開始 1 時間後から 2 時間後まで、固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) では反応開始 5 時間後から 6 時間後までの 1 時間に増加する塩素イオン濃度を測定して活性を算出することとした。これは固定化したものの脱ハロゲン化速度 (すなわち、活性) について予備実験を行ったところ、基質である 2-CPA が 100mM 以上であれば上記時刻で最大に近い活性を得ることができるという傾向が見られたため、このように条件を設定したものである。また、1 分間に 1 μ mol の塩素イオンを遊離する活性量を 1U と定義し、反応に用いた菌体量及び担体量から菌体 1mg 及び担体 1mL 当たりの活性量を算出して脱ハロゲン比活性を U/mg-菌体、U/mL-担体とそれぞれ定義した。非固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) 5mg、固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) 2mL をそれぞれ使用し、100mM Tris-H₂SO₄ 緩衝液 (pH9.5) それぞれ 1mL または 2mL 中で基質と反応させた。

d) 固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の活性に対する 反応温度の影響

反応温度として 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C に設定し、寒天固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) およびアクリルアミド固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を 100mM 2-CPA と反応させ、各温度における塩素イオ

ン濃度を測定した。温度を均一にするため、活性測定開始 1 時間前に各温度に設定したウォーターバス中に反応容器を静置した。また、非固定化菌体に対しては反応開始直後に各温度に設定したウォーターバス中に反応容器を静置し、塩素イオン濃度を測定した。なお、対照実験として 100mM Tris-H₂SO₄ 緩衝液 (pH9.5) に最終濃度 100mM となるように 2-CPA のみを添加したものを各温度に対して用意した。

e) 固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の活性持続性

本研究で *E. coli* JM109 (pUCDEXL) に固定化を適用する目的の一つに、その活性持続性の向上がある。本研究で用いた *E. coli* JM109 (pUCDEXL) は、利用対象のデハロゲナーゼ遺伝子はプラスミドに組み込んでおり、このプラスミドが脱落するなどして結果として活性が低下することが考えられる。生物学的には選択圧をかける、コピー数の多いプラスミドを使用するなどの方法が考えられるが、工学的な方法として固定化を適用することにより *E. coli* JM109 (pUCDEXL) の活性持続性に与える影響について明らかにすることを目的として次の実験をおこなった。

調製した寒天固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) およびアクリルアミド固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を 50mL ずつ、非固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を 250mg、それぞれ 500mL 三角フラスコに分注した 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 50mL 中に入れ、室温に静置した。これら三角フラスコ中の寒天固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL)、アクリルアミド固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL)、非固定化 *E. coli* JM109 (pUCDEXL) を経時的に採取し、(6c) の方法で、それぞれの脱ハロゲン比活性を測定した。

3. 結果と考察

(1) *E. coli* JM109 (pUCDEXL) への固定化法の適用

各担体当たりの菌体濃度を変化させた場合における、塩素イオン濃度の経時変化を Fig.3 に示す。ここで得られた塩素イオン濃度は、担体内の菌体による脱ハロゲン反応のみならず、担体から漏出した菌体による脱ハロゲン反応の両方によるものと考えられる。反応系全体の脱ハロゲン反応のうち、担体から漏出した菌体による脱ハロゲン反応の比率を Table1 に示した。これは実験開始 2 時間後から 3 時間後までの 1 時間に増加した単位体積 1 分間あたりの塩素イオン濃度から算出した。

固定化担体として寒天を用いた場合には、菌体濃

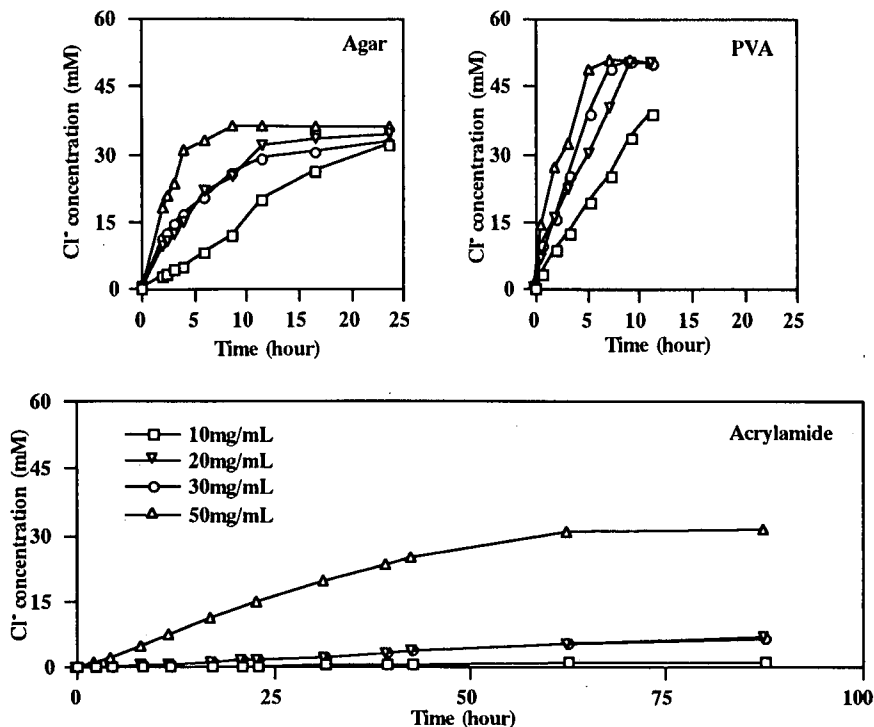


Fig.3 Dehalogenation of 50mM 2-CPA by immobilized *E.coli* JM109 (pUCDEXL). Agar, PVA and Acrylamide were used for immobilization.

Table 1 Dehalogenation by leaked cell after immobilization.

		Cell concentration (mg/mL)			
		10	20	30	50
Agar	A	0.011	0.019	0.033	0.058
	B	0.001	0.009	0.017	0.044
	B/A	0.09	0.47	0.52	0.76
PVA	A	0.052	0.089	0.121	0.071
	B	0.046	0.051	0.081	0.053
	B/A	0.88	0.57	0.67	0.75
Acrylamide	A	0.0003	0.002	0.002	0.009
	B	N.D	N.D	N.D	0.001
	B/A	—	—	—	0.1

A : Cl⁻ concentration in each reaction mixture (μmol/mL/min)

B : Dehalogenation by leaked cell (μmol/mL/min)

B/A : Ratio of dehalogenation catalyzed by leaked cell in reaction mixture (-)

度が 20mg/mL-担体以上で反応開始直後から脱ハロゲン反応が比較的速く進行していた。しかし、Table1 からわかるように固定化の際の菌体濃度が高くなるとともに、担体から漏出した菌体による脱ハロゲン反応の比率が高まっていることを考慮すると、担体内に保持される *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の量にはある程度の限界があることが伺える。PVA を担体として用いた場合には、菌体濃度として 20mg/mL の設定

においても実験開始から 10 時間後には塩素イオン濃度が 50mM に達していることから、ほぼ完全に基質である 2-CPA が分解・脱ハロゲン化されていた。また、50mg/mL の場合には実験開始から 5 時間で反応が進行していた。しかしながら、本実験で設定した設定した菌体濃度の範囲では、進行した脱ハロゲン反応のうち漏出した菌体によるものの比率が 60% を越えていることを Table1 は示している。これは *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の宿主である大腸菌はおよそ 1μm 程度であるが、PVA の細孔径が大きいことが想像される。従って *E.coli* JM109 (pUCDEXL) を担体内に長期間安定的に保持するという観点からは、PVA は固定化担体としては適さないことがわかった。

アクリルアミドの場合では、菌体濃度が 50mg/mL の場合で明らかな反応の進行が見られたものの、その速度は寒天および PVA の場合と比較してかなり遅く、実験開始から 70 時間経過してもその塩素イオン濃度はおよそ 30mM にとどまっていた。漏出した菌体による脱ハロゲン反応はほとんど見られないことを Table1 は示しており、Fig.4 で得られた塩素イオン濃度は担体内に保持されている *E.coli* JM109 (pUCDEXL) によるものであることがわかる。脱ハロゲン反応の進行が遅い理由の一つとして、固定化による生物活性の減少が考えられる。特にアクリルア

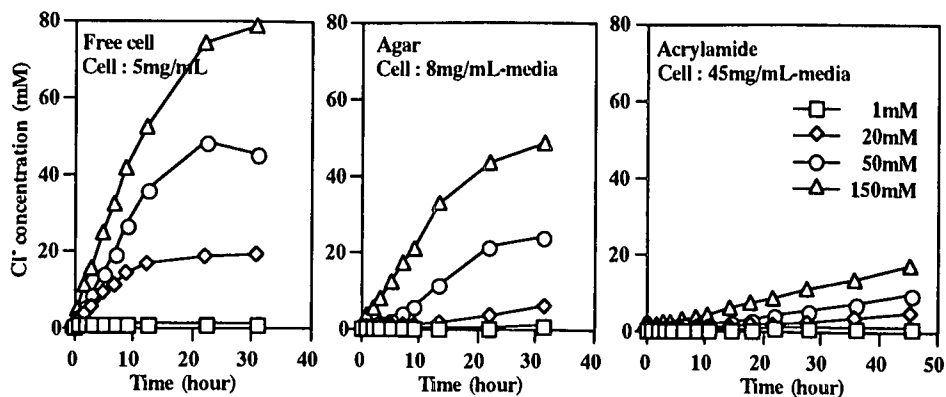


Fig.4 Difference of reaction velocity for dehalogenation by free and immobilized *E.coli* JM109 (pUCDEXL). 8 and 45mg/mL-media of the *E.coli* were immobilized with agar and acrylamide, respectively. 5mg/mL of free *E.coli* JM109(pUCDEXL) was applied to the reaction mixture. 2-CPA was used as a substrate. No reaction was occurred in the case of 0mM 2-CPA.

Table 2 Remaining dehalogenase activity after immobilization.

Material	Dehalogenase (U/mg-cell)	Remaining activity (%)
Free cell	8.4×10^{-3}	100
Agar	1.3×10^{-3}	16.0
Acrylamide	0.11×10^{-3}	1.3

ミドはその生物に対する毒性がマイナス面のひとつとして挙げられており、ここで検討した他の固定化担体と比較してその残存活性が少ないことが予想される。なお、予備実験では固定化の際の菌体濃度を45mg/mL-担体以上では一部に固まらない部分が認められた。

一般に遺伝子組換え微生物を環境工学的に応用する場合には、対象となる菌株の環境中への漏出が少ないことが望ましい。以上の結果から、*E.coli* JM109 (pUCDEXL)の固定化担体として寒天とポリアクリルアミドを選択した。また、寒天の場合は菌体濃度を8mg/mL-担体、ポリアクリルアミドの場合は菌体濃度を45mg/mL-担体に設定して固定化菌体を調製することとした。

(2) *E.coli* JM109 (pUCDEXL)に対する固定化の効果

a) 固定化後の残存デハロゲナーゼ活性

固定化の前後でのデハロゲナーゼ活性を、使用した*E.coli* JM109 (pUCDEXL)1mgあたりの活性に換算してまとめたものをTable2に示した。固定化に供した*E.coli* JM109 (pUCDEXL)のデハロゲナーゼ活性は 8.4×10^3 U/mg-cellであったのに対して、寒天を担体に用いた場合には活性残存率は16%、アクリルアミドの場合には1.3%となった。

寒天を用いて固定化する際に、50~55°Cに保温した寒天溶液に*E.coli* JM109 (pUCDEXL)懸濁液を添加している。*E.coli* JM109 (pUCDEXL)のデハロゲナーゼは熱に対してやや感受性があり、60°C下に10分間おかれた場合、その活性の約半分が失われることから、固定化操作条件が活性損失に与える影響が大きいものと考えられる。

アクリルアミドを用いた場合では、残存活性が1.3%と活性が大きく失われた。アクリルアミドによる固定化では*E.coli* JM109 (pUCDEXL)の担体からの漏出があまり認められないことがTable1で示されており、活性の消失はアクリルアミドモノマーなどの固定化試薬によるものであると考えられる。

b) 固定化*E.coli* JM109 (pUCDEXL)の脱ハロゲン化反応に対する基質濃度の影響

非固定化*E.coli* JM109 (pUCDEXL)、寒天およびアクリルアミドに固定化された*E.coli* JM109 (pUCDEXL)による2-CPAの脱ハロゲン化反応の経時変化をFig.4に示した。

固定化していない*E.coli* JM109 (pUCDEXL)では、基質濃度が20および50mMの場合にはおおむね24時間で塩素イオン濃度が設定された基質濃度とほぼ等しくなり定常に達していたことから、本実験で用いた*E.coli* JM109 (pUCDEXL)は十分な活性を有していた。寒天を用いた場合では、150mMでは比較的速やかに反応が進行したが、50mMあるいは20mMでは約10時間前後のラグが生じた。また、アクリルアミドではさらにそのラグは長く、48時間後においても反応はあまり進行しなかった。これは固定化による残存活性の低下とその回復だけではなく、担体への基質の浸透性も影響しているものと考えられる。2-CPA

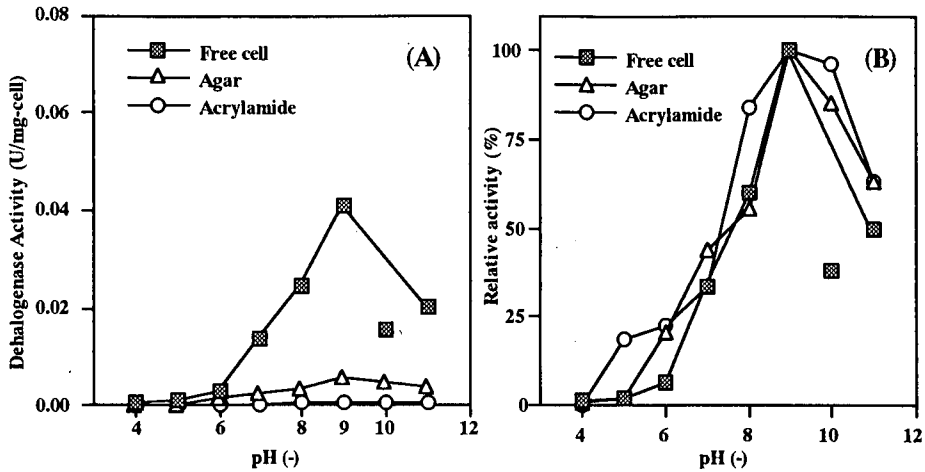


Fig.5 Effect of pH on dehalogenase activity. Dehalogenase activity (A) and Relative activity (B) are shown. Residual activities of free and immobilized with agar or acrylamide were 0.041(100%), 0.005(12.2%) and 0.0007(1.7%) (U/mg-cell) at 30°C and pH9, respectively. Activities at pH9 are expressed as 100% in figure (B).

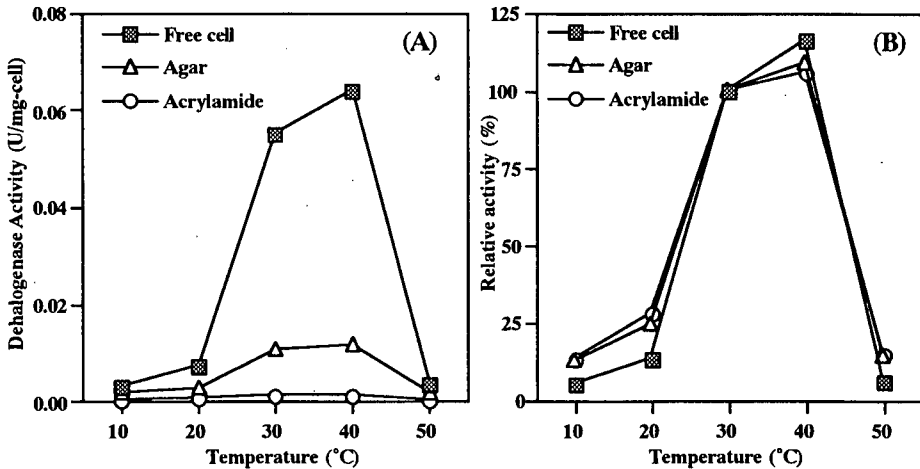


Fig.6 Effect of temperature on dehalogenase activity. Dehalogenase activity (A) and Relative activity (B) are shown. Residual activities of free and immobilized with agar or acrylamide were 0.055(100%), 0.01(18.1%) and 1.0×10^{-3} (1.8%) (U/mg-cell) at 30°C and pH9, respectively. Activities at 30°C are expressed as 100% in figure (B).

は比較的低分子であり、アクリルアミドでは包括された菌体も漏出しにくい、基質や反応生成物の移送もまた困難であることが考えられる。

c) 固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の活性に対する pH の影響

得られた結果を固定化に供した菌体湿重量あたりの活性で示したものを Fig.5(A)に、pH9におけるデハロゲナーゼ活性を 100%として、非固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) および固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の各 pH における相対活性を Fig.5(B)に示した。なお、非固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) に

ついては、pH10においてpH11の場合より活性が低下することは考えにくい。予備実験などではこのような例は見られなかったことから、図中には示したがプロットからはこの点を除外した。

絶対的な活性については固定化に供した菌体の活性0.041U/mg-cellに対してTable2で示した残存活性とほぼ同様であった。非固定化、固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) いずれにおいても pH9で最大活性が得られていた。精製デハロゲナーゼについても同様の傾向を示していることから、本デハロゲナーゼの活性は菌体内あるいは菌体が固定化されていても外界の pH に影響を受けていた。本実験条件下では寒天およ

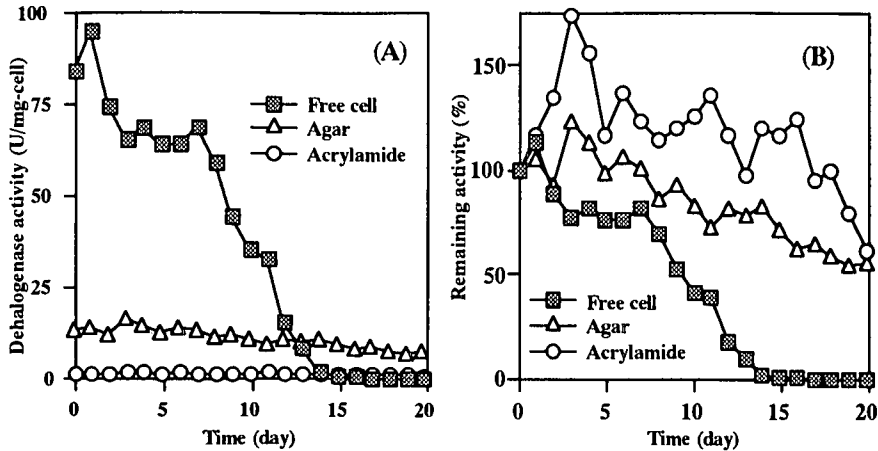


Fig.7 Remaining dehalogenase activities of free and immobilized *E.coli* JM109(pUCDEXL). Dehalogenase activity (A) and Remaining activity (B) are shown. Initial activities of free and immobilized with agar or acrylamide were 8.4×10^{-3} (100%), 1.3×10^{-3} (15.7%) and 0.1×10^{-3} (1.3%), respectively. Initial activities are expressed as 100% in figure (B).

びポリアクリルアミド中の溶液がそれぞれの緩衝液で十分置換されており、菌体あるいはデハロゲナーゼがゲル中に保持されていても活性はpHに依存していることがわかる。しかしながら Fig.5(B)に示されるように、最大活性を与えるpH9前後のpH8,10では、アクリルアミドの場合に最大活性に対する残存活性が他に比べ比較的高い傾向が見られた。

d) 固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の活性に対する反応温度の影響

固定化に供した菌体湿重量あたりの活性 (U/mg-cell) で示した結果を Fig.6(A)にまとめた。いずれの系においても 40°Cにおける活性が最も高かったが、本研究では 30°C・pH9 という条件を比較のための基準にしていることから、30°Cにおける活性を 100 として各温度における相対活性を Fig.6(B)に示した。非固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の相対活性の変化はデハロゲナーゼのそれに類似していた。また寒天あるいはアクリルアミドにより固定化した *E.coli* JM109 (pUCDEXL) でも、非固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) とほぼ同様の傾向を示していたが、本実験条件下では 10, 20 および 50°C においては、やや固定化された *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の方が温度に対する影響が少ない傾向があった。

微生物を固定化することにより高温での耐熱性が増すという報告¹⁷⁾もあるが、本実験の結果からは明確な差は得られなかった。

e) 固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の活性持続性

Fig.7(A) は固定化および非固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の活性の経日変化を、Fig.7(B) は実験開

始時の活性を 100% とした相対活性で表した。

・非固定化菌体の脱ハロゲン活性は 7 日間までは 75% 程度の活性を維持したものの、9 日間で半減し、14 日後にはほとんど消失した。これに対して、各固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) における脱ハロゲン活性は時間の経過と共にゆっくりと減少する傾向にあり、寒天においては 16 日間、アクリルアミドでは 19 日間かかって半減した。非固定化 *E.coli* JM109 (pUCDEXL) では脱ハロゲン活性がほぼ検出できなくなった 14 日後においても、寒天固定化菌体では約 8×10^{-2} (U/mL-担体)、ポリアクリルアミド固定化菌体では約 6×10^{-2} (U/mL-担体) の脱ハロゲン比活性を示していた。

これらの結果より、寒天による固定化により 7 日、アクリルアミドによる固定化では 10 日間、固定化を適用しない場合と比較して脱ハロゲン活性が半減するまでの期間を延長することができたことから、固定化の適用により脱ハロゲン活性の持続性が向上したことが示された。また、固定化時の活性の損失という点では寒天に比べアクリルアミドは担体として劣っているものの、固定化による *E.coli* JM109 (pUCDEXL) の活性の安定化という点では寒天より優れていることが分かった。固定化に供した菌体は予め培養したものであり、デハロゲナーゼが菌体内に蓄積された状態のものを固定化している。一方、静置条件下では菌体は休止菌体(菌体は生きているが、分裂などの活動はあまりしていない菌体)の状態にあるものと考えられる。非固定化菌体では固定化菌体よりも酸素の供給がされやすいことから酸素供給に

よる活性の低下も考えられるが、本条件下では固定化により菌体あるいはデハロゲナーゼが保持・保護されていることによる効果が卓越しているものと考えられる。

4. 結論

本研究では遺伝子組換え大腸菌に寒天・ポリビニルアルコール・アクリルアミドによる固定化を適用し、その効果について次の結果を得た。

- (1) 寒天、ポリビニルアルコール、アクリルアミドによる固定化を適用したところ、PVAでは菌体の漏出が目立った。残存活性の面では不利であったが、アクリルアミドによる固定化では菌体を高濃度かつ安定して保持することができた。
- (2) 基質濃度と固定化*E. coli* JM109 (pUCDEXL)の反応性については、寒天では反応開始から10時間程度のラグが生じた。アクリルアミドでは反応の進行が遅く、基質および反応生成物の透過性について考慮が必要である。
- (3) 固定化*E. coli* JM109 (pUCDEXL)の反応に対するpHと温度の影響については、最適pHが9・最適温度40°Cという値は変わらなかったが、pH8-10の領域で、また反応温度についても検討した範囲では固定化しなかった場合と比較してこれらの影響は受けにくくなる傾向が見られた。
- (4) 活性の持続性については、固定化した場合にその活性が持続する期間が長くなった。以上の結果から、遺伝子組換え大腸菌においても固定化法を適用することで、遺伝子組換え大腸菌が有する活性の低下を改善することができるものと考えられた。

参考文献

- 1) Jones, I., Primrose, S., Robinson, A. and Ellwood, D. : Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture, *Mol. Gen. Genet.*, 180, 3, 579-584, 1980.
- 2) Skogman, G., Nilsson, J. and Gustafsson, P. : The use of a partition locus to increase stability of tryptophan-operon-bearing plasmids in *Escherichia coli.*, *Gene*, 23, 2, 105-115, 1983.
- 3) Miller, C. and Cohen, S. : The partition (par) locus of pSC101 is an enhancer of plasmid incompatibility, *Mol. Microbiol.*, 9, 4, 695-702, 1993.
- 4) de Taxis du Poet, P., Dhulster, P., Barbotin, J. N. and Thomas, D. : Plasmid inheritability and biomass production: comparison between free and immobilized cell cultures of *Escherichia coli* BZ18(pTG201) without selection pressure, *J. Bacteriol.*, 165, 3, 871-877, 1986.
- 5) de Taxis du Poet, P., Arcand, Y., Bernier, R., Jr., Barbotin, J. N. and Thomas, D. : Plasmid stability in immobilized and free recombinant *Escherichia coli* JM105(pKK223-200): importance of oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 7, 1548-1555, 1987.
- 6) 橋本奨, 藤田正憲 : 固定化細菌による芳香族化合物含有廃水の処理に関する研究, 衛生工学研究論文集, 第25巻, 179-186, 1989.
- 7) Nasri, M., Sayadi, S., Barbotin, J. N., Dhulster, P. and Thomas, D. : Influence of immobilization on the stability of pTG201 recombinant plasmid in some strains of *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol*, 53, 4, 740-744, 1987.
- 8) Koshikawa, H., Ohkouchi, Y., Ozaki, H. and Terashima, Y. : Dehalogenation Catalyzed by Soil Bacteria Utilizing Organo Halide Herbicides, *Proc. of Environmental Engineering Research*, 32, 121-127, 1995.
- 9) Ohkouchi, Y., Koshikawa, H., Nishijima, M., Ozaki, H. and Terashima, Y. : Purification and Characterization of 2-Halo Acid Dehalogenase Produced by 2,4-D Degrading Strain, *Proc. of Environmental Engineering Research*, 33, 185-193, 1996.
- 10) Liu, J. Q., Kurihara, T., Hasan, A. K. M. Q., Nardi-dei, V., Koshikawa, H., Esaki, N. and Soda, K. : Purification and Characterization of Thermostable and Nonthermostable 2-Haloacid Dehalogenases with Different Stereospecificities from *Pseudomonas* sp. Strain YL, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 7, 2389-2393, 1994.
- 11) Motosugi, K., Esaki, N. and Soda, K. : Purification and properties of 2-halo acid dehalogenase from *Pseudomonas putida*, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 837-838, 1982.
- 12) Smith, J. M., Harrison, K. and Colby, J. : Purification and characterization of D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23., *J. Gen. Microbiol.*, 136, 881-886, 1990.
- 13) Motosugi, K., Esaki, N. and Soda, K. : Purification and properties of a new enzyme, DL-2-haloacid dehalogenase, from *Pseudomonas* sp., *J. Bacteriol.*, 150, 522-527, 1982.
- 14) Weightman, A. J., Weightman, A. L. and Slater, J. H. : Stereospecificity of 2-monochloropropionate dehalogenation by the two dehalogenases of *Pseudomonas putida* PP3: evidence for two different dehalogenation mechanisms., *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1755-1762, 1982.
- 15) Leigh, J. A., Skinner, A. J. and Cooper, R. A. : Partial purification, stereospecificity and stoichiometry of three dehalogenases from *Rhizobium* species., *FEMS Microbiol. Lett.*, 49, 353-356, 1988.
- 16) Iwasaki, I., Utsumi, S., Hagino, K. and Ozawa, T. : A new spectrophotometric method for the determination of small amounts of chloride using the mercuric thiocyanate method, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 29, 860-864, 1956.
- 17) Yamamoto, K., Tosa, T. and Chibata, I. : Continuous Production of L-Alanine Using *Pseudomonas dacunhae* Immobilized with Carrageenan, *Biotech. Bioeng.*, 22, 10, 2045-2054, 1980.

(1999.8.3 受付)

APPLICATION OF IMMOBILIZATION TO *E. COLI* CARRYING RECOMBINANT PLASMID CODING DEHALOGENASE GENE

Hiramoto KOSHIKAWA, Naoko INOUE, Yumiko OHKOUCHI and Yutaka TERASHIMA

In this study, application of immobilization of *E. coli* JM109 (pUCDEXL) introduced recombinant plasmid DNA coding 2-halo acid dehalogenase gene from *Burkholderia cepacia* KY and its effect on the microbial activity were discussed. *E. coli* JM109 (pUCDEXL) was immobilized with agar, polyvinyl alcohol and acrylamide. The activity was comparatively higher, but some leakage of *E. coli* JM109 (pUCDEXL) was found in case with polyvinyl alcohol. Although the remaining activity was rather lower after immobilization, the cell was sufficiently held in acrylamide. Immobilization was effective in the reaction at pH8~10. Dehalogenase activity in immobilized *E. coli* JM109 (pUCDEXL) sustained longer than free cell. These results suggested the possibility that immobilization could improve stability of genetically engineered microorganisms for bioremediation.