

(21) 2,4-D 分解菌の生産するデハロゲナーゼの精製と特性

Purification and Characterization of 2-Halo Acid Dehalogenase Produced by 2,4-D Degrading Strain

大河内由美子*, 越川博元*, 西嶋真幸*, 尾崎博明*, 寺島泰*

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

ABSTRACT; From the standpoint of improving biological wastewater treatments by biochemical and genetic methods, the biodegradation and dehalogenation of haloaromatic pollutants were investigated. The crude enzyme extracted from 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetate) degrading strain was effective for the dehalogenation of 2-halo acid, especially 2-Chloropropionate(DL-2-CPA). Based on the activity staining of this crude enzyme extract, it was found that only one dehalogenase was produced in this 2,4-D degrading strain.¹⁾ The 2-halo acid dehalogenase was purified using FPLC, and it exhibited maximum activity at 45-50°C and pH 9-10, respectively. This enzyme had a molecular weight of 68.5kDa and appeared to be composed of two identical subunits of 34kDa. Enzymatic activity of this dehalogenase was only detected with 2-halo acid which had carbons less than three, such as Bromoacetate, Iodoacetate, 2,3-Dichloropropionate, DL-2-CPA, but no dehalogenation was detected for haloaromatic substrates, such as 2,4-D or MCPA(4-Chloro-2-methylphenoxyacetate).

KEYWORDS; 2,4-D, DL-2-CPA, dehalogenation, dehalogenase, purification, characterization

1. はじめに

近年、環境汚染性の非生物物質が生活の進化にともない多量に生産・消費されており、従来からの野生型微生物の天与の分解能を利用した生物処理手法のみで対応することは困難になってきている。本研究ではその解決法の一つとして、遺伝子クローニング技術の応用による微生物の基質分解領域・分解活性面からの改良・育種を行い、最終的には廃水処理をはじめとした環境浄化技術へと発展させることを目的としている。

本研究ではこうした難分解性物質の一例として、芳香族ハロゲン化合物である 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)や 4-クロロ-2-メチルフェノキシ酢酸(MCPA)を対象として取り上げている。これらのフェノキシ酢酸系農薬は、水田等で除草剤として広く使用されていることから環境中における残留が問題となっており、従来より 2,4-D を分解する土壌微生物が報告されている²⁾が、2,4-D から 2,4-ジクロロフェノールへの変換を触媒する 2,4-D モノオキシゲナーゼ³⁾や、さらに 2,4-ジクロロフェノールを 3,5-ジクロロカテコールに変換する 2,4-ジクロロフェノール ヒドロキシラーゼに着目した研究⁴⁾がほとんどであり、生化学的視点にとどまっているのが現状である。そこで本研究では 2,4-D の無害化という観点から、無害化に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。著者らはこれまでに、2,4-D および MCPA を唯一の炭素源として分解・資化可能な菌株を土壤中より単離し、これら単離菌株による基質分解にともない脱ハロゲン反応が起こっていることを確認している。また、各菌株の休止菌体と抽出した粗酵素液による 2 種の 2-ハロ酸 (モノクロロ酢酸、DL-2-クロロプロピオン酸 (DL-2-CPA)) からの脱ハロゲンが確認されたことから、脱ハロゲンが酵素反動的に起こっていること、さらに活性染色の手法を用いることにより、2-CPA に対して最も高い活性を示した 2,4-D 分解菌の菌体内では、1 種類のみ 2-ハロ酸デハロゲナーゼが発現していることも確認・報告している¹⁾。なお、2,4-D、MCPA および 2-CPA の各分子構造を Fig.1 に示す。

*京都大学大学院工学研究科環境工学専攻(Dept. of Environ. Eng., Kyoto University)

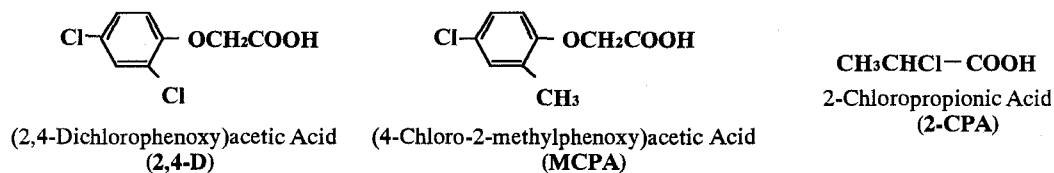


Fig. 1 The Structures of Chlorinated Substrates

これらの知見に基づき、2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングを行うための基礎、さらには菌体・酵素の廃水処理への応用可能性といった両観点から、本研究では2,4-D分解菌で発現している2-ハロ酸デハロゲナーゼに着目して酵素の精製を行うとともに、その基本的な酵素特性を調べることで2-ハロ酸デハロゲナーゼ活性の最適条件を決定し、廃水処理システムへの応用可能性に関する基礎的知見を得ることとした。

2. 2,4-D分解菌の特徴

土壌より単離した2,4-D分解菌は好気条件下で白色コロニーを形成し、グラム染色試験および検鏡の結果からグラム陰性の桿菌であることがわかった。さらに DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)による同定の結果、単離した2,4-D分解菌は *Burkholderia cepacia* に属し、運動性を有することがわかった。

3. 実験材料の調製および実験方法

3.1 粗酵素液の調製方法

前述の2,4-D分解菌をジャーファーメンター(20L)を用いて、30℃で36時間程度培養した。使用した培地の組成をTable 1に示す。この培養により得られた菌体(湿重量14g)を、0.02%2-メルカプトエタノール(酵素の酸化防止剤)と1mM EDTA(プロテアーゼ阻害剤)を添加した50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁した後、超音波破碎を行った。過剰な温度上昇による酵素の失活を防ぐため、超音波破碎中は菌懸濁液を氷水中において冷却し、30秒ごとにスイッチのon/offを繰り返した。破碎後、酵素溶液中に存在する細胞膜等の不溶画分を除去するため、100,000gで30分遠心分離を行った。さらに上清を透析チューブに集め、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に対して10,000倍になるように透析を行った。ここで、1分間に1μmolの塩素イオンを放出する反応を触媒する酵素量を1Uと定義するとともに、タンパク質1mgあたりの酵素量を比活性(Specific activity; U/mg)と表すことにし、比活性0.025U/mgの粗酵素液、約25mLを得た。

Table 1. The Composition of Culture Medium
(pH : 7.0)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	%
KH_2PO_4	0.1	%
Na_2HPO_4	0.1	%
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01	%
2,4-D	0.1	%

3.2 2-ハロ酸デハロゲナーゼの精製

本研究が最終的な目標としている遺伝子クローニング技術の応用による新しい廃水処理システムの構築には、有用な酵素の探索と共に、その酵素の遺伝情報をコードしている遺伝子に関する情報を得ることが不可欠である。また組換え菌株による処理のみならず、クローン株を利用して酵素の大量生産を行い、固定化等の手段により酵素そのものを利用した処理システムも可能であるため、有用な酵素の特性を調べておくことが必要であり、また酵素タンパク質のアミノ酸配列から遺伝子に関する情報を得ることができる。しかし、粗酵素液中には多数の夾雑タンパク質が共存し、その相互作用による影響を無視することができない。そこで、本研究では良好な活性が確認されている2-ハロ酸デハロゲナーゼに焦点を当て、その精製を行った。

3.1 で調製した粗酵素液中の 2-ハロ酸デハロゲナーゼの精製を以下の手順で試みた。精製には各段階で必要なカラムを装着した FPLC(Pharmacia Biotech)を使用し、タンパク質の検出は UV モニター(波長 280nm)で行った。また、酵素の失活を最小限に抑えるため、カラムクロマト後の各フラクションは氷水により低温に保って操作を行った。各操作で使用する 50mM リン酸緩衝液には酵素の酸化防止剤として 0.02% 2-メルカプトエタノールを、プロテアーゼ阻害剤として EDTA を 1mM 添加している。

また以降の精製の各ステップで用いたリン酸緩衝液の pH はすべて 7.5 である。今回使用したカラムは以下の 4 種類である。

- 1) DEAE-TOYOPEARL (弱イオン交換クロマトグラフィー)
- 2) BUTYL-TOYOPEARL (疎水クロマトグラフィー)
- 3) MonoQ (強陰イオン交換クロマトグラフィー)
- 4) Superdex 75 HR (ゲルろ過クロマトグラフィー)

1)、3) のイオン交換ではリン酸緩衝液の塩濃度を、2) の疎水クロマトでは硫酸アンモニウムにより同じく塩濃度を変化させて目的タンパクの分離を行い、4) のゲルろ過ではタンパク質の分子量による分離を行った。また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⁵⁾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⁶⁾に従い、SDS-PAGE(SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)を行うことで、目的タンパク質の精製・濃縮の度合いを視覚的に確認した。アクリルアミドゲル濃度は 12.5%とし、泳動後のゲルを Coomassie brilliant blue により染色した後、バックグラウンドの脱色を行い、ゲルを乾燥させた。なお、分子量スタンダードとして SDS-PAGE スタンダード(Low)(BIO-RAD)を使用した。ここではサンプルとしてゲルろ過クロマトグラフィー後のサンプルに加えて、各精製段階におけるサンプルも同時にアプライした。アプライしたタンパク質量は各レーンにつき、5 μ g である。

3.3 2-ハロ酸デハロゲナーゼの分子量測定

3.3.1 ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過はタンパク質分子等をその大きさによって分離する方法であり、未変性のタンパク質の分子量測定に適している。カラムには Superdex 75 HR 10/30(Pharmacia Biotech, 10mm $\times$ 300mm)を、分子量スタンダードとして Molecular Weight MARKER PROTEINS(HPLC)(Oriental Yeast CO.,LTD)を使用し、スタンダードのタンパク質溶出位置をもとに、精製を進めた 2-ハロ酸デハロゲナーゼの分子量を決定した。

3.3.2 SDS-PAGE

Laemmli 法⁶⁾に従い、精製酵素の構成サブユニットの解析・分子量の決定に広く利用されている SDS-PAGE を 3-1 と同様の手法で行い、スタンダードタンパク質とデハロゲナーゼの泳動距離をもとに分子量を決定した。

3.4 ハロ酸デハロゲナーゼ活性の温度特性評価方法

酵素反応も一般的な化学反応同様、温度上昇と共に Arrhenius の式に従って反応速度が増大する。しかし、ある温度以上ではタンパク質が熱変性により失活するため、こうした 2 つの現象の重なり合った結果として存在する、上記のデハロゲナーゼの至適温度を求めた。50mM リン酸緩衝液中の酵素を 20、30、40、45、50、55、60、70 $^{\circ}$ C の各温度に設定したウォーターバス中で 25mM DL-2-CPA と反応させ、3M H₂SO₄ で反応を停止させた後、反応液中に遊離した塩素イオンを Iwasaki らの方法⁵⁾により測定した。反応は 100mM Tris/H₂SO₄ (pH9.5) 中で行い、反応時間は 10 分とした。なお以下の実験で用いた各反応溶液中の酵素量は 0.004U である。

3.5 ハロ酸デハロゲナーゼの熱安定性評価方法

酵素タンパク質はある温度以上では熱変性により触媒作用を失うため、本デハロゲナーゼが触媒作用を持つ安定

な温度範囲について調べた。50mM リン酸緩衝液(pH7.5)中の酵素を各温度に設定したウォーターバス中で10分間保温し、その後再び氷上に戻した。このように熱処理を行った酵素液を25mM DL-2-CPAと30℃で10分間反応させ、3M H₂SO₄を加えて反応停止させた後、遊離した塩素イオン濃度を測定した。コントロールとして熱処理を行っていない酵素液による反応を行った。

3.6 ハロ酸デハロゲナーゼのpH特性評価方法

酵素はpHにより活性基や基質の解離状態、活性基を含む活性中心の微細な立体構造が変化し、その触媒作用に大きな影響を受けるため、本デハロゲナーゼが最大の触媒作用を示すpH(至適pH)を求めた。各反応は50mM Bis-tris Propane(pH 6-9.5)、50mM CHES(pH 9-10.0)、50mM CAPS(pH 10-11)中⁷⁾で行った。酵素を各pHの緩衝液中で25mM DL-2-CPAと30℃、10分間反応させ、3M H₂SO₄で酵素反応を停止させた後、遊離した塩素イオン濃度を測定した。また各緩衝液によるバックグラウンドの差が無視できないため、あらかじめ3M H₂SO₄で失活させた酵素についても同様の操作を行い、コントロールとして用いた。

3.7 ハロ酸デハロゲナーゼの基質特異性

直鎖の2-ハロ酸を中心に、2,4-D分解において代謝物となりうる芳香族有機塩素化合物を対象として、各基質に対するデハロゲナーゼ活性を調べた。各基質濃度は25mMに統一し、反応温度は30℃、反応時間は10分とした。先に述べたように3M H₂SO₄で酵素反応を停止させた後、反応液中に遊離した塩素イオン濃度を測定した。また各基質により炭素-ハロゲン結合の強弱が異なりバックグラウンドの差が生じるため、3M H₂SO₄であらかじめ酵素活性を失活させたサンプルをコントロールとして用いた。

3.8 粗酵素液による芳香環開裂反応の測定方法

粗酵素液を用いた基質特異性の結果(結果は示さず)から、本デハロゲナーゼは炭素数3までの2-ハロ酸に特異的に作用することが予想された。この結果から、*Burkholderia cepacia*による2,4-D分解過程での脱ハロゲン反応は、一連の酵素反応により2,4-Dが芳香環開裂を受け、低分子量化が進んでから起こっていると考えられる。そこで、本研究ではこれらの酵素反応中でも特に重要な役割を果たしていると考えられる芳香環開裂反応に着目して、その活性を確認した。

3.1で述べた方法により調製した粗酵素液を用いて、Meerらの方法⁹⁾によりカテコール1,2-ジオキシゲナーゼ活性を測定した。反応は50mM リン酸緩衝液(pH7.5)中、4-クロロカテコールを基質として基質濃度500μM、室温(23-25℃)で行った。酵素液の添加により反応を開始し、*cis,cis*-クロロムコン酸の生成の経時変化を $\lambda=260\text{nm}$ における吸光度の増加により測定した。

4. 結果と考察

4.1 2-ハロ酸デハロゲナーゼの精製

精製の結果をTable 2に示す。全活性が35.1U、全タンパク質量が1388mg、比活性0.025U/mgの粗酵素液を出発材料として、6ステップのクロマトグラフィーを行った結果、比活性19.4U/mgの最終標品を得た。収率は2.1%と非常に低い結果であったが、約780倍という高い精製倍率を得た。この一因として、この2,4-D分解菌で発現しているデハロゲナーゼが非常に少量であることが考えられる。

またSDS-PAGE後のゲルをFig.2に示す。精製の段階が進むにつれ、多数存在していたタンパク質のバンドが減少していくと共に、デハロゲナーゼが濃縮されていく様子が分かる。今回得られたゲルろ過クロマトグラフィー後のサンプルではデハロゲナーゼのバンドの下側にもう一つバンドが見えていることから、少なくとも1種類の夾雑タンパク質が残存しているものと考えられる。

Table 2 Purification of 2-Haloacid Dehalogenase

*S.A.: specific activity

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	*S.A. (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	35.1	1388	0.025	1	100
DEAE-TOYOPEARL (1st)	23.4	173.6	0.135	5.4	66.7
DEAE-TOYOPEARL (2nd)	23.1	70.0	0.330	13.2	65.8
BUTYL-TOYOPEARL	8.62	0.912	9.45	378	24.6
Mono Q (1st)					
Mono Q (2nd)					
Superdex 75 HR	0.722	0.0372	19.4	776	2.1

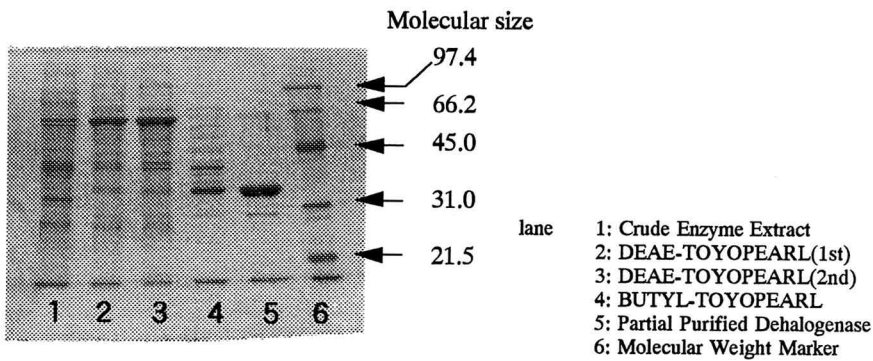


Fig.2 SDS-PAGE of 2-Halo Acid Dehalogenase containing Fractions during Purification (Applied 5 μ g of protein at each lane)

4.2 2-ハロ酸デハロゲナーゼの分子量測定

まずゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量を測定した結果を Fig.3 に、SDS-PAGE による分子量測定の結果を Fig.4 に示す。ゲルろ過クロマトグラフィー測定による native なタンパク質の分子量は 68,500Da であった。

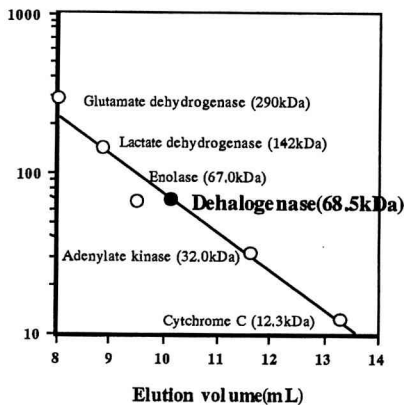


Fig. 3 M.W. Determination by Superdex 75 Column

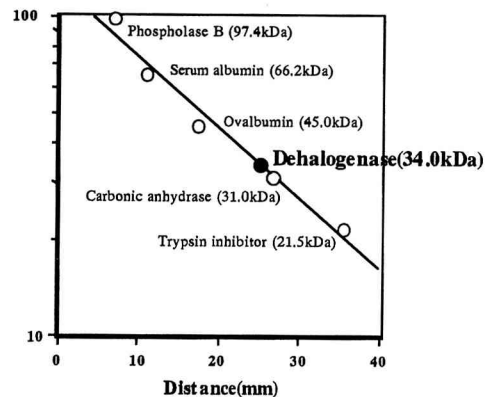


Fig. 4 M.W. Determination by SDS-PAGE

一方、SDS-PAGE による分子量は 34,000Da という結果が得られた。両者の結果から、この 2-ハロ酸デハロゲナーゼは分子量 34,000Da のサブユニット 2 つで構成されるホモダイマーであると考えられる。

なお、これまで報告されている L-2-ハロ酸デハロゲナーゼには、*Pseudomonas putida* No.109 の生産する H-109⁹⁾や *Pseudomonas* sp. YL の L-DEX⁷⁾など、25,000~28,000Da のサブユニットで構成される酵素が多いとされている¹⁰⁾が、今回精製を行った *Burkholderia cepacia* 由来の 2-ハロ酸デハロゲナーゼは、分子量的には *Pseudomonas* sp. 113 が生産する DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ(68,000Da, 34,000Da*2)と高い類似性を示す¹¹⁾。

4.3 ハロ酸デハロゲナーゼ活性の温度特性

結果を Fig.5 に示す。最も活性の高かった 45℃ を 100 として、各温度における相対活性で表している。このデハロゲナーゼは 45-50℃ 付近で最も高い活性を示すが、55℃ 以上では急激にその活性が落ちることがわかった。

4.4 ハロ酸デハロゲナーゼの熱安定性

結果を Fig.6 に示す。熱処理を行っていないコントロールの活性を 100 として、それぞれの残存活性で表している。このデハロゲナーゼは 40℃、10 分の熱処理まではほぼ 100%活性が残存しているが、それ以上の温度では直線的に活性が減少し、60℃、10 分の熱処理により約 50%の活性が失われることがわかった。この結果から、本デハロゲナーゼは 50℃の熱処理により約 25%の活性が失われたにも関わらず、5-1 の結果では 50℃付近で最大活性を示している理由として、酵素が反応液中で基質と結合して酵素-基質複合体を形成することで酵素の触媒部位が保護され、酵素の反応速度が熱変性による失活速度を上回っている可能性が考えられる。これらの結果から廃水処理に酵素を応用する場合には至適温度付近での反応が望ましいが、一般的な廃水の中低温付近では活性を最大限に引き出す代わりに熱による失活もほとんど無いといえる。

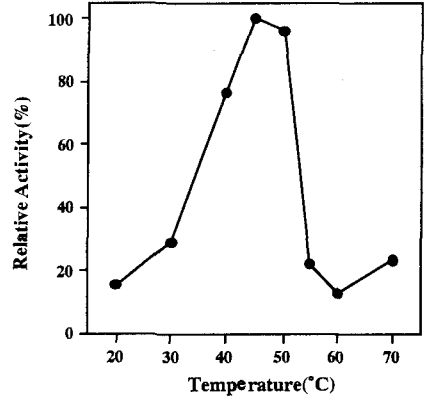


Fig. 5 Effect of temperature on the dehalogenase activity

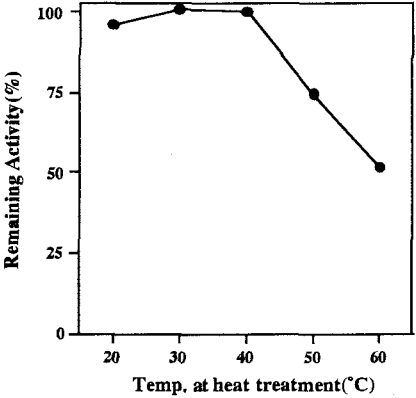


Fig. 6 Thermostability of the dehalogenase

4.5 ハロ酸デハロゲナーゼの pH 特性

結果を Fig.7 に示す。pH 9-10 に至適 pH が存在していると考えられる。従来から報告されている 2-ハロ酸デハロゲナーゼの至適 pH も pH 9-10.5 の範囲に存在しているものがほとんどである。また pH 9 以下では急激に活性が低下した。

4.6 ハロ酸デハロゲナーゼの基質特異性

結果を Table 3 に示す。DL-2-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。炭素鎖 2 のモノハロ酢酸に関しては基質に対してよく作用する順に Br>I>Cl となっている。

モノクロロ酢酸よりプロモ酢酸やヨード酢酸において反応が進む理由として、炭素-ハロゲン結合の強さが関係していると考えられる。ジクロロ酢酸にはほとんど作用しなかった。

炭素鎖3のクロロプロピオン酸類では2-クロロプロピオン酸>2,3-ジクロロプロピオン酸>2,2-ジクロロプロピオン酸の順で反応が進んだ。2,2-ジクロロプロピオン酸で反応が進みにくい理由として、炭素数が一つ少ないジクロロ酢酸にもほとんど作用していないことから、 α 炭素に塩素原子が2つ結合した基質はその立体構造ないしは分子サイズゆえに、酵素の触媒部位に近づきにくい、あるいは結合部位に結合できないのではないかと予想される。

さらに炭素鎖4の2-クロロ酪酸になると、急激にその活性が低下していることから、この2-ハロ酸デハロゲナーゼは長鎖のハロ酸に対しては作用しないものと考えられる。ここで、一般的には基質の炭素鎖と反応速度の関係が、ハロ酢酸>ハロプロピオン酸>ハロ酪酸の順になる2-ハロ酸デハロゲナーゼが多いと報告されているが、本デハロゲナーゼはハロプロピオン酸を最もよい基質とすると考えられる。一方、芳香族ハロゲン化合物に対する活性は全く検出されず、本デハロゲナーゼは直鎖の2-ハロ酸に特異的に作用する酵素であると考えられる。

4.7 粗酵素液による芳香環開裂反応

結果をFig.8に示す。開始後15分まで A_{260} が直線的に増大し、クロロカテコールから cis,cis -クロロムコン酸への変換が起こっていることが示された。この結果から、2,4-D分解菌から抽出した粗酵素液中には芳香環開裂反応を触媒する酵素、カテコール1,2-ジオキシゲナーゼが存在しており、2,4-Dが直鎖の低分子量ハロゲン化合物に変換された後に脱ハロゲン反応が起こることが示唆された。従来報告されている2,4-D分解菌についてもこの経路により分解するとされている¹²⁾が、フェノールや安息香酸に代表される芳香族汚染物質の分解経路中でもこの酵素が重要な役割を果たしている例が多い^{13,14)}。さらに、精製したデハロゲナーゼが芳香族ハロゲン化合物に直接作用できない点とを考慮して、組換え菌を構築する際にはデハロゲナーゼ遺伝子とジオキシゲナーゼ遺伝子を同時に導入することで、2,4-D分解能の強化に加えて各種芳香族化合物を対象とする分解能の多様化を図ることが可能になると考えられる。

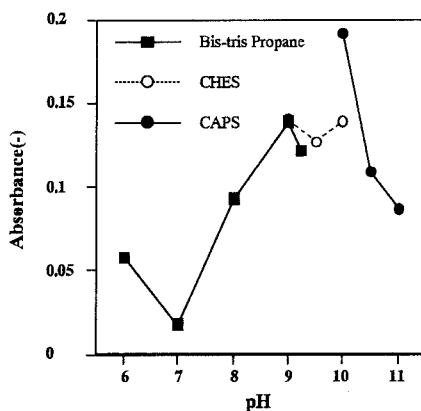


Fig. 7 Effect of pH on the dehalogenase activity

Table 3. Substrate specificity

Substrate	Relative activity(%)
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

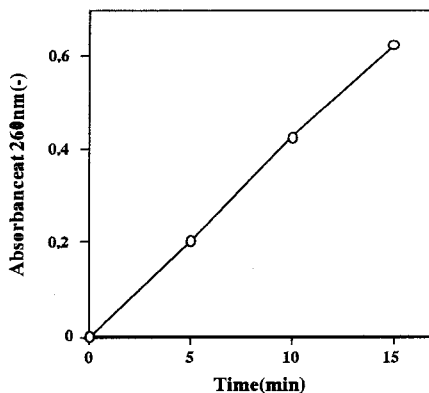


Fig. 8 Assay for Catechol 1,2-Dioxygenase

5. 結論

本研究では、除草剤 2,4-D を唯一の炭素源・エネルギー源として分解・資化可能な微生物、*Burkholderia cepacia* から抽出した粗酵素液を出発材料として、2,4-D の無害化に重要な役割を果たす脱ハロゲン反応に着目して反応を触媒する酵素（デハロゲナーゼ）の精製を行い、デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングに際しても有効となる遺伝子情報を得ることも可能になった。また精製酵素の基本的な性質を調べ、廃水処理現場への酵素的応用の可能性をも考慮した。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) 4 種のカラムを用いて 2-ハロ酸デハロゲナーゼの精製を試み、夾雑タンパク質が 1 種類存在するものの、ほぼ精製することができた。
- (2) 精製した 2-ハロ酸デハロゲナーゼの分子量を測定した結果、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ることが分かった。
- (3) 精製した酵素を用いて、本 2-ハロ酸デハロゲナーゼの基本的特性を調べた結果を以下に列挙する。
 - 至適温度 : 45-50°C で最大活性を示した。
 - 熱安定性 : 40°C、10 分の熱処理まで安定な活性を示した。
 - 至適 pH : pH 9-10 の範囲で最大活性を示した。
 - 基質特異性 : プロモ酢酸、ヨード酢酸、DL-2-CPA、2,3-ジクロロプロピオン酸といった炭素数 3 までの 2-ハロ酸に対して特異的に作用した。芳香族ハロゲン化合物には全く作用しなかった。
- (4) 粗酵素液による 4-クロロカテコールからクロロムコン酸への変換が確認された。この結果から、本粗酵素液中にはカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼが存在し、2,4-D が芳香環開裂を受けて低分子量化されてから脱ハロゲン反応が起こっている可能性が示唆された。

単離した 2,4-D 分解菌、*Burkholderia cepacia* の生産するデハロゲナーゼは高い精製倍率からもわかるように、菌体内での発現量が非常に少ないと考えられるため、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。今回得られた精製酵素のアミノ酸配列から作成したプローブを基に、2-ハロ酸デハロゲナーゼ遺伝子のクローニングを行うことが可能になる。さらに、2,4-D 分解は一連の酵素反応により行われていることから、他の重要な役割を果たす酵素、本研究で取り上げた一例として芳香環開裂反応を触媒する酵素に着目し、この遺伝子を組換え菌に同時に導入し発現させることができれば、2,4-D 分解能を強化することができるうえ、さらには複数の難分解性芳香族汚染物質が共存する混合廃水系においても威力を発揮することが予想できる。

しかし、その一方では導入した遺伝子の安定した発現や他の微生物集団との共存系下における挙動・活性発現等、重要な検討課題が残されるため、従来からの活性汚泥法等に関する種々の知見との融合により、新しい廃水処理システムの構築が可能になると考えられる。

6. 参考文献

- 1) 越川博元ら、土壌から単離した除草剤分解菌による脱塩素反応、環境工学研究論文集, vol.32, 121-127, 1995
- 2) R.P.Fisher *et al.*, Isolation and Characterization of the Pesticide-Degrading Plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*, J. Bacteriol., **135**, 798-804, 1978
- 3) W.R.Streber *et al.*, Analysis, Cloning and High-Level Expression of 2,4-Dichlorophenoxyacetate Monooxygenase Gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134, J. Bacteriol., **169**, 2950-2955, 1987
- 4) B.Kaphammer *et al.*, Cloning and Characterization of *tfdS*, the Repressor-Activator Gene of *tfdB*, from the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Catabolic Plasmid pJP4, J. Bacteriol., **172**, 5856-5862, 1990
- 5) I.Iwasaki *et al.*, A New Spectrophotometric Method for the Determination of Small Amounts of Chloride Using the Mercuric Thiocyanate Method, Bull. Chem. Soc. Japan, vol.29, **6**, 860-864, 1956
- 6) 日本生物工学会編(1992) 生物工学実験書, 培風館, 東京

- 7) Ji-Quan Liu *et al.*, Purification and Characterization of Thermostable and Nonthermostable 2-Haloacid dehalogenases with Different Stereospecificities from *Pseudomonas* sp. Strain YL, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.60, 7: 2389-2393, 1994
- 8) J.R.Meer *et al.*, Sequence Analysis of the *Pseudomonas* sp. Strain P51 *tcb* Gene Cluster, Which Encodes Metabolism of Chlorinated Catechols: Evidence for Specialization of Catechol 1,2-Dioxygenases for Chlorinated Substrates, *J. Bacteriol.*, 173, 2425-2434, 1991
- 9) H.Kawasaki *et al.*, Cloning and Sequence Analysis of a Plasmid-encoded 2-Haloacid Dehalogenase Gene from *Pseudomonas putida* No.109, *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 160-163, 1994
- 10) Dick B.Janssen *et al.*, Genetics and Biochemistry of Dehalogenating Enzymes, *Annu. Rev. Microbiol.*, 48: 163-191, 1994
- 11) K.Motosugi *et al.*, Purification and Properties of a New Enzyme, DL-2-haloacid Dehalogenase, from *Pseudomonas* sp., *J. Bacteriol.* 150, 522-527, 1982
- 12) G.R.Chaudhry *et al.*, Isolation and Characterization of a New Plasmid from a *Flavobacterium* sp. Which Carries the Gene for Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetate, *J. Bacteriol.* 170, 3897-3902, 1988
- 13) 土木学会 衛生工学委員会編(1993) 環境微生物工学研究法, 技報堂出版, 東京
- 14) R.N.Patel *et al.*, Catechol 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: Purification and Properties, *J. Bacteriol.* 127, 536-544, 1976