

フタル酸ジエステル資化性菌とそれが生産する  
フタル酸モノエステル加水分解酵素の性質

平成二十七年 度

岩 田 眞 人

## 目 次

### 序論 研究の背景と目的

1 節 研究の背景	1
1. フタル酸エステル類	
2. 既知のフタル酸エステル類の分解細菌と分解酵素	
2 節 本研究の目的と概要	5

### 第 1 章 フタル酸ジエステル資化性菌の単離とその性質

1.1 節 緒言	7
1.2 節 実験材料及び操作	7
1.2.1. 試料と試薬	
1.2.2. 単離方法	
1.2.3. 単離した細菌の同定	
1.3 節 実験結果	10
1.3.1. DEHP 資化性菌の単離と同定	
1.3.2. 単離した DEHP 資化性菌の形態と性質	
1.4 節 考察	15
1.5 節 要約	16

### 第 2 章 フタル酸ジエステル資化性菌 2 株の生産する mono-2-ethyl-hexyl phthalate (MEHP) 加水分解酵素の性質

2.1 節 緒言	17
2.2 節 実験材料及び操作	17
2.2.1. MEHP 加水分解酵素の活性測定法	
2.2.2. BCA™ protein assay kit を用いたタンパク質濃度の測定	
2.2.3. 無細胞抽出液の調整法	
2.2.4. 各種カラムクロマトグラフィーによる MEHP 加水分解酵素の精製法	
2.2.5. 精製酵素と限定分解ペプチドの N 末端アミノ酸配列の決定	
2.2.6. MEHP 加水分解酵素の塩基配列の決定	

2.3 節	実験結果	28
2.3.1.	MEHP 加水分解酵素の精製とその性質	
2.3.2.	MehpH の一次構造	
2.4 節	考察	42
2.5 節	要約	43
第 3 章	変異 EG-5 MehpH の活性への影響	
3.1 節	緒言	44
3.2 節	実験材料及び操作	44
3.2.1.	EG-5 MehpH の大腸菌発現系の構築	
3.2.2.	MEHP 加水分解酵素遺伝子への変異導入	
3.2.3.	野生型および変異型 MEHP 加水分解酵素の大腸菌発現と精製	
3.2.4.	各種基質を用いた活性測定法	
3.3 節	実験結果	49
3.3.1.	野生型および変異型 EG-5 MehpH の大腸菌発現と精製	
3.3.2.	基質 1-ナフチル酢酸と 1-ナフチル酪酸に対する加水分解活性	
3.3.3.	野生型および変異型 EG-5 MehpH の MEHP に対する $K_m$ と $V_{max}$ の比較	
3.4 節	考察	51
3.5 節	要約	52
考察		53
要約		56
参考文献		58
本論文に関係のある論文		63
謝辞		64

## 序論 研究の背景と目的

### 第1節 研究の背景

#### 1. フタル酸エステル類

フタル酸ジエステル類は、プラスチック製品の生産時に可塑剤として大量に用いられるだけでなく、接着剤、塗料、ボール紙、化粧品などの製造時に添加剤としても使用され、工業的に重要な有機合成化合物である。塩ビ工業・環境協会のHP ([http://www.vec.gr.jp/anzen/anzen2\\_2.html](http://www.vec.gr.jp/anzen/anzen2_2.html)) によれば、2014年の日本での年間生産量は約20万トンで、その約6割を di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) が占め、diisononyl phthalate が続いている。これらのフタル酸ジエステル類は、プラスチック樹脂などの分子間に入り込み、樹脂分子同志を遠ざけ、滑らせることで樹脂に柔軟性を付与し、加工を容易にする。フタル酸ジエステル類は、樹脂の分子とは共有結合しておらず、製品から容易に溶け出すが、難分解性の化合物であるため環境中に蓄積する (Bao et al, 2015)。そのため、フタル酸ジエステル類の生産工場、樹脂製品の製造工場だけでなく、多くの調査された環境で、フタル酸ジエステル類による汚染が見られる。

フタル酸ジエステル類およびそのエステル結合の一つが加水分解されたフタル酸モノエステル類の生物への影響として、内分泌攪乱作用と腫瘍誘発作用が懸念されている。環境庁（当時）が1998年にとりまとめた「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」では、「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」にフタル酸エステル類では DEHP、butyl benzyl phthalate、dibutyl phthalate、dicyclohexyl phthalate、diethyl phthalate、dipentyl phthalate、dihexyl phthalate、dipropyl phthalate の8物質が、「優先してリスク評価に取り組むべき物質」に、DEHP、dibutyl phthalate、dicyclohexyl phthalate の3物質が含まれていた。その後のメダカとラットを用いた試験と評価（表0-1）では、上記のフタル酸エステル類は全て、「（ヒト推定暴露量を考慮した比較的low濃度での）明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった」とされたものの、これら動物の内分泌に影響を与えることが示唆された。その後の研究、報告によれば、ラットを含むげっ歯類に対しては、フタル酸エステル類による肝腫瘍誘発、生殖器の発生異常と精巣毒性が明らかとされている (Foster, 2006)。一方、げっ歯類の腫瘍誘発にはペルオキシソーム増殖が重要な役割を果たしていると考えられており、この現象がサルなどの霊長類では見られなかったことから、

表 0-1 環境省が実施したメダカとラットに対する試験結果

物質名	メダカのライフサイクル試験等結果	ラットの 1 世代試験結果
DEHP	明らかな内分泌攪乱作用とは言えないが、内分泌攪乱作用に関連する所見が認められた。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
dibutyl phthalate	内分泌攪乱作用と関連する所見および、関連のない所見が認められたが、明らかな内分泌攪乱作用とは言えなかった。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
dicyclohexyl phthalate	内分泌攪乱作用と関連する所見および、関連のない所見が認められたが、明らかな内分泌攪乱作用とは言えなかった。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられるものと意義については今後の検討課題とするものがあつた。
butyl benzyl phthalate	内分泌攪乱作用とは関連のない所見が認められた。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。
diethyl phthalate	内分泌攪乱作用とは関連のない所見が認められた。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
dipropyl phthalate	内分泌攪乱作用とは関連のない所見が認められた。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられるものと意義については今後の検討課題とするものがあつた。
dipentyl phthalate	内分泌攪乱作用とは関連のない所見が認められた。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
dihexyl phthalate	内分泌攪乱作用とは関連のない所見が認められた。	影響が既に認められている用量未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられるものと意義については今後の検討課題とするものがあつた。

SPEED'98 取組の成果 (<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/pamph.pdf>) より抜粋。

2000 年に IARC (International Agency for Research on Cancer, 国際がん研究機関) は、DEHP の発がん性分類を Group 2B (ヒトに対して発がん性のある可能性がある) から Group 3 (ヒトに対する発がん性について分類できない) へ変更した。しかし 2010 年頃、マウスの DEHP による発がんにおけるペルオキシソーム増殖の重要性に疑問を呈する報告が複数あり (Guyton et al., 2009; Ren et al., 2010)、2011 年に IARC は DEHP の分類を再び Group 2B に戻した。このように、フタル酸エステル類のヒトへの腫瘍誘発作用については未だ評価が確定していない。

また、ヒトに対する生殖・発生毒性の懸念も払拭されておらず、フタル酸エステル類への暴露が、精子の質低下 (Matsumoto et al., 2008)、胎児の生殖器発生への悪影響 (Swan, 2008)、胎盤の必須脂肪酸代謝への影響 (Xu et al.,

2005)、ステロイドホルモン濃度への影響 (Adibi et al., 2010) などを引き起こすとの報告がある。さらに、小児の多動性注意欠陥障害 (ADHD) と関連する発達神経毒性 (Chopra et al., 2014)、ぜんそくやアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患 (Jaakkola and Knight 2008) との関連性なども指摘されている。

## 2. 既報のフタル酸エステル類の分解細菌と分解酵素

前節で述べたことから、フタル酸エステル類の分解細菌とその分解酵素が関心を集めている。

現在 (2015 年 10 月) までに、フタル酸ジエステル類およびフタル酸モノエステル類の資化能、分解能を持つ細菌として報告されたものを表 0-2 にまとめている。

表 0-2 フタル酸エステル類の資化能または分解能を持つと報告のある細菌

門	細菌名	文献
<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> S-1	Kurane et al., 1984
	<i>Micrococcus</i> sp. YGJ1	Akita et al., 2001; Maruyama et al., 2005
	<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B	Eaton, 2001
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Hara et al., 2010
	<i>Rhodococcus</i> sp. JDC-11	Jin et al., 2010
	<i>Gordonia</i> sp. strain QH-11	Jin et al., 2012
<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-1	Xu et al., 2005
	<i>Enterobacter</i> sp. T5	Fang et al., 2010
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Liao et al., 2010
	<i>Acinetobacter</i> sp. strain M673	Wu et al., 2013
	<i>Sphingobium</i> sp. TJ	Jin et al., 2013
	<i>Camelimonas</i> sp. M11	Wu et al., 2015
	<i>Achromobacter</i> sp. W-1	Jin et al., 2015
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i> No.66	Quan et al., 2005
	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332	Zhang et al. 2014
	<i>Bacillus</i> sp. K91	Ding et al., 2015
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Liao et al., 2010

このように、主に土壌から分離された *Actinomycetes* 門（放線菌門）、*Proteobacteria* 門、*Firmicutes* 門にまたがる多種の細菌がフタル酸エステル類を資化、分解すると報告されている。しかし、フタル酸エステル類の分解酵素の特徴づけ、あるいは遺伝子が同定されているものは限られている。表 0-3 には既報のフタル酸エステル類分解酵素の特徴についてまとめている。これらは、フタル酸エステル類のエステル結合を加水分解する活性を持っている。*Rhodococcus erythropolis* S-1 では、単一の phthalate ester hydrolase（遺伝子未同定）が DEHP を含むフタル酸ジエステル類の 2 個のエステル結合を加水分解し、phthalate を生じる（Kurane et al., 1984）。*Bacillus* sp. K91 の CarEW（accession No.AIZ00845）も、単一の酵素で diisobutyl phthalate を monobutyl phthalate へ、さらに phthalate まで分解する活性を持つと報告されている（Ding et al., 2015）。しかし、CarEW の diisobutyl phthalate、monobutyl phthalate に対する  $K_m$  値はそれぞれ 1.6 M、76 mM と非常に高く、生理的に機能しない可能性がある。その他の細菌では、まずフタル酸ジエステルのエステル結合の一つが加水分解され、その産物のフタル酸モノエステルをフタル酸にさらに加水分解する分解経路を持ち、それぞれの加水分解過程で異なる酵素が機能する。*Micrococcus* sp. YGJ1 では、1 個の dialkyl phthalate esterase と 2 個の monoalkyl phthalate esterase (E1、E2) の特徴づけがされているが、遺伝子は全て未同定である（Akita et al., 2001; Maruyama et al., 2005）。*Acinetobacter* sp. strain M673 と *Sulfobacillus acidophilus* DSM 10332 では、dialkyl phthalate esterase の特徴づけと遺伝子同定（それぞれ AFK31309 と AEW03609）がされているが、*S. acidophilus* の酵素 EstS1 のフタル酸ジエステル類に対する  $K_m$  値、 $V_{max}$  値は不明である（Wu et al., 2013; Zhang et al., 2014）。一方、*Rhodococcus jostii* RHA1 の PatE（WP\_011599104.1）は、詳細な特徴づけはされていないが、PatE 遺伝子を発現させた大腸菌破碎液がフタル酸モノエステル類を分解したことから monoalkyl phthalate esterase 活性を持つと推定され、N 末端配列が *Micrococcus* sp. の E1 と E2 のそれらと 20 残基中 14 残基一致している（Hara et al., 2010）。また *Arthrobacter keyseri* 12B の PehA（AAK16532.1）は、フタル酸ジエステル類を切断せず、アミノ酸配列レベルで *R. jostii* の PatE に 80% の相同性を示すことから、PatE と同様に monoalkyl phthalate esterase 活性を持つと推定される（Eaton, 2001）。

以上のように、フタル酸エステル類の加水分解酵素に関する知見は徐々に増加しつつあるが、未だに不明なことは多い。特に、フタル酸モノエステル類の加水分解酵素では、詳細な酵素化学的特徴づけがなされ、かつ遺伝子が同定さ

れたものは、この研究を始めた 2005 年の時点のみならず、2015 年 10 月時点でも極めて少ない。

## 第 2 節 本研究の目的と概要

本研究では、新たなフタル酸ジエステル類を効率よく分解する細菌とフタル酸エステル類加水分解酵素の取得およびその特徴の解明を目指し、第 1 章では、金属の研磨油に汚染された土壌から DEHP 資化性細菌を 2 株単離した。得られた細菌の特徴を明らかにし、さらに、系統発生的分類により、異なる属に分類されることを示した。第 2 章では、両菌株が、いずれも DEHP 代謝中間体と考えられる mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) の加水分解酵素 (MehpH) を持つことを明らかにした。また、MehpH をそれぞれの菌株から精製し、その酵素化学的特徴づけを行った。さらに、両菌株の Meh pH をコードする遺伝子の取得を行い、一次構造の特徴を解析した。特に、セリン加水分解酵素の活性中心残基のセリン周辺の pentapeptide motif (G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G) が両菌株の Meh pH に保存されていること、その X<sub>2</sub> 残基が他のセリン加水分解酵素ではすべて疎水性残基であるのに対して、塩基性残基のアルギニンであることを明らかにした。第 3 章では、X<sub>2</sub> 残基を疎水性残基に変異させた組換え Meh pH を大腸菌で発現させ、その特徴を調べた。結果の詳細、考察、要約について以下に記述する。



表 0-3 既報のフタル酸エステル類加水分解酵素の特徴

細菌名	酵素	酵素の分子質量/ サブユニットの分子質量/構成	基質(複数ある場合は最も活性が高いもの)	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu mol/min/mg$ )	$k_{cat}$ (/s)	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} mM^{-1}$ )	文献、備考
<i>Rhodococcus erythropolis</i> S-1	phthalate ester hydrolase / lipase	15 kDa	DEHP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Kurane et al., 1984
<i>Bacillus</i> sp. K91	CarEW	54 kDa	diisobutyl phthalate	$1615 \times 10^3$	N.D.	166	0.11	Ding et al., 2015
			monoisobutyl phthalate	$76 \times 10^3$	N.D.	2.3	0.03	Ding et al., 2015
<i>Micrococcus</i> sp. YGJ1	dialkyl phthalate esterase	56 kDa/ monomer	dipropyl phthalate	980	54	N.D.	52	Akita et al., 2001
	monoalkyl phthalate esterase E1	60 kDa/ 23 kDa / dimer	monobutyl phthalate	$1.7 \times 10^3$	40	N.D.	24	Maruyama et al., 2005. 両酵素は N 末端 20 aa が一致。
	monoalkyl phthalate esterase E2	60 kDa/ 23 kDa / dimer	monobutyl phthalate	$2.7 \times 10^3$	50	N.D.	18	
<i>Acinetobacter</i> sp. strain M673	dibutyl phthalate hydrolase	41 kDa / monomer	dibutyl phthalate	754*	N.D.	7.6	10	Wu et al., 2013
<i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM10332	dialkyl phthalate esterase EstS1	34 kDa / monomer	<i>p</i> -nitrophenyl butyrate	180	2440	1218	6770	Zhang et al. 2014 フタル酸ジエステルに対する分解活性測定はバッチで行い、TLCで観察しており、特異性定数不明。
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PatE	23 kDa (SDS-PAGE)	monoalkyl phthalate	精製した酵素の活性値は不明。PatE を発現させた大腸菌の crude extract での分解活性( $\mu mol/min/mg$ ): monomethyl PTH 15; monobutyl PTH 15; monohexyl PTH 10; mono-(2-ethylhexyl) PTH 9.2				Hara et al., 2010. <i>Micrococcus</i> sp. YGJ1 の monoalkyl phthalate esterase の N 末端に相同性 (14/20 aa)
<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B	PehA	24 kDa	酵素化学的特徴付けはされていない。PehA を発現させた大腸菌は dimethyl-, diethyl-, dibutyl phthalate を切断しなかった。				Eaton, 2001 PatE に 80%の相同性	

N.D., not determined; \*文献に記載の値は 0.754  $\mu M$  だが、活性測定時の基質濃度が 1.0–10 mM であるため、こちらが正しいと思われる。

## 第1章 フタル酸ジエステル資化性菌の単離とその性質

### 1.1 節 緒言

フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) を初めとするフタル酸エステル類は難分解性物質である。特に長鎖の側鎖を持つ DEHP を効率よく分解できる微生物は稀である。1997 年に倉根隆一郎によって DEHP 分解菌 *Rhodococcus erythropolis* S-1 の報告がされた (Kurane, 1997)。本菌は DEHP をフタル酸に加水分解する酵素を細胞外に分泌し、フタル酸を菌体内に取り込むことがすでに報告されている。著者らはさらに効率よく DEHP を分解する微生物を見出し、単離することを目的に研究を開始した。その結果を以下に記す。

### 1.2 節 実験材料及び操作

#### 1.2.1. 試料と試薬

- (1) 崇城大学 (熊本市) 周辺の五箇所から採取した土壌を試料とした。  
それぞれの試料土壌を No.1、No.2、No.3、No.4、No.5 と名付けた。
- (2) 使用試薬 : di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) (和光純薬)

#### 1.2.2. 単離方法

採取した土壌を精製水で懸濁後、上澄みをさらに精製水で 100 倍希釈し、DEHP を超音波で懸濁した M9 培地にそれぞれ 2% 植菌後、30℃で振盪培養した。

表 1-1 M9 培地組成 pH 7.0

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.0 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g/l
NaCl	0.5 g/l
100 mM CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O*	1.0 ml
1 M MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O*	1.0 ml
Oligoelement solution**	培地量の 1%

500 ml 容三角フラスコに 200 ml  
121℃で 15 min オートクレーブ  
して使用

\* : フィルター滅菌済みのものを  
オートクレーブ後に左記  
の割合で添加

\*\* : 別にオートクレーブした  
ものを、左記の割合で添加

表 1-2 Oligoelement solution 組成	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.0 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	2.0 g/l
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.0 g/l
Na-citrate	0.5 g/l
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1 g/l
K <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O	0.1 g/l

### 1.2.3. 単離した細菌の同定

#### 1.2.3.1. 染色体 DNA の抽出

ISOPLANT kit (ニッポンジーン) を使用した。

- (1) 単離した細菌の培養液 1 mL を 1.5 mL マイクロチューブに取り、10,000 rpm、1 min 遠心後、上澄みを除いた。
- (2) Solution I を 300  $\mu$ L 加え、Vortex mixer で完全に懸濁した。
- (3) Solution II を 150  $\mu$ L 加え、約 30 秒 Vortex した。
- (4) 50°C、15 min インキュベートした。その途中で一回、約 30 秒 Vortex を行った。
- (5) 数秒間 Vortex した後、Solution III を 150  $\mu$ L 加え、再度数秒 Vortex した。
- (6) 氷上で 15 min インキュベートした。
- (7) 12,000 rpm、15 min、4°C 遠心した。
- (8) 水相を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、エタノール 1 mL を加え、転倒混和した。
- (9) 10,000 rpm、5 min、4°C 遠心後、上清を除いた。
- (10) 70 %エタノール 1 mL を加え、数回転倒混和した。
- (11) 10,000 rpm、5 min、4°C 遠心後、上清を除いた。
- (12) 減圧乾燥を 5 min 行い、TE 緩衝液を 50  $\mu$ L 加え、タッピングで DNA を溶解させた。

### 1.2.3.2. 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

真正細菌の 16S rDNA の内部領域 1.4～1.5 kbp を増幅する以下のプライマーセットと KOD -plus- DNA Polymerase (TOYOBO) を使用した。

プライマーセット

6F: 5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3' (Tchelet et al., 1999)

1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3' (Lane, 1991)

(1) 0.2 mL マイクロチューブ内で以下の試薬を混合した。

染色体 DNA 溶液	10 $\mu$ L
10×KOD -plus- buffer	5 $\mu$ L
2 mM dNTP mix	5 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ L
5 pmol/ $\mu$ L 6F primer	2 $\mu$ L
5 pmol/ $\mu$ L 1492R primer	2 $\mu$ L
1 U/ $\mu$ L KOD -plus-	1 $\mu$ L
滅菌水	23 $\mu$ L

(2) サーマルサイクラーを用いて以下の条件で PCR 増幅を行った。

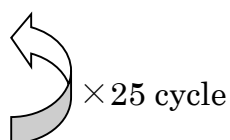
94°C, 2 min

94°C, 15 sec

60°C, 30 sec

68°C, 1 min 30 sec

4°C,  $\infty$



(3) 増幅をアガロースゲル電気泳動で確認し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製を行った。

### 1.2.3.3. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定

上記の条件で、PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子をプラスミドベクター pBluescript II KS+ (Agilent Technologies) (EcoRV 処理済み) にライゲーションし、大腸菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を形質転換した。形質転換株からプ

ラスミドを抽出し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と ABI 3130xl Genetic Analyzer（共に ThermoFisher Scientific）を使用し、クローニングされた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 1.2.3.4. 相同性検索

単離菌を同定するための相同性検索は、blastn プログラムを用い nr/nt データベースを対象に行った。この際、「Uncultured/environmental sample sequences」は対象から除外した。

### 1.3 節 実験結果

#### 1.3.1. DEHP 資化性菌の単離と同定

##### 1.3.1.1. DEHP 資化性菌の単離

試料土壌 No.1 を種とする培養で、培養 20 日目に DEHP が肉眼で見られなくなり、同時に培養液も白濁した。顕微鏡観察の結果、菌の増殖が観察された。なお、No.1 以外の試料では目視による DEHP の分解も、培養液の白濁も見られなかった。そこで、NB 寒天培地に培養液を塗布し、25℃で数日間培養し、増殖して来たコロニーを採取した。これらコロニーの DEHP 資化能を調べるため、M9 寒天培地に爪楊枝でスポットし、その上に DEHP の油滴を載せ、コロニーの形成を観察した。その結果、増殖したコロニーを再び NB 寒天培地に塗布し、そこで形成された形態の異なるコロニー 2 種類をそれぞれ P8219 株と EG-5 株と命名した。

##### 1.3.1.2. DEHP 資化性菌の 16S rRNA 遺伝子と同定

単離した P8219 株および EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。得られたそれぞれ 1457 bp および 1441 bp の配列は、accession No.AB054838 および LC094141 で DDBJ/GenBank/EMBL データベースに登録された。これらの配列を用いて相同性検索を行った結果を表 1-3、1-4 に示した。

表 1-3 P8219 株の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性検索結果（上位 10 エントリー）

Description*	Max score	Identity (%)	Accession No.
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	2686	99.93	AY278367
<i>Gordonia</i> sp. MN 110a	2676	99.86	AJ313023
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> strain Kd2	2673	99.73	NR_026500
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> strain W8488	2669	100	HM195274
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> strain G1	2667	99.93	DQ154925
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> strain W8560	2665	99.93	HM195275
<i>Gordonia</i> sp. 091-07	2665	99.93	EF680936
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2	2663	99.66	NR_074523
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> strain W9085	2663	99.93	HM195278
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	2663	99.66	AF416719

\*“16S ribosomal RNA gene”の記述は削除している。

表 1-4 EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性検索結果（上位 10 エントリー）

Description*	Max score	Identity (%)	Accession No.
<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain CCM 4851	2662	100	KT265744
<i>Rhodococcus</i> sp. SPO17	2662	100	KR007616
<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain IHBB 9860	2662	100	KR085921
<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain IHBB 11158	2662	100	KR085867
<i>Rhodococcus jialingiae</i> strain IHBB 11065	2662	100	KR085866
<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain BG43	2662	100	CP011295
<i>Rhodococcus</i> sp. K5	2662	100	KF790905
<i>Rhodococcus</i> sp. D40	2662	100	KF479663
<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain G20	2662	100	EU070938
<i>Rhodococcus erythropolis</i> EK5	2662	100	AJ237967

\*“16S ribosomal RNA gene”の記述は削除している。

P8219 株の配列では、スコアの上位 10 エントリー全てが *Gordonia* 属細菌で、そのうち 8 エントリーが *Gordonia polyisoprenivorans* であった。このことから、P8219 株は *G. polyisoprenivorans* に近縁の *Gordonia* 属細菌と考えられた。そこで本菌株を *Gordonia* sp. P8219 と呼ぶことにした。

一方、EG-5 株の配列では、スコアの上位 10 エントリーは同スコアで、そのうち 3 エントリーずつが *Rhodococcus qingshengii* と *Rhodococcus erythropolis* であった。このことから、EG-5 株を *Rhodococcus* sp. EG-5 とした。

### 1.3.2. 単離した DEHP 資化性菌の形態と性質

#### 1.3.2.1. *Gordonia* sp. P8219 の性質

分離したコロニーは、濡れた滑らかな泥のような形状で、薄いベージュ、であり、培養後期になると、オレンジ色、表面が粗く、乾燥した状態に変わった。本菌は、DEHP を唯一の炭素源として増殖でき、グラム陽性、好気性、非運動性のグラム陽性菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であった。

*Gordonia polyisoprenivorans* の文献 (Linosa et al., 1999) に従って、Yeast Nitrogen base を基本培地とした各種の炭素源に関する資化性実験を行った (表 1-5)。その結果、フタル酸・アスパラギン酸・プロリン・グルコン酸・コハク酸ナトリウムの 5 項目に関して明らかに文献の報告とは異なる結果が得られた。フタル酸の資化能について、*G. polyisoprenivorans* には、その資化能があるのに対し、P8219 株はなかった。この結果は、フタル酸エステルを菌体外酵素によって分解し、生じたフタル酸とアルコールを資化して増殖することができないことを示唆している。以上の結果を総合して、P8219 株は *Gordonia* sp. の新規の株であると考えられた。

顕微鏡による観察の結果、図 1-1 に示すように P8219 株は培養の極めて初期から DEHP の油滴の内部または表面に吸着していることが分かった。また、培地水分中には細胞が観察されなかったことから、特殊な細胞膜構造をしていることが考えられる。細胞形態の特徴として、培養初期は V 字型の桿菌で、培養後期は短桿菌、さらに球菌へと変化する多形性桿菌であった。

表 1-5 P8219 株の炭素源資化性実験結果

No.	サンプル名	測定結果						文献(※1)	相同性
		1	2	3	平均値	実値	結果		
1	ブランク	0.061	0.002	0.031	0.031				
2	ブランク	0.42	0.47	0.51	0.47	0			
3	ラムノース	1.2	1.0	1.1	1.1	0.63	◎	+	◎
4	フタル酸	0.07	0.04	0.04	0.052	0	×	+	×
5	L-バリン	0.82	0.71	0.67	0.74	0.27	◎	+	◎
6	アラビノース	1.8	1.3	1.1	1.2	0.70	◎	+	◎
7	p-アミノ安息香酸	0.09	0.09	0.15	0.11	0	×	—	◎
8	DL ロイシン	0.41	0.30	0.55	0.42	0	×	—	◎
9	グルコン酸	0.70	1.0	0.78	0.83	0.36	◎	ND	
10	アスパラギン酸	0.77	0.47	0.42	0.44	0	×	+	×
11	プロリン	0.33	0.31	0.32	0.32	0	×	+	×
12	アラニン	0.36	0.37	0.48	0.40	0	×	—	◎
13	4-ヒドロキシ安息香酸	0.22	0.20	0.33	0.25	0	×	+	×
14	クエン酸 3 カリウム	0.99	1.0	0.96	0.99	0.52	◎	+	◎
15	コハク酸ナトリウム	1.1	0.89		0.98	0.51	◎	—	×
16	グルコース	1.1	1.7	1.1	1.1	0.61	◎	ND	
17	スクロース	0.94	0.95	0.96	0.95	0.48	◎	++	◎

※ 結果は、最終値が 0 以上のものを◎、0 以下のものを×とした。

※ 相同性に関しては、実験結果と文献を比較して一致するものを◎、一致しないものを×と記した。

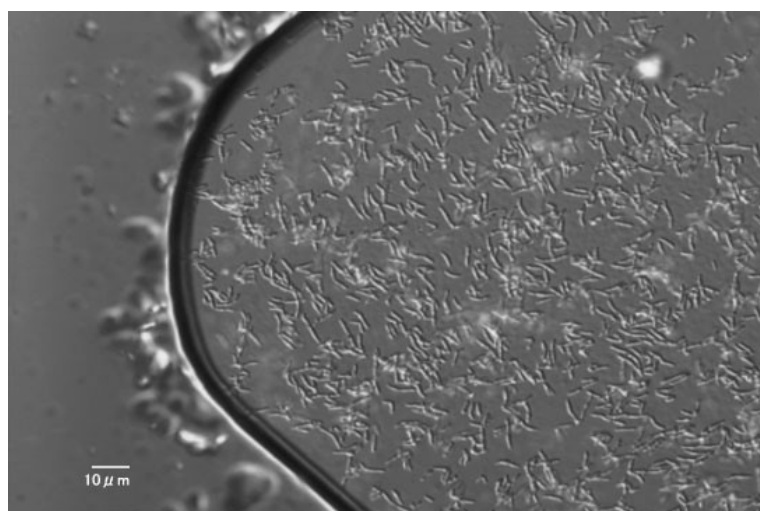


図 1-1 DEHP を単一炭素源にした時の顕微鏡写真



### 1.3.2.2. *Rhodococcus* EG-5 株の性質

分離したコロニーは、乾いた粗い形状で、薄い赤色であり、培養時期によって形状に大きな変化はなかった。P8219 株と同じように、DEHP を唯一の炭素源として増殖でき、好気性、非運動性のグラム陽性菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、細胞形態も P8219 株と同様、培養初期は V 字型の桿菌で、培養後期は短桿菌、さらに球菌へと変化する多形性桿菌であった。

### 1.3.2.3. P8219 株と EG-5 株による DEHP の分解

それぞれの株を無機塩培地である M9 培地に 2% 植菌し、その後 DEHP を約 1.5 ml 添加し、25℃ で回転振盪培養した。その時間的变化を図にしたのが下記の図 1-2 である。細胞の濃度は培養液からタンパク質を抽出し、タンパク質濃度で表し、DEHP の残存量は酢酸エチルで抽出後、メタノールに転溶し HPLC で定量した。

P8219 株の場合、培養の初期に培地表面に浮いていた DEHP の油滴が培養の進行に従って白濁し、培養液中に複数の塊となって浮遊するようになった。この塊は振とうによって簡単に分割できた。培養終了時には、この白い塊は消え、培養液全体が濁り、普通の細菌の培養液のようになった。培養途中の白濁の塊を顕微鏡で観察したのが図 1-1 で、既に述べたように、細胞が DEHP の油滴の内部または表面に吸着している状態であることが分かった。培養中の P8219 株の増殖と DEHP の培地からの消失を図 1-2 に示す。

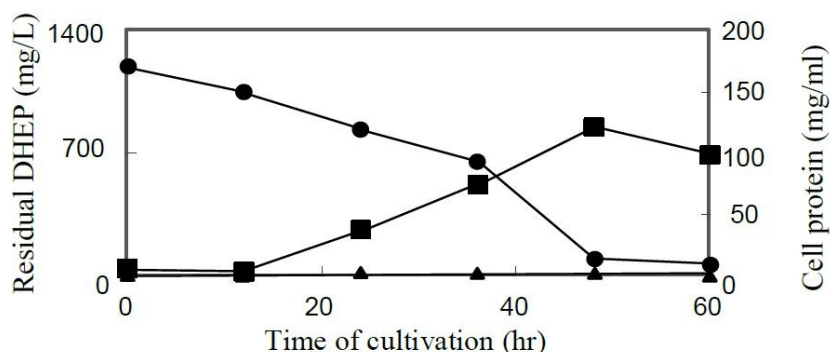


図 1-2 培養時の P8219 株の増殖と DEHP の消失

DEHP を添加した M9 液体培地で培養した際の菌体タンパク質の量 (■)、培地液中の DEHP 濃度 (●) およびフタル酸濃度 (▲) を経時的に測定した。

EG-5 株の場合、培養の初期に培地表面に浮いていた DEHP の油滴が培養液中に見られなくなり、上記の P8219 株とは異なる、振とう程度では容易にほぐすことが出来ない、少数の比較的大きな細胞塊ができた。そのため、P8219 株の場合のように増殖と DEHP の消失をうまく測定できなかった。ただ、培養 40 時間程度で DEHP は完全に検出できなくなった。

#### 1.4 節 考察

研磨油で汚染された土壌から単離した DEHP 資化性細菌 2 株は系統発生学的分類によって、*Gordonia* sp. P8219 と *Rhodococcus* sp. EG-5 と命名した。両株はコロニー形態や培養 DEHP を単一炭素源とする培養で、状態が少し違うが、DEHP を取り囲む細胞凝集塊を作ることから、DEHP 分解の初期代謝に共通点があると考えられた。分泌酵素ではなく、細胞表面で DEHP を加水分解するのか、あるいは細胞内に取り込んでから加水分解するのかいずれかの可能性が高いと思われた。

すでに報告されているフタル酸エステル類分解能を持つ細菌に、*Gordonia* 属細菌は 1 株 (*Gordonia* sp. strain QH-11)、*Rhodococcus* 属細菌は 3 株 (*Rhodococcus erythropolis* S-1、*Rhodococcus jostii* RHA1、*Rhodococcus* sp. JDC-11) がある。P8219 株と QH-11 株 (accession No. JN641798) の 16S rRNA 遺伝子配列の同一性は 97%で、異なる菌株と考えられた。EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、*Rhodococcus erythropolis* の複数の株と完全に一致していたが、S-1 株の 16S rRNA 遺伝子配列が登録されていないため、S-1 株と同一の菌株かは不明である。また、EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子配列の RHA1 株 (NR\_074610) と JDC-11 株 (FJ378037) のそれらに対する同一性はそれぞれ 98%と 97%で、どちらも異なる菌株と考えられた。上記の P8219 株と EG-5 株以外の菌株は DEHP を資化できないこと、一方、P8219 株と EG-5 株は DEHP を単一炭素源にできる生理的特徴を持つことから、両株は新規のフタル酸ジエステル類分解細菌であることが分かった。

## 1.5 節 要約

研磨油で汚染された土壌から DEHP 資化性細菌 2 株を単離した。これら 2 株の細胞は V 字型の桿菌で培養後期に単桿ないし球菌になること等共通した性質を持っていた。一方、コロニー形態が明らかに異なること、培養の状態の観察から、P8219 株、EG-5 株ともに DEHP の油滴に吸着するが、その結果生じる培養液中の塊の形態がかなり異なることなど、それぞれの特徴も示した。16S rRNA 遺伝子配列から、P8219 株と EG-5 株は *Gordonia* 属と *Rhodococcus* 属の細菌と同定され、系統発生学的な側面からも放線菌門の細菌で、同じ *Corynebacteriales* 目に含まれるが、異なる *Gordoniaceae* 科と *Nocardiaceae* 科に属していることが分かった。

## 第 2 章 フタル酸ジエステル資化性菌 2 株の生産する mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) 加水分解酵素の性質

### 2.1 節 緒言

第 1 章に述べたように DEHP 分解菌が 2 株単離できた。これら 2 株を、16S rRNA 遺伝子の解析から *Gordonia* sp. P8219 株と *Rhodococcus* sp. EG-5 株と名づけた。当初は P8219 株、EG-5 株共に *Rhodococcus erythropolis* の近縁株であることから、DEHP を菌体外でフタル酸に加水分解すると考えたが、培養時に DEHP に吸着する特徴から、両株とも細胞表面ないしは細胞内に DEHP 加水分解酵素を持っている可能性が浮上した。さらに、これら 2 株の無細胞抽出液に DEHP の加水分解物と考えられる MEHP を基質に使うとフタル酸への加水分解が起こることが観察できた。そこで、それぞれの株から新規 MEHP 加水分解酵素の精製を試み、両株の酵素の特性を解明し、両者を比較することを目的に実験を行った。

### 2.2 節 実験材料及び操作

#### 2.2.1. MEHP 加水分解酵素の活性測定法

##### 2.2.1.1. HPLC を用いた活性測定法

試験管に反応液を調製（表 2-1 参照）し、パラフィルムにて蓋をした後、震盪速度 123 rpm、50℃で 15 分間酵素反応を行った。反応終了に 6 N の塩酸を 1 ml 添加し、Vortex mixer にて攪拌した。反応を停止させた反応液に、酢酸エチルを 2 ml 添加し、Vortex mixer にて 2 分間攪拌し反応産物を抽出し、1.2 ml の有機層を回収しエバポレートさせた後、300  $\mu$ l のメタノールで置換した。これを YMC-DUO filter にてろ過し、Handy-ODS8 (Wako) カラムを付けた HPLC（クラマトパック：C-R8A VP，ポンプ：LC-10AD VP，デガッサー：DGU-12A VP，カラムオーブン：CTO-10A VP，検出器：SPD-10A VP，コントロールパネル：SCL-10A VP）にて、検出波長 254 nm にてサンプルの定量を行った。ブランクとして、反応前に 6 N 塩酸を添加したものを同様に測定した。

表 2-1 酵素反応組成

1 M リン酸緩衝液, pH 7.5	100 $\mu$ l
50 mM or 30 mM MEHP 基質溶液	10 $\mu$ l
酵素溶液	X $\mu$ l
精製水	890 - X $\mu$ l
Total	1000 $\mu$ l

50 mM 基質溶液を使った場合、HPLC による活性測定に使用し、30 mM 基質溶液を使った場合、分光光度計を用いた活性測定に使用した。

HPLC にて定量されたフタル酸の  $\Delta Area$  から MEHP 加水分解活性を算出した。

MEHP 分解活性( $\mu$ mol/min  $\cdot$  ml)

$$= \frac{\Delta Area \text{ (反応後フタル酸 Area - 未反応フタル酸 Area)}}{\text{換算定数} \cdot \text{フタル酸分子量} \cdot \text{反応時間} \cdot \text{濃縮率} \cdot \text{反応液中の酵素液量}}$$

- \* 換算定数=5805 (検量線から求めた  $\Delta Area$  をフタル酸の  $\mu$ g に換算する係数)
- \* フタル酸分子量=166
- \* 反応時間= 10 (min)
- \* 濃縮率=2
- \* 反応液中の酵素液量の割合= X/1000
- \* 抽出効率=0.95

#### 2.2.1.2. 分光光度計を用いた活性測定法

基質である MEHP と反応生成物であるフタル酸は、波長 242 nm の吸収スペクトルが異なっており、エステル結合をもつ MEHP がフタル酸に比べ高い値をとる。その差スペクトルより求めたミリモル吸光係数 ( $1.83 \text{ mM}^{-1}$ ) と反応初速度 ( $\Delta A_{242}/\text{min}$ ) より、MEHP 分解活性を求めた。

酵素液を除く反応溶液を 1 分間、50°C でプレインキュベートし、酵素液を添加し、反応温度 50°C で波長 242 nm の吸光度を 2 分間カイネティクスモードで測定した。求めた反応初速度 ( $\Delta A_{242}/\text{min}$ ) を次式に代入し MEHP 分解活性を求めた。

$$\text{MEHP 分解酵素活性 } (\mu\text{mol/min} \cdot \text{ml}) = \frac{\Delta A_{242}/\text{min}}{\text{ミリモル吸光係数} \cdot \text{酵素液量} / \text{反応液量}}$$

- \* ミリモル吸光係数 = 1.83 (mM<sup>-1</sup>)
- \* 酵素液量 = X (μl)
- \* 反応液量 = 1000 (μl)

### 2.2.2. BCA™ protein assay kit を用いたタンパク質濃度測定

BCA™ protein assay Reagent A : BCA™ protein assay Reagent B = 50 : 1 で混合した (以下 BCA 混合液)。BCA 混合液 : Sample = 20 : 1 で混合し、Water Bath Shaker にて、37℃で 30 分間反応した。Blank として精製水を Sample と等量入れたものも作成し、同様に反応させた。反応停止として、氷水中で急冷させた。反応終了した Sample を波長 562 nm にて測定した。得た吸光度をもとに、Standard の検量線からタンパク質濃度を求めた。

BCA™ protein assay kit : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA

### 2.2.3. 無細胞抽出液の調製法

#### 2.2.3.1. 使用菌株

- (1) *Gordonia* sp. P8219 株
- (2) *Rhodococcus* sp. EG-5 株

#### 2.2.3.1. 使用器具

- ・ 100 ml、500 ml 容三角フラスコ (IWAKI 製)
- ・ ロータリーシェーカー (和研薬製 innova 4330)
- ・ 遠心分離機 (BECKMAN COULTER 製 Avanti HP-25, Roter ID JA-14)
- ・ ダイノミル (Willy A. Bachofen AG Maschinenfabric 製 Type KDL-A)
- ・ ホモジナイザー (MILLIPORE 製)

#### 2.2.3.2. 使用試薬

- ・ Phenylmethanesulfonyl fluoride (以下 PMSF : M.W. 174.2 SIGMA 製)
- ・ Dimethyl Sulfoxide (以下 DMSO : ナカライテスク製)

### 2.2.3.3. 使用緩衝液

- ・ 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 (表 2-2 参照)

表 2-2 50mM リン酸緩衝液, pH 7.5

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako 特級試薬 M.W : 174)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Wako 特級試薬 M.W : 136)

それぞれ精製水にて 50m M の溶液を作製し、混合して pH 7.5 に調製した。

### 2.2.3.6. 培地組成

前培養および本培養に NB 培地 (pH 7.0) を使用した。

表 2-3 に組成を記す。

表 2-3 NB 培地組成 pH 7.0

Glucose	20.0 g/l
Polypepton	5.0 g/l
Meat extract	3.0 g/l
Yeast extract	2.0 g/l
NaCl	2.0 g/l

前培養 : 100 ml 容三角フラスコに 20 ml  
本培養 : 500 ml 容三角フラスコに 200 ml  
  
121°C で 15 min オートクレーブして使用

MEHP 分解酵素の誘導に M9 培地を使用した。その組成は 1.2. に記した。

### 2.2.3.7. 無細胞抽出液の調製

#### (1) 前培養及び本培養 (NB 培地使用)

保存菌 (NB 斜面培地) より白金耳で菌を取り、前培養用の NB 培地に植菌し、設定温度 25°C のロータリーシェーカーで 48 時間培養を行った。その後、本培養用の NB 培地に 4% 植菌し、温度 25°C のロータリーシェーカーで 48 時間培養を行った。

#### (2) MEHP 加水分解酵素の誘導 (M9 培地使用)

本培養が終了した培養液 200 ml をクリーンベンチ内で遠心管に移し、遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間) を行い生じた沈殿に滅菌水を加え、菌の洗浄を 2 回行った。その後、集菌した菌体を全量 200 ml の M9 培地に添加した。また、同時に単一炭素源として 1,500 mg/l になるように DEHP

を添加し、25℃のロータリーシェーカーにて15時間振盪培養を行い MEHP 加水分解酵素の誘導を行った。

### (3) 集菌および細胞破碎

MEHP 加水分解酵素の誘導が終了した P8219 株または EG-5 株にガラスビーズ（φ0.25 mm～0.5 mm）を加え、Dyno-Mill にて細胞破碎（30 秒×6）した。その際プロテアーゼ阻害剤として、DMSO に溶解させた 0.25 M の PMSF を 0.1%（v/v）添加した。その後、細胞破碎液をろ過しガラスビーズを取り除き 10,000 rpm, 4℃で15分間遠心分離を行い、上澄みを回収した。回収した上澄みを無細胞抽出液とした。

## 2.2.4. 各種カラムクロマトグラフィーによる MEHP 加水分解酵素の精製法

### 2.2.4.1. 使用サンプル

P8219 株および EG-5 株より調製した Cell-extract 300 ml

### 2.2.4.2. 使用器具

- ・分光光度計（SHIMADZU 製 UV-1600）
- ・フラクションコレクター（Bio-rad 製）
- ・送液ポンプ（IWAKI）
- ・限外濃縮キット（MILLIPORE）

### 2.2.4.3. 使用ゲルおよび樹脂

- ・DE-52（Whatman）
- ・Butyl TOYOPEARL 650M（東ソー）
- ・Superdex 200 prep grade（GE Healthcare）

### 2.2.4.4. 使用緩衝液

- ・A 緩衝液：50 mM リン酸緩衝液, pH 7.2
- ・B 緩衝液：50 mM リン酸緩衝液, pH 7.2+500 mM KCl
- ・C 緩衝液：50 mM リン酸緩衝液, pH 7.2+20%飽和硫酸アンモニウム



#### 2.2.4.5. 各種カラムクロマトグラフィー

##### (1) DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィーによる精製

調製した Cell-extract を精製水にて 2 倍希釈し、20 分間脱気を行ったものをチャージサンプルとした。溶出は 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 に溶解させた 0 mM~500 mM KCl (A 緩衝液、B 緩衝液共に 300 ml 使用した) による線形勾配で行った。表 2-4 に DEAE-Cellulose カラムによる精製条件を記した。

表 2-4 DEAE-Cellulose カラム条件			
chromatographic carrier : DE-52			
charged protein : 1915 mg			
column size : $\phi$ 3×40 cm			
緩衝液 : A 緩衝液 (300 ml)、B 緩衝液 (300 ml)			
flow : 60 ml/hr			
1 fraction : charge, wash	20 ml	gradient	10 ml

溶出後、各フラクションの  $A_{280}$  測定値をもとに溶出パターンを作成した。分光光度計で MEHP 加水分解活性を確認し、活性の高かったフラクションをプールした。これを DEAE eluate とした。

##### (2) 疎水カラムクロマトグラフィーによる精製

DEAE eluate を氷水中で冷却しながら硫酸アンモニウム溶液を 20%飽和になるまで添加し、4 時間平衡化し、その後 10,000 rpm、15 分間遠心分離を行い、その上澄みを 10 分間脱気したものをチャージサンプルとした。溶出は、50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 に溶解させた 20%~0% 硫酸アンモニウム (A 緩衝液、C 緩衝液共に 100 ml 使用した) による線形勾配で行った。表 2-5 に疎水カラムによる精製条件を記した。

表 2-5 疎水カラム条件
chromatographic carrier : Butyl TOYOPEARL 650M
charged protein : 90.4 mg
column size : $\phi$ 2×7 cm
緩衝液 : A 緩衝液 (100 ml)、C 緩衝液 (100 ml)
flow : 30 ml/hr
1 fraction : charge, wash 10 ml      gradient 5 ml

溶出後、各フラクションの A<sub>280</sub> 測定値をもとに溶出パターンを作成した。分光光度計で MEHP 加水分解活性を確認し、活性の高かったフラクションをプールした。これを TOYOPEARL eluate とした。

### (3) ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる精製

TOYOPEARL eluate の硫酸アンモニウム除去及びゲルろ過カラムチャージサンプル調製のため、氷水中で限外濃縮器を用いて緩衝液交換および酵素の濃縮を行った。サンプル液量を 2 ml まで濃縮を行い、10 分間脱気を行ったものをチャージサンプルとした。以下にゲルろ過カラムによる精製条件を記す。

表 2-6 ゲルろ過カラム条件
chromatographic carrier : Superdex 200 prep grade
charged protein : 17.6 mg
column size : $\phi$ 2.5×49 cm
緩衝液 : A 緩衝液
flow : 80 ml/hr
1 fraction : 2 ml

溶出後、各フラクションの A<sub>280</sub> 測定値をもとに溶出パターンを作成した。その後、分光光度計で MEHP 加水分解活性を確認し、活性の高かったフラクションをプールした。これを Superdex eluate とした。

また、Gel-Filtration Standard (BIO-RAD) を同様の操作でゲルろ過カラムにかけ、検量線を作成して MEHP 加水分解酵素の分子質量を決定した。

(5) ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製

Bio-Gel HTP (1.5 by 8.5 cm; Bio-Rad Laboratories)カラムを A 緩衝液で平衡化し、上記 (4) で溶出した Superdex eluate の活性の高い画分を本カラムにチャージして、A 緩衝液で洗浄した後、緩衝液のリン酸濃度を上昇させ、目的タンパク質を溶出させた。これを Bio-Gel HTP eluate とした。

(6) SDS-PAGE 法

定法に従って、SDS-PAGE (ランニングゲル濃度 10%) による精製純度の確認を行った。精製画分に×3 Sample 緩衝液 (組成は表 2-7 を参照) を試料容積の 1/3 加え、95℃で 5 分間インキュベートした後に泳動を行った。サンプルとマーカーを各レーンにチャージし、濃縮ゲルは 20 mA で分離ゲルは 40 mA でそれぞれ電気泳動を行った。泳動終了後、30 分間染色 (CBB 染色法) を行い、脱色し泳動パターンを確認した。なお、トリシン電気泳動は定法に従って行った。

表 2-7 ×3 Sample 緩衝液

250 mM Tris-HCl (pH 6.8)	40 ml/100 ml
Glycerol	50 ml/100 ml
2-mercaptoethanol	5 ml/100 ml
SDS	5 g/100 ml
Bromophenol Blue	0.01 mg/100 ml

2.2.5. 精製酵素と限定分解ペプチドの N 末端アミノ酸配列の決定

2.2.5.1. 使用機器、器具および材料

精製した P8219 および EG-5 株由来 MEHP 加水分解酵素

- Power supply (ATTO 製 CROSSPOWER 500)
- セミドライブロッキング装置 (ATTO 製)
- ペプチドシーケンサー (SHIMADZU 製 model PPSQ-21A)
- 3MM CHROMATOGRAPHY PAPER (ろ紙: Whatman 製)
- Immobilon-PSQ (PVDF 膜: Millipore 製)

使用試薬および組成

- ブロッキング溶液 1～3 (表 2-8,2-19,2-10 参照)
- 2-mercaptoethanol (Wako)
- シアン化臭素, (BrCN : Wako)
- 70%ギ酸 (formic acid : Wako アミノ酸配列分析用)
- N'N'N'N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED : Wako 試薬特級)
- 過硫酸アンモニウム (Wako 電気泳動用)

精製水で 15%過硫酸アンモニウム溶液を作成 (E 液)

- 陰極側電極液 (表 2-11 参照)
- 陽極側電極液 (表 2-12 参照)
- ゲル緩衝液 (表 2-13 参照)
- 3% C アクリルアミド溶液 (表 2-14 参照)
- 3×SDS Sample buffer (前記、表 2-7 参照)
- TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0)
- リゾチーム (Wako)
- フェノール・クロロホルム溶液 (=96 : 4)
- フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (=50 : 48 : 2)

---

表 2-8 ブロッキング溶液 1

---

高純度トリス	18.15 g (終濃度 0.3 M)
メタノール	100 ml (終濃度 20%)
10% SDS	2.5 ml (終濃度 0.05%)

---

ミリ Q 水にて、500 ml までメスアップ

---

表 2-9 ブロッキング溶液 2

---

高純度トリス	1.5 g (終濃度 25 mM)
メタノール	100 ml (終濃度 20%)
10% SDS	2.5 ml (終濃度 0.05%)

---

ミリ Q 水にて、500 ml までメスアップ

表 2-10 ブロッキング溶液 3

高純度トリス	1.5 g	(終濃度 25 mM)
6-アミノ-n-カプロン酸	2.6 g	(終濃度 40 mM)
メタノール	100 ml	(終濃度 20%)
10% SDS	2.5 ml	(終濃度 0.05%)

ミリ Q 水にて、500 ml までメスアップ

表 2-11 陰極側電極液 pH 8.9 (HCl にて)

高純度トリス	12.11 g	(終濃度 0.2 M)
--------	---------	-------------

ミリ Q 水にて、500 ml までメスアップ

表 2-12 陽極側電極液 pH 8.25 (HCl にて)

高純度トリス	12.11 g	(終濃度 0.2 M)
Tricine	8.96 g	(終濃度 0.1 M)
SDS	0.5 g	(終濃度 0.1%)

ミリ Q 水にて、500 ml までメスアップ

表 2-13 ゲル緩衝液 pH 8.45 (HCl にて)

高純度トリス	10.9 g	(終濃度 0.3 M)
SDS	0.09 g	(終濃度 0.3%)

ミリ Q 水にて、30 ml までメスアップ

表 2-14 アクリルアミド溶液 (3% C)

アクリルアミド	48 g	(終濃度 6.76 M)
ビスアクリルアミド	1.5 g	(終濃度 97.3 mM)

ミリ Q 水にて、100 ml までメスアップ

#### 2.2.5.2. 精製 MEHP 加水分解酵素のエレクトロブロッキング

精製が終了した MEHP 加水分解酵素 20 ng を SDS-PAGE で展開した。SDS-PAGE 中にゲルの大きさにあわせ、ろ紙を 6 枚、PVDF 膜を 2 枚準備し、ろ紙を 2 枚ずつブロッキング溶液 1~3 に 5 分間浸した。PVDF 膜はメタノールで洗浄した後、ブロッキング溶液 3 に 5 分間浸した。

SDS-PAGE 終了後、PAGE-Gel は染色を行わずブロッティング溶液 3 に 5 分間浸しセミドライブロッティング装置に、ろ紙、PVDF 膜共にセットした。1 mA/cm<sup>2</sup>にて 90 分間ブロッティングを行った。

#### 2.2.5.3. 精製 MEHP 加水分解酵素のシアン化臭素による限定分解とアミノ酸配列解析

MEHP 加水分解酵素の部分アミノ酸配列を決定するために、シアン化臭素を用いて限定分解を行った（シアン化臭素はメチオニン残基の C 末端側を切断する）。精製した MEHP 加水分解酵素 1.48 g をミリ Q 水に置換した。凍結乾燥を行った後、8  $\mu$ l の 2-mercaptoethanol に溶解させ、シアン化臭素を含む 70%ギ酸を 1 ml 添加（MEHP 分解酵素 1 mg/シアン化臭素 120 mg）した。低温室で 48 時間反応させ限定分解を行った後ミリ Q 水にて希釈し、凍結乾燥を行い、再びミリ Q 水 300  $\mu$ l に溶解した。この限定分解 MEHP 分解酵素をトリシン電気泳動で分離し、エレクトロブロッティングにより PVDF 膜に転写した。得られた限定分解ペプチドのバンドをペプチドシーケンサーで解析し、部分アミノ酸配列を決定した。

#### 2.2.6. MEHP 加水分解酵素の塩基配列の決定

##### 2.2.6.1. 使用機器、器具および材料

*Gordonia* sp. P8219 株より抽出した染色体 DNA

*Rhodococcus* sp. EG-5 株より抽出した染色体 DNA

KOD -Plus- DNA polymerase (Toyobo)

##### 2.2.6.2. P8219 株および EG-5 株からの染色体 DNA の抽出法

染色体 DNA の抽出効率を上げるために *Gordonia* sp. P8219 株および *Rhodococcus* sp. EG-5 株のリゾチーム処理を行った。エッペンドルフチューブに培養液を 1.5 ml 入れ、遠心分離し上澄みを破棄した。そこにリゾチーム溶液（リゾチーム 2 mg/ml）を 500  $\mu$ l 添加し 37°C で 15 分間インキュベートした。その後、遠心分離（10,000 rpm, 10 分間, 室温）を行い、上澄みを破棄し、ISOPLANT Kit（ニッポンジーン）による DNA 抽出を行った。

TE 緩衝液に溶解させた染色体 DNA にフェノール・クロロホルム溶液を等量入れ混合し遠心分離（14,000 rpm、4℃、15 分間）した。上層に対しエタノール沈殿を行い、染色体 DNA を精製した。

### 2.2.6.3. MEHP 加水分解酵素（MehpH）塩基配列の決定

それぞれの N 末端アミノ酸配列と限定分解ペプチドの N 末端アミノ酸配列をもとにし、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。このプライマーを組み合わせ、それぞれの染色体 DNA を鋳型に PCR 増幅を行い、増幅した DNA 断片の塩基配列を決定した。次に、その配列をもとにインバース PCR 用プライマーを新たに設計し、染色体 DNA を適当な制限酵素で消化し、環状化した後に鋳型に使いインバース PCR を行った。増幅した DNA の塩基配列を決定した。この操作を繰り返し、MehpH 遺伝子（*mehpH*）のコード領域全長を決定した。

## 2.3 節 実験結果

### 2.3.1 MEHP 加水分解酵素の精製とその性質

#### 2.3.1.1. Meh pH 精製一覧と分子量

表 2-15 に *Gordonia* sp. P8219 株の Meh pH（P8219 Meh pH）、表 2-16 に *Rhodococcus* sp. EG-5 株の Meh pH（EG-5 Meh pH）の精製一覧表を示す。

表 2-15 P8219 Meh pH の精製一覧

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Cell-free extract	1540	473	0.31	100	1
DE52	21	154	7.3	33	24
TOYOPEARL	11	101	9.1	21	29
Superdex	3.6	37	10	7.9	32
Bio-Gel HTP	1.0	17	17	3.6	55

One unit is defined as the amount of protein that converts 1 micromole of MEHP per minute to phthalic acid.

最終的に比活性を 17 unit/mg まで高めることができた。その際の精製度は 55 倍だった。この最終標品は、SDS-PAGE で均一であることが確かめられた。

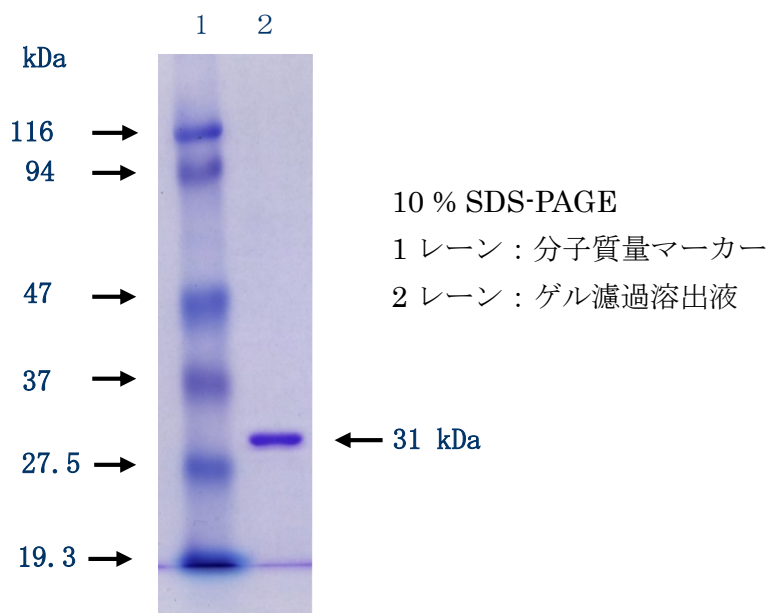


図 2-1 精製した P8219 Meh pH の SDS-PAGE

表 2-16 EG-5 Meh pH の精製一覧

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Cell-free extract	1915	896	0.47	100	1
DE52	90	419	4.7	47	10
TOYOPEARL	18	227	13	25	28
Superdex	4.6	118	26	13	55

One unit is defined as the amount of protein that converts 1 micromole of MEHP per minute to phthalic acid.

最終的に比活性を 26 unit/mg まで比活性を高めることができた。その際の精製度は 55 倍だった。この最終標品は、SDS-PAGE で均一であることが確かめられた。



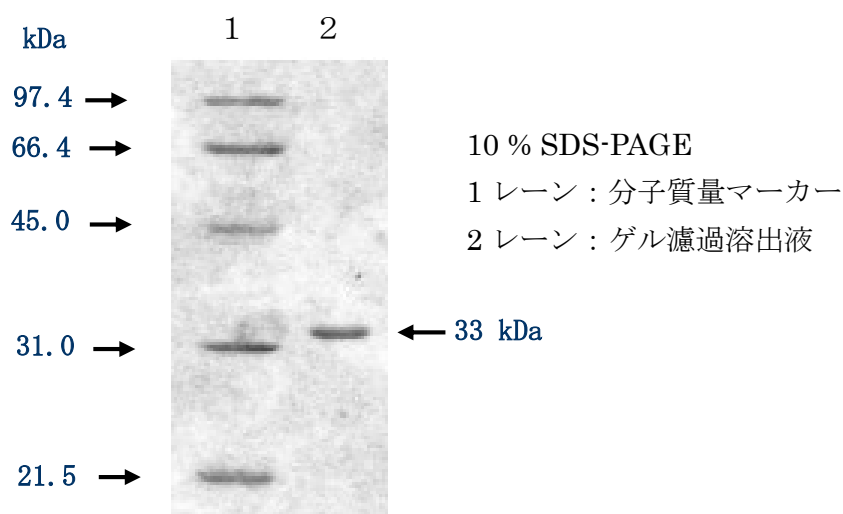


図 2-2 精製した EG-5 Meh pH の SDS-PAGE

*Gordonia* sp. P8219 株、*Rhodococcus* sp. EG-5 株、それぞれに由来する MEHP 加水分解酵素を、再度ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにかけ、分子質量の測定を行った。ゲルろ過スタンダードの溶出パターンより分子質量の標準直線を作成し、MEHP 加水分解酵素の分子質量を決定した。

その結果、P8219 Meh pH の分子質量は約 62 kDa、EG-5 Meh pH は約 66 kDa だった。また SDS-PAGE の結果、前者は約 31 kDa、後者は約 33 kDa に単一のバンドを確認したことから、いずれの MEHP 加水分解酵素ともにホモ 2 量体を形成していることが分った。

#### 2.3.1.2. 反応速度に及ぼす温度の影響

精製した酵素を 10 分間、氷水・30・40・45・50・55・60℃の 7 種類でインキュベートし、その後、活性測定を行った。活性は、酵素液を除く反応液組成を 50℃で 1 分間インキュベートした後、酵素液を添加し測定を行った。活性測定は各温度条件について 3 回ずつ行った。

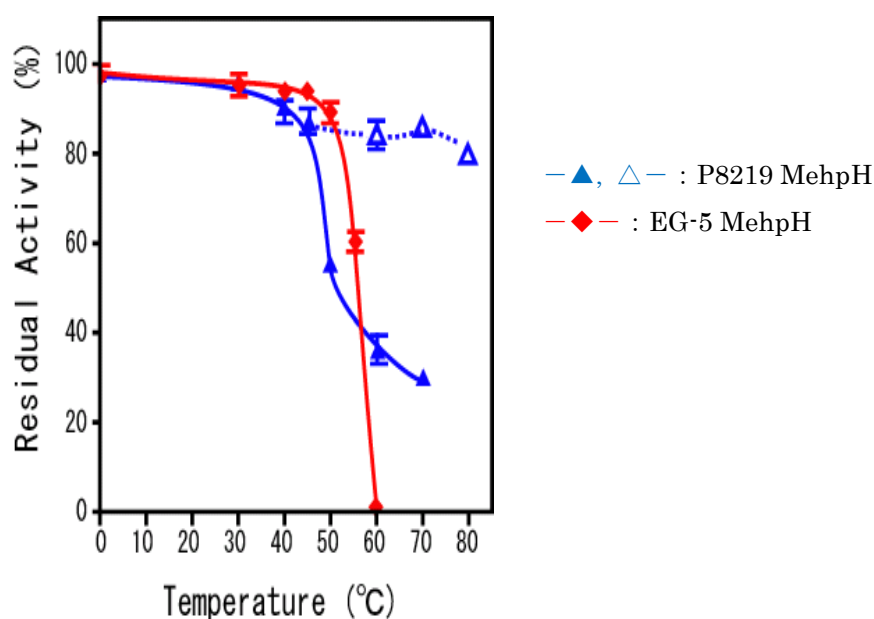


図 2-3 熱安定性

(▲, ◆) : 各温度で 10 分間インキュベートした酵素の残存活性を示す。

(△) : 各温度でインキュベートを行った後、氷水中で 30 秒、20℃で 30 分間インキュベートした酵素の残存活性を示す

P8219 Meh pH は、50℃以上の高温で酵素を失活させても、氷水中で 30 秒、20℃で 30 分間インキュベートすることで、その活性が回復することが分かった (△で示す)。

同様の操作を EG-5 Meh pH に行ったが、活性の回復は無かった。EG-5 Meh pH は、氷水に静置したものが最大の活性を示し、50℃まで数%ほどの活性の減少にとどまったが、55℃で酵素活性は 60%まで落ち込んだ。さらに 60℃では活性は完全に無くなり、失活した。

酵素反応時における温度を変更し活性測定を行い、反応最適温度を調べた。反応温度は、30・40・45・50・55・60・70℃の 7 種類を調べた。酵素液を除く反応液組成を上記温度で 1 分間インキュベートした後、酵素液を添加し活性測定を行った。活性測定は各温度条件について 3 回ずつ行った。

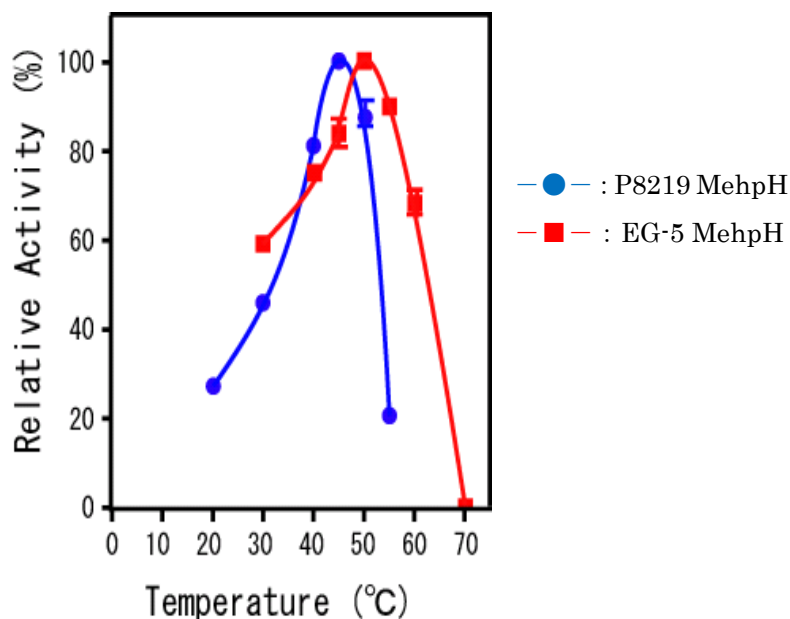


図 2-4 反応最適温度

(●, ■) : 酵素反応時における温度を変更し、活性測定を行った。最大値を示した時の温度の活性を100%とした。

P8219 MehpH は反応温度が 45°C で最大の活性を示し、EG-5 MehpH は、反応温度 50°C で最大の活性を示した。

#### 2.3.1.3. 反応速度に及ぼす pH の影響

反応前に各種 pH にて酵素を 30 分間、20°C でインキュベートし、活性測定を行った。pH 6.0・7.0・7.5・8.0・8.5・9.0 の 7 種類を使用した。MEHP 加水分解酵素は、50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 溶液に溶解しているため、500 mM の各種 pH の緩衝液と 1 : 1 で混合しインキュベートを行った。その後、酵素液を除く反応液組成を 50°C で 1 分間インキュベートした後、酵素液を添加し、活性測定を行った。活性測定は各 pH について 3 回ずつ行った。

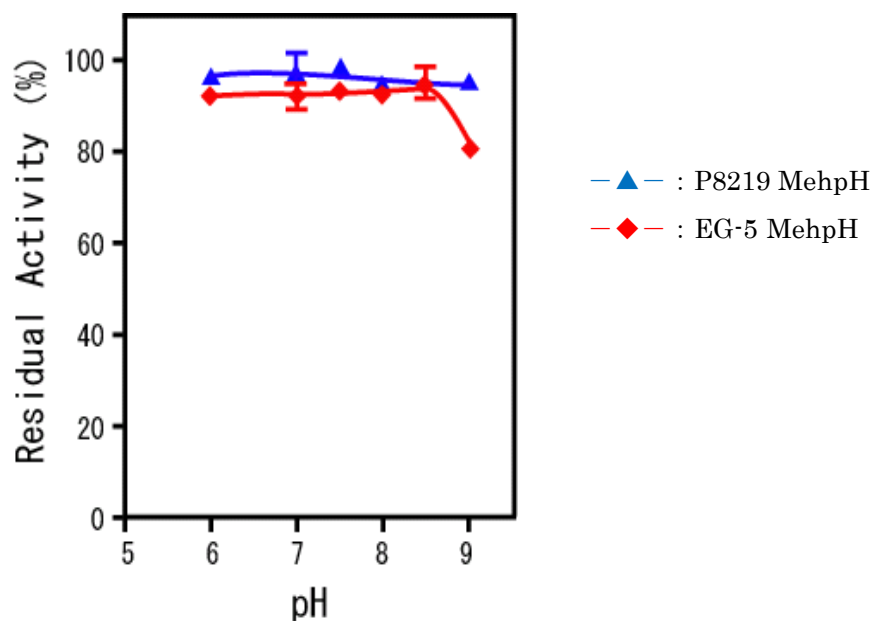


図 2-5 pH 安定性

(▲, ◆) : 酵素反応前に各種 pH にてインキュベートを行った酵素残存活性を示す。

pH 6.0～8.0 : リン酸緩衝液を使用した。

pH 8.0～9.0 : Tris-HCl 緩衝液を使用した。

P8219 MehpH は、測定した pH 6.0～9.0 の間で安定だった。

EG-5 MehpH は、pH 6.0～8.5 の間で安定であったが、pH 9.0 ではその残存活性は 80%まで減少した。

つぎに、酵素反応時における pH を変更して活性測定を行い、反応最適 pH を求めた。反応 pH は、pH 6.0・7.0・7.5・8.0・8.5・9.0 の 7 種類の緩衝液（終濃度 100 mM）で、酵素液を除く反応液組成を 50℃で 1 分間インキュベートした後、酵素液を添加し活性測定を行った。活性測定は各 pH について 3 回ずつ行った。

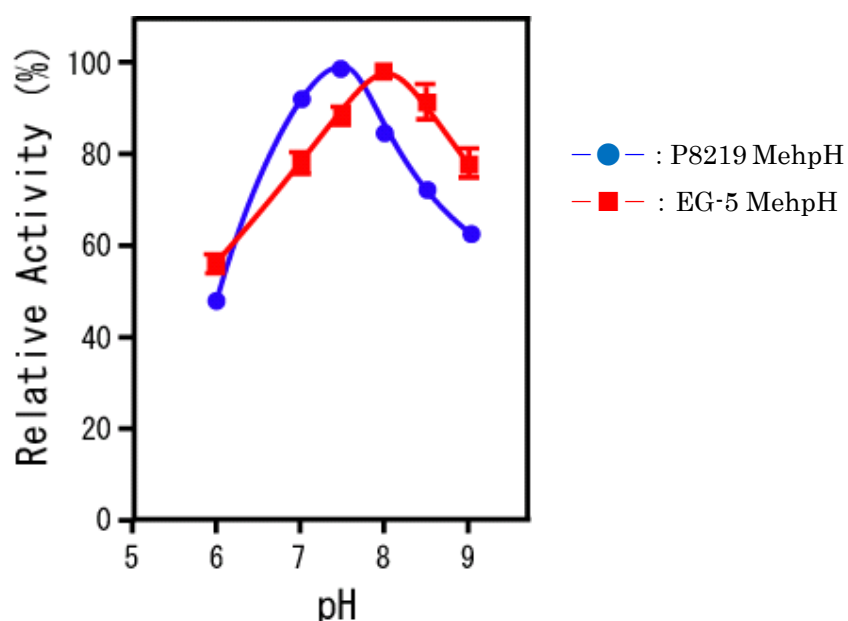


図 2-6 反応最適 pH

(●, ■) : 酵素反応時における pH を変更し、活性測定を行った。最大値を示した時の pH の活性を 100%とし、その相対活性をプロットした。

pH 6.0～8.0 : リン酸緩衝液を使用した。

pH 8.0～9.0 : Tris-HCl 緩衝液を使用した。

P8219 MehpH は反応 pH 7.5 で最大の活性を示した。一方、EG-5 MehpH は、反応 pH 8.0 で最大の活性を示した。

#### 2.3.1.4. MehpH の $K_m$ 、 $V_{max}$

基質として、mono-(2-ethylhexyl、n-hexyl、n-butyl、ethyl) phthalate の 4 種類を用いて反応溶液を調製し、各濃度 5 回ずつ活性測定を行なった。それにより得られた比活性から各基質における  $K_m$  と  $V_{max}$  の値を求めた。

表 2-17 に各基質に対する P8219 MehpH の  $K_m$  と  $V_{max}$  を記した。

表 2-17 各基質に対する  $K_m$ 、 $V_{max}$  (P8219 MehpH)

Substrate	$K_m$ (Std. Error) [ $\mu$ M]	$V_{max}$ (Std. Error) [Unit/mg]
Mono-2-ethylhexyl phthalate	27 (4.3)	18 (0.9)
Mono-n-hexyl phthalate	30 (5.8)	14 (0.8)
Mono-n-butyl phthalate	31 (2.4)	12 (0.3)
Mono-n-ethyl phthalate	28 (6.1)	8.0 (0.5)

Unit :  $\mu$ mol/min

MEHP を基質としたときの  $K_m$  は  $27 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  は  $18 \text{ Unit/mg}$  となった。  
また、P8219 Meh pH は、基質であるフタル酸モノエステル類のアルキル鎖  
が長いほど反応速度が大きく、短いほど反応速度が小さいことが分かった。

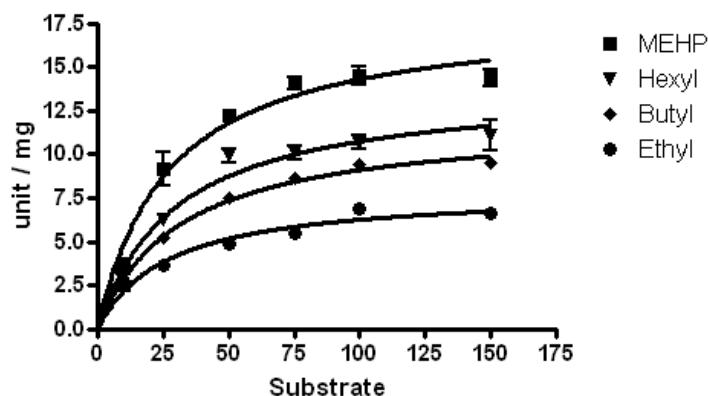


図 2-7 P8219 Meh pH のフタル酸モノエステル類に対する活性

表 2-18 に各基質に対する EG-5 Meh pH の  $K_m$  と  $V_{\max}$  を記した。

表 2-18 各基質における  $K_m$ 、 $V_{\max}$  (EG-5 株)

Substrate	$K_m$ (Std. Error) [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\max}$ (Std. Error) [Unit/mg]
Mono-2-ethylhexyl phthalate	85 (9.9)	37 (1.6)
Mono-n-hexyl phthalate	126 (12)	28 (1.2)
Mono-n-butyl phthalate	130 (12)	20 (0.8)
Mono-n-ethyl phthalate	151 (35)	8.7 (0.9)

Unit :  $\mu\text{mol/min}$

MEHP を基質としたときの  $K_m$  は  $85 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  は  $37 \text{ Unit/mg}$  となった。  
また、EG-5 Meh pH も、基質であるフタル酸モノエステル類のアルキル鎖  
が長いほど反応速度が大きく、短いほど反応速度が小さいことが分かった。  
 $K_m$  は、ほとんど差が見られなかった。

P8219 Meh pH と比較した場合、各 monoalkyl phthalate 類に対する親和  
性は EG-5 Meh pH の方が低い値となった。しかし反応速度は EG-5 Meh pH  
の方が大きい値だった。また、EG-5 Meh pH は、各 monoalkyl phthalate  
類の側鎖が長いほど親和性が増すという、P8219 Meh pH では見られなかつ  
た傾向が見られた。 $V_{\max}$  の値より、アルキル鎖の長さに対する反応速度の傾  
向は同じだった。

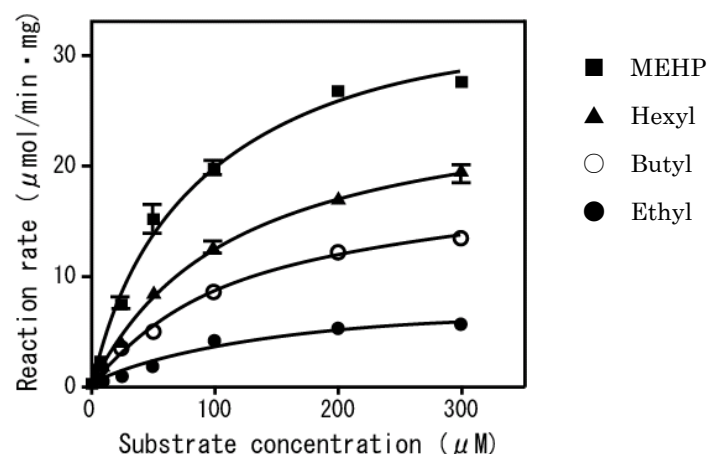


図 2-8 EG-5 Meh pH のフタル酸モノエステル類に対する活性

#### 2.3.1.5. 阻害剤への感受性

各種阻害剤を添加し活性測定を行った。また、阻害剤を添加しないものをブランクとし、その活性を 100% とした。

表 2-19 阻害剤による Meh pH 活性への影響

酵素の活性 阻害残基	添加物	終濃度	P8219 Meh pH 残存活性 (%)	EG-5 Meh pH 残存活性 (%)
—	—	—	100	100
セリン	PMSF	1 mM	79	0
		10 μM	／	76
	DFP	1 mM	5	0
		10 μM	／	33
ヒスチジン	DEPC	1 mM	24	0
		10 μM	／	61
システイン	<i>p</i> -CMB	1 mM	57	0
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2 μM	0	32
	HgCl <sub>2</sub>	2 μM	0	0
金属イオン	EDTA-2Na	1 mM	109	98

表左に各種阻害剤に影響を及ぼすターゲットを記した。PMSF、DFP、DEPC、EDTA は添加後 45℃で 20 min プレインキュベートした後に、金属塩は添加直後に活性測定を行った。／は測定せず。

なお、略号はつぎのとおりである。Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、*p*-Mercuric benzoic acid (*p*-CMB)、EDTA2Na、Diethyl pyrocarbonate (DEPC)、Diisopropyl fluorophosphate (DFP)

P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH のいずれも EDTA2Na 添加による活性への影響がないことが分った。つまり両酵素が MEHP 分解活性に金属イオンを必要としないことが示唆された。PMSF を添加した場合、終濃度 1mM で P8219 Meh pH は 21%、EG-5 Meh pH は 100%の活性阻害を起こした。DFP を添加した場合、終濃度 1mM で P8219 Meh pH 95%、EG-5 Meh pH は 100%の活性阻害をそれぞれ起こした。このことから、いずれの Meh pH ともにセリン残基を活性中心に有するセリン加水分解酵素である可能性が示唆された。

しかし、*p*-CMB、HgCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub> (システイン残基をターゲットとし、活性中心にシステインを有する酵素の活性を阻害する)を添加した場合も活性阻害を起こした。セリン加水分解酵素には、その活性にセリン残基の他に、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基が活性に関与する catalytic triad が報告されている。それらの結果から Hg<sup>2+</sup>や Cu<sup>2+</sup>が、ヒスチジン残基に配位し活性が阻害されていると考えた。ただし、P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH では阻害される割合に違いがあった。

そこでヒスチジン残基のエトキシホルミル化剤である DEPC を添加し活性測定を行ったところ、やはり P8219 Meh pH の活性は阻害剤の終濃度 1mM で 76%、EG-5 Meh pH では 100%の阻害がみられた。

以上のことから、いずれの Meh pH も、catalytic triad を有するセリン加水分解酵素である可能性が強く示唆された。しかしながら EG-5 Meh pH は、PMSF、DFP、DEPC が、P8219 Meh pH と比べ低濃度でも活性が阻害された。よって、両株の MEHP 加水分解酵素とも、活性中心こそ同じであるが、多少の酵素学的特性が異なっているように思われた。

### 2.3.2. Meh pH の一次構造

#### 2.3.2.1. 一次構造上の特徴と C-C 加水分解酵素との相同性

両株の Meh pH の N 末端配列、P8219 Meh pH の限定分解ペプチド 1 個、EG-5 Meh pH の限定分解ペプチド 3 個の N 末端配列を決定した(表 2-20)。



表 2-20 精製 Meh pH および BrCN 限定分解ペプチドの N 末端配列

P8219 Meh pH (N 末端)

M-P-S-S-S-I-T-Q-K-F-H-T-V-D-V-K-G-V-Q-

P8219 Meh pH (限定分解ペプチド)

M-D-(F or I)-Y-E-R-V-E-A-T-A-P-G-G-S or G-A-E-L-I

EG-5 Meh pH (N 末端)

M-N-T-D-L-S-V-N-Y-I-S-V-G-G-I-R-T-R-Y-I

EG-5 Meh pH (限定分解ペプチド 1)

M-P-E-S-T-K-G-L-F-I-V-S-X-A-T-L

EG-5 Meh pH (限定分解ペプチド 2)

M-V-E-K-K-Y-R-E-P-S-L-Q-A-A-K-D-D-I-R-A-R

EG-5 Meh pH (限定分解ペプチド 3)

M-P-V-G-G-D-G-R-A-P-V-I-A-P-L-V-D-K-G-F-K

下線は縮重プライマーを設計した部位を示す。

得られたアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計し、*P8219 meh pH* と *EG-5 meh pH* のコード領域内部を増幅し、塩基配列を決定した。*P8219 meh pH* では約 500 bp、*EG-5 meh pH* では約 450 bp の断片が増幅され、これらの配列を決定できた。これらの DNA の塩基配列をもとに、inverse PCR を繰り返し、*P8219 meh pH* と *EG-5 meh pH* の全コード領域を決定した。それぞれ 936 bp および 912 bp の塩基配列が得られた。これらは、それぞれ accession No.AB214635 および LC094142 で DDBJ/GenBank/ EMBL データベースに登録された。

塩基配列から推定された P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH のアミノ酸配列には、それぞれの N 末端および限定分解ペプチドの配列がすべて含まれていた。また、アミノ酸配列から算出した P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH の分子質量は 32,164 Da と 33,009 Da で、両酵素の SDS-PAGE の結果と一致した。また、両酵素には serine hydrolase で保存されている pentapeptide motif (・G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G・) が保存されており、serine hydrolase の活性中心の

catalytic triad を構成する残基 (H、S、D) も存在していた (図 2-10)。このことは両酵素の阻害剤に対する感受性試験の結果と一致した。

両酵素のアミノ酸配列を用いて相同性検索を行ったところ、単離され特徴付けされている酵素の中では、両酵素が互いに最も高い同一性を示した。しかし、同一性は 39% とあまり高くなかった。P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH は、酵素活性とアミノ酸配列の特徴から *serine esterase* と考えられたが、既知の *serine esterase* との同一性は 19~22% と低く、むしろ *Bunkholderia* 属、*Clostridium* 属、*Limnobacter* 属 *Cupriavidus* 属、*Acidovorax* 属、*Ralstonia* 属、*Marinobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Comamonas* 属などの細菌が持つ *meta*-cleavage compound hydrolase に、より高い同一性を示した (同一性 25~32%)。これらの酵素は biphenyl、carbazole、catechol などの芳香族化合物の生分解過程で生じる *meta*-cleavage compound の炭素—炭素間の結合を切断する C-C hydrolase である (図 2-9)。

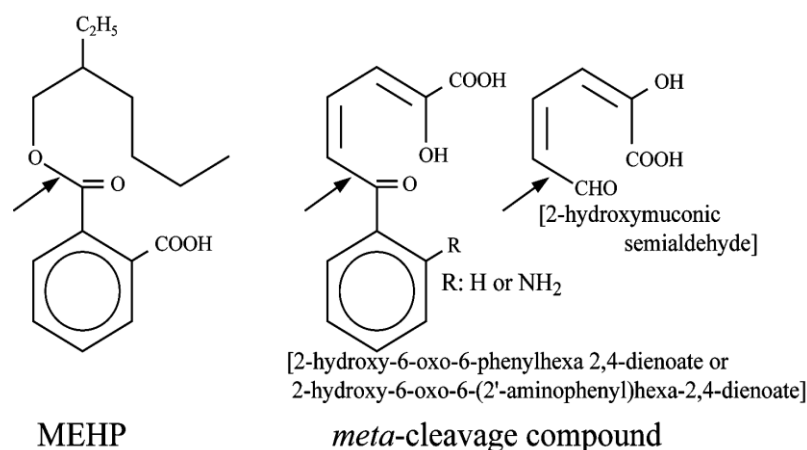


図 2-9 MEHP と *meta*-cleavage compound の構造

矢印は MEHP と *meta*-cleavage compound が対応する加水分解酵素で切断される部位を示す。

P8219 Meh pH、EG-5 Meh pH およびいくつかの C-C hydrolase のアミノ酸配列をアライメントしたところ (図 2-10)、P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH では pentapeptide motif の配列は一致し、X<sub>1</sub> と X<sub>2</sub> はそれぞれヒスチジン (H) とアルギニン (R) の塩基性アミノ酸であった。

一方、C-C hydrolase や他の *serine hydrolase* では、X<sub>1</sub> はアスパラギン (N) もしくはヒスチジン (H) (N が大部分で H は少数) で、X<sub>2</sub> は非極性のフェニルアラニン (F)、メチオニン (M)、ロイシン (L) であった。

特徴づけされている serine hydrolase で、X<sub>2</sub>に塩基性のアルギニンを持つものは他になく、MEHP hydrolase の酵素活性に重要である可能性が考えられた。

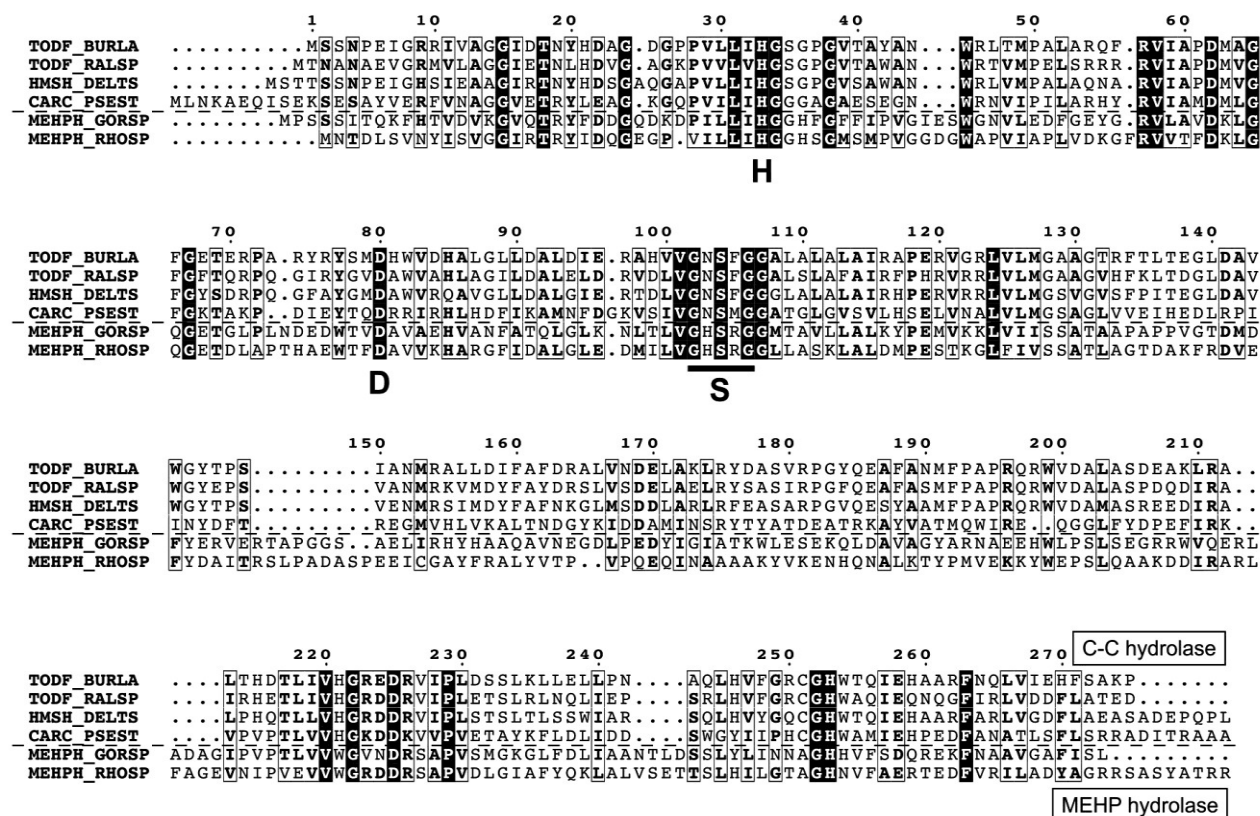


図 2-10 P8219 MehpH、EG-5 MehpH と C-C hydrolase のアライメント

全配列で保存されている残基を白抜き、保存性の高い残基を太字と囲いで示す。Catalytic triad を構成するヒスチジン (H)、セリン (S)、アスパラギン酸 (D) の残基をアライメントの下に、serine hydrolase に保存されている pentapeptide motif (GXSGX) を下線で示す。TODF\_BURLA, 2-hydroxy-6-oxo-2,4-heptadienoate hydrolase from *Burkholderia lata* (WP\_011356546); TODF\_RALSP, 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase from *Ralstonia* sp. JS705 (CAA06969) (van der Meer et al., 1998) ; HSMH\_DELTS, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Delftia tsuruhatensis* (AAX47253) (Liang et al., 2005) ; CARC\_PSEST, 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoate hydrolase from *Pseudomonas stutzeri* (BAA31270) (Ouchiya et al., 1998) ; MEHPH\_GORSP, MEHP hydrolase from *Gordonia* sp. P8219 (本研究) ; MEHPH\_RHOSP, MEHP hydrolase from *Rhodococcus* sp. EG-5 (本研究)。

### 2.3.2.2. MEHP 加水分解酵素とそのホモログが形成する 2 つのグループ

上述の様に、単離され特徴づけされている酵素が P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH に高い同一性を示さないが、ゲノムシーケンスにより最近登録された「hypothetical protein」には、98%以上の非常に高い同一性を示すものがある。具体的には、RefSeq データベースに、P8219 Meh pH に同一性を示す *Gordonia polyisoprenivorans* HW436、*Mycobacterium llatzerense* CLUC14、*Mycobacterium abscessus* M159、*Gordonia sihwensis* NBRC 108236、*Gordonia* sp. HS-NH1 由来のものが、EG-5 Meh pH に同一性を示す *Mycobacterium senegalense* CK1、*Mycobacterium conceptionense* MLE、*Kocuria* sp. SM24M-10 由来のアミノ酸配列である。

これらの系統樹を図 2-11 に示す。

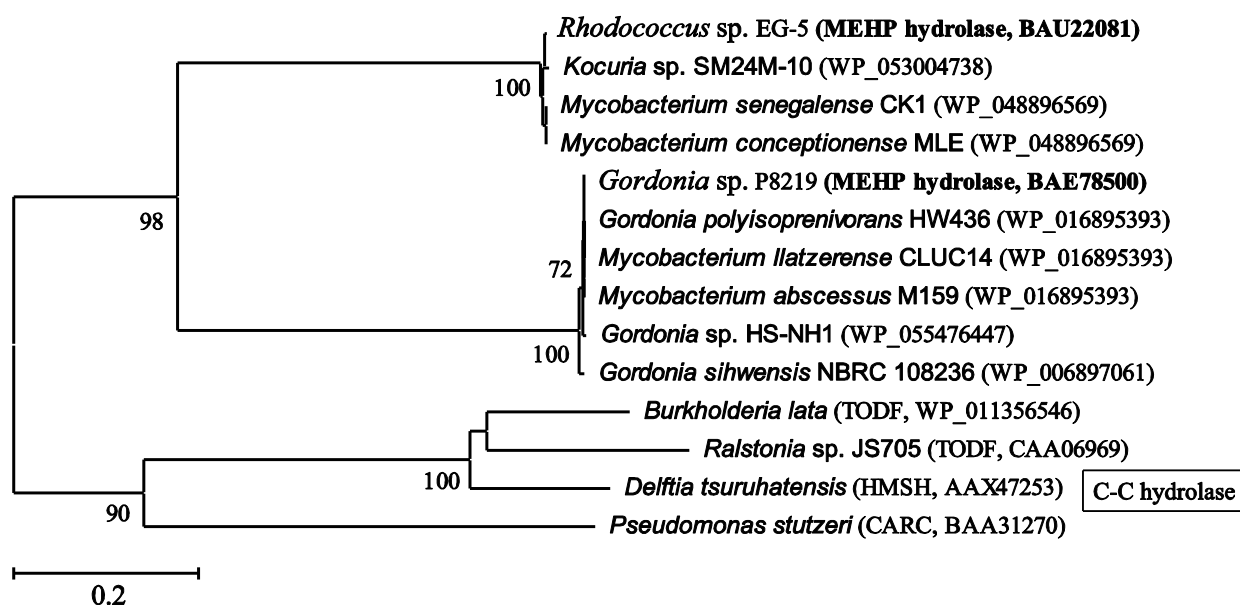


図 2-11 Meh pH と高い同一性を示す hypothetical protein の系統樹

Meh pH と RefSeq データベースに登録されている「hypothetical proteins」のアミノ酸配列の系統樹を MEGA 6 (Tamura et al., 2013) を用い、NJ 法で作成した。C-C hydrolase の配列は outgroup として用い、1,000 回の試行で 70%以上のブートストラップ値を表記している。

これらの菌株には、排水処理バイオリアクター、(*Gordonia sihwensis* NBRC 108236) (Kim et al., 2003)、汚染土壌 (*Gordonia* sp. HS-NH1)、

イソプレングム含有培地 (*Gordonia polyisoprenivorans* HW436) (Linós et al., 1999) など、MEHP や DEHP とは比較的關係のある人工化合物に接触する環境から見つかったものがある。仮に、「hypothetical protein」を発現していれば、これらの細菌が MEHP 分解能を持ち、DEHP 資化性を有する可能性が示唆される。

一方、動物の病原菌、共生菌と考えられるものもある。分離源がサングの粘液 (*Kocuria* sp. SM24M-10)、ヒトの外傷後の骨炎部分 (*Mycobacterium conceptionense* MLE) (Adékambi et al., 2006)、脳の膿瘍 (*Mycobacterium llatzerense* CLUC14)、肺の感染症患者的の気管支の吸引液 (*Mycobacterium abscessus* M159) (Ngeow et al., 2013) およびウシ鼻疽の原因細菌 (*Mycobacterium senegalense*) (Hamid, 2014) など、これらの「hypothetical protein」の機能については不明である。

以上の結果から、P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH は新しい Meh pH ファミリーの別のグループを形成していることが分かった。

## 2.4 節 考察

P8219 Meh pH をコードする 936 bp の *P8219 mehpH*、EG-5 Meh pH をコードする 912 bp の *EG-5 mehpH* の塩基配列を決定した。両酵素の酵素化学的特徴は類似していたものの、推定アミノ酸配列の同一性は 39% とあまり高くなかった。しかし、serine hydrolase の特徴に加えて、既知 serine esterase よりも C-C hydrolase により高い同一性を示すこと、pentapeptide motif 中の X<sub>2</sub> 部位にアルギニン残基が存在することが共通していた。特に、単離され特徴づけされている serine hydrolase で、X<sub>2</sub> にアルギニン残基を持つものは P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH の他になく、これが MEHP などのフタル酸エステル類の加水分解に重要である可能性が考えられた。

データベース上には、P8219 Meh pH と EG-5 Meh pH にほぼ同一の「hypothetical protein」が 8 種登録されており、MEHP hydrolase が放線菌に分布していると考えられた。しかし、これらの細菌にはヒト、家畜の病気と関係するものが多く、分離源にフタル酸エステル類が存在するとは考え難かった。そのため、これらの「hypothetical protein」が MEHP の加水分解以外の生理学的活性を持つ可能性も考えられた。

## 2.5 節 要約

P8219 株と EG-5 株から、mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) の加水分解酵素 (MehpH) をそれぞれ精製した。両株の MehpH の酵素化学的特徴づけを行ったところ、酵素の構成がホモ 2 量体で分子質量が 60 kDa を少し超えるなど類似していた。P8219 MehpH の温度安定性と pH 安定性は、45°C まで、pH6.0~9.0、EG-5 MehpH の温度安定性と pH 安定性は、50°C まで、pH 6.0~8.5 で、多少の違いがあった。最適反応温度と最適 pH は、P8219 MehpH の場合 45°C、pH7.5、EG-5 MehpH の場合 50°C、pH8.0 となり、両株で若干異なっていた。MEHP に対する  $K_m$  と  $V_{max}$  は、P8219 MehpH では若干低く、EG-5 MehpH では若干高かった。フタル酸モノエステル類の側鎖長が長くなるほど親和性が増加する傾向が EG-5 MehpH のみに見られた。両酵素のアミノ酸配列の同一性は 39% しかなかったが、serine hydrolase の特徴および既知 serine esterase よりも C-C hydrolase に同一性を示すことが分かった。このことから、P8219 MehpH と EG-5 MehpH は新しい MehpH ファミリーの別のグループを形成していることが分かった。

また、pentapeptide motif (G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G) 中の X<sub>2</sub> 部位にアルギニン残基が存在することが共通していた。X<sub>2</sub> のアルギニン残基は既知の酵素には見られず、フタル酸モノエステル類の加水分解に重要である可能性が考えられた。データベース上には、MehpH にほぼ同一の配列の *Actinomyces* 門細菌の「hypothetical protein」が 8 種登録されており、これら「hypothetical protein」がフタル酸モノエステル類加水分解以外の生理学的活性を持つ可能性も考えられた。

## 第 3 章 変異 EG-5 Mehph の活性への影響

### 3.1 節 緒言

第 2 章で実施した阻害剤に対する感受性試験の結果および決定したアミノ酸配列の特徴から、P8219 Mehph と EG-5 Mehph のどちらも serine hydrolase と考えられた。両酵素のアミノ酸配列では、serine hydrolase に保存されている pentapeptide motif 中の X<sub>2</sub> 部位（活性中心を構成するセリンの +1 位）は疎水性残基であるが、塩基性のアルギニン残基になっていた。これは他の serine hydrolase には見られない特徴であり、MEHP などのフタル酸エステル類の加水分解に重要と推測した。本章では、この部位（EG-5 Mehph では 109 番目の残基）のアルギニン残基を疎水性残基に変異させた EG-5 Mehph を大腸菌発現させ、その特徴を調べることで、Mehph に特異的なアルギニンの酵素活性への寄与を解析する。

### 3.2 節 実験材料及び操作

#### 3.2.1 EG-5 Mehph の大腸菌発現系の構築

##### 3.2.1.1 EG-5 mehph のクローニング

以下のプライマーセットを使用し、EG-5 株の染色体 DNA を鋳型に EG-5 mehph の両端に制限酵素認識部位を付加した DNA 断片を PCR 増幅した。

(プライマーセット)

Forward: 5'-CATATGAACACAGACCTGTCCGTGA-3'

Reverse: 5'-TCTAGAACGACGCGTCGCATAG-3'

下線部はそれぞれ NdeI と XbaI の認識部位を表す。太字は EG-5 mehph の翻訳開始コドンを TTG から ATG に変更した部位を表す。

(反応溶液の組成)

EG-5 株染色体 DNA 溶液	1 $\mu$ L
10 $\times$ KOD -plus- buffer	5 $\mu$ L
2 mM dNTP mix	3 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ L
5 pmol/ $\mu$ L Forward primer	2 $\mu$ L
5 pmol/ $\mu$ L Reverse primer	2 $\mu$ L
1 U/ $\mu$ L KOD -plus-	1 $\mu$ L
滅菌水	34 $\mu$ L

(反応条件)

94°C, 2 min

94°C, 15 sec

56°C, 30sec

68°C, 1 min

4°C,  $\infty$



$\times 25$  cycle

増幅した EG-5 *mehph* を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し、EcoRV で消化した pBluescript II KS+ とライゲーションし、pBS-EG-5 *mehph* を作製した。このプラスミドで大腸菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を形質転換し、形質転換株から抽出した pBS-EG-5 *mehph* をシーケンシングし、クローニングした EG-5 *mehph* にエラーがないことを確認した。

### 3.2.1.2 発現プラスミドと発現株の構築

pBS-EG-5 *mehph* を NdeI と XbaI で切断したものをアガロースゲル電気泳動に供し、EG-5 *mehph* のバンドを切り出し精製した。これを、同じく NdeI と XbaI で消化した発現ベクター pCold I (Takara Bio) とライゲーションし、pColdI-EG-5 *mehph* を作製した。pColdI-EG-5 *mehph* で大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) を形質転換し、形質転換株を野生型 EG-5 MehphH 発現株とした。



### 3.2.2 MEHP 加水分解酵素遺伝子への変異導入

#### 3.2.2.1 R109F、R109M、R109A 変異の導入

EG-5 MehpH の pentapeptide motif 中の X<sub>2</sub> 部位のアルギニン (R<sup>109</sup>) を疎水性のフェニルアラニン (F)、メチオニン (M)、アラニン (A) にした変異酵素 (R109F、R109M、R109A) の発現プラスミドを作製するため、以下の forward プライマーの 1 つと reverse プライマーを組み合わせ、pColdI-EG-5 *mehpH* を鋳型に PCR を行った。

(プライマー)

Forward1 (R109F 用) : 5'- **TT**CGGTGGCCTGCTGGCGAG -3'

Forward2 (R109M 用) : 5'- **AT**GGGTGGCCTGCTGGCGAG -3'

Forward3 (R109A 用) : 5'- **GC**CGGTGGCCTGCTGGCGAG -3'

Reverse: 5'- CGAGTGCCCGACCAAGAATCATGT -3'

太字は変異させた塩基を表す。

(反応溶液の組成)

1 ng/μL pColdI-EG- <i>5mehpH</i>	1 μL
10×KOD -plus- buffer	5 μL
2 mM dNTP mix	3 μL
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 μL
5 pmol/μL Forward primer	2 μL
5 pmol/μL Reverse primer	2 μL
1 U/μL KOD -plus-	1 μL
滅菌水	34 μL

(反応条件)

94°C, 2 min

94°C, 15 sec

65°C, 30sec

68°C, 4 min

4°C, ∞



× 25cycle

増幅した変異導入した pColdI-EG-5 *mehph* を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し、T4 polynucleotide kinase (Takara Bio) でリン酸化した後、自己環状化させた。これらのプラスミドで大腸菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を形質転換し、形質転換株から抽出したプラスミドをシーケンスし、目的の変異が導入されていることをそれぞれ確認した。これらの変異導入したプラスミドで大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) を形質転換し、形質転換株を変異型 EG-5 Meh pH 発現株とした。

### 3.2.3 野生型および変異型 MEHP 加水分解酵素の大腸菌発現と精製

#### 3.2.3.1 野生型および変異型 EG-5 Meh pH 発現株の培養と発現酵素の精製

まず、野生型および変異型 EG-5 Meh pH 発現株を、アンピシリンを 50  $\mu\text{g/mL}$  含む LB 培地で前培養した。これを、3 L 三角フラスコに入れた LB 培地 1 L (アンピシリン 50  $\mu\text{g/mL}$  添加) に 1% 接種し、OD<sub>600</sub> が 0.5 程度になるまで 37°C で振盪培養した。三角フラスコごと氷上に 15 分置き、IPTG を 0.1 mM になるよう添加した後、さらに 16°C で overnight 振盪培養した。

培養後の菌体を遠心分離で集菌し、buffer A {20 mM Tris-HCl (pH8.0) , 200 mM NaCl} 100 mL に懸濁した。超音波処理で菌体を破碎後、10,000  $\times g$ 、30 min、4°C で遠心し、その上清をさらに 100,000  $\times g$ 、1 hr、4°C で超遠心し、cell-free extract を得た。これを buffer A で平衡化した Ni-NTA カラムに供し、20 mM および 200 mM の imidazole を添加した buffer A 各 50 mL でそれぞれ洗浄と溶出を行った。溶出画分の野生型および変異型 EG-5 Meh pH の純度を SDS-PAGE で確認し、タンパク質濃度を Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

### 3.2.4 各種基質を用いた活性測定法

#### 3.2.4.1 基質 MEHP 加水分解活性の測定法

MEHP 濃度 200  $\mu\text{M}$  および 300  $\mu\text{M}$  の活性を測定した。

2 個の 1.5 mL キュベット中で以下の溶液をそれぞれ調製した。

酵素溶液	適当量
20 mM MEHP/methanol	15 or 22.5 $\mu\text{L}$
1 M Tris-HCl (pH8.0)	150 $\mu\text{L}$
ミリ Q 水	up to 1500 $\mu\text{L}$

酵素を添加したキュベットを分光光度計 MPS-2400 (Shimadzu) のサンプル側に、添加していないキュベットをリファレンス側にセットし、45°Cで 242 nm の吸光度差をタイムコースで測定した。反応速度の算出には、242 nm の MEHP と phthalic acid の吸光係数の差  $1.83 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を使用した。

### 3.2.4.2 基質 1-naphthyl ester の加水分解活性測定法

理由は不明であるが、野生型 EG-5 Meh pH は、1-ナフチル酢酸と 1-ナフチル酪酸のどちらにも活性を示すことが分かった。

基質濃度 200  $\mu\text{M}$  の活性測定法を以下に記す。

2 個の 1.5 mL キュベット中で以下の溶液をそれぞれ調製した。

20 mM 1-naphthyl acetate/methanol or	15 $\mu\text{L}$
20 mM 1-naphthyl butyrate/methanol	
1 M Tris-HCl (pH8.0)	150 $\mu\text{L}$
ミリ Q 水	up to 1500 $\mu\text{L}$

調製した反応液を 2 つのキュベットにそれぞれ入れ、分光光度計 MPS-2400 のサンプル側とリファレンス側にセットした。サンプル側キュベットに適当量の酵素を添加し、リファレンス側にキュベットに脱イオン水を同量入れ、45°Cで 322 nm の吸光度差をタイムコースで測定した。反応速度の算出には、322 nm の 1-naphtyl ester と 1-naphthol の吸光係数の差  $2.20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を使用した。

### 3.3 節 実験結果

#### 3.3.1. 野生型および変異型 EG-5 MephH の大腸菌発現と精製

大腸菌で発現させた野生型 EG-5 MephH を Ni-NTA カラムにかけ、溶出された画分の SDS-PAGE を以下に示す。変異型 EG-5 MephH でも同様の SDS-PAGE のパターンが得られた。

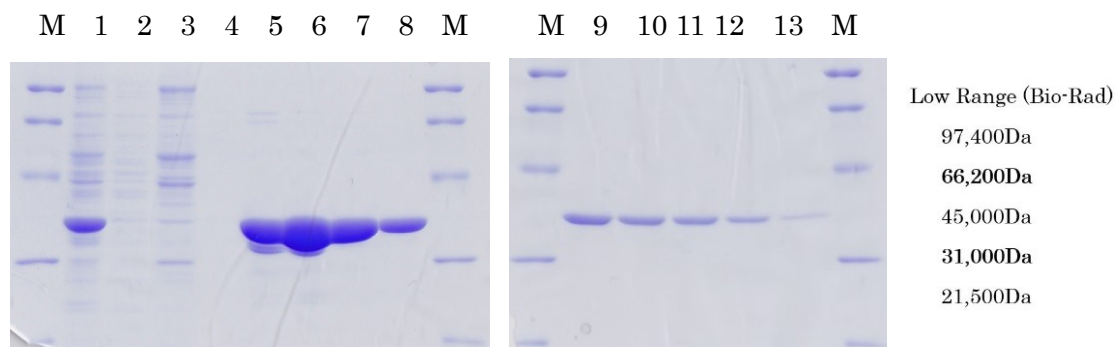


図 3-1 発現野生型 EG-5 MephH の Ni-NTA カラム溶出画分の SDS-PAGE

M, Protein Molecular Weight Marker.

Lane 1, cell-free extract (100mL 中 10 $\mu$ L をアプライ)

Lane 2, Ni-NTA カラム素通り画分 (100mL 中 10 $\mu$ L をアプライ)

Lane 3, Ni-NTA カラム洗浄画分 (50mL 中 10 $\mu$ L をアプライ)

Lane 4~13, Ni-NTA カラム溶出画分 (各 5mL 中 10 $\mu$ L をアプライ)

発現 EG-5 MephH では、N 末端に 2,043 Da のタグ配列が付加されるため分子質量は約 35 kDa と予想された。レーン 5~8 の濃いバンドの位置がその分子質量に対応していた。溶出画分のうち、タンパク質濃度の最も高い画分を活性測定に使用した。

#### 3.3.2. 基質 1-ナフチル酢酸と 1-ナフチル酪酸に対する加水分解活性

本研究の過程で、EG-5 MephH は、フタル酸エステル類以外に 1-ナフチル酢酸、1-ナフチル酪酸といった 1-naphthyl ester の加水分解能を持つことが判明した。大腸菌で発現させた野生型 EG-5 MephH および変異型 EG-5 MephH の MEHP、1-ナフチル酢酸、1-ナフチル酪酸に対する比活性を表 3-1 にまとめた。

表 3-1 野生型および変異型 EG-5 Meh pH の活性

	比活性 ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ )		
	MEHP	1-naphthyl acetate	1-naphthyl butyrate
野生型	25	3.2	13
R109F 変異型	0.22	4.0	7.7
R109M 変異型	0.15	2.9	9.5
R109A 変異型	0.25	2.7	19

基質濃度はすべて 200  $\mu\text{M}$  で測定を行った。

大腸菌で発現させた野生型 EG-5 Meh pH は、精製した native の酵素（第 2 章）と同程度の Meh pH 比活性を示した。しかし、3 種の変異型酵素の Meh pH 比活性は、野生型酵素の 1/100 程度しかなかった。一方、1-ナフチル酢酸、1-ナフチル酪酸に対する比活性は、多少バラツキがあるものの、野生型と 3 種の変異型 Meh pH で大きな違いはなかった。以上からアルギニン ( $\text{R}^{109}$ ) 残基の疎水性残基への変異はいずれも大きな Meh pH 活性の低下をもたらすことが判明した。そこで、この活性の低下が基質 MEHP の親和性の低下によるのか、反応速度の低下によるのか、あるいは両方のためかを調べるため、R109F 変異型 EG-5 Meh pH を使って  $K_m$  と  $V_{\max}$  の値を求めた。

### 3.3.3. 野生型および変異型 EG-5 Meh pH の MEHP に対する $K_m$ と $V_{\max}$ の比較

大腸菌発現した野生型と R109F 変異型の EG-5 Meh pH について、300  $\mu\text{M}$  MEHP に対する加水分解活性をタイムコースで測定した（図 3-2）。MEHP 濃度の時間的変化のグラフから、MEHP 濃度 25  $\mu\text{M}$  ごとの比活性を算出し、 $K_m$  と  $V_{\max}$  の値を求めた。

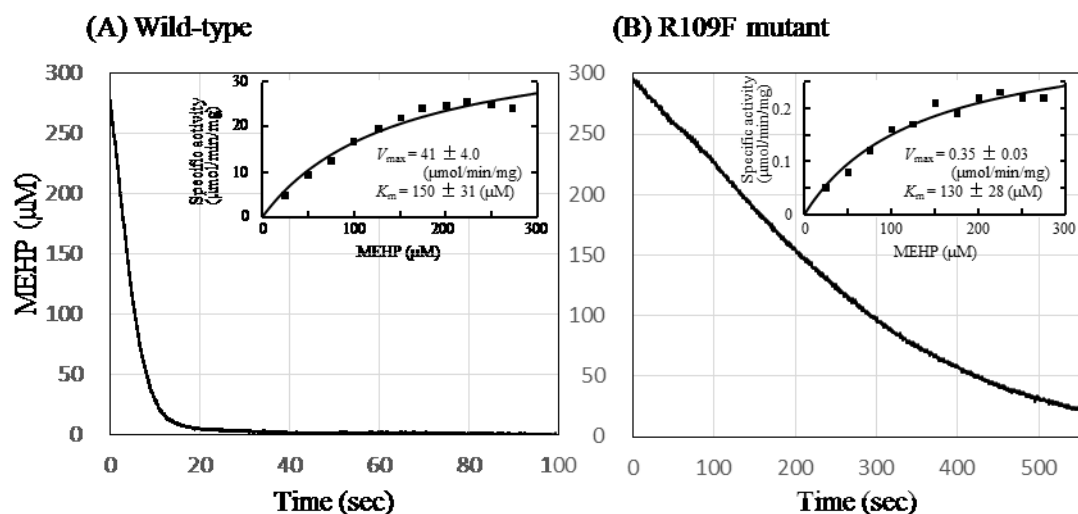


図 3-2 野生型 (A) および R109F 変異型 (B) EG-5 MehpH の MEHP 加水分解活性

野生型および R109F 変異型 EG-5 MehpH をそれぞれ終濃度 0.082 mg/mL と 0.20 mg/mL で使用した。MEHP 濃度の減少を野生型は 100 sec、変異型は 550 sec まで測定し、Microsoft Excel ファイルに記録した。MEHP 濃度 25 μM 毎に、野生型は 1 sec 間、変異型は 15 sec 間の MEHP 濃度変化を求め、比活性を算出した。これをプロットした図をそれぞれ挿入しており、プロットの Michaelis-Menten 式に従った非線形回帰曲線から  $K_m$  と  $V_{max}$  の値を求めた。

野生型 EG-5 MehpH の  $K_m$  と  $V_{max}$  の値はそれぞれ  $150 \pm 31$  μM と  $41 \pm 4.0$  μmol/min・mg protein で、EG-5 株から精製した native 酵素の値と同程度であった。一方、R109F 変異型酵素では、 $K_m$  値は  $130 \pm 28$  μM と野生型および native の EG-5 MehpH と同程度であったが、 $V_{max}$  値は  $0.35 \pm 0.03$  μmol/min・mg protein と非常に低かった。このことから、R<sup>109</sup> の F への変異は、MEHP に対する親和性に影響せず、加水分解速度のみを著しく低下させることが判明した。

### 3.4 節 考察

単離され特徴づけされている serine hydrolase の中で、pentapeptide motif 中のアルギニンが P8219 MehpH と EG-5 MehpH のみに見られた。EG-5 MehpH の R<sup>109</sup> を疎水性残基 (F、M、A) に変異させた EG-5 MehpH を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定した。これらの変異型酵素は、野生型酵素に比

べ、MEHP に対する活性が著しく低下した (表 3-1)。基質 1-ナフチル酢酸および 1-ナフチル酪酸に対する比活性が変異導入にほとんど影響されなかったことから (表 3-2)、変異導入により酵素の構造が変化または不安定化しないことが考えられる。この活性低下の原因を調べるため、MEHP を基質にして、野生型 EG-5 Meh pH と R109F 変異型 EG-5 Meh pH の  $K_m$  と  $V_{max}$  の値を調べた。その結果、変異型酵素では、 $V_{max}$  値が大きく低下し、 $K_m$  値はほとんど変化しないことが分かった (図 3-2)。MEHP に対する親和性の低下はなかった。以前から、*Micrococcus* sp. YGJ1 の monoalkyl phthalate esterase E1 と E2 では、フタル酸モノエステル類のカルボキシル基の負電荷を中和し、エステル結合に対する求核攻撃への妨害を防ぐ塩基性残基の存在が推定されていた (Maruyama et al., 2005)。しかし、塩基性残基の同定には至っていない。本研究で、初めて変異の影響は serine hydrolase の反応機構で一般に言われている基質のターゲット部位への求核攻撃への影響と考えられた。すなわち、基質フタル酸が有する free のカルボキシル基が酵素のセリン残基の OH による求核攻撃を阻害する。それを酵素の pentapeptide motif 中のアルギニン残基がカルボキシル基のマイナス電荷を中和していることが考えられた。

今後の Meh pH の立体構造解析で、より詳細な触媒メカニズムが明らかになると期待される。

### 3.5 節 要約

EG-5 Meh pH の pentapeptide motif 中の特異的なアルギニン残基 (R<sup>109</sup>) を疎水性残基に変異させ、酵素活性への影響を解析した。疎水性残基に置換した変異型酵素、EG-5 Meh pH を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定した。その結果、MEHP に対する活性は、野生型の 1/100 に低下した。基質 1-ナフチル酢酸と 1-ナフチル酪酸に対しては、変異型酵素は野生型酵素と同程度の活性を示し、変異型酵素でも立体構造を保つと考えられた。一方、R109F の変異導入により MEHP に対しては  $V_{max}$  値が大きく低下したが、 $K_m$  値はほとんど変化しなかった。これらのことから、Meh pH に特異的なアルギニン残基が MEHP のカルボキシル基のマイナス電荷を中和し、エステル結合への求核攻撃を妨害しないように機能していることを初めて確認した。

## 考察

本研究では、フタル酸ジエステル類を効率よく分解する新たな細菌を単離するため、研磨油に汚染された土壌から DEHP を唯一の炭素源とした培地で生育する細菌のスクリーニングを行った。得られた 2 株の細菌は、系統発生学的分類（表 1-3、1-4）によって *Gordonia* sp. P8219 と *Rhodococcus* sp. EG-5 と命名した。これらの属の細菌には難分解性化合物の分解能を持つものがあり、すでにフタル酸エステル類分解能を持つと報告されている細菌にも *Gordonia* 属細菌が 1 株（Jin et al., 2012）、*Rhodococcus* 属細菌が 3 株あった（Kurane et al., 1984; Hara et al., 2010; Jin et al., 2010）。P8219 株と EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子配列は既報の細菌のそれらとは一致せず、どちらも新規のフタル酸ジエステル類分解細菌であった。両菌株は 1,000 mg/L の DEHP を約 2 日でほぼ完全に分解しており、フタル酸ジエステル類の高い生分解活性を持っていた。その過程で、DEHP 分解の中間体と考えられる MEHP と phthalic acid はほとんど検出されなかった。フタル酸ジエステルの生分解中間体が観察されない現象は、*Micrococcus* sp. YGJ1 株の dibutyl phthalate 分解でも報告されており（Akita et al., 2001）、フタル酸モノエステルと phthalic acid は細胞内で生成し、分解されると考えられた。

P8219 株と EG-5 株はいずれも MEHP の加水分解酵素（MehpH）を細胞内に持っていた。P8219 MehpH と EG-5 MehpH の MEHP に対する  $k_{\text{cat}}/K_m$  はそれぞれ  $720 \text{ (s}^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{)}$  と  $480 \text{ (s}^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{)}$  で、既報のフタル酸エステル類の加水分解酵素のそれら（表 0-3、*Sulfobacillus acidophilus* DSM10332 の EstS1 は測定に用いている基質がフタル酸エステル類ではないため除外）に比べ 50 倍程度の高い活性を持っていた。そのため、両菌株の MehpH にはフタル酸モノエステル類の加水分解能を高める特徴が存在する可能性が考えられた。それは、pentapeptide motif (G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G) の X<sub>2</sub> 部位に両菌株のみ存在するアルギニン残基なのかも知れない（図 2-10）。

これを明らかにするため、EG-5 MehpH の X<sub>2</sub> 部位（R<sup>109</sup>）を疎水性残基に変異させた変異型 EG-5 MehpH を発現させた。変異型酵素はすべて、野生型酵素に比べ MEHP に対する活性が 1/100 程度まで低下した（表 3-2）。その原因は  $V_{\text{max}}$  値の低下で、 $K_m$  値は変異の影響をほとんど受けていなかった（図 3-2）。1-ナフチル酢酸および 1-ナフチル酪酸に対する酵素活性は、変異にほとん



ど影響されなかったことから、変異酵素の MEHP に対する活性低下は、酵素の構造の変化によるものではないと考えられた。これらを総合すると、MehpH に特異的なアルギニン残基は、MehpH—フタル酸モノエステル類間の相互作用（基質認識）ではなく、活性中心残基のセリンのエステル結合への求核攻撃のみ寄与していると考えられた。

本研究で測定した Meh pH のフタル酸モノエステル類に対する  $K_m$  値（表 2-3、2-4）は、他の細菌のフタル酸モノエステル加水分解酵素のそれら（表 0-3）に比べて低かった。そのため、Meh pH にはフタル酸モノエステル類との親和性を高める構造上の特徴が存在するかも知れない。このこと並びにフタル酸モノエステル類の分解における触媒メカニズムのさらなる解明には、pentapeptide motif 以外の部位の変異の解析 and/or 酵素の立体構造の解析が必要と思われる。Meh pH の大腸菌発現系は本研究で構築済みのため、これを用いて Meh pH の結晶化と X 線結晶構造解析を試みたい。

また、DEHP 生分解の最初の過程である DEHP 加水分解酵素については不明なことが多い。以前に P8219 株および EG-5 株で、染色体にランダムに挿入されるトランスポゾンを利用した遺伝子破壊を行い、DEHP 資化性を失った株のスクリーニングを行ったが、DEHP 加水分解酵素遺伝子と推定されるものは破壊されておらず、未だ同定に至っていない。現在、DEHP 加水分解活性が Meh pH と同じく cell-free extract に存在することが判明したため、カラムクロマトグラフィーを用いた酵素の精製を試みている。

これら酵素が cell-free extract に含まれることは、基質であるフタル酸ジエステル類を細胞内に取り込む機構が存在し、その機能が菌体のフタル酸ジエステル類の資化能、分解能に重要なことを意味する。実際に、上述のトランスポゾンによる遺伝子破壊では、複数の ABC transporter（ATP の化学エネルギーを使用する能動輸送体）、MFS (Major Facilitator Superfamily) protein（プロトンやナトリウムイオンの濃度勾配と電位差を利用する能動輸送体）といった輸送酵素の遺伝子が破壊された株が DEHP 資化能を失ったものとして得られている（data not shown）。これらの働きを明らかにするため、DEHP 輸送体候補の遺伝子破壊株を用いてその性状を調べ、DEHP 資化に機能する膜輸送体を明らかにしたい。

当研究室ではすでに、P8219 株および EG-5 株の *mehpH* 遺伝子周辺の染色体 DNA の配列をそれぞれ約 30 kb ずつ決定している。第 2 章で検出された、MehpH に高い同一性を示す「hypothetical protein」を持つ細菌の、「hypothetical protein」遺伝子周辺のゲノム配列とこれらを比較することで、DEHP 加水分解酵素および DEHP 輸送体の遺伝子を同定できるかも知れない。「hypothetical protein」に MEHP の加水分解以外の生理学的活性があるとなれば、それを推定する手がかりが得られる可能性もある。

これらの課題を解決することが、フタル酸ジエステル類の生分解機構の全容の解明に繋がると考えている。

## 要約

第 1 章では、研磨油で汚染された土壌から単離した DEHP 資化性細菌 2 株を単離した。これら 2 株の細胞は V 字型の桿菌で培養後期に単桿ないし球菌になること等共通した性質を持っていた。一方、コロニー形態が明らかに異なった。P8219 株は、濡れた滑らかな泥のような形状で、薄いベージュで、培養後期になると、オレンジ色、表面が粗く、乾燥した状態に変わった。

EG-5 株は、乾いた粗い形状で、薄い赤色であり、培養初期は V 字型の桿菌で、培養後期は短桿菌さらに球菌へと変化する多形性桿菌であった。培養の状態の観察から、P8219 株、EG-5 株ともに DEHP の油滴に吸着するが、その結果生じる培養液中の塊の形態がかなり異なることなどそれぞれの特徴も示した。

また、16S rRNA 遺伝子配列から、P8219 株と EG-5 株は *Gordonia* 属と *Rhodococcus* 属の細菌と同定され、系統発生的な側面からも放線菌門の細菌で、同じ *Corynebacteriales* 目に含まれるが、異なる *Gordoniaceae* 科と *Nocardiaceae* 科に属していることが分かった。

DEHP への吸着能がある点から DEHP 加水分解酵素は、分泌酵素ではなく、細胞表面で DEHP を加水分解するのか、あるいは細胞内に取り込んでから加水分解するのかいずれかの可能性が高いと思われた。

第 2 章では、P8219 株と EG-5 株から、mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) の加水分解酵素 (MehpH) をそれぞれ精製した。両株の MehpH は、ホモ 2 量体で分子質量が 60 kDa を少し超えるなど類似していた。P8219 MehpH の温度安定性と pH 安定性は、45℃まで、pH 6.0~9.0、EG-5 MehpH の温度安定性と pH 安定性は、50℃まで、pH 6.0~8.5 で、多少の違いがあった。最適反応温度と最適 pH は、P8219 MehpH の場合 45℃、pH 7.5、EG-5 MehpH の場合 50℃、pH 8.0 となり、両株で若干異なっていた。MEHP に対する  $K_m$  と  $V_{max}$  は、P8219 MehpH では若干低く、EG-5 MehpH では若干高かった。フタル酸モノエステル類の側鎖長が長くなるほど親和性が増加する傾向が EG-5 MehpH のみに見られた。

両酵素のアミノ酸配列の同一性は 39%しかなかったが、serine hydrolase の特徴および既知 serine esterase よりも C-C hydrolase に多少の同一性を示すことが分かった。P8219 MehpH と EG-5 MehpH は新しい MehpH ファミリーの別のグループを形成していることが分かった。

pentapeptide motif (G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G) 中の X<sub>2</sub> 部位にアルギニン残基が存在することが共通していた。X<sub>2</sub> のアルギニンは既知の酵素には見られず、フタル酸モノエステル類の加水分解に重要である可能性が考えられた。一般にゲノムシーケンス等によって遺伝子が同定され、酵素としては単離され特徴付けがされていない hypothetical protein がタンパク質データベースに多く存在する。最近、登録された hypothetical protein の中に Meh pH と高い (>99%) 同一性を示すものが、8 種類存在する。P8219 Meh pH とは 5 種類、EG-5 Meh pH とは 3 種類である。これら「hypothetical protein」がフタル酸モノエステル類加水分解酵素として機能している可能性と、それ以外の生理学的活性を持つ可能性が考えられた。

第 3 章では、EG-5 Meh pH の pentapeptide motif 中の特異的なアルギニン (R<sup>109</sup>) を疎水性残基に変異させ、酵素活性への影響を解析した。変異型酵素、EG-5 Meh pH を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定した。その結果、MEHP に対する活性は、野生型の 1/100 に低下した。一方、基質 1-ナフチル酢酸と 1-ナフチル酪酸に対しては、変異型酵素は野生型酵素と同程度の活性を示し、変異型酵素でも立体構造を保っていると考えられた。活性低下の原因を詳しく調べるため、R109F の変異導入により MEHP に対しては  $V_{\max}$  値が大きく低下したが、 $K_m$  値はほとんど変化しなかった。これらのことから、Meh pH に特異的なアルギニン残基が MEHP のカルボキシル基のマイナス電荷を中和し、エステル結合への求核攻撃を妨害しないように機能しているためであることを初めて確認した。

## 参考文献

- 1) Adékambi T, Stein A, Carvajal J, Raoult D, Drancourt M. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. J Clin Microbiol. 2006; 44(4):1268-1273.
- 2) Adibi JJ, Whyatt RM, Hauser R, Bhat HK, Davis BJ, Calafat AM, Hoepner LA, Perera FP, Tang D, Williams PL. Transcriptional biomarkers of steroidogenesis and trophoblast differentiation in the placenta in relation to prenatal phthalate exposure. Environ Health Perspect. 2010; 118(2):291-296.
- 3) Akita K, Naitou C, Maruyama K. Purification and characterization of an esterase from *Micrococcus* sp. YGJ1 hydrolyzing phthalate esters. Biosci Biotechnol Biochem. 2001; 65(7):1680-1683.
- 4) Bao LJ, Wei YL, Yao Y, Ruan QQ, Zeng EY. Global trends of research on emerging contaminants in the environment and humans: a literature assimilation. Environ Sci Pollut Res Int. 2015; 22(3):1635-1643.
- 5) Chopra V, Harley K, Lahiff M, Eskenazi B. Association between phthalates and attention deficit disorder and learning disability in U.S. children, 6-15 years. Environ Res. 2014; 128:64-69.
- 6) Ding J, Wang C, Xie Z, Li J, Yang Y, Mu Y, Tang X, Xu B, Zhou J, Huang Z. Properties of a newly identified esterase from *Bacillus* sp. K91 and its novel function in diisobutyl phthalate degradation. PLoS One. 2015; 10(3): e0119216.
- 7) Eaton RW. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. J Bacteriol. 2001; 183(12):3689-3703.

- 8) Fang CR, Yao J, Zheng YG, Jiang CJ, Hu LF, Wu YY, Shen DS. Dibutyl phthalate degradation by *Enterobacter* sp. T5 isolated from municipal solid waste in landfill bioreactor. *Int Biodeter Biodegr*. 2010; 64(6):442-446.
- 9) Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl*. 2006; 29(1):140-147.
- 10) Guyton KZ, Chiu WA, Bateson TF, Jinot J, Scott CS, Brown RC, Caldwell JC. A reexamination of the PPAR-alpha activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants. *Environ Health Perspect*. 2009; 117(11):1664-1672.
- 11) Hamid ME. Current Perspectives on *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense*, the Causal Agents of Bovine Farcy. *Vet Med Int*. 2014; 2014:247906.
- 12) Hara H, Stewart GR, Mohn WW. Involvement of a novel ABC transporter and monoalkyl phthalate ester hydrolase in phthalate ester catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(5):1516-1523.
- 13) Jaakkola JJ, Knight TL. The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2008; 116(7):845-853.
- 14) Jin DC, Liang RX, Dai QY, Zhang RY, Wu XL, Chao WL. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(10):1440-1445.
- 15) Jin D, Bai Z, Chang D, Hoefel D, Jin B, Wang P, Wei D, Zhuang G. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp. strain

- QH-11: Genetic identification and degradation kinetics. J Hazard Mater. 2012; 221-222:80-85.
- 16) Jin D, Kong X, Cui B, Bai Z1, Zhang H. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by a newly isolated halotolerant *Sphingobium* sp. Int J Mol Sci. 2013; 14(12):24046-24054.
  - 17) Kim KK, Lee CS, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Lee ST. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium isolated from a wastewater-treatment bioreactor. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(5):1427-1433.
  - 18) Kurane R, Suzuki T, Fukuoka S. Purification and some properties of a phthalate ester hydrolyzing enzyme from *Nocardia erythropolis*. Appl Microbiol Biotechnol. 1984; 20: 378-383.
  - 19) Kurane R. Microbial degradation and treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons and plasticizers. Ann N Y Acad Sci. 1997; 829:118-134.
  - 20) Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. UK: Wiley; 1991. pp. 115-148.
  - 21) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007; 23(21):2947-2948.
  - 22) Liang Q, Takeo M, Chen M, Zhang W, Xu Y, Lin M. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9. Microbiology. 2005; 151(10):3435-3446.

- 23) Liao CS, Chen LC, Chen BS, Lin SH. Bioremediation of endocrine disruptor di-n-butyl phthalate ester by *Deinococcus radiodurans* and *Pseudomonas stutzeri*. Chemosphere. 2010; 78(3):342-346.
- 24) Linos A, Steinbüchel A, Spröer C, Kroppenstedt RM. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49(4):1785-1791.
- 25) Maruyama K, Akita K, Naitou C, Yoshida M, Kitamura T. Purification and characterization of an esterase hydrolyzing monoalkyl phthalates from *Micrococcus* sp. YGJ1. J Biochem. 2005; 137(1):27-32.
- 26) Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. Regul Toxicol Pharmacol. 2008; 50(1):37-49.
- 27) Ngeow YF, Leong ML, Wong YL, Wong GJ, Tan JL, Wee WY, Ong CS, Pang YK, Choo SW. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium massiliense* Strain M159, Showing Phenotypic Resistance to  $\beta$ -Lactam and Tetracycline Antibiotics. Genome Announc. 2013; 1(4). pii: e00669-13.
- 28) Ouchiya N, Miyachi S, Omori T. Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge. J Gen Appl Microbiol. 1998; 44(1):57-63.
- 29) Quan CS, Liu Q, Tian WJ, Kikuchi J, Fan SD. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 66(6):702-710.
- 30) Ren H, Aleksunes LM, Wood C, Vallanat B, George MH, Klaassen CD, Corton JC. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-



- (2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol Sci.* 2010; 113(1):45-59.
- 31) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12):2725-2729.
  - 32) Tchelet R, Meckenstock R, Steinle P, Jan Roelof van der Meer JR. Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. *Biodegradation.* 1999; 10(2):113-125.
  - 33) van der Meer JR, Werlen C, Nishino SF, Spain JC. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(11):4185-4193.
  - 34) Wu J, Liao X, Yu F, Wei Z, Yang L. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(6):2483-2491.
  - 35) Xu Y, Cook TJ, Knipp GT. Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and its metabolites on fatty acid homeostasis regulating proteins in rat placental HRP-1 trophoblast cells. *Toxicol Sci.* 2005; 84(2):287-300.
  - 36) Xu XR, Li HB, Gu JD. Biodegradation of an endocrine disrupting chemical di-*n*-butyl-phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2005; 55(1):9-15.
  - 37) Zhang XY, Fan X, Qiu YJ, Li CY, Xing S, Zheng YT, Xu JH. Newly identified thermostable esterase from *Sulfobacillus acidophilus*: properties and performance in phthalate ester degradation. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(22):6870-6878.

## 本論文に関係のある論文

Tuguhiro Nishioka, Makoto Iwata, Takuya Imaoka, Maiko Mutoh, Yoshihiro Egashira, Takashi Nishiyama, Takashi Shin, Takao Fujii. A Mono-2-Ethylhexyl Phthalate Hydrolase from a *Gordonia* sp. That Is Able To Dissimilate Di-2-Ethylhexyl Phthalate. Applied and Environmental Microbiology, Apr. 2006; 72(4):2394-2399.

Makoto Iwata, Takuya Imaoka, Takashi Nishiyama, Takao Fujii. Re-characterization of Mono-2-Ethylhexyl 1 Phthalate Hydrolase Belonging to the Serine Hydrolase Family. Journal of Bioscience and Bioengineering, Feb. 2016; doi:10.1016/j.jbiosc.2016.01.008

## 謝辞

本研究を行うに際し、終始ご懇切にご指導を賜りました崇城大学生物生命学部応用生命科学科・教授 藤井隆夫先生に心より深く感謝申し上げます。また本研究を遂行する過程で適切な実験指導、ご助言によってご指導いただきました同大学生物生命学部応用生命科学科・准教授 西山孝先生に御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、ご校閲ならびに有益なご助言をいただき、副査をご快諾くださいました同大学生物生命学部応用生命科学科・教授 千々岩崇仁先生、同大学生物生命学部応用微生物工学科・教授 安藤祥司先生に厚く御礼申し上げます。