

環境汚染物質のバイオレメディエーション

Bioremediation of environmental pollutants

其木茂則

麻布大学生命・環境科学部

Shigenori Sonoki

School of Life and Environmental Science, Azabu University

Abstract: The white-rot fungus *T. versicolor* UAMH 8272 produced two groups of laccases, each of which included several isoforms showing different isoelectric points (pI). Group 1 and group 2 laccases respectively displayed higher pI 5–6 and lower pI 3–4. Of the four cloned full-length laccase cDNAs, Lac 1 and Lac 4 were expressed in the heterologous protein expression system using *Aspergillus oryzae*. The measured pI of each Lac 1 and Lac 4 expressed in *A. oryzae* was lower than that of pI predicted from the amino acid composition. With this regard, isoelectric focusing of Lac 1 showed the presence of multiple protein bands in the 3.0–4.0 pI range, although the predicted pI value of Lac 1 was 4.7. Similarly, Lac 4 exhibited a pI value which was lower than that predicted (3.6 vs. 4.3, respectively). In all tested hydroxyPCBs, higher chlorinated hydroxyPCBs were less susceptible to in vitro degradation by laccase than lower chlorinated hydroxyPCBs. Although Lac 4 showed a generally higher activity than Lac 1, the two laccases were characterized by quite different substrate specificity toward two hydroxy-tetrachlorobiphenyl congeners. Two metabolites were obtained from the metabolism of hydroxy-pentachlorobiphenyl: a 10 chlorine-substituted dimer with a C–O bond, and one with a C–C bond.

1. 目的

生物の持つ代謝機能を利用して汚染された環境の修復を目指す技術は、バイオレメディエーションと呼ばれ、低コストで環境負荷が小さいなどの利点があると考えられている。樹木の構成成分であるリグニンをリグニン分解系酵素と呼ばれる酵素群により酸化分解し、エネルギーとして利用している白色腐朽菌は、その化学構造がリグニンと類似している難分解性有機汚染物質に対しても代謝活性を有していることから、バイオレメディエーションに白色腐朽菌を利用した報告が数多くなされている(1-7)。しかし複数種類存在するリグニン分解系酵素の中で、有機汚染物質の代謝との関連を詳しく検討した報告

は少ない。よって、本研究ではリグニン分解系酵素の中でも特に多くのアイソフォームが存在し、様々な化学物質に対する代謝活性が期待できるラッカーゼに注目し、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* が産生するラッカーゼアイソフォーム遺伝子のクローニングと、麴菌を利用した高タンパク質発現系を用いて発現させたラッカーゼアイソフォームによる環境汚染物質代謝性について検討を行う。

2. 方法

白色腐朽菌はカナダのアルバータ大学の University of Alberta Microfungus Collection & Herbarium (UAMH) から購入した *T. versicolor* (UAMH 8272) を使用し、ポリペプトン培地を用いて培養を行った。

白色腐朽菌からの総RNA調製は、定法によりグアニジンチオシアン酸塩/塩化リチウムを用いて行った。NCBIのDNAシーケンスデータベースにおける*T. versicolor*を由来とするラッカーゼをコードする完全長cDNAの塩基配列同士の相同性を比較した結果に基づき、95%以上の相同性を持つグループを4つにまとめ、それぞれの完全長cDNAをクローニングするためのプライマーセットを構築した。

クローニングにはバクテリオファージラムダの部位特異的組換えシステムに基づいたクローニング法であるインビトロジェン社のゲートウェイテクノロジーを利用した。クローニングしたラッカーゼ完全長cDNAは*Aspergillus oryzae*タンパク質発現系を利用して、各アイソフォームを単一にかつ大量に産生させた(8,9)。

ラッカーゼ完全長cDNAで形質転換した*A. oryzae*株の培養液から陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いてラッカーゼアイソフォームを精製した。精製したラッカーゼアイソフォームの等電点電気泳動には、両性担体Pharmalyte pH 2.5-5を含んだ0.5%アクリルアミドゲルを用い、ラッカーゼ活性の検出には、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を用いて420 nmの吸光度を測定した。

水酸化PCB(HO-PCBs)の代謝試験については、6種類の同族体、4-OH-3,5-DiCB(HO-DiCB)、4-OH-2',3,5'-TrCB(HO-TiCB)、4-OH-2',3,5,5'-TeCB(HO-TeCB(1))、4-OH-2',3',4',5'-TeCB(HO-TeCB(2))、4-OH-2',3,3',4',5'-PeCB(HO-PeCB)、4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB(HO-HxCB)を用いて、37℃で1時間反応したのち、固相抽出法で同族体を回収し、トリメチルシリルジアゾメタン-メタノール溶液でメチル化し、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフで分析した。

ラッカーゼによるHO-PCBsの分解産物の解析には、HO-P5CBを用いて37℃で1日間振とう反応させたのち、代謝産物は逆相分配カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分離調製した。代謝産物はトリメチルシリルジアゾメタンによる誘導体化を施し、質量分析計を用いて直接注入法で解析した。質量分析の条件は、イオン化には電子イオン化を用い、イオン化電圧70 eV、イオン源温度280℃であった。

3. 結果と考察

3-1. *T. versicolor*由来の完全長ラッカーゼcDNAのクローニング

NCBIのDNAデータベースで*T. versicolor*由来のラッカーゼ遺伝子を検索した結果、accession No.でAF414109, AY049725, AY081188, Y18012, X84683, U44430, U44431およびU44851の計8種類の完全長cDNAが見つかった。これらの遺伝子を遺伝子解析ソフトGENETYX Version 8.0(SOFTWARE DEVELOPMENT)にて互いの相同性を検索した結果AF414109, Y18012およびAY081188の3種類の塩基配列が95.8%以上の相同性を示したため、これをひとつのグループLac1遺伝子として分類した。同じくAY049725, U44851およびU44430が互いに95.6%以上の相同性を示したためLac2遺伝子として分類した。残るX84683とU44431は他のどの塩基配列と相同性を比較しても、最高値で72.6%と低かったため、単独でLac3遺伝子、Lac4遺伝子と分類した。データベース上のLac1遺伝子からLac4遺伝子まで4グループのcDNAの塩基配列情報の冒頭部分と末端部分を参考に、*T. versicolor* UAMH 8272株からラッカーゼの完全長cDNAを獲得するためインビトロジェン社のゲートウェイテクノロジー対応プライマー4対を設計した。これらのプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、それぞれ1.5 kbp付近のバンドが獲得できた。DNAシーケンスの結果、多くのラッカーゼに共通して見出される4つの銅原子結合部位が含まれていたことから、それぞれラッカーゼであることが確認できた(10)。

3-2. *A. oryzae*タンパク質発現系によるラッカーゼの発現

ラッカーゼ遺伝子を導入した*A. oryzae*の培養液から陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製したラッカーゼ活性を比較したところ、Lac2とLac3に比べLac1とLac4が高活性を示したことから、この後の実験にはLac1とLac4を用いた。精製したLac1とLac4を等電点電気泳動した結果、Lac1はpI 4.0付近に最も濃いバンドが確認され、そこから3.3付近にかけて一定の間隔をおいて少なくとも5本以上のバンドの存在が認められたのに対し、Lac4は3.6付近に単1バンドの存在が認められた。

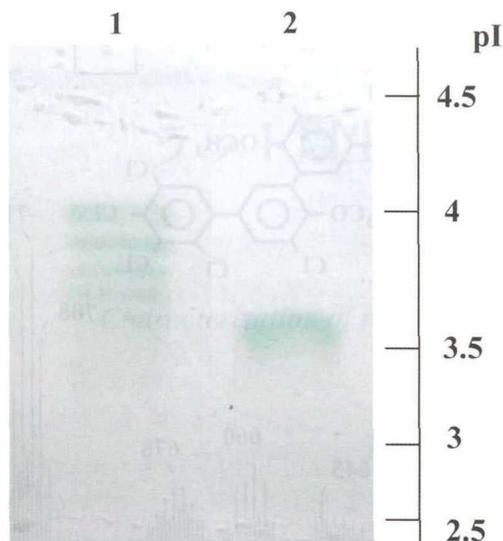


Fig. 1 Isoelectric focusing of laccase isoforms expressed from cloned cDNAs in the heterologous protein expression system using *A. oryzae*. The purified isoforms of Lac 1 (lane 1) and Lac 4 (lane 2) were analyzed at pH 2.5–5. The gel was stained with ABTS to visualize laccase activities.

Bertrandらは *T. versicolor* 由来のラッカーゼ Lac IIIb (NCBI accession number AY414109) が Lac1 と同じく等電点の異なる5つのアイソフォームを示すことを報告しており、この理由として、Asn-X-Thrの配列を持つ6つのN-グリコシル化部位におけるグリコシル化の違いを反映しているものと考えている(11)。Lac 1にも同じく6つのAsn-X-Thrの配列が存在することからLac IIIbと同様にラッカーゼタンパク質翻訳後の多様なグリコシル化が起きていることが示唆される。

3-3. HO-PCBsの代謝

6種類のHO-PCB同族体に対するLac1とLac4の代謝性を検討した。その結果、HO-DiCBに対してはLac1, Lac4共にほぼ100%の分解率を示した。また、塩素化の位置の異なる2つの4塩素化同族体では、HO-TeCB(1)はHO-TeCB(2)よりもラッカーゼによる代謝を受け易かった。さらにLac1とLac4の分解率を比較すると、HO-TeCB(1)はLac1が60%、Lac4が73%でLac4の方が分解率が高かったが、HO-TeCB(2)はLac1が34%、Lac4が18%でLac1のほうが高い結果となった。またHO-PeCBおよびHO-HxCBに対してはLac1とLac4でほぼ同様の代謝率となった。

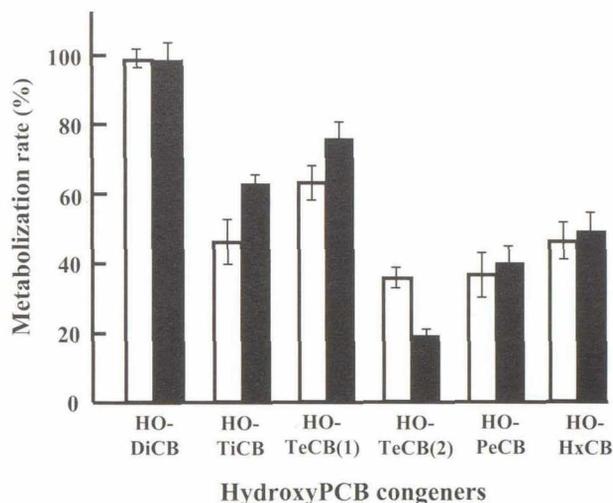


Fig. 2 Metabolism of six hydroxy polychlorinated biphenyl congeners with Lac 1 (open bar) and Lac 4 (closed bar) laccases. Each bar represents the mean and the standard deviation of three determinations.

3-4. ラッカーゼによるHO-PeCBの分解産物の解析

代謝産物として、親分子であるHO-PeCBよりも極性の低い2つの物質が確認された。質量分析計により得られたマススペクトルは非常に近似していたが、両方共に親イオンと見られるフラグメントが、HO-PeCBの2倍程度の質量を有し、なおかつ10塩素化合物特有のフラグメント形状を示していた。そこで両物質は一方はベンゼン環と水酸基が重合(C-O結合)し、もう一方はベンゼン環同士が重合(C-C結合)した二量体ではないかと推測した。両物質は水酸基の数が異なるため、この水酸基をメチル誘導体化し、質量分析を行った。その結果、一方の代謝産物は親イオンの分子量が $M + 4 = 696$ であり、C-O結合した二量体であった。また、他方の親イオンは分子量が $M + 4 = 710$ であり、C-C結合した二量体であった。

4. 要約

NCBIデータベース上の *T. versicolor* 由来の8種類のラッカーゼ遺伝子を、それらの相同性により4つのグループ(Lac1遺伝子, Lac2遺伝子, Lac3遺伝子およびLac4遺伝子)に分け、これらをクローニングするための4対のプライマーを作製した。RT-PCRの結果、これら4種類の遺伝子に相当すると考えられる完全長cDNAを獲得した。4種類の遺伝子の塩基配列を比較したところ、互いの相同性は75%以下と

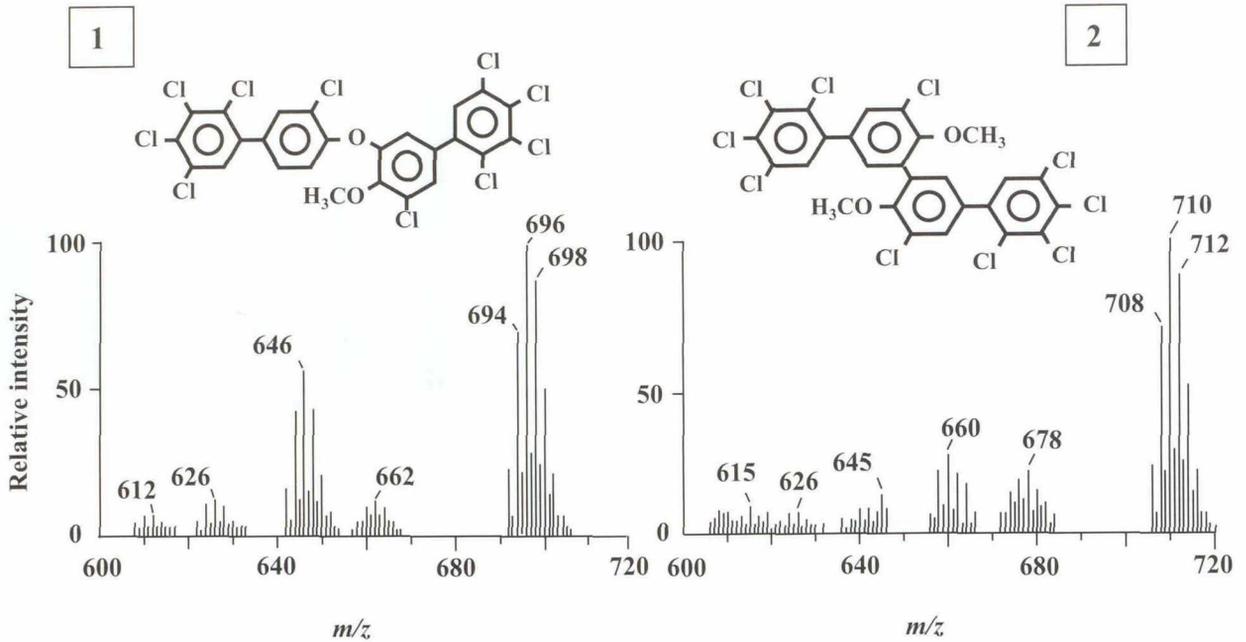


Fig. 3 Mass spectra of two metabolites from 4-hydroxy-2',3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl. The deducible C-O bonded (1) and C-C bonded (2) structures are also shown.

なった。これらの遺伝子がコードするタンパク質はラッカーゼ特有の4か所の銅原子結合部位を保存していることが確認された。これらを麹菌 *A. oryzae* に導入した結果、基質のABTSを酸化してラッカーゼ活性を示す形質転換体が獲得された。以降の実験は、高い酵素活性が得られたLac1およびLac4について行った。形質転換 *A. oryzae* の培養液から陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した酵素の等電点電気泳動では、Lac1は等電点4.0を最大とする複数バンドが、Lac4は3.6の単一バンドが確認された。

エストロゲン作用等を示し、内分泌かく乱物質の一つと危惧されている6種類のHO-PCBの代謝試験では、4塩素化HO-PCBの2種類の同族体のうち、4-OH-2',3,5,5'-TeCBの方が4-OH-2',3',4',5'-TeCBよりも強く代謝を受けた。また、4-OH-2',3,5,5'-TeCBについてはLac4の方がLac1よりも高い代謝活性を示し、4-OH-2',3',4',5'-TeCBについては逆にLac1の方が代謝活性が高く、アイソフォーム間で基質特異性の違いが見られた。

また、ラッカーゼと5塩素化HO-PCBの反応から、PCB同士が結合した二量体の中間代謝物2物質が初めて同定され、そのうちの一種類は水酸基を介してC-O結合しており、他方は、ベンゼン環同士がC-C

結合した二量体であることが示唆された。

文献

- 1) Barr DP, Aust SD, Rev Environ Contam Toxicol 138: 49-72 (1994)
- 2) Van Aken B, Hofrichter M, Scheibner K, Hatakka AI, Naveau H, Agathos SN, Biodegradation 10: 83-91 (1999)
- 3) Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD, Appl Microbiol Biotechnol 54: 751-758 (2000)
- 4) Kubatova A, Erbanova P, Eichlerova I, Homolka L, Nerud F, Sasek V, Chemosphere 43: 207-215(2001)
- 5) Han MJ, Choi HT, Song HG, J Microbiol 42: 94-98 (2004)
- 6) Soares A, Jonasson K, Terrazas E, Guieysse B, Mattiasson B, Appl Microbiol Biotechnol 66: 719-725 (2005)
- 7) Kamei I, Kogura R, Kondo R, Appl Microbiol Biotechnol 72: 566-575 (2006)
- 8) Minetoki T, Kumagai C, Gomi K, Kitamoto K, Takahashi K, Appl Microbiol Biotechnol 50: 459-467 (1998)
- 9) Tsuboi H, Koda A, Toda T, Minetoki T, Hirotsune M, Machida M, Biosci Biotechnol Biochem 69: 206-208 (2005)
- 10) Kwon SI, Anderson AJ, Canadian Journal of Botany 80: 563-570 (2002)
- 11) Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C, Biochemistry 41: 7325-7333 (2002)