

ダイオキシン分解菌，V2からのリグニンペルオキシダーゼ 活性を有するフラクションの分画の試み*

大川 浩樹* · 伊藤 和貴* · 橘 燦郎*

Trial for fractionation of fractions having lignin peroxidase activity
from fungus V2, a dioxins-degradable fungus**.

Hiroki OHKAWA*, Kazutaka ITOH* and Sanro TACHIBANA*

Summary : Fractionation of lignin peroxidase (LiP), a peroxidase functioned by addition of hydrogen peroxide (H_2O_2), from an extracellular crude enzymes from fungus V2 was tried. The crude enzymes separated into 18 fractions (Fr.1-18) by DEAE Bio-Gel A ion-exchange chromatography, and five fractions having high LiP activity were obtained. After further fractionation of the fractions by DEAE Bio-Gel A ion-exchange chromatography, three fractions (Fr.5-13, Fr.A-9, Fr.B-9) having higher LiP activity were separated from the crude enzymes. Among them, Fr.A-9 maximally degraded 49.7% of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF). The LiP activity of the fraction was 275 Unit/ml. In addition, a part of 2,4,8-TCDF was degraded by the fraction without addition of H_2O_2 . So, the existence of enzymes responsible for the degradation except LiP in the fraction was also suggested. However, the degradation rate of 2,4,8-TCDF with the fraction by addition of H_2O_2 was considerably higher than that with the fraction by no addition of H_2O_2 . Consequently, it was considered that a large part of the fraction was LiP. Further fractionation of the fraction will be needed for isolation of pure LiP.

Keywords: 2,4,8-trichlorodibenzofuran, lignin peroxidase, degradation of dioxins, ion-exchange chromatography

要 旨 天然からスクリーニングにより見出したダイオキシン分解菌 (V2) から、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) (一種の過酸化酵素でその作用時に過酸化水素を必要とする) 活性の高いフラクションの分画を試みた。V2から得た菌体外粗酵素をDEAE Bio-Gel Aを用いた、イオン交換クロマト

* 森林資源利用化学研究室 Laboratory of Chemistry and Biotechnology for Utilization of Forest Resources

** Received November 30, 2000. 本報告の一部は第43回リグニン討論会 (1998年10月, 府中) で発表した。

グラフィーにより、18フラクションに分画した。そして、LiP活性の高い5フラクションを得た。さらに、それらのフラクションをDEAE Bio-Gel Aを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより細分し、LiP活性の高い3フラクション(Fr.5-13, Fr.A-9, Fr.B-9)を得た。中でもFr.A-9は2,4,8-TCDFを最高49.7%分解できた。このフラクションのLiP活性は275 Unit/mlであった。分画したフラクションは過酸化水素を添加しなくても一部の2,4,8-TCDFを分解したことから、分画したフラクション中にLiP以外の分解酵素の存在も示唆された。しかし、2,4,8-TCDFの分解率は過酸化水素無添加時よりも過酸化水素添加時の方が遙かに高いので、このフラクションの大部分はLiPと考えられた。

1. 緒 言

1. 緒 言

先に著者ら^{1, 2)}は、天然からダイオキシン分解能を有する菌のスクリーニング法を見出すと共に、そのスクリーニングにより天然から得た3種の菌(563, V1, V2)と2種の木材腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*) を用いて2,7-ジクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(2,7-DCDD)の分解とその分解時の酵素活性との関連について報告した。また、先に使用した5種の菌(天然からスクリーニングにより得た3種の菌と2種の木材腐朽菌)を用いて、2,4,8-トリクロロジベンゾフラン(2,4,8-TCDF)及び塩素置換のないジベンゾフラン(DF)の分解についても検討した³⁾。その結果、5種の菌は2,4,8-TCDFを2%~76%分解できることを見出すとともに2種の菌 [*P. chrysosporium* と天然からスクリーニングした菌(V2)]によりDFが81%~95%分解されることを見出した。さらに、前報⁴⁾では、*P. chrysosporium* およびV2の2種の菌を用いて、微生物分解時の酵素活性と2,4,8-TCDFの分解率との関係について調べた。その結果、2,4,8-TCDFの分解には、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)などその作用時にH₂O₂を必要とする酵素とジオキシゲナーゼなどその作用時にH₂O₂を必要としない酵素が分解に関与していることが示唆された⁴⁾。そこで、本研究では、天然からスクリーニングにより見出したV2からLiP活性を有するフラクションの分画を試みるとともに、得られたフラクションが2,4,8-TCDFをどの程度分解できるのかについて検討した。

2. 実 験

2.1 試薬

2,4,8-TCDFは、シグマアルドリッチジャパン(株)より購入した。3,5-ジクロロサリチル酸および2,5-ヒドロキシ安息香酸は東京化成(株)より購入した。また、DEAE Bio-Gel AはBio-Rad Laboratories社製の膨潤済み交換体を使用した。

2.2 供試菌

天然からスクリーニングにより見出した1種の菌(V2)を用いた。

2.3 V2の液体培養および菌体外粗酵素の調製

2.3.1 V2の液体培養

前報²⁾と同様にして行った。Kirkら⁵⁾のBasal溶液にコハク酸ナトリウム(20mM)とグルコース(2%)および窒素源として酒石酸アンモニウム(1.2mM)を加えた。この培養液のpHを4.5に調整後、オートクレーブで滅菌した。これに0.1%濃度になるようにTween80を加えた。上記の培養液各20mlを100mlの三角フラスコに分注し、これにV2を一白金耳植菌した後、フラスコにダブルキャップをして

25℃で5日間静置培養した。なお、毎日1回各培養フラスコに酸素を吹き込んだ。所定期間培養後、遠心分離(10,000rpm, 4℃, 15分間)し、菌体と培養ろ液に分けた。培養ろ液を菌体外粗酵素液として使用した。

2.3.2 菌体外粗酵素の調製

2.3.1で得たV2からの菌体外粗酵素液に硫酸アンモニウムを加え0.9飽和として、4℃で一晩放置した。その後、冷却遠心分離(10,000rpm, 4℃, 20分間)して沈殿部を得た。この沈殿部を少量の酢酸緩衝液(20mM) (pH 3.0)に溶解し、4℃で一晩透析した。これをもう一度冷却遠心分離(10,000rpm, 4℃, 20分間)して沈殿部を取り除いた。この溶液をLowry法⁶⁾によりタンパク量を測定し、1mg/mlになるように酢酸緩衝液(20mM, pH 3.0)で希釈して、菌体外粗酵素とした。

2.4 V2からの菌体外粗酵素のDEAE Bio-Gel AによるLiP分画

2.4.1 試料のカラムへの充填

DEAE Bio-Gel Aをコハク酸ナトリウム緩衝液(5.0mM) (pH 5.5)で平衡化した後、カラム(直径3.5cm, 長さ60cm)に充填した。(なお、予めタンパク質試料がコハク酸ナトリウム緩衝液(5.0mM) (pH5.5)に溶解することを確認した。)2.3.1で得た菌体外粗酵素をカラムに重層した。カラム容積の約2倍の緩衝液で溶出して、夾雑タンパク質を除去した後、NaCl溶液の濃度を段階的に変化させて酵素を溶出した(0mMから0.02mMずつ段階的にNaCl溶液で0.14mMの濃度になるまで各々100mlで溶出した)。溶出液は5ml毎にフラクションコレクターで集めた。分画して得られた各フラクションは280nmの吸光度を測定し、予め作成した検量線からタンパク量を求めた。また、吸光度の変化から18フラクションに分画した。

2.4.2 分画したフラクションのLiP活性

前報⁴⁾に従って、前記の18フラクションのLiP活性を測定した。

2.4.3 LiP活性の高いフラクション, Fr.5, Fr.6~8, Fr.13~14のDEAE Bio-Gel Aによる分画

2.4.1と同様にして、タンパク量当たりのLiP活性が高いフラクションFr.5, Fr.6~8, およびFr.13~14を再度DEAE Bio-Gel Aで分画した。なお、Fr.6~8, Fr.13~14は合併し、各々Fr.A, Fr.Bとしてさらに分画した。Fr.5, Fr.A, Fr.BをDEAE Bio-Gel Aにより更に分画して得られた各フラクションは280nmの吸光度を測定するとともに、予め作成した検量線からタンパク量を求めた。また、吸光度の変化からFr.5, Fr.A, Fr.Bは各々13, 9, 13フラクションに細分した。

2.4.4 分画したフラクションによる2,4,8-TCDFの分解

分画したフラクション中で、タンパク量当たりのLiP活性が高いフラクション(各10ml)を試験管に取り、これに0.1%濃度になるようにTween 80を添加した後、25℃で保温した。保温後、H₂O₂(100m mol)を添加し、1つの試験管毎に0.2mlのDMFに溶解した1.25m molおよび0.25m molの2,4,8-TCDFを添加した。反応は25℃で1, 3, 6時間振とうしながら行った。また、H₂O₂を添加した場合と同様にして、H₂O₂無添加のものも行った。

2.4.5 抽出・分析

所定時間反応後、前報⁴⁾と同様にして、各反応生成物を得た。各反応生成物は前報⁴⁾と同様にしてガスクロマトグラフ(GLC)で分析した。

2.4.6 分画したフラクションの酵素活性の測定

前報⁴⁾と同様にして、分画したフラクション中のLiP, マンガンペルオキシダーゼ, ラッカーゼおよびジオキシゲナーゼの活性を調べた。

3. 結果と考察

3.1 V2からのLiPの分画の試み

前報で示した結果⁴⁾から、V2による2,4,8-TCDFの分解にはLiPおよびジオキシゲナーゼなどが関与しているものと考えられた。そこで、LiPによる2,4,8-TCDFの分解について検討する一環として、V2からLiP活性を有するフラクションを分画し、それらが2,4,8-TCDFをどの程度分解できるのかについて調べた。V2は著者らが天然からスクリーニングした菌であり、未だV2からのLiPの分画は報告されていない。

3.1.1 分画された各フラクションのLiP活性

図1にDEAE Bio-Gel Aによる分画のプロファイルを示した。図1に示したようにV2からの菌体外粗酵素を18のフラクションに分画した。分画された各フラクションのLiP活性を図2に示した。図2に示したLiP活性の結果から2つのピークが観察され、Fr.5, Fr.6, Fr.7およびFr.13, Fr.14のLiP活性が高かった。また、図2には示していないが、タンパク量当たりのLiP活性も高いことが分かった。中でもFr.6のLiP活性は338Unit/mlと最も高かった。

LiP活性の高いこれらのフラクションについて更に分画を行った。なお、図1および2から、Fr.6~Fr.8を併せてフラクションA (Fr. A), Fr.13とFr.14を併せてフラクションB (Fr. B)とし、Fr.5, Fr. AおよびFr. Bの3フラクションについてDEAE Bio-Gel Aによる再分画を行った。

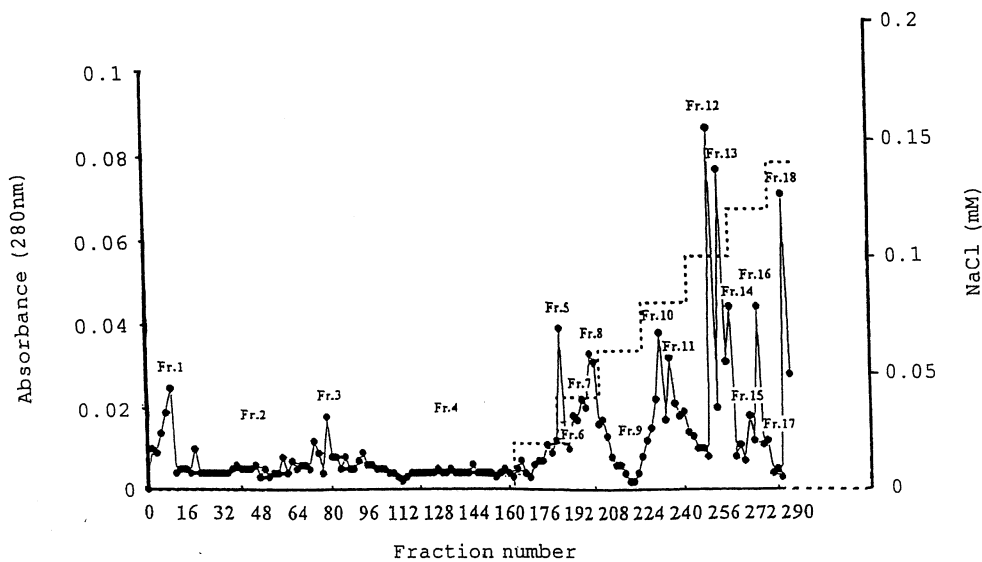


Fig.1 Fractionation of the extracellular crude enzymes obtained from 15-days cultures of fungus V2 by chromatography on a column of DEAE Bio-Gel A.

Notes : Step line shows NaCl gradient. Each 5ml of the solution was collected.

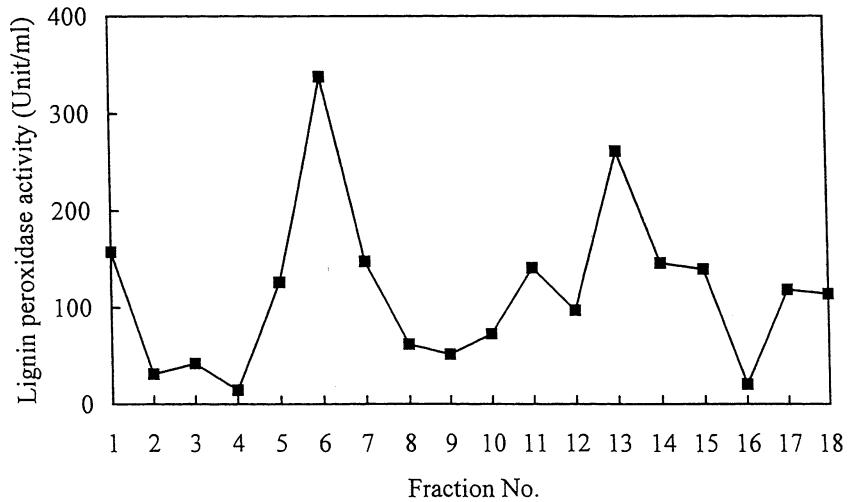


Fig.2 Change in lignin peroxidase activity in each fraction separated from the extracellular crude enzymes of fungus V2 by chromatography on a column of DEAE Bio-Gel A.

(1) DEAE Bio-Gel AによるFr. 5の再分画と各フラクションのLiP活性

DEAE Bio-Gel AによりFr.5を更に13フラクションに分画した。その結果を図3に示した。

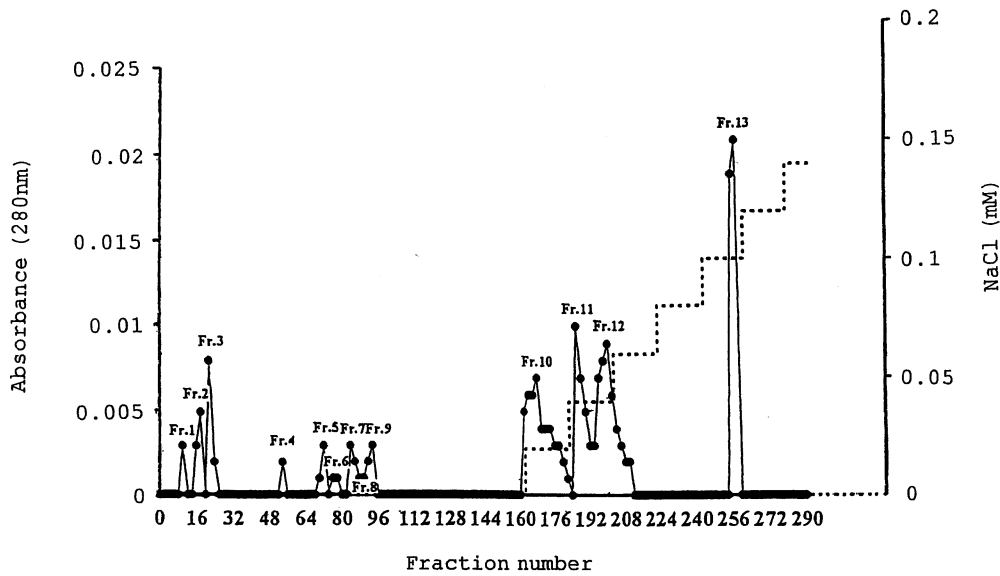


Fig.3 Fractionation of the Fraction 5 obtained by separation of the extracellular crude enzymes from fungus V2 by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes : Dotted line shows NaCl gradient. Each 5ml of the solution was collected.

分画された各フラクションのLiP活性とタンパク量の関係を図4に示した。13フラクションに分画した中で、最もLiP活性の高かったのはFr.13 (Fr.5-13) の425Units/mlであった。

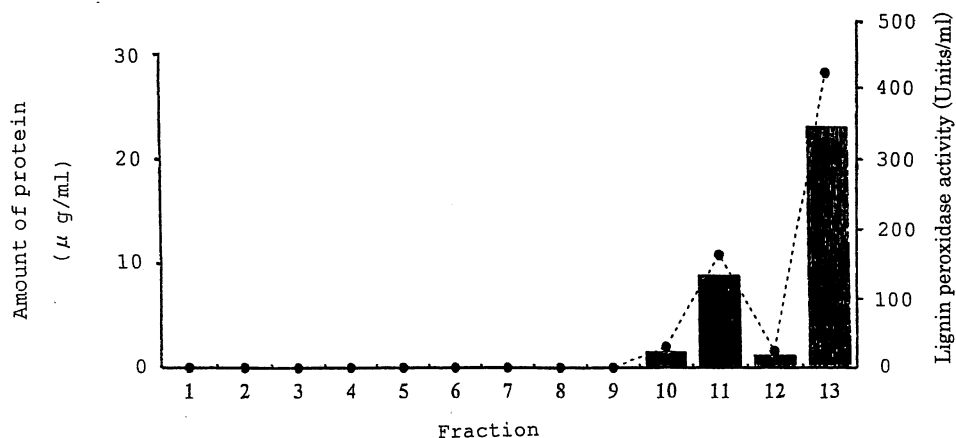


Fig.4 Relationship between amount of protein and change in lignin peroxidase activity in each fraction separated from the Fraction 5 by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes : Bar graph shows amount of protein. Line graph shows lignin peroxidase activity.

(2) DEAE Bio-Gel AによるFr.Aの分画と各フラクシヨンのLiP活性

DEAE Bio-Gel AでFr.Aを9のフラクシヨンに分画した。その結果を図5に示した。また、分画された各フラクシヨンのLiP活性とタンパク量の関係を図6に示した。9フラクシヨンに分画した中では、Fr.9 (Fr.A-9)が最もLiP活性が高く、275Unit/mlであった。

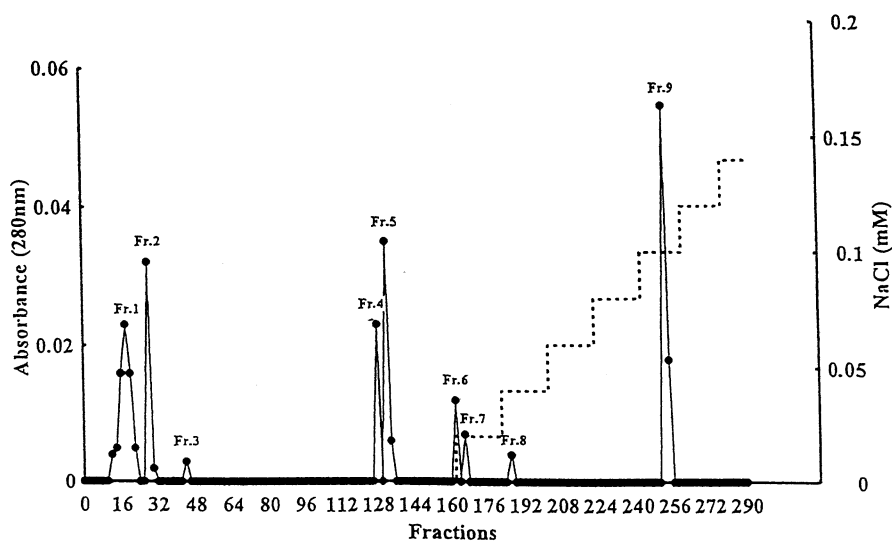


Fig.5 Fractionation of the Fraction A obtained by separation of the extracellular crude enzymes from fungus V2 by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes : Dotted line shows NaCl gradient. Each 5ml of the solution was collected.

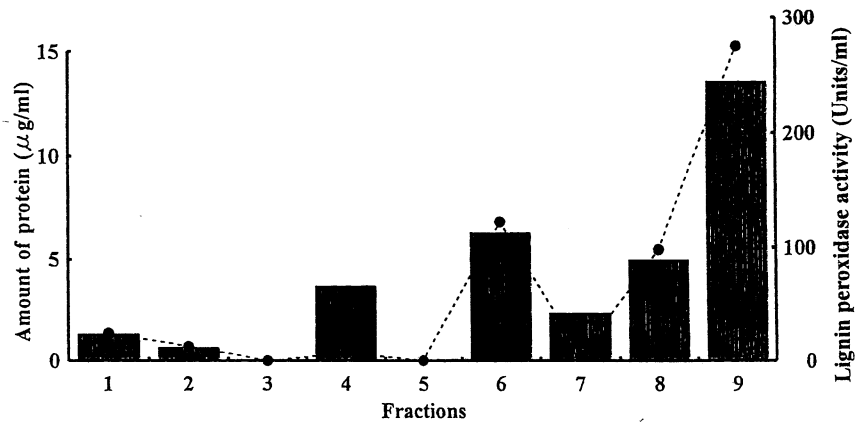


Fig.6 Relationship between amount of protein and change in lignin peroxidase activity in each fraction separated from the Fraction A by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes : Bar graph shows amount of protein. Dotted lines show lignin peroxidase activity.

(3) DEAE Bio-Gel AによるFr.Bの分画と各フラクションのLiP活性

DEAE Bio-Gel AでFr.Bを13のフラクションに分画した。その結果を図7に示した。また、分画された各フラクションのLiP活性とタンパク量の関係を図8に示した。13フラクションに分画した中では、Fr. 9 (Fr. B-9)が最もLiP活性が高く、302Unit/mlであった。

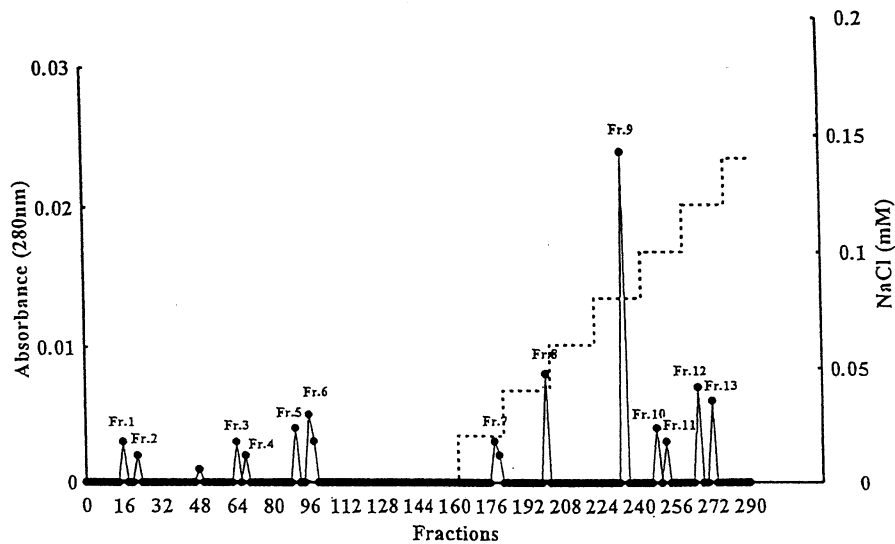


Fig.7 Fractionation of the fraction B obtained by separation of the extracellular crude enzymes from fungus V2 by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes : Dotted lines show NaCl gradient. Each 5ml of the solution was collected.

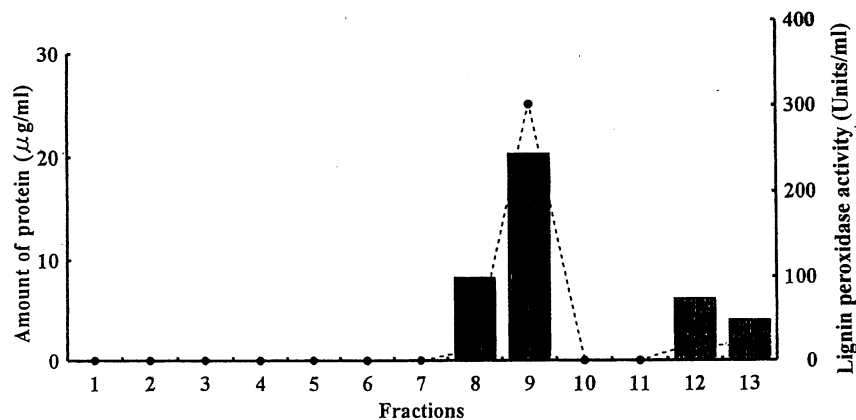


Fig.8 Relationship between amount of protein and change in lignin peroxidase activity in each fraction separated from the Fraction B by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes : Bar graph shows amount of protein. Dotted lines show lignin peroxidase activity.

3.1.2 Fr.5-13, Fr.A-9, Fr.B-9の2,4,8-TCDFの分解率について

結果の一部を図9~11, 表1に示した。まず図9に示すように, Fr.5-13による2,4,8-TCDFの分解率は22.6%~33.7%であった。2,4,8-TCDFの分解率は反応時間が長くなる程高くなった。1.25mMの2,4,8-TCDFを添加した場合, 最高の分解率は6時間反応した場合の33.7%であった。また, 0.25mM添加した場合のそれは32.6%(6時間反応)であった。

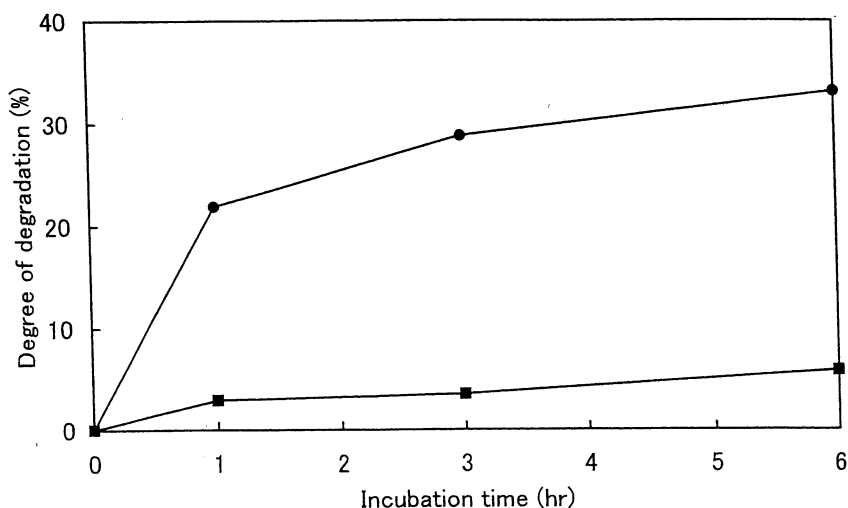


Fig.9 Change in degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF)

(1.25mM) by the fraction 5-13 separated from the fraction 5 by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes ; ● : Additon of H₂O₂ ; ■ : No addition of H₂O₂

Fr.A-9による2,4,8-TCDFの分解率は27.6%~49.7%であった。2,4,8-TCDFの分解率は反応時間が長くなる程高くなった。図10にFr.Aの再分画によって得られたFr.A-9による2,4,8-TCDF

(0.25mM添加) の分解結果を示した。この図に示したように、2,4,8-TCDFを0.25mM添加した場合のそれは49.7% (6時間反応)であった。また、1.25mMの2,4,8-TCDFを添加した場合の最高の分解率は6時間反応した場合の27.9%であった。

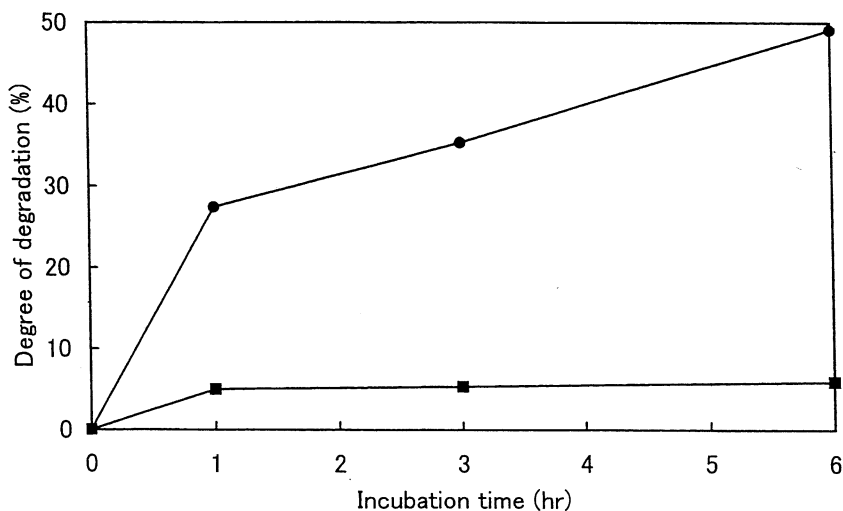


Fig.10 Change in degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) (0.25mM) by the fraction A-9 separated from the fraction A by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes ; ● : Addition of H₂O₂ ; ■ : No addition of H₂O₂

Fr.B-9による2,4,8-TCDFの分解率は19.6%~30.1%であった。この場合もFr.5-13, Fr.A-9と同様に反応時間が長くなる程分解率は高くなった。図11にFr.Bの再分画によって得られたFr.B-9による2,4,8-TCDF (1.25mM添加) の分解結果を示した。0.25mMの2,4,8-TCDFを添加した場合の最高の分解率は6時間反応した場合の30.1%であり、1.25mM添加した場合のそれは、図11に示したように25.5% (6時間反応)であった。

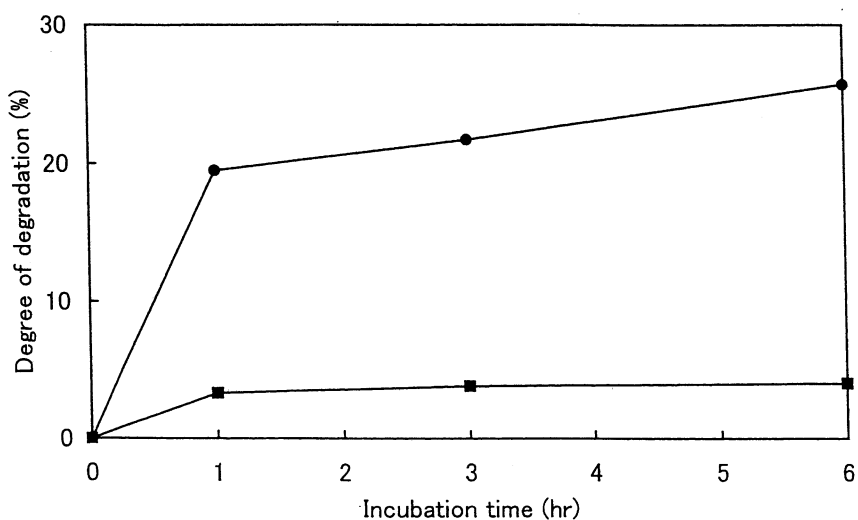


Fig.11 Change in degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) (1.25mM) by the fraction B-9 separated from the fraction B by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

Notes ; ● : Addition of H₂O₂ ; ■ : No addition of H₂O₂

2,4,8-TCDFがFr.5-13により分解された2種の分解物, 2,5-ジヒドロキシ安息香酸と3,5-ジクロロサリチル酸を定量した結果を表1に示した。H₂O₂を添加した場合, 3,5-ジクロロサリチル酸と2,5-ジヒドロキシ安息香酸生成量は基質を0.25mM添加し, 1時間反応させた場合は, いずれもH₂O₂無添加のそれに比べて約5倍増加し, 3時間反応させた場合には約3倍, 6時間反応させた場合には約20倍増加した。基質を1.25mM添加した場合も6時間反応させた場合を除き2倍~3倍の増加が認められた。これらの結果は, H₂O₂添加により2,5-ジヒドロキシ安息香酸と3,5-ジクロロサリチル酸の生成量がH₂O₂無添加のそれらよりも多いことから, H₂O₂添加により働くLiPなどその作用時にH₂O₂を必要とする酵素により, より多くの2,4,8-TCDFが分解されたものと考えられた。

著者らは前報³⁾で2,4,8-TCDFを5種の菌を用いて分解した結果を報告した。また, 5種の菌の1種V2による2,4,8-TCDFの分解経路を推定した。その分解経路には, LiPによる分解経路(ルートA)とジオキシゲナーゼによる分解経路(ルートB)が存在することを示すと共に, その経路で生成する中間体が反応生成物中に存在することから, これらの経路で分解が起こっているものと考えた。

LiPによる分解経路(ルートA)では, 2,4,8-TCDFはまずLiPにより脱塩素及びエーテル結合の結合の開裂が起き, 3,5-ジクロロ-2,2',5-トリヒドロキシビフェニルが生成される。そして, これが更に酸化分解され, 3,5-ジクロロサリチル酸と2,5-ジヒドロキシ安息香酸が生成する。そして, これらの生成物はLiPを含む種々の酵素により最終的に二酸化炭素と無機体の塩素にまで分解されるものと考えられる。

しかし, 表1に示したように, H₂O₂無添加の場合でも3,5-ジクロロサリチル酸, 2,5-ジヒドロキシ安息香酸が生成していることから, ここで分画したフラクションにも分解経路(ルートB)に示したようなH₂O₂を必要としないで脱塩素およびエーテル結合の開裂を起こす酵素が存在することが示唆された。しかしながら, 図9~11に示したように, 分画したフラクションにH₂O₂を添加して2,4,8-TCDFを分解した場合の分解率は, H₂O₂無添加のそれの約5~10倍高い。それゆえ, これらの分画したフラクション中に含まれるH₂O₂無添加時でも2,4,8-TCDFを分解できる酵素の量は少ないものと考えられた。

Table 1 Amounts of 2,5-dihydroxybenzoic acid and 3,5-dichlorosalicylic acid in the extracts of the Fraction 5-13 separated from the Fraction 5 by chromatography on a column of DEAE-Bio-Gel A.

| Incubation time (hr) | Addition or no addition of H ₂ O ₂ | Amount of 2,5-dihydroxybenzoic acid (% to the substrate) | | Amount of 3,5-dichlorosalicylic acid (% to the substrate) | |
|----------------------|--|--|--------|---|--------|
| | | 0.25mM | 1.25mM | 0.25mM | 1.25mM |
| 1 | Addition of H ₂ O ₂ | 3.3 | 0.3 | 8.6 | 0.8 |
| 3 | | 2.3 | 0.4 | 5.9 | 0.9 |
| 6 | | 2.0 | 0.5 | 5.2 | 1.4 |
| 1 | No addition of H ₂ O ₂ | 0.6 | 0.1 | 1.6 | 0.3 |
| 3 | | 0.8 | 0.2 | 2.2 | 0.6 |
| 6 | | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |

Notes ; Fraction 5-13 refer to Fig.9; Fraction 5 refer to Fig.7

以上の結果から、V2の菌体外粗酵素からLiP活性を有するフラクションの分画を行い、LiP活性の高い3フラクション(Fr.5-13, Fr.A-9, Fr.B-9)を得た。中でもFr.A-9は2,4,8-TCDFを最高49.7%分解できることがわかった。3種のフラクションにはいずれも高いLiP活性が認められたが、これらの酵素の異同についてはそのアイソザイム等を解明していかなければならない課題と考えられる。

引用文献

- 1) 橋 燦郎, 大川浩樹, 伊藤和貴, 沖 妙, 平林達也: 木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(I), ダイオキシン分解能を有する菌のスクリーニングおよび選抜した菌と数種の木材腐朽菌による2,7-ジクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシンの分解, 紙パ技協誌, 50(12), 1806-1815(1996).
- 2) 伊藤和貴, 大川浩樹, 橋 燦郎, 平林達也: 木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(II), ダイオキシン分解菌の酵素活性と2,7-Dichlorodibenzo-*p*-Dioxinの分解との関連およびダイオキシン分解菌のスクリーニング法の改良, 紙パ技協誌, 51(11), 1759-1768 (1997).
- 3) 大川浩樹, 伊藤和貴, 橋 燦郎: 木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(III), ダイオキシン分解菌による2,4,8-トリクロロジベンゾフラン及びジベンゾフランの分解, 紙パ技協誌, 53(8), 1054-1062(1999).
- 4) 大川浩樹, 伊藤和貴, 橋 燦郎: ダイオキシン分解菌の酵素活性と2,4,8-トリクロロジベンゾフランの分解との関連, 愛媛大学農学部演習林報告第39号, 53-61 (2001).
- 5) T.K.Kirk, E.Schultz, W.J.Connors, L.F.Lorenz and J.G.Zeikus: Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*, Arch. Microbiol, 117, 277-285(1978).
- 6) 鮫島正浩: “木材科学実験書” II. 化学編, 日本木材学会化学編集委員会, 内外産業調査会, 1985, P.338-339.
- 7) M.Tien and T.K.Kirk : Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 2280-2284 (1984).
- 8) M.H.Gold, M.Kuwahara, A.A.Chiu and J.K.Glenn: Purification and Characterization of an Extracellular H₂O₂-Requiring Diarylpropane Oxidase from the White Rot Basidiomycete, *Phanerochaete Chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 234, 353-362 (1984).