

4-クロロ安息香酸の脱ハロゲン化における *Acinetobacter* sp. 117c 株の ATP・CoA 依存性

飛田 修作 小林 規矩夫

Dependence of the dehalogenation of 4-chlorobenzoate on ATP and CoA
in *Acinetobacter* sp. strain 117c
Shusaku TOBITA and Kikuo KOBAYASHI

多種多様なハロゲン化芳香族化合物が環境中に放出されているが、一般にそれらの化合物は微生物分解を受けにくいことが知られている。例えば、実際に土壌中のバクテリアをスクリーニングしてみると、安息香酸を分解するバクテリアは広く分布しているのに対し、4-クロロ安息香酸を分解するバクテリアの分布はごく限られている(未発表)。ハロゲン化安息香酸は、バクテリアによる PCB の代謝物としても知られているが、ハロゲン化芳香族化合物そのものの微生物分解、特に脱ハロゲン化過程を研究する上でのモデル化合物としても使われてきた。

我々はこれまでに PCB 関連化合物の微生物分解に関する研究¹⁾の一環として、一般家庭の庭土から4-クロロ安息香酸(4-CBA)を分解する *Acinetobacter* sp. 117c 株を分離し、その分解過程について報告した^{2, 3)}。117c 株による4-CBAの分解過程は、4-CBAの加水分解的脱ハロゲン化による4-ヒドロキシ安息香酸(4-HBA)の生成(図1)で開始されるが⁴⁾、増殖細胞や休止細胞では問題なく進むこの脱ハロゲン化が細胞抽出液ではまったく進まない(未発表)。この原因として、細胞抽出液中の脱ハロゲン化酵素の不安定性、あるいは酵素反応に必要な何らかの要素の欠落が考えられた。後者の

可能性については、他の4-CBA分解菌による4-CBAの脱ハロゲン化においてコエンザイム A (CoA) と ATP が関与しているとの報告がある^{5~7)}。本報では117c株の細胞抽出液による4-CBAの脱ハロゲン化における CoA・ATP 依存性と、4-CBAの関連化合物に対する脱ハロゲン化活性を検討した結果を報告する。

材料および方法

1. 試 薬

4-CBAをはじめハロゲン化安息香酸のすべてと4-HBAはナカライカスク製、CoA、ATPは興人製を用いた。その他は市販の試薬特級を用いた。

2. 保存株の培養と細胞抽出液の調製

4-CBA分解菌117c株は一般家庭の庭土から分離したもので、ブドウ糖非酵性のグラム陰性桿菌で *Acinetobacter* 属に属する³⁾。保存株の増殖は500mg/lの4-CBAを含むPAS培地⁸⁾を用いて30℃で振とう培養で行った。対数増殖期後半の培養液を遠心分離で集菌し、0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で2回洗ったのち-20℃で使用直前まで保存した。細胞抽出液の調製は、超音波破碎によった。OD 0.38の培養液340 mlから得た凍結保存の細胞を0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 3.0 mlに懸濁させて0~5℃で超音波破碎(160W, 30秒, 10回)し、4℃で遠心分離(7,000×g, 20分)した上清を-20℃で保存して用いた。

3. 脱ハロゲン化活性試験

4-CBAを基質とする細胞抽出液の脱ハロゲン化活性試験は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による4-CBAの減少量と4-HBAの生成量の測定によった。標

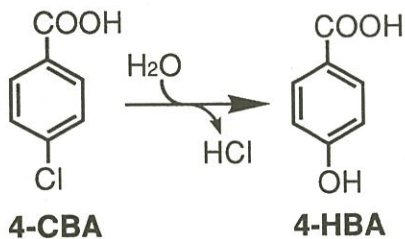


図1 4-CBAの脱ハロゲン化

準の反応液（全量 3.0 ml）の構成は、0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.0）、4-CBA 1 mM、細胞抽出液 80 μ l、CoA 0.5 mM、ATP 5 mM、MgSO₄ 5 mM から成り、反応は細胞抽出液の添加で開始された。反応液は適当な時間、室温に放置して 0.5 ml を分取し、反応停止剤として 18 % HCl 5 μ l を添加、メンブランフィルター（0.45 μ m、アクロディスク LC13、ゲルマンサイエンス）で濾過して HPLC 分析に供した。

他のハロゲン化安息香酸を基質とする脱ハロゲン化活性試験もこれと全く同じ条件で行った。

4. 脱ハロゲン化活性の ATP・CoA 依存性

ATP 依存性については、上記の活性試験の反応条件のうち、CoA を 4-CBA と等量の 1 mM に変更し、ATP を 0.5~20 mM 添加して反応停止後の 4-CBA の残存率を HPLC で測定した。

CoA 依存性については、上記の活性試験の反応条件のうち、CoA を 0.25~10 mM 添加して反応停止後の 4-CBA の残存率を HPLC で測定した。

5. 脱ハロゲン化活性への 2 価金属イオンの影響

上記 3. の活性試験と同じ反応条件で、Mg のほかに 5 種類の 2 価金属イオン（MnSO₄、FeSO₄、ZnSO₄、CuSO₄、CoCl₂）を同じく 5 mM それぞれ加え、反応停止後の 4-CBA の残存率を HPLC で測定し、コントロールと比較した。

6. GC-MS による代謝物の同定

上記 3. の活性試験と同じ条件で反応させた各種基質の反応液 3.0 ml に 18 % HCl 20 μ l を添加後、メンブランフィルター（0.45 μ m、マイレクス、ミリポア）で濾過、濾液を酢酸エチル 1 ml で 3 回抽出した。酢酸エチル層に窒素ガスを吹き付けて濃縮、乾固し、N,O-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド 0.2 ml を加えて 70 $^{\circ}$ C、30 分放置後、ガスクロマトグラフ質量分析（GC-MS）に供した。

7. 分析条件

培養液の OD は直径 0.5 インチの試験管セルを用いて 600 nm で測定した。

4-CBA をはじめとするハロゲン化安息香酸と生成物 4-HBA の HPLC 分析条件は次のとおりである。カラム：Shim-pack CLC-ODS (M) 4.6 mm (内径) \times 15 cm、溶離液：4-CBA については、メタノール-水-酢酸 (50 : 50 : 1)、4-CBA 以外のハロゲン化安息香酸については、メタノール-水-酢酸 (74 : 25 : 1)、検出器：UV (254 nm)。

GC-MS 分析にはヒューレットパッカード社製の GC (5890A) を接続した日本電子製 JMS-AX 505 を使用した。GC の分析条件は次のとおりである。カラム：DB-5 (5 % ジフェニル, 95 % ジメチルポリシロキサン)、0.25 mm (内径) \times 30 m、膜厚 0.25 μ m (J&W 社製)、カラム温度：50 (1 分保持) ~ 140 $^{\circ}$ C (25 $^{\circ}$ C/min)、140 ~ 250 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C/min) の 2 段昇温、注入口温度：280 $^{\circ}$ C。MS の測定は EI 法でイオン化電流 300 μ A、イオン化電圧 70 V、スキャンレンジ 50~500 M/Z、スキャン速度 1 秒の条件で行った。

結 果

1. 脱ハロゲン化活性発現の条件

表 1 に結果を示した。脱ハロゲン化活性の有無は 7 時間後と 14 時間後の反応液中の 4-CBA の減少量と 4-HBA の生成量を HPLC で定量して判定した。4-CBA に細胞抽出液を加えても脱ハロゲン化活性は現れなかった。細胞抽出液のほかに ATP、CoA の両者を添加すると脱ハロゲン化活性が現れた。さらに Mg²⁺ を添加すると、活性が約 2 倍増強され、14 時間後の 4-CBA から 4-HBA への変換率は 78 % に達した。ATP、CoA のいずれかが欠けても脱ハロゲン化活性は発現しなかった。細胞抽出液は、-20 $^{\circ}$ C で保存したものを 15 日以内に使用したが、70 日間保存したものでも、反応液に ATP、CoA、Mg²⁺ を添加することにより、脱ハロゲン化活性が認められた。

表 1 117c 株細胞抽出液の 4-CBA 脱ハロゲン化活性発現の条件

反 応 液 の 構 成				Mg ²⁺	4-HBA への変換率 (%)		脱ハロゲン化 活 性
4-CBA	cell ext.	ATP	CoA		7 時間後	14 時間後	
+	+	-	-	-	0	0	-
+	+	+	-	-	0	0	-
+	+	-	+	-	0	0	-
+	+	+	+	-	19	30	+
+	+	+	+	+	39	78	++

cell ext. : 細胞抽出液 +, - : 有無

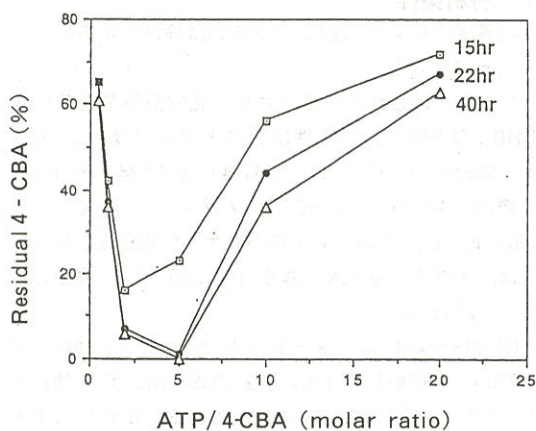


図2 117c株細胞抽出液の4-CBA脱ハロゲン化活性のATP依存性

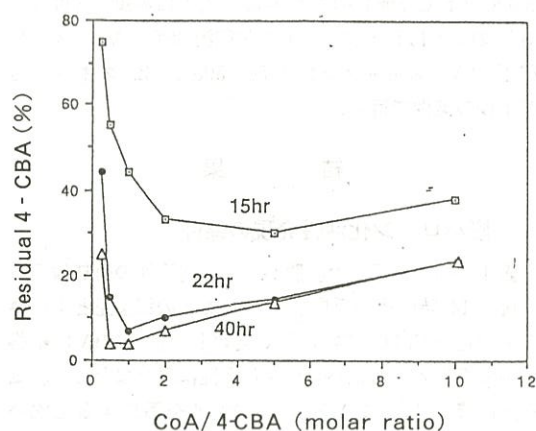


図3 117c株細胞抽出液の4-CBA脱ハロゲン化活性のCoA依存性

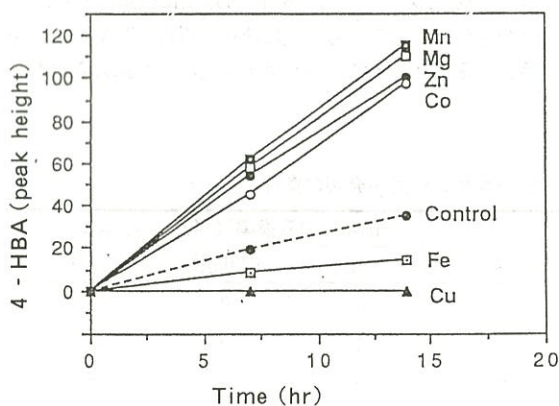


図4 117c株細胞抽出液の4-CBA脱ハロゲン化活性への2価金属イオンの影響

2. 脱ハロゲン化活性のATP, CoA依存性

図2に4-CBA脱ハロゲン化活性のATP依存性を示した。反応開始から15時間後、22時間後、40時間後の4-CBAの残存率を見ると、ATPの添加量がモル比で4-CBAの2~5倍の時、4-CBAの残存率は最小となり、最も高い活性を示した。また、ATPを10倍以上に加えると残存率は著しく高くなり、脱ハロゲン化活性は抑制された。

図3に4-CBA脱ハロゲン化活性のCoA依存性を示した。22時間後、40時間後の4-CBAの残存率は、CoAの添加量がモル比で4-CBAの1倍量の時、最小となり、最も高い活性を示した。40時間後の4-CBAの残存率に注目すると、CoAの添加量がモル比で4-CBAの0.5倍量の場合も1倍量の場合と変わらない高い活性を示した。この結果は、化学量論的にみてCoAが反応に繰り返し使用され、一種の触媒として働いたことをうかがわせる。一方、CoAを5倍以上加えると4-CBAの残存率は高くなり、脱ハロゲン化活性は抑制の傾向にあった。

以上、4-CBA脱ハロゲン化活性のATP, CoA依存性を検討した結果、十分な活性を得るための条件として、4-CBAに対するモル比でATPが2~5倍、CoAが0.5~1倍が適当であった。

3. 脱ハロゲン化活性への2価金属イオンの影響

図4に4-CBA脱ハロゲン化活性への2価の金属イオンの影響を示した。7時間後、14時間後の4-HBAの生成量で活性を比較したところ、金属イオンを加えなかったコントロールに対して、MgのほかMn, Zn, Coの各イオンは活性をおよそ3倍増強させた。一方、Fe, Cuの各イオンは抑制的に働き、特にCuイオンの場合、活性が消失した。

4. GC-MSによる代謝物の同定

4-CBAの代謝物の同定を目的に別途行った実験では、HPLCの結果、反応時間15時間で4-CBAから4-HBAへの変換率は91%に達した。ところが、反応時間を延長した23時間後、40時間後の4-HBAへの変換率はそれぞれ、63%、15%と低下し、反応時間の経過とともに4-HBAがさらに代謝されていくのがうかがわれた。各反応時間後の代謝物をGC-MSで分析した結果、いずれからも4-HBAがシリル化誘導体として同定された[m/z 282 (M⁺), 267 (M-CH₃), 223 (M-CH₃, CO₂), 193 (M-OTMS), 126]。しかし、4-HBAから先の代謝物を検索したところ、プロトカテキユ酸、β-ケトアジピン酸およびその間に想定された中間体(β-カルボキシムコン酸、γ-カルボキシムコンラクトン、β-ケトアジピン酸エノールラクトン³⁾はいずれもシリル化誘導体として検出され

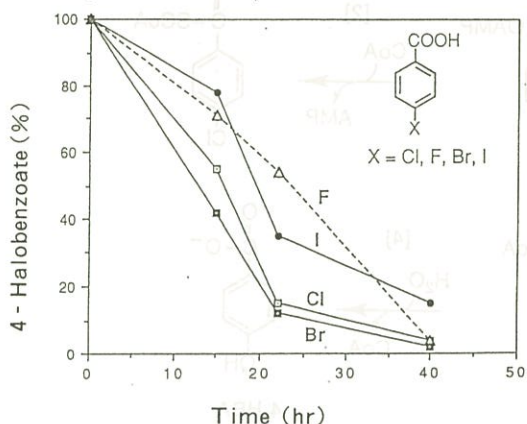


図5 4-CBA 関連化合物に対する117c株細胞抽出液の脱ハロゲン化活性

表2 117c株細胞抽出液の脱ハロゲン化活性

基質	脱ハロゲン化活性	生成物
2-CBA	-	-
3-CBA	+ ?	不明
4-CBA	+	4-HBA
4-FBA	+ ?	不明
4-BrBA	+	4-HBA
4-IBA	+	4-HBA

ず、一旦生成した4-HBAが反応時間の経過とともに何に変化したかは明らかにはできなかった。

5. 4-CBA 関連化合物に対する脱ハロゲン化活性

図5に4-CBAの関連化合物に対する脱ハロゲン化活性を示した。基質の残存率を見ると、4-CBAのほかに4-ブromo安息香酸(4-BrBA)、4-ヨード安息香酸(4-IBA)、4-フルオロ安息香酸(4-FBA)に対して活性が認められ

た。GC-MSの結果、4-BrBAと4-IBAの反応液からは4-HBAがシリル化誘導体として同定された。しかし、4-FBAについては4-HBAの生成がまったく認められず、4-FBAが休止細胞では分解されなかった⁴⁾ことも考えあわせると、他の関連化合物とは別の分解経路によって消失した可能性も否定できない。

表2に今回調べた4-CBA関連化合物に対する脱ハロゲン化活性の結果をまとめた。休止細胞では変化を受けなかった2-クロロ安息香酸(2-CBA)、3-クロロ安息香酸(3-CBA)のうち、3-CBAは細胞抽出液では基質が消失したが、GC-MSで4-HBAの生成は認められず、分解経路は不明である。

考 察

これまでに報告された4-CBA分解菌の中で、細胞抽出液の脱ハロゲン化活性とその安定性について報告したものがいくつかある。Marks⁹⁾は、*Arthrobacter* sp. 株から細胞抽出液を酸素を完全に除いた条件下で調製すると、細胞抽出液のみでも4-CBA、4-FBA、4-BrBAが脱ハロゲン化されたが、酸素の存在によって活性が抑制されたと報告している。Shimao⁹⁾は、*Arthrobacter* sp. SB8株から調製した細胞抽出液の脱ハロゲン化活性が非常に不安定で、一部は酸素によって不活性化されること、また細胞抽出液の調製時に窒素ガスを吹き付けて酸素を除かないと活性がほとんど失われると報告している。一方、我々が117c株から調製した細胞抽出液は、調製時よりもより-20℃での保存でも、酸素の存在によって不活性化することはなく、反応中も酸素の存在下、CoA、ATP、Mg²⁺の添加により脱ハロゲン化活性を示した。この点では、脱ハロゲン化活性が酸素に対して不安定であるとするMarksらとShimaoらの報告とは117c株の脱ハロゲン化酵素の性質が異なっている。117c株の細胞抽出液中の脱ハロゲン化酵素は、酸素に対して

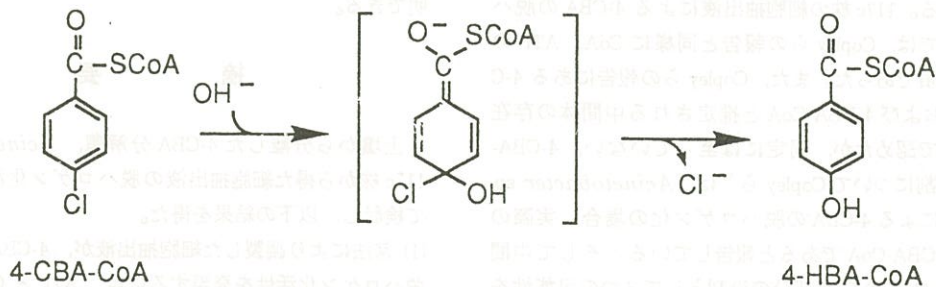


図6 4-CBA脱ハロゲン化を容易にする4-CBA-CoAの役割

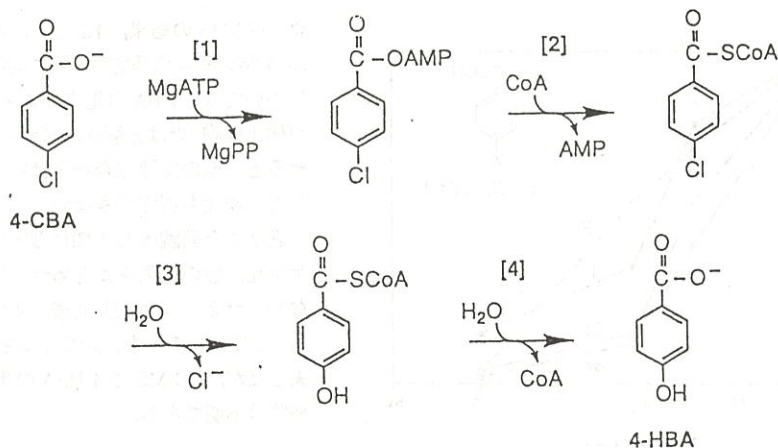


図7 4-CBA脱ハロゲン化におけるATP, CoA, Mg²⁺の関与

安定であるばかりでなく、-20℃での保存にも決して不安定なものではないことが明らかとなった。

嫌気的条件下の芳香族カルボン酸の微生物分解では、中間体としてCoAチオエステルの生成が知られている¹⁰⁻¹³⁾。Schennenら¹⁰⁾は、*Pseudomonas*のある種の株が安息香酸を分解する際、安息香酸がCoAチオエステル合成酵素を誘導し、この酵素が安息香酸の嫌氣的分解に関わる最初の酵素であると報告している。また彼等は、ベンゾイル-CoAの生成をHPLCで確認している。我々が用いた117c株は好気性バクテリアであるが、4-CBAを脱ハロゲン化して4-HBAを生成する過程は、分子状酸素を必要とせず^{3,4)}、この過程はSchennenらの報告¹⁰⁾にある安息香酸の嫌氣的分解の第一段階に類似していると考えられる。安息香酸の嫌氣的分解にベンゾイル-CoAが関与するのと同じように、4-クロロベンゾイル CoA (4-CBA-CoA)の関与があっても不思議ではない。これを裏付ける報告として、Copleyら⁷⁾は、*Acinetobacter* sp. 4-CB1株による4-CBAの脱ハロゲン化が、最初に4-CBA-CoAが生成することによって起こると報告している。また、中間体として4-ハイドロキシ安息香酸 CoA (4-HBA-CoA)の存在も実証している。117c株の細胞抽出液による4-CBAの脱ハロゲン化では、Copleyらの報告と同様にCoA, ATPの存在が必須であった。また、Copleyらの報告にある4-CBA-CoAおよび4-HBA-CoAと推定される中間体の存在をHPLCで認めたが、同定には至っていない。4-CBA-CoAの役割についてCopleyら⁷⁾は、*Acinetobacter* sp. 4-CB1株による4-CBAの脱ハロゲン化の場合、実際の基質は4-CBA-CoAであると報告している。そして中間体4-CBA-CoAのCoA部分の役割として3つの可能性を挙げているが、このうち、図6に示したように、チオエステルがカルボキシル基よりも電子吸引性が強く、パラ位での加水分解的脱ハロゲン化を容易にし、また、CoA

部分がマイナス荷電の遷移状態の安定化に寄与して脱ハロゲン化を促進するとの解釈は有機化学的に説得力がある。

化学量論的な検討の結果、CoAは117c株の細胞抽出液の脱ハロゲン化活性の発現に一種の触媒として関与していることが示唆された。一方、モル比で基質の2倍以上を必要としたATPは、4-CBAにCoAを結合させて4-CBA-CoAを生成する際のエネルギー源として使用されたと解釈できる。Copleyら⁷⁾は、4-CBAの脱ハロゲン化はATPの加水分解と結びついているが、4-CBA-CoAと細胞抽出液から成る系では脱ハロゲン化にATPは必要でないと報告している。また、Löfflerら⁶⁾は、4-CBAから4-HBA 1モルが生成するのにATP 1モルが消費されると推定したが、細胞抽出液中にはATPaseの活性が残っているために、ATPの一部は4-HBAの生成に関与せずに分解し、ATPは過剰に必要であったと報告している。117c株の細胞抽出液による4-CBAの脱ハロゲン化の過程は、2価の金属イオンの関与も含め、Scholtenら⁵⁾による図7に示した4つの部分反応に脱ハロゲン化を容易にする4-CBA-CoAのCoA部分の有機化学的解釈(図6)を加えることによって、合理的に説明できる。

摘 要

土壌から分離した4-CBA分解菌、*Acinetobacter* 117c株から得た細胞抽出液の脱ハロゲン化活性について検討し、以下の結果を得た。

(1) 常法により調製した細胞抽出液が、4-CBAに対して脱ハロゲン化活性を発現するには、ATPとCoAの添加が必須であった。ATPとCoAの添加量は、4-CBAに対するモル比でATPが2~5倍、CoAが0.5~1倍が適当であった。

(2) 2価の金属イオンのうちMg, Mn, Co, Znの添加は脱ハロゲン化活性を増強した。しかし, Fe, Cuは抑制的に働き, 特にCuの場合, 活性が消失した。

(3) CoAは一種の触媒としての関与が示唆され, 実験結果はScholtenらが提出した図7に示した脱ハロゲン化過程を支持している。直接脱ハロゲン化を受けるのは中間体のCoAチオエステルで, パラ位における求核置換反応を活性化してClのOHによる置換を容易にしていると解釈できる。

(4) 4-CBAの脱ハロゲン化と同様の条件で, 4-BrBA, 4-IBAから脱ハロゲン化物の4-HBAが生成した。また, 4-FBAと3-CBAについても基質の消失がみられたが生成物の同定には至らなかった。

文 献

1) 飛田修作, 久田美子, 堤 充紀, 佐藤章夫: 山梨衛公研年報, **31**, 39~43 (1987)
 2) 飛田修作, 久田美子, 堤 充紀: 山梨衛公研年報, **32**, 42~47 (1988)

3) Tobita, S. and Iyobe, S.: Water Sci. Technol., **25**, 411-418 (1992)
 4) 飛田修作, 小林規矩夫: 山梨衛公研年報, **36**, 43~48 (1992)
 5) Scholten, J. D. et al.: Science, **253**, 182-185 (1991)
 6) Löffler, F., Müller, R. and Lingens, F.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **176**, 1106-1111 (1991)
 7) Copley, S. D. and Crooks, G. P.: Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1385-1387 (1992)
 8) Marks, T. S., Smith, A. R. W. and Quirk, A. V.: Appl. Environ. Microbiol., **48**, 1020-1025 (1984)
 9) Shimao, M. et al.: Appl. Environ. Microbiol., **55**, 478-482 (1989).
 10) Schennen, U, Braun, K. and Knackmuss, H. J.: J. Bacteriol., **161**, 321-325 (1985)
 11) Harwood, C. S. and Gibson, J.: J. Bacteriol., **165**, 504-509 (1986)
 12) Geissler, J. F., Harwood, C. S. and Gibson, J.: J. Bacteriol., **170**, 1709-1714 (1988)
 13) Merkel, S. M. et al.: J. Bacteriol., **171**, 1-7 (1989)

