

## 4-クロロ安息香酸分解菌による 加水分解的脱ハロゲン化

飛田 修作 小林規矩夫

Hydrolytic dehalogenation of 4-chlorobenzoate by an *Acinetobacter* sp.

Shusaku TOBITA and Kikuo KOBAYASHI

PCB 関連化合物の微生物分解について、これまでに土壌から分離した2種類の分解菌, 117I 株と 117C 株の諸特性を明らかにしてきた。すなわち, 117I 株は4-クロロビフェニルを4-クロロ安息香酸にまで分解し<sup>1)</sup>, 117C 株は4-クロロ安息香酸を分解して完全に無機化する<sup>2)</sup>。そして, 両者を組み合わせることにより, 4-クロロビフェニルは全分解された<sup>3)</sup>。また, 117C 株による4-クロロ安息香酸の分解経路の概略も明らかにした(図1)<sup>3)</sup>。ところで, 有機塩素化合物についてのこの種の研究の核心は, 脱ハロゲン化の過程であると言えよう。図1に示した117C 株による4-クロロ安息香酸全分解の脱ハロゲン化の過程については, 前報<sup>3)</sup>で以下の点が明らかになっている。すなわち, 脱ハロゲン化が全分解の第一段階であること, そして, 好氣的条件下では4-クロロ安息香酸は容易に炭酸ガスまで分解が進み, 脱ハロゲン化生成物である4-ヒドロキシ安息香酸は痕跡程度認められるにすぎないが, 窒素ガスを通気した嫌氣的条件下では4-ヒドロキシ安息香酸が80%以上の高収率で蓄積されるという事実である(図2)。これらの実験事実から, この脱ハロゲン化には分子状酸素が必ずしも必要ではなく, 脱ハロゲン化は加水分解的なプロセスであろうことが示唆された。本報では117C 株によるこの脱ハロゲン化機構と4-クロロ安息香酸同族体に対する脱ハロゲン化の基質選択性について報告する。

### 材料および方法

#### 1. 略 称

本報では次の略称を用いる。CBA(クロロ安息香酸), 4-CBA(4-クロロ安息香酸), 4-HBA(4-ヒドロキシ安

息香酸), PCA(プロトカテック酸; 3,4-ジヒドロキシ安息香酸), OD(島津ボッシュロム・スペクトロニック 20 を使用して12.7mm 試験管セルによる600nm での吸光度)。

#### 2. 試 薬

(1) 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特級試薬, N, O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドは和光純薬製を用いた。H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (<sup>18</sup>O 含量 97~98%) は Cambridge Isotope Laboratories 社製, 窒素ガスは純度 99.9% のものを用いた。

(2) 2,500 ppm 4-CBA の 0.5 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) の調製: 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 ml に 4-CBA 125 mg を加え, 攪拌しながら 10% NaOH を加えて溶かし (pH 11), これに 18% HCl を加えて pH 7.6 とした。次いで, 0.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を加えて pH 7.0 に調整し, これに 0.5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて全量 50 ml とした。

(3) PA 溶液 (1 倍液)<sup>4,5)</sup>: 1 l あたり以下の成分を含有する。K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 g, NH<sub>4</sub>Cl 2.1 g。

(4) 2.5 mM ハロゲン化安息香酸の PA 溶液の調製: PA 溶液 (1 倍液) 100 ml に 2.5 mM 相当のハロゲン化安息香酸を加え, 室温で攪拌して溶かした。

(5) S 溶液 (100 倍)<sup>4,5)</sup>: 1 l あたり以下の成分を含有する。MgSO<sub>4</sub> 19.5 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.3 g, L-アスコルビン酸 1 g。

#### 3. 微生物と培養条件

4-CBA 分解菌 117C 株は, 一般家庭の庭土から分離したもので, ブドウ糖非醗酵のグラム陰性桿菌で

*Acinetobacter* 属に属する<sup>3)</sup>。休止細胞を得るための分離株の増殖は、これまでと同様、500 ml 三角フラスコ中 500 ppm の 4-CBA を含む PAS 培地<sup>1)</sup> 100 ml を用いて振とう培養で行った。対数増殖期の培養液を遠心分離にかけて集菌し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗ったのち、休止細胞は遠沈後のペレット状態で -20 °C で使用直前まで保存した。培養温度はすべて 30 °C とし、振とう速度は 120 rpm とした。培養液の遠心分離はすべて 4 °C, 12,000 rpm, 10 分間の条件で行った。なお、前報<sup>3)</sup> では 117C 株を ST-1 株と呼んだが、本報では 117C 株の呼称を踏襲する。

#### 4. H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 存在下、4-CBA の 4-HBA への変換

10ml 遠沈管中、H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 1ml に 117C 株の休止細胞 (OD 0.45 の培養液 20ml 相当) を懸濁させ、窒素ガスを通気下、2,500 ppm 4-CBA の 0.5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100 μl を加え、室温で 6 時間培養した。コントロールとして H<sub>2</sub><sup>18</sup>O の代わりに蒸留水を用いたものを同様に培養した。いずれも培養終了後、メンブランフィルター (ミリポア社製 0.45 μm マイレクス HA) で濾過し、濾液の 10 μl を HPLC に注入して 4-CBA, 4-HBA, PCA を定量した。残りの濾液に 18% HCl 5 μl を加えて pH 約 2 とし、酢酸エチル 1 ml で 1 回、0.5 ml で 2 回抽出し、酢酸エチル層を合わせて濾過 (ワットマン社製シリコン処理フェーズ・セパレータ) 後、3 ml バイアル中、窒素ガスを吹き付けて乾固させ、シリル化後、GC/MS 分析に供した。シリル化は N,O-ビス (トリメチルシリル) アセトアミド 0.3 ml を加え、70 °C で 30 分加熱して行った。

#### 5. ハロゲン化安息香酸の分解性試験

2.5mM ハロゲン化安息香酸の PA 溶液 20ml に S 溶液 0.2ml を加え、休止細胞の PA 溶液 (1 倍液) 懸濁液 0.1ml (OD 0.45 の培養液 4ml に相当) を加えて 96 時間培養した。残存するハロゲン化安息香酸および生成した 4-HBA の濃度は、培養液 1 ml をメンブランフィルターで濾過し、濾液の 5 μl を HPLC に注入して測定した。

#### 6. 分析条件

4-CBA から 4-HBA への微生物変換における 4-CBA, 4-HBA, PCA 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) × 15 cm, 溶離液: メタノール-水-酢酸 (50 : 50 : 1), 検出器: UV (254 nm), 流速: 1.0 ml/min, オープン温度: 40 °C。ハロゲン化安息香酸の分解性試験におけるハロゲン化安息香酸と生成した 4-HBA の濃度測定は、同じカラムを用いて以下の条件で行った。溶離液: メタノール-水-酢酸 (74 : 25 : 1), 検出器: UV (254 nm), 流速: 0.5 ml/min, オープン温度: 40 °C。

GC/MS 分析には日本電子製 JMS AX-505 W 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) × 30 m, 膜厚 0.25 μm (J & W 社製), カラム温度: 50 °C (1 分保持) ~ 140 °C (25 °C/min), 140 ~ 250 °C (5 °C/min) の 2 段昇温, 注入口温度: 280 °C。MS の測定は EI 法でイオン化電流 300 μA, イオン化電圧 70 eV, スキャンレンジ 10 ~ 500 m/z, スキャン速度 1 秒の条件で行った。

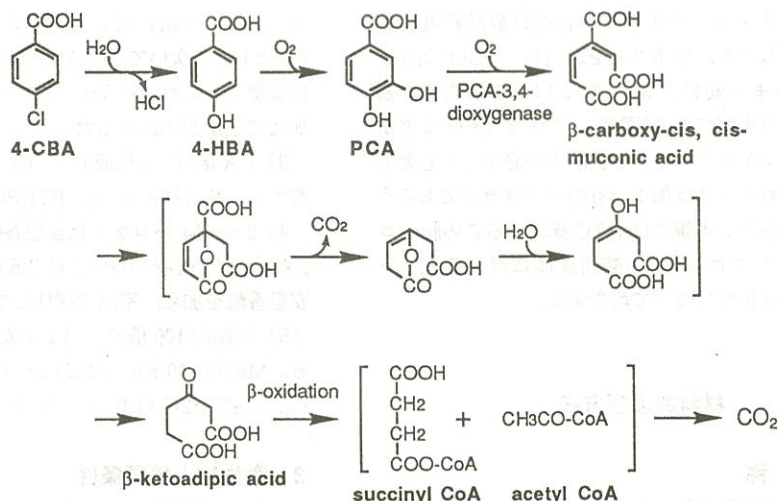


図1 *Acinetobacter* sp. 117C 株による 4-CBA の全分解経路<sup>3)</sup>

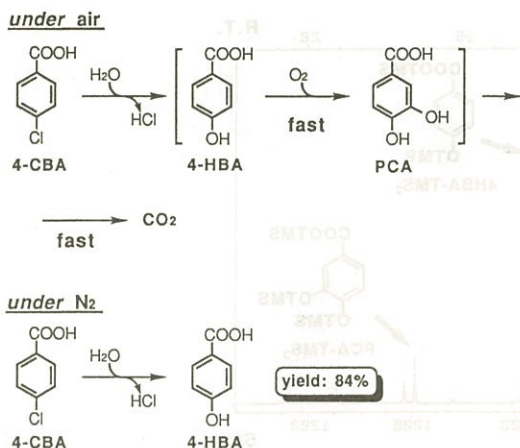


図2 好気的および嫌気的条件下での117C株による4-CBA代謝の相違<sup>3)</sup>

## 結 果

### 1. 脱ハロゲン化機構

117C株による4-CBAから4-HBAへの加水分解的脱ハロゲン化を以下の実験で証明した。前述のとおり、<sup>18</sup>Oの含有率97~98%のH<sub>2</sub><sup>18</sup>Oとリン酸緩衝液を用いて休止細胞の懸濁液を調製し、これに4-CBAを加え、窒素ガスを通じながら培養した。培養系のH<sub>2</sub><sup>18</sup>O濃度は88~89%である。この変換反応で蓄積された4-HBAは<sup>18</sup>Oでラベルされたもので、トリメチルシリル化後のGC/MS分析の結果、4位の水酸基の酸素原子はその80%が<sup>18</sup>Oでラベルされていた(図3)。これにより、4-HBAの水酸基の酸素原子の起源が溶媒の水であり、このプロセスが加水分解的脱ハロゲン化であることが実証された。

次に、その根拠となったGC/MS分析について述べる。図4はシリル化した代謝物のトータルイオンクロマトグラムを示したもので、基質の4-CBAが若干残っているが4-HBAの蓄積が明らかで、さらに代謝の進んだPCAがわずかながら存在している。シリル化前のHPLCによる定量の結果、4-CBAから4-HBAへの変換率は80%であった。また、4-CBA、4-HBA、

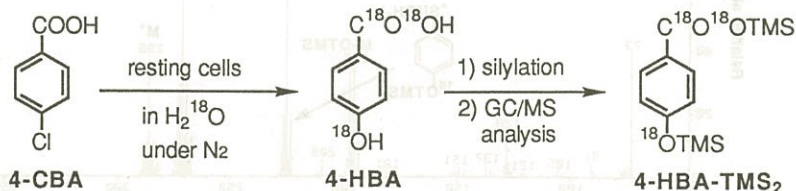


図3 窒素気流中H<sub>2</sub><sup>18</sup>O存在下、117C株による4-CBAから4-HBAへの変換における

<sup>18</sup>Oの取り込みと4-HBAのトリメチルシリル化誘導体

PCAの濃度はそれぞれ36 ppm(0.23 mM)、157 ppm(1.13 mM)、11 ppm(0.07 mM)で、三者のモル濃度合計は1.43 mMとなり、反応開始時の4-CBAの初期濃度1.41 mMにはほぼ一致することから、PCAから先へは代謝が進んでいないことがわかる。

マススペクトルのうち、<sup>18</sup>Oを取り込んでいないコントロールの4-HBAのトリメチルシリル(TMS)誘導体を図5に示した。M-CH<sub>3</sub>、M-OTMSは、TMS誘導体に共通するごく一般的なフラグメントである。M-OTMSよりも強いM-59のピークは、フラグメントSMTO•C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>•Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>に帰属され、COOを含まないことから水酸基への<sup>18</sup>Oの取り込み率を見る上で好都合のフラグメントである。このフラグメントは図5に示したメカニズムでM<sup>+</sup>からCH<sub>3</sub>、さらにCO<sub>2</sub>が脱離して生成したものと説明される。なお、このフラグメンテーションパターンは4-CBAのトリメチルシリル誘導体にも見られ、安息香酸の誘導体に共通するものと考えられる<sup>6)</sup>。

一方、図6は前述のH<sub>2</sub><sup>18</sup>Oを用いた微生物変換で得られた4-HBAのTMS誘導体のマススペクトルである。取り込まれた<sup>18</sup>Oの数は、水酸基に1個、このほかに培養中にカルボキシル基のOHの交換が起こるため、カルボキシル基に2個、合計3個である。その結果、<sup>18</sup>Oを3個含むフラグメントM<sup>+</sup>とM-CH<sub>3</sub>は、ともにピークのクラスターが特に複雑になっている。図5で見たM-59のフラグメントは水酸基の<sup>18</sup>Oと<sup>16</sup>Oの存在量を反映し、<sup>18</sup>O体由来するm/z 225の強度と<sup>16</sup>O体由来するm/z 223の強度の比から<sup>18</sup>OでラベルされたOH基は80%と計算された。培養系のH<sub>2</sub><sup>18</sup>O濃度が88~89%であったから、培養系からの<sup>18</sup>Oの取り込み率は90%に相当する。

### 2. 脱ハロゲン化の基質選択性

117C株の加水分解的脱ハロゲン化の基質選択性を4-CBAの同族体8種類について検討した(表1)。まず各基質の分解性を4日間の菌の増殖で判定した。次に、分解性が認められた化合物について脱ハロゲン化物をHPLCで同定して確認した。その結果、モノクロ安息香酸ではオルト、メタの異性体が分解されなかった。

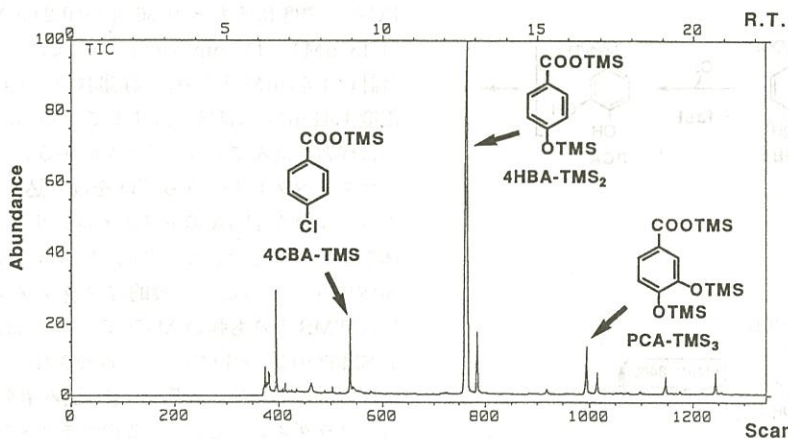


図4 窒素気流中  $H_2^{18}O$  存在下, 117C 株による 4-CBA 代謝物の TMS 誘導体のトータルイオンクロマトグラム

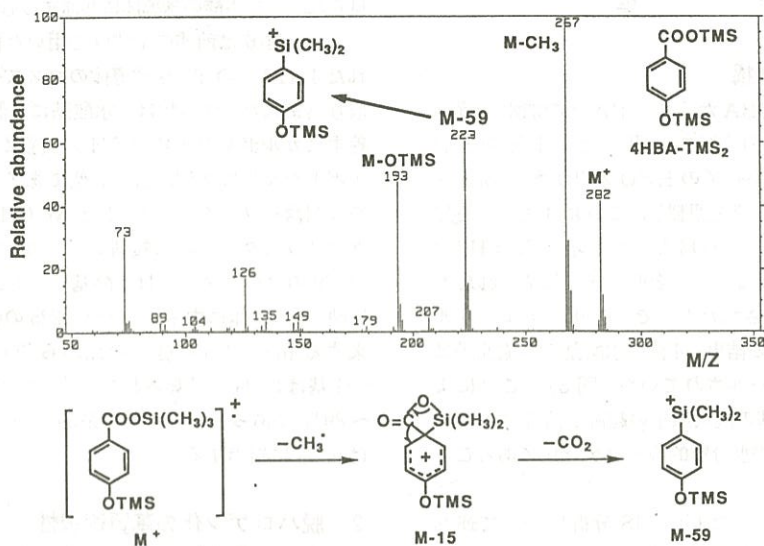


図5 4-HBA の TMS 誘導体のマススペクトルおよび (M-59) フラグメントイオンの生成機構

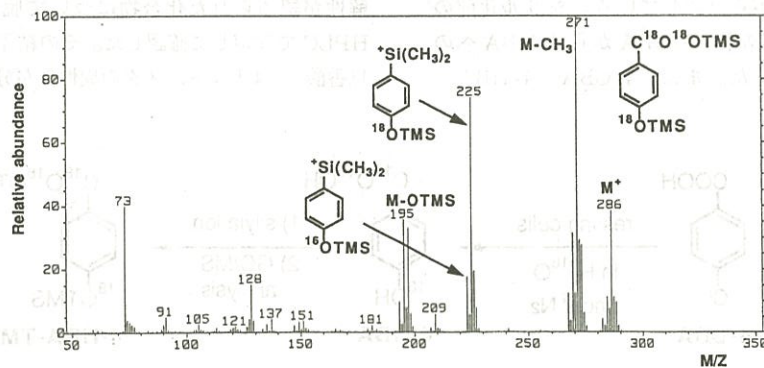


図6  $H_2^{18}O$  存在下, 117C 株によって 4-CBA から変換された 4-HBA の TMS 誘導体のマススペクトル

表1 117C株によるハロゲン化安息香酸の分解性

Compound	Growth (96hr)	Dehalogenation activity
2-CBA	-	-
3-CBA	-	-
4-CBA	+	+
4-Fluorobenzoate	-	-
4-Bromobenzoate	+	+
4-Iodobenzoate	+	+
2,4-Dichlorobenzoate	-	-
3,4-Dichlorobenzoate	-	-
3,5-Dichlorobenzoate	-	-

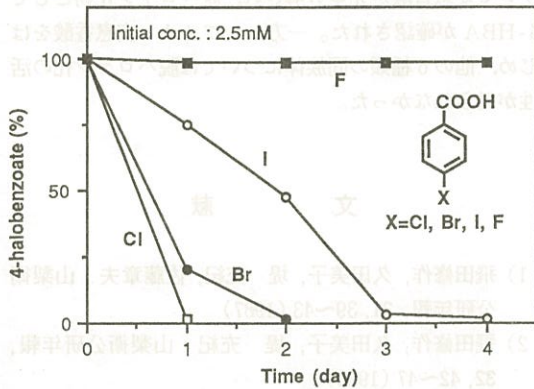


図7 4-CBAで馴化された117C株による4-ハロゲン化安息香酸の分解性

4-ハロゲン化安息香酸では4-ブromo安息香酸、4-ヨード安息香酸が分解され、いずれも脱ハロゲン化物として4-CBAと同様に4-HBAを生成したが、4-フルオロ安息香酸に対しては活性がみられなかった。また、2,4-, 3,4-, 3,5-の3種類のジクロロ安息香酸はいずれも分解されなかった。

図7は振とう培養での4-ハロゲン化安息香酸の分解性の相違を示したものである。分解の第一段階が共通して脱ハロゲン化による4-HBAの生成であり、その後の分解経路が同じであることから、図7は脱ハロゲン化の難易度も示している。植菌には4-CBAで馴化したものを用いたので、4-CBAの分解性が最も良いのは当然である。ついで4-ブromo安息香酸の分解性が高く、4-ヨード安息香酸もゆっくりではあるが分解された。一方、4-フルオロ安息香酸は4日間の培養ではまったく分解を受けなかった。

## 考 察

環境中での有機ハロゲン化合物の難分解性は、分子中の炭素と塩素の結合の切れにくさに帰すことができる。このことは、土壌微生物によって安息香酸が容易に分解

されるのに対して、塩素化された4-CBAがはるかに難分解性であることからもうかがえる。土壌中には117C株のように脱ハロゲン化能を有する微生物が存在するが、残念ながらその分布は広くなく、密度も低い。PCBをはじめ多種多様の有機ハロゲン化合物の残留性が問題視されている由縁である。有機ハロゲン化合物の微生物分解についての研究の焦点は、言うまでもなく、脱ハロゲン化の過程である。脱ハロゲン化がより早い段階で起これば、それだけ生分解は容易となる。

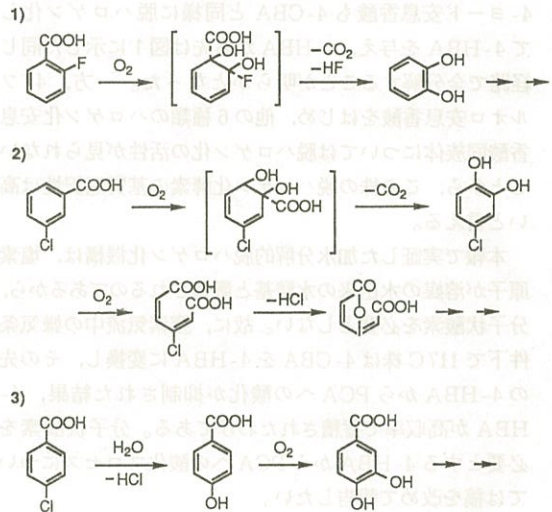


図8 好気性細菌によるハロゲン化安息香酸の脱ハロゲン化機構<sup>7-10)</sup>

ハロゲン化安息香酸の生分解は、有機ハロゲン化合物の脱ハロゲン化過程のモデルとしても研究されてきた。図8は好気性微生物によるハロゲン化安息香酸の脱ハロゲン化のプロセスを例示したものである。図中1)は酸化的水酸化と脱炭酸に伴う脱ハロゲン化<sup>9)</sup>、2)はベンゼン環の開裂後、ラクトン化に伴う脱ハロゲン化<sup>10)</sup>、3)は初期の段階での加水分解的脱ハロゲン化<sup>7,8)</sup>の例である。このうち3)は脱ハロゲン化が最初に起こるので、その後の生分解は極めて容易となる。3)のプロセスの報告例は比較的新しいものであるが、例示のとおり4-CBAを4-HBA経由で分解する細菌は多数報告されている<sup>9)</sup>。しかし、4-CBAから4-HBAに至る脱ハロゲン化機構を実証的に明らかにしているのは、2報あるのみである。Müllerら<sup>7)</sup>、Marksら<sup>8)</sup>は、*Pseudomonas*属、*Arthrobacter*属の細菌の粗酵素液をそれぞれ用いてH<sub>2</sub><sup>18</sup>O由来の<sup>18</sup>Oの4-HBAへの取り込みを見ている。我々の場合、*Acinetobacter*属の休止細胞を用いて同様の手法で加水分解的脱ハロゲン化の過程を実証することができた。実験の細部での相違に言及すると、<sup>18</sup>Oの4-HBAへの取り込みをGC/MSで分析する際、

Müller ら, Marks らともに 4-HBA のメチル化誘導体を用いたのに対し, 我々は TMS 誘導体を用いたが, TMS 化の利点として次のような点を上げることができる。すなわち, メチル化では水酸基の  $\text{OCH}_3$  体と未反応の  $\text{OH}$  体の混合物が生じるのに対し, TMS 化は単一の誘導体を与えること, 加えて  $^{18}\text{O}$  の 4-HBA への取り込み率は前述の TMS 誘導体特有のフラグメント  $\text{M}-59$  ( $\text{M}^+-\text{CH}_3, -\text{CO}_2$ ) のクラスターイオンの強度に着目することにより一義的に数値化できることである。

基質選択性については, 117C 株は 4-プロモ安息香酸, 4-ヨード安息香酸も 4-CBA と同様に脱ハロゲン化して 4-HBA を与え, 4-HBA から先は図 1 に示した同じ経路で全分解することが明らかとなった。一方, 4-フルオロ安息香酸をはじめ, 他の 6 種類のハロゲン化安息香酸同族体については脱ハロゲン化の活性が見られないことから, この株の脱ハロゲン化酵素の基質選択性は高いと言える。

本報で実証した加水分解的脱ハロゲン化機構は, 塩素原子が溶媒の水由来の水酸基と置換されるのであるから, 分子状酸素を必要としない。故に, 窒素気流中の嫌気条件下で 117C 株は 4-CBA を 4-HBA に変換し, その先の 4-HBA から PCA への酸化が抑制された結果, 4-HBA が高収率で蓄積されたわけである。分子状酸素を必要とする 4-HBA から PCA への酸化プロセスについては稿を改めて報告したい。

## 摘 要

土壌から分離した *Acinetobacter* 属の 117C 株が 4-クロロ安息香酸 (4-CBA) を完全分解することを前報<sup>3)</sup>で報告したが, その第一段階の脱ハロゲン化は嫌気的条件下でも進むことから, 脱ハロゲン化酵素の直接関与が示唆された。そこで, 同株による 4-CBA の脱ハロゲン化機構と基質選択性を検討して以下の結果を得た。

(1) 脱ハロゲン化機構については, 休止細胞を 4-CBA, リン酸緩衝液,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  から成る系 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$  濃度: 88~89%) で窒素ガスを通気しながら培養し, 生成した 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HBA) の水酸基への  $^{18}\text{O}$  の取り込みを GC/MS を用いて測定した。その結果, 4-

HBA のトリメチルシリル化誘導体のマスフラグメントの  $m/z$  225 ( $\text{M}^+-\text{CH}_3, -\text{CO}_2$ ) と  $^{16}\text{O}$  由来の  $m/z$  223 の強度比から計算して, 4-HBA の水酸基の 80% が  $^{18}\text{O}$  でラベルされたことが明らかとなり, 加水分解的脱ハロゲン化が実証された。

(2) 基質選択性について, 4-CBA の異性体, 他の 4-ハロゲン化安息香酸 (F, I, Br), 3 種類のジクロロ安息香酸, 計 8 種類を基質とし, 分解性ととも脱ハロゲン化物の生成を HPLC を用いて検討した。その結果, 96 時間の培養で 4-CBA 同様, 4-ヨード安息香酸, 4-プロモ安息香酸が完全分解され, 脱ハロゲン化物として 4-HBA が確認された。一方, 4-フルオロ安息香酸をはじめ, 他の 6 種類の同族体については脱ハロゲン化の活性が見られなかった。

## 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.: Wat. Sci. Tech., 25, 411~418 (1992)
- 4) 古川謙介: 微生物の分離法 (山里一英ら編), pp. 667~675, R & D プラニング (1987)
- 5) Bedard, D. L. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 51, 761~768 (1986)
- 6) Budzikiewicz, H., Djerassi, C. and Williams, D. H. 著, 中川有造, 池田正澄訳: 有機化合物のマススペクトル, p.478, 丸善 (1973)
- 7) Müller, R. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 124, 178~182 (1984)
- 8) Marks, T.S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 124, 669~674 (1984)
- 9) Engesser, K.-H., Schmidt, E. and Knackmuss, H.-J.: Appl. Environ. Microbiol., 39, 68~73 (1980)
- 10) Dorn, E. and Knackmuss, H.-J.: Biochem. J., 174, 73~84 (1978)