

酸化還元酵素チロシナーゼとペルオキシダーゼによる

環境汚染物質の除去

日大生産工 ○山田和典・柏田 歩・松田清美・平田光男

1. 緒言

汚染物質の1つとしてあげられるアルキルフェノールは、石油精製、樹脂製造、製紙など多くの工場から排出され、中には発ガン性のものである(1)。また、アルキルフェノールと同様に産業界で多く使われている化合物としてビスフェノールA(BPA)があり、エポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の製造原料として、また抗酸化剤、難燃剤、顔色剤などとして繊維、染料、製紙産業などで使われている。非イオン界面活性剤であるアルキルフェノールエトキシレートの分解生成物であるオクチルフェノールやノニルフェノール及びBPAは動物やヒトの内分泌系をかく乱する恐れがあるとして問題視されており、鳥類の卵殻薄化、魚介類の雌化、免疫機能の低下などの影響があると言われている。また、これらの化合物は、生分解性が低いため、環境中に残留して食物連鎖によって水棲動物(魚類、両生類、哺乳類)に数千から数万倍に濃縮されることも指摘されている(2, 3)。

これらの化合物は構造中にベンゼン環を有することから、酵素によって分解しにくいと言われていたが、近年様々な方法によってこれらの物質を分解または内分泌かく乱特性を失活させる研究が行われるようになってきた。我々が行ってきたこれまでの基礎研究からマッシュルームチロシナーゼや麹菌(*Aspergillus oryzae*)チロシナーゼが *p*-アルキルフェノールをキノン酸化することや西洋ワサビペルオキシダーゼが過酸化水素存在下でアルキルフェノールやBPAをラジカル化することがわかり、酵素を使った効率的な環境汚染物質の除去を構築できると考えている。その中で、マッシュルームチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズとの反応を利用した高効率な除去法を見出した(4, 5)。しかし、酵素を溶解させて用いると、処理後活性を保持した状態で単離することは困難である。また、酵素の多くは、熱、酸、アルカリ、有機溶

媒などに対して不安定であり、至適条件下で使用したとしても比較的早く失活するなどの欠点もある。そこで、酵素を固体担体に固定化することができれば、酵素の連続使用や保存などこれまでの課題となっている多くの問題を解決することができる(6, 7)。

我々は17及び18年度を通して①麹菌由来のチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着(8)、②過酸化水素存在下で、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼによる *p*-アルキルフェノールとBPAのフェノキシラジカル化とラジカルカップリング反応による水不溶性ポリフェノールの形成による沈殿除去(9)、③共有結合を介したイオン交換樹脂へのマッシュルームチロシナーゼの固定化と固定化チロシナーゼの反復利用に関する研究を行ってきた。本発表では、上述した方法によりチロシナーゼとペルオキシダーゼを用いた *p*-アルキルフェノールやBPAを効率的に除去する際の至適条件の決定とその応用について報告する。

2. 実験

2. 1 麹菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

麹菌チロシナーゼは月桂冠(株)において産生、粗精製された比活性936と1170 U/mg-solidのものを使用した(10)。pH6.0のリン酸緩衝溶液を溶媒として麹菌チロシナーゼとアルキル鎖長の異なる *p-n*-アルキルフェノール(和光純薬(株)と東京化成工業(株)製)の溶液を調製した。富士紡績(株)から購入したキトサンビーズ(粒径: 70~200nm, 比表面積: 70~100m²/g)は緩衝溶液中に保存し、実験に使用した。 *p*-クレゾールを除去する際に決定した至適条件である pH6.0, 30°Cで(8)、褐色三角フラスコに入ったキトサンビーズ 0.50cm³を含む *p-n*-アルキルフェノール(0.5~0.05mM)溶液 20cm³に濃度が 150U/cm³となるように麹菌チロシナーゼ溶液を加えるこ

Removal of Environmental Pollutants by Oxidoreductases, Tyrosinase and Peroxidase

Kazunori YAMADA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA and Mitsuo HIRATA

とで、酵素反応を開始させた。実験中は、所定時間ごとに波長 300 ~ 600nm の範囲で UV-visible スペクトルを測定し、逆相カラム Inertsil ODS-2 または Inertsil C8-3 (5 μ m, 4.6mmi.d. \times 15cm) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法によって溶液中の *p-n*-アルキルフェノール濃度を求めた。移動相としてアセトニトリル水溶液を用い、アルキル鎖長によって組成を調節した。初期濃度と残留濃度の関係からキノンへの転化率を求めた。また、キトサンビーズを添加した溶液と添加していない溶液の UV-visible スペクトル測定から生成したキノンのキトサンビーズへの吸着率を求め、転化率と吸着率から除去率を決定した。

2. 2 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA の除去

Sigma Aldrich(株)製の西洋ワサビチロシナーゼ(E.C 1.11.1.7, 224U/mg-solid)を使用した。BPA とその誘導体は東京化成工業(株)から購入し、そのまま使用した。pH6.0 のリン酸緩衝溶液とエタノールからなる混合溶媒で 5.0mM の BPA 溶液を調製した。この BPA 溶液に pH6.0 の緩衝溶液を溶媒として調製した HRP 溶液、分子量 1.0×10^4 のポリエチレングリコール(10K-PEG) 溶液、過酸化水素溶液を加えて酵素反応を開始させ、所定時間ごとに濁度と残量濃度を測定した。BPA の除去における HRP 濃度、PEG 濃度と分子量、過酸化水素濃度、pH 及び温度などの至適条件を決定し、種々のビスフェノール誘導体の除去に応用した。残留濃度は Inertsil ODS-2 を用いた HPLC 法によって求め、移動相のアセトニトリル水溶液の組成は使用したビスフェノール誘導体によって調節した。

2. 3 マッシュルームチロシナーゼの固定化と *p*-クレゾールの除去

Sigma Aldrich(株)製のマッシュルームチロシナーゼ(E.C 1.14.18.1, 2590U/mg-solid)を使用した。pH7.0 の緩衝溶液中に保持したカルボキシル基型弱酸性陽イオン交換樹脂(DIAION WK-10)0.5cm³ に濃度 2000U/cm³ のマッシュルームチロシナーゼ(Sigma Aldrich(株)製, E.C 1.14.18.1, 2590U/mg-solid)溶液 2.5cm³ と濃度 0.333mmol/cm³ の水溶性カルボジイミドである(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)溶液 0.9cm³ を加え、4 $^{\circ}$ C で攪拌することでイオン交換樹脂にチロシナーゼを固定化した。

内径 5 mm のカラムにチロシナーゼを固定化した樹脂 0.5cm³ を、内径 8 mm のカラムにキト

サンビーズ 4 cm³ を充填した。チロシナーゼ固定化樹脂を充填したカラムに pH7.0、濃度 0.5mM の *p*-クレゾール溶液 20cm³ を滴下し、チロシナーゼ固定化樹脂を充填したカラムから溶出した溶液はキトサンビーズを充填したカラムに流入させ、2 本のカラムへ繰り返し流通させた。経時的に吸光度測定と HPLC を用いて *p*-クレゾールの濃度を測定した。

3. 結果と考察

3. 1 麴菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

マッシュルームチロシナーゼとキトサンビーズを用いた *p*-クレゾールの除去において至適条件(pH7.0, 45 $^{\circ}$ C)が決定され、アルキル鎖長 2 ~ 9 の *p-n*-アルキルフェノールの除去への応用を検討した結果、95%以上の除去率が得られた(4, 5)。ここでは、麴菌チロシナーゼを用いた際の *p-n*-アルキルフェノールの除去を検討した。麴菌チロシナーゼの至適条件である pH6.0, 30 $^{\circ}$ C(8)で濃度 150U/cm³ の麴菌チロシナーゼを含む 0.5mM の *p*-クレゾール溶液においてキトサンビーズ添加量を 0.0125 ~ 0.075cm³/cm³ とした際の反応時間に対するキノン形成を示す波長 400nm の吸光度の変化を図 1 に示す。キトサンビーズを加えて酵素反応を開始させると、吸光度の上昇が抑えられ、その後吸光度は反応時間とともに低下した。これは酵素反応によって *p*-クレゾールから形成したキノン化合物がキトサンビーズのアミノ基と反応して除去されたことを示す。また、添加したキトサンビーズ添加量が多いほど、吸光度の低下は顕著であり、キトサンビーズ量 0.025cm³/cm³ では反応時間 100 分で *p*-クレゾールはほぼ完全に除去された。

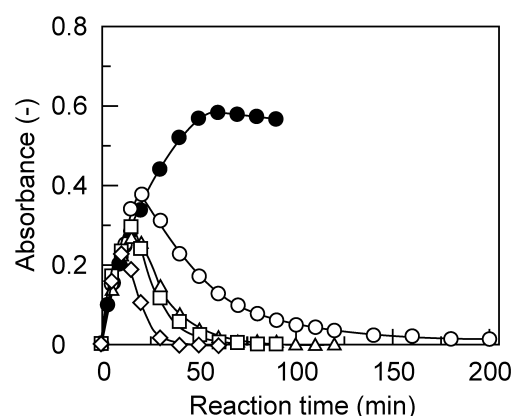


Figure 1 Enzymatic removal of *p*-cresol with *Aspergillus oryzae* tyrosinase in the absence (●) and presence of chitosan beads of 0.0125 (○), 0.025 (△), 0.050 (□), and 0.075 (◇) cm³/cm³.

Table 1 Removal of *p*-alkylphenols by the combined use of *Aspergillus oryzae* tyrosinase and chitosan beads at pH 6.0 and 30 °C.

<i>p</i> -alkylphenol	Initial conc. (mM)	Tyrosinase conc. (U/cm ³)	Chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Conversion %	Adsorption %	Removal %	Time (min)
<i>p</i> -cresol	0.50	150	0.025	100	100	100	100
4-ethylphenol	0.50	150	0.025	100	100	100	120
4- <i>n</i> -propylphenol	0.50	150	0.025	100	100	100	110
4- <i>n</i> -butylphenol	0.50	150	0.100	100	97.6	97.6	90
4- <i>n</i> -pentylphenol	0.50	150	0.100	100	97.6	97.6	120
4- <i>n</i> -hexylphenol	0.30	150	0.100	100	98.3	98.3	120
4- <i>n</i> -heptylphenol	0.10	150	0.025	100	100	100	80
4- <i>n</i> -octylphenol	0.05	150	0.025	100	100	100	120
4- <i>n</i> -nonylphenol	0.05	150	0.025	100	100	100	3
4-isopropylphenol	0.50	150	0.025	92.8	90.5	84.0	180
		200	0.025	100	100	100	120
4- <i>sec</i> -butylphenol	0.50	150	0.025	88.6	83.3	73.8	120
		200	0.025	100	82.3	82.3	180
		200	0.050	100	100	100	160
4- <i>tert</i> -butylphenol	0.50	150	0.025	92.1	54.5	50.2	180
		200	0.025	95.6	57.8	55.3	180
		200	0.050	95.2	72.6	69.1	180
		250	0.050	100	71.1	71.1	300
		250	0.100	100	90.6	90.6	480
4- <i>tert</i> -pentylphenol	0.50	150	0.025	84.9	86.2	73.2	360
		250	0.050	94.9	87.9	83.4	360
		250	0.100	96.0	95.4	92.6	360
		250	0.150	95.5	100	95.5	480

形成したキノンのキトサンとの反応はキノンの水付加反応と競争的に進行するので(11), キトサンビーズ添加量が少ないときの除去率低下の原因と考えられる. さらに pH6.0, 30°Cでアルキル鎖長 2~9 の *p-n*-アルキルフェノールの除去実験を行った結果を表 1 にまとめた. *p-n*-ブチルフェノール, *p-n*-ペンチルフェノール, *p-n*-ヘキシルフェノールでは生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着が遅かったので, キトサンビーズ量を 0.100cm³/cm³に増加させて除去実験を行った結果, いずれの *p-n*-アルキルフェノールに対しても 97%以上の除去率が得られ, 高く除去できることがわかった. さらに, 分岐状 *p*-アルキルフェノールの除去においても表 1 に示すように麴菌チロシナーゼ濃度とキトサンビーズ添加量を上昇させることで 90~100%の除去率が得られた. 4-*tert*-ブチルフェノール(4TBP)は過酸化水素存在下においてマッシュルームチロシナーゼによってキノン酸化することが報告されているが, 麴菌チロシナーゼは過酸化水素なしで 4TBP と 4-*tert*-ペンチルフェノールをキノン酸化し, 本方法によってこれらを効率的に除去することができた.

3. 2 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA の除去

HRP は過酸化水素存在下において BPA をラジカル化し, 過酸化水素濃度の上昇とともに反応時間 180 分での BPA(2.5mM)の残留率は低下

し, 溶液は不溶性のオリゴマーの形成により高く白濁した. また, [BPA]/[H₂O₂]=1.0 の条件で残留率が 0%となった. これは HRP が酵素活性を示す反応機構サイクルにおいて過剰に過酸化水素が存在すると, HRP が不活性な形態をとるためと言われている(12). さらに溶液中に PEG を加えると, 酵素反応によって形成したフェノキシラジカルや自己重合生成物が PEG との間で可溶性の複合体を形成し, HRP の活性の低下を抑えることができた(13). さらに, 諸条件を変化させて BPA の残留率を検討した結果, pH6.0, 30°C, [BPA]/[H₂O₂]=1.0, [HRP]=1.0U/cm³, [10K-PEG]=0.1mg/cm³を至適条件として決定できた. この条件で種々のビスフェノール誘導体の除去実験を行った結果を表 2 にまとめた. HRP はビスフェノール S と 2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホンに対しては活性を示さなかったが, 他の 11 種類のビスフェノール誘導体を処理することができ, 残留率を 5~0%にすることができた. さらに, 酵素反応処理後, 溶液の pH を塩酸で 4.0 まで低下させると, 形成した不溶性オリゴマーの凝集が進むことで溶液を容易にろ過することができ, 無色透明な溶液が得られた.

2. 3 マッシュルームチロシナーゼの固定化と *p*-クレゾールの除去

固定化反応において pH6.0 以下ではマッシュルームチロシナーゼが EDC とともに凝集する

Table 2 Removal of BPA and its derivatives (2.5 mM) with HRP at pH 6.0 and 30 °C
[bisphenol derivative]=[H₂O₂], [10K-PEG]=0.1 mg/cm³

Bisphenol derivatives	[HRP] (U/cm ³)	% residual	Absorbance at pH 4	Color of filtrantat
bisphenol A	1.0	0	0.012	transparent
bisphenol B	5.0	0	0.006	transparent
bisphenol C	1.0	0	0	transparent
bisphenol E	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol F	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol S	20.0	no activity		
bisphenol T	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol Z (0.5mM)	2.0	0	0.21	white
diphenolic acid	20.0	5.1	1.080	white
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	20.0	no activity		
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	1.0	0	0.001	transparent
2,4'-dihydroxybenzophenone	20.0	3.9	0.021	transparent
4,4'-dihydroxybenzophenone	20.0	5.5	0.65	white
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	0.1	0	0.004	ocher

ため、固定化量を決定できなかつたが、pH7.0～10.0の範囲では固定化反応を行うことができ、固定化時間が長いほど高い固定化量が得られた。pH7.0で72時間固定化反応させて得たクロシナーゼ固定化樹脂を用いて *p*-クレゾールの除去実験を5回行ったところ、測定回数を繰り返すことによって除去率がわずかに低下したが、85%以上の除去率が得られた。また、固定化時間を長くして調製したクロシナーゼ固定化樹脂を用いると、繰り返し利用した際の活性の低下が抑えられた。これは固定化時間を長くすることで樹脂とクロシナーゼ分子との間の結合枝数が増加し、変性しにくくなったためと考えられ、固定化によるクロシナーゼの反復利用の可能性を見出した。

4 結言

本発表では3種類の酸化還元酵素を用いて *p*-アルキルフェノールやBPAとその誘導体を効率的に除去できることを述べたが、今後は個々の酵素の特徴を活かした利用方法を見だし、他の環境汚染物質の除去への応用を検討する。また、工業的な利用(実用化)を考える上で、酵素の反復利用は重要な課題であり、現時点では固定化によって酵素の活性が十分に保持されているとは言えないので、固定化条件やキトサンビーズの合成などを検討することで、高く活性を保持した安定な固定化酵素の構築を目指すことが我々の今後の研究課題である。

5 参考文献

1) Guillet, L. J., Gunderson, M. P., *Reproduct.*,

122, 857-864 (2001).

2) 稲森悠平, 宇都宮暁子, ”非イオン界面活性剤と水環境”日本水環境学会[水環境と洗剤研究委員会]編, 技報堂出版, p.113-136 (2000).

3) Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A. G. M., Bowmer, T., *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).

4) Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).

5) Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006).

6) Bieganski, A. T., Bukowska, M. J., and Jackowska, ., *Bioelectrochem.*, **69**, 41-48 (2006).

7) Yamada, K., Iizawa, Y., Yamada, J., and Hirata, M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **102**, 4886-4896 (2006).

8) 山田和典, 井上友明, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 第 20 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, p172-173 (2006).

9) 池田尚也, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 日本化学会第 87 春季年会予稿集, 印刷中.

10) Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., and Ichishima, E., *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004).

11) Jiménez, M., and Carcía-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).

12) Wright, H., and Nicell, J. A., *Bioresource Technol.*, **70**, 69-79 (1999).

13) Duarte-Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, M. A., García-Almendarez, B. E., and Regalado, C., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 42-47 (2002).