

Aquamicrobium sp. SK-2 株由来 Biphenyl 分解酵素 BphC の精製と分解特性

菅原 豪人¹・小山 大貴¹・澤田 研²・張 俗喆^{1*}・菊池 慎太郎¹

¹室蘭工業大学工学研究科環境創生工学系専攻 (〒050-8585 北海道室蘭市水元町 27-1)

²室蘭工業大学工学研究科生産システム工学系専攻 (〒050-8585 北海道室蘭市水元町 27-1)

*E-mail: ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

Aquamicrobium sp. SK-2 株からビフェニル分解酵素 2,3-ジヒドロキシビフェニル-1,2-ジオキシゲナーゼ(BphC)の精製を行い、BphC 酵素を精製した。この酵素の分子量は 65kDa で二量体であった。諸特性の検討を行った結果、幅広い温度領域において活性を保持し、その最適温度は 30°C であった。最適 pH の検討に関しては、中性からアルカリ性領域において高い活性を保持し、その最適 pH は 8.0 であった。 K_m と V_{max} を算出した結果、 $K_m=12.0 \mu\text{M}$ 、 $V_{max}=154 \text{ mM/min}$ であり、SK-2 株由来 BphC は 2,3-DHBP と比較的高い親和性を有していることが判明した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、*Pseudomonas* sp. KKS102 株由来 BphC と 92% の高い相同性を示した。また、BphC による 2,3-ジヒドロキシビフェニルとカテコールの開環反応を確認した。

Key Words: biphenyl, *Aquamicrobium* sp. SK-2, BphC, purification, aromatic compounds

1. はじめに

芳香族炭化水素であるビフェニル並びにジビフェニルを合成原料とするポリ塩化ビフェニル (PCB) は典型的な難生分解性合成有機物質であり、環境に残留するこれらの物質が生物に対して強い毒性を有することが明らかにされて以来¹⁾、それらの使用や排出などが激しく制限されるに至った²⁾。

現在はビフェニル及び PCB 分解菌の研究は数多く報告され、好気性細菌は付加塩素原子数 (置換塩素原子数) の少ない PCB を分解し、嫌気性細菌は逆に置換塩素数の多い PCB を分解する傾向にあると理解されている^{3,4)}。その中、当研究室で単離された *Aquamicrobium* sp. SK-2 株と Hatamian-Zarni らにより単離された *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 が置換塩素原子数の多い PCB まで好気条件下で資化可能であることが報告された^{5,6)}。しかし、いずれにおいても分解メカニズムに関する酵素や遺伝子レベルまでの解明は行われていない。

Aquamicrobium sp. SK-2 株は、耐塩性及びビフェニルを唯一の炭素源として資化する能力を有し、置換塩素数の多い高塩素 (塩素が 7 つ置換したもの) の PCB 分解能を有し、ビフェニル分解経路もすでに報告されている⁶⁾。既報の研究によれば、ビフェニル代謝経路は複数の酵素により段階的に行われており、*Aquamicrobium* sp. SK-2 株においても同様の経路を経ていることが判明している。

この代謝経路を司る酵素の 1 つに 2,3-ジヒドロキシビフェニル(2,3-DHBP)を 2-ヒドロキシ-6-オキソヘキサ-2,4-ジエン酸(HOPDA)に代謝する酵素 2,3-ジヒドロキシビフェニル-1,2-ジオキシゲナーゼ (BphC) が存在する。この BphC は既報の研究により、2,3-DHBP 以外にも様々な芳香族化合物を分解することが報告されており、環境汚染の原因とされる芳香族化合物の分解への応用が期待されている^{7,8)}。

本稿では、PCB を分解する *Aquamicrobium* sp. SK-2 株の分解能力を活用し、PCB の生物学的処理法の確立のために PCB の分解に重要な酵素 BphC を精製し、その活性の最適条件と分解に関する特性の検討を行うことで、応用のための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 供試菌株

本実験に用いた菌株は当研究室で単離された *Aquamicrobium* sp. SK-2 株 (以下 SK-2 株と省略) であり、その菌の詳細については既報の論文で紹介した⁹⁾。

(2) BphC の精製プロセス

まず菌体の培養を行った。ビフェニルを唯一の炭素源として 4 L の MS 無機塩培地 (以下 MS 培地と省略)⁹⁾ に最終濃

度が 100 mg/L になるように加えた後 SK-2 株を接種し、30°C で対数増殖期後期まで振盪培養した。96 時間の培養終了後、その培養液を遠心分離 (3,000×g, 20 min, 4°C) して集菌し、上清を捨てて菌体を回収した。回収された総菌体質量 0.8~1.0 g (湿潤重量) の菌体ペレットに 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加え 2 回洗浄を行った後、トリス塩酸緩衝液に再懸濁し、超音波破碎機 (BRANSON SONIFIER 133 kW 50 kHz) で破碎処理 3 分と冷却時間 1 分を 5 回繰り返す工程を計 2 回行った。その後、遠心分離 (10,000×g, 10 min, 4°C) を行い得た上清を粗酵素液とした。次に、粗酵素液を陰イオン交換カラム (Bio-Rad 製 Bio-scale Mini Macro-Prep HighQ Cartridge) に供した。陰イオン交換カラムは 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した後、試料を添加した。タンパク質の溶出は、塩化ナトリウム (0.1 ~ 1 M) を直線的に濃度変化させることで行った。流速は 0.5 ml/min で、フラクションサイズを 1 ml とした。BphC の活性を有する画分を混合し、ゲルろ過カラム (GE ヘルスケア製 Hicap 16/60 sephacryl S-300HR) に供した。pH7.5 に調製した 50 mM トリス塩酸緩衝液でゲルろ過カラムは平衡化した。流速 0.5 ml/min で平衡化に使用した緩衝液にてタンパク質を溶出させた。溶出液は陰イオン交換カラムと同様に画分した。BphC の 2,3-DHBP 分解活性 (比活性) は、紫外可視分光光度計を用いて測定した。測定後、活性を有する画分を混合し、限外ろ過ユニット (Merck Millipore 製 Amicon Ultra 50k) にて脱塩処理を行い、BphC を得た。

(3) BphC の分解活性測定とタンパク質の定量

各画分の BphC の 2,3-DHBP 分解活性とタンパク質濃度は紫外可視分光光度計および Bradford 法により測定した。酵素の活性は比色法により消費基質モル数を求めた。分析は 1 ml セル内に 20 μL の酵素液、970 μL のトリス塩酸緩衝液 (100 mM, pH 7.5)、10 μL の 2,3-DHBP を最終濃度 10 mM になるよう加え 3 分後の OD₄₃₂ の値から 2,3-DHBP の定量を行った。

Bradford 法は Bio-rad 社製 Quick start Bradford 液を使用した。以上二つの測定結果から、比活性の算出を行った。本研究では、1 U (Unit) = 2,3-DHBP の消費基質モル数 (μmol) / 反応時間 (min) と定義している。

$$\text{比活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg of protein}) = \frac{\text{活性(U)}}{\text{測定時濃度}(\text{mg of protein})}$$

(4) 分子量の推定

SK-2 株から精製した BphC の分子量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびタンパク質分子量マーカー (TEFCO 製 wide Range 3.5-204 kDa) による分子量の推定を行った。また、目的タンパク質分子が多量体、サブユニット構造を有している場合の分子量算出に対応するよう、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-

PAGE) も行った。分子量の確認には牛血清アルブミン 900 μL にキモトリプシノゲン 0.001 g を溶かしたものを使用した (60 kDa, 25 kDa)。

(5) アミノ末端配列の決定

分子量の推定に利用した SDS-PAGE の泳動バンドから目的酵素のバンドを切り出し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した後、エドマン分解法により N 末端アミノ酸配列の解析を行った。

(6) BphC の最適 pH および温度

最適 pH の検討には酢酸緩衝液 (pH 4.0, pH 5.0)、リン酸緩衝液 (pH 6.0)、トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0, pH 8.0)、ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) を用いた。各緩衝液の中に酵素液 (0.12 μg protein/ml) を加え、前述したように、比色法によって酵素活性を測定した。各緩衝液の濃度は 0.05 M で使用した。また、最適温度の検討は pH 8.0 のトリス塩酸緩衝液に基質と精製酵素液を混合した反応液を用いた。また、反応液はそれぞれの温度 (10, 25, 30, 35, 40, 45°C) 条件において 5 分間静置反応させた後、比色法により測定した。

(7) 2,3-DHBP 濃度の影響

2,3-DHBP の濃度を 0.01 から 0.05 M として、各基質濃度における酵素活性を測定することで反応速度を求めた。Lineweaver-Burk プロットを用いて K_m 値および V_{max} 値を求めた。

(8) 芳香族化合物の分解および分解産物の同定

実験に使用する芳香族化合物は、SK-2 株の生分解能抑制に使用した芳香族化合物と、BphC がエクストラジオール型の酵素であることを考慮し選択した。使用した芳香族化合物は 2,3-DHBP、安息香酸、フェナントレン、4-クロロフェノール、カテコール、ジフェニルアミン、ニトロベンゼン、トルエン、アニリン、トリフェニルベンゼン、ナフタレン、*o*-キシレン、ヒドロキノン、レソルシノール、4-クロロカテコール、3,5-ジクロロカテコールの 16 種であった (表-1)。また、分解産物の同定は TMS 誘導化を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (SHIMADZU 製 GCMS-QP2010, 以下 GCMS と省略) を用いて行った。

3. 結果と考察

(1) BphC の精製

粗酵素液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、回収した画分の溶出パターンを (図-1A) に示した。24 から 34 画分に大きな活性のピークが確認された。この中で特に活性の高い 26 から 30 画分を電気泳動により検討したところ、30 kDa

以上のタンパク質バンドが多く確認された（データ省略）。この画分を混合し、次にゲルろ過クロマトグラフィーに供した。その溶出パターンを（図1B）に示した。38から45画分に大きな活性のピークが確認された。この中で特に活性の高い38から42画分を電気泳動により検討したところ、単一のタンパク質バンドが確認された（データ省略）。一方、ゲル濾

過カラムにより精製したタンパク質（推定分子量 65 kDa）の比活性は 14.6 U/mg of protein であった（表-2）。この結果は、既報の *Dyella ginsengisoli* LA-4 (118.3 U/mg of protein) の比活性より低く、*Bacillus* sp. JF8 (5.47 U/mg of protein) より高い値であった^{10), 11)}（データ省略）。

表-1 分解実験に用いた供試芳香族化合物

対照芳香族化合物	構造式	対照芳香族化合物	構造式	対照芳香族化合物	構造式	対照芳香族化合物	構造式
2,3-DHBP	<chem>Oc1ccc(cc1)-c2ccc(O)cc2</chem>	ニトロベンゼン	<chem>O=[N+]([O-])c1ccccc1</chem>	カテコール	<chem>Oc1ccccc1O</chem>	ナフタレン	<chem>c1ccc2ccccc2c1</chem>
安息香酸	<chem>OC(=O)c1ccccc1</chem>	トルエン	<chem>Cc1ccccc1</chem>	ジフェニルアミン	<chem>Nc1ccc(cc1)-c2ccccc2</chem>	o-キシレン	<chem>Cc1cccc(c1)C</chem>
フェナントレン	<chem>c1ccc2c(c1)ccc3ccccc23</chem>	アニリン	<chem>Nc1ccccc1</chem>	ヒドロキノン	<chem>Oc1ccc(O)cc1</chem>	レスゾシノール	<chem>Oc1ccc(O)cc1</chem>
4-クロロフェノール	<chem>Oc1ccc(Cl)cc1</chem>	1,3,5-トリフェニルベンゼン	<chem>c1cc(ccc1)-c2ccccc2-c3ccccc3</chem>	4-クロロカテコール	<chem>Oc1ccc(Cl)cc1O</chem>	3,5-ジクロロカテコール	<chem>Oc1cc(Cl)cc(Cl)cc1O</chem>

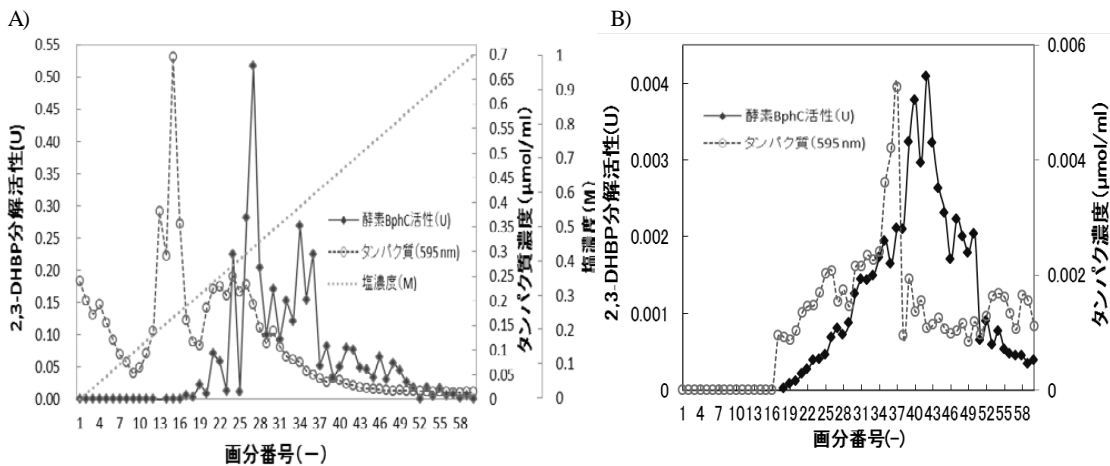


図-1 陰イオン交換カラム(A)とゲルろ過カラム(B)による各画分の溶出パターン

表-2 陰イオン交換カラムおよびゲルろ過カラムによる精製段階における比活性

精製段階	活性 (U)	タンパク質量 (mg of protein)	比活性 (U/mg of protein)
粗酵素	0.0686	0.0187	3.672
陰イオン交換カラム	0.0592	0.0137	4.335
ゲルろ過カラム	0.0076	0.0005	14.60

(2) 分子量の推定

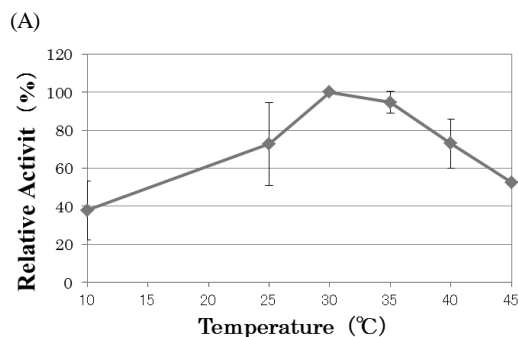
SDS-PAGE 電気泳動の分析から、限外ろ過後のサンプルに 32 kDa の精製バンドが確認できた (図-2A) . しかし、既報の BphC の分子量は 65 kDa 以上のものが多いことから^{12), 13)}, タンパク質分子が生体内で多量体やサブユニット構造を形成している可能性が考えられた. そこで、Native-PAGE 電気泳動を行ったところ、60 kDa より上の位置に単一バンドが確認され (図-2B) , ゲル濾過カラムを用いた精製におけるタンパク質の溶出時間を考慮すると、単一バンドの分子量はおよそ 65 kDa と推定された. さらに、この分子量は SDS-PAGE 電気泳動の 2 倍にあたるため、BphC は二量体であると考えられた.

(3) 精製酵素の同定結果

SDS-PAGE の泳動バンドから目的タンパク質のバンドを切り出し、エドマン分解法による精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、N 末端から 12 残基 (SXERLGYLGFV) のアミノ酸配列を解析できた (表-3) . 2 残基目の X は Leu もしくは Ile の可能性が考えられた. 精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析結果を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 検索を用いて既報の芳香族分解菌由来 BphC の N 末端アミノ酸配列と比較した. その結果、*Pseudomonas* sp. KKS102 株由来 BphC と最も高い相同性を示した.

(4) BphC の基質分解における最適温度と最適 pH

BphC の温度に関する検討した. 室温よりも高い温度条件下で高い活性を示した (図-3A) . 特に 30°C 条件下における活性が高く、これが最適温度であることが半明した. 一方、他の菌株由来 BphC の最適温度に関しては、*Rhodococcus* sp. R04 (30°C) , *Rhodococcus* sp. K37(40°C) , *Burkholderia* sp. JF8(50°C) と報告されてある^{10), 14-16)}. また、30°C の比活性を 100% としたとき、10°C や 45°C 条件下においても相対活性は 40% 以上を保持していたことから、幅広い温度範囲で活性を有していると判明した.



次に BphC の pH に関する検討を行った結果、中性から弱アルカリ性領域において高い活性が見られた (図-3B) . 特に pH 8.0 において高い活性を示したことから、最適 pH は 8.0 であることが半明した. この結果は、SK-2 株の培養液を用いたピフェニルの生分解実験における最適 pH の結果と一致した (データ省略) . また、他の BphC の最適 pH に関しては、*Rhodococcus* sp. R04(pH 9.0) , *Rhodococcus* sp. K37 (pH 8.0) , *Burkholderia* sp. JF8 (pH 8.5) と報告されてある^{10), 14-16)}.

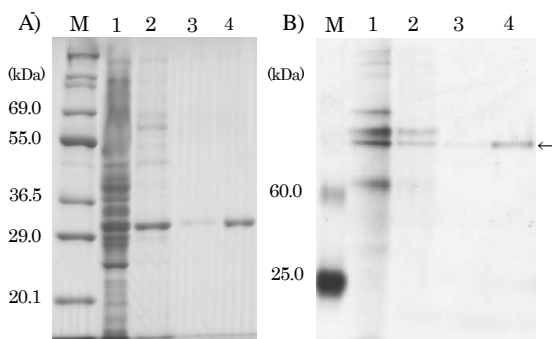


図-2 SDS-PAGE(A) と Native-PAGE(B) の分析

M: タンパク質分子量マーカー 1: 粗酵素 2: 陰イオン交換後の画分濃縮料
3: ゲル濾過後の精製酵素(BphC) 4: BphC の限外ろ過後の濃縮試料
←: 約 65 kDa のバンド位置

表-3 各菌株由来 BphC の N 末端アミノ酸配列

BphC の由来菌株名	N 末端アミノ酸配列	相同性(%)
<i>Aquamicrobium</i> sp. SK-2	SXERLGYLGFV	—
<i>Pseudomonas</i> sp. KKS102	SIERLGYLGFV	92
<i>Pseudomonas</i> sp. KF707 ¹⁵⁾	SIRSLGYMGFAV	67
<i>Comamonas testosteroni</i>	SIERLGYLGFV	92
<i>Burkholderia</i> sp. LB400	SIRSLGYMGFAV	67
<i>Dyella</i> sp. LA-4	SVKNLGYMGFSV	59

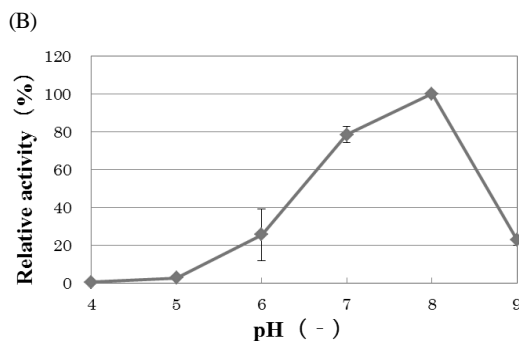


図-3 BphC の最適温度(A) と最適 pH(B) の検討

(5) 2,3-DHBP 濃度の影響

各濃度における BphC の活性測定結果から、Lineweaver-Burk プロットを作成し、 K_m と V_{max} を算出した結果、 $K_m=12.0 \mu\text{M}$ 、 $V_{max}=155 \mu\text{M}/\text{min}$ であった。この K_m は *Rhodococcus* sp. R04 株の BphC1 と同程度の値をとった。BphC の K_m に関しては 1.0~141.8 の幅広い値が報告されている (表 4)。SK-2 株の K_m (12 μM) は報告されている K_m の範囲と比べると比較的高い親和性を有していた。 V_{max} に関しては、*Rhodococcus* sp. TA421 株由来 BphC1 と同じ結果となった。

(6) BphC による芳香族化合物の分解と分解産物の同定

今回検討した 16 種の芳香族化合物の中で、分解が確認できたのは 2,3-DHBP とカテコールの 2 種であった。2,3-DHBP とカテコールの分解実験のガスクロマトグラムにおける分解産物の質量スペクトルを解析したところ、2,3-DHBP の分解産物は最大質量が 362 (最大 $m/z=362$) の 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸 TMS 誘導体であると推定され (図 4A)、カテコールの分解産物は最大質量が 286 (最大 $m/z=286$) の 2-ヒドロキシムコン酸-6-セミアルデヒド TMS 誘導体もしくはシス-ムコン酸セミアルデヒド TMS 誘導体であると推測された (図 4B)。表 3 に示したように、2,3-DHBP とカテコールは共通してジオール化合物であるが、同じジオール化合物であるヒドロキノンとレスノルシノールは開環反応が確認されなかった。このことから、SK-2 株由来 BphC はオルト位のヒドロキシ基 (OH 基) を認

識し触媒反応を示すのではないかと推察した。しかし、オルト位に OH 基を有する 4-クロロカテコールと 3,5-ジクロロカテコールに関して開環反応が確認されなかったことから、今回精製した BphC のみでは塩基置換したカテコール化合物の開環反応を触媒できず、ビフェニルの分解経路に関与する BphA や BphB、BphD などの相互複合作用によって開環反応を触媒すると推察された。一方、現在遺伝子の全塩基配列の解析を完了しており、その結果からビフェニル分解に関与する酵素として少なくとももう一つの BphC の存在が確認されていること (データ省略) から、クロロカテコールの開環反応機構の解明に向けてさらなる検討が必要と考えられる。

表 4 各菌株由来 BphC の K_m 値と V_{max} 値

菌株名	酵素名	K_m (μM)	V_{max} (mM/min)
<i>Aquamicrobium</i> sp. SK-2	BphC	12.0	154
<i>Rhodococcus</i> sp. R04 ¹⁴⁾	BphC1	12.3	-
	BphC2	1.0	-
<i>Rhodococcus</i> sp. TA421 ¹⁷⁾	BphC1	141.8	178
	BphC2	51.1	9964
	BphC3	5.4	9438
	BphC4	21.0	3797
<i>Achromobacter</i> sp. BP3 ¹²⁾	BphC1	2.13	-
	BphC2	4.49	-
	BphC3	39.1	-

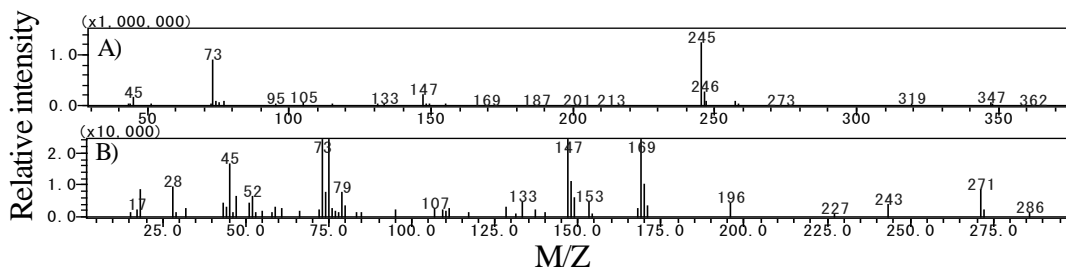


図 4 分解実験における 2,3-DHBP の分解産物 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸 (A) とカテコールの分解産物 2-ヒドロキシムコン酸-6-セミアルデヒド (B) の質量スペクトル

4. まとめ

Aquamicrobium sp. SK-2 株の分解能力を活用した PCB の生物学的処理法の確立のために PCB に重要な酵素 BphC を精製し、その活性の最適条件と分解に関する特性を検証することで、応用のための基礎的知見を得た。以下に述べるのが本研究の結果である。

Hiprep 16/60 sephacryl S-300HR, Bio-scale Mini Macro-Prep HighQ Cartridge の 2 種のカラムクロマトグラフィーによ

り精製を行い分子量 32 kDa の精製バンドを確認した。Native-PAGE の結果から分子量 65kDa の精製バンドが確認できたことから、精製酵素は二量体であることがわかった。これらの結果は、現在までに報告されているビフェニル分解酵素の値とよく一致した。また、精製した酵素の N 末端のアミノ酸配列を解析した結果、報告されている *Pseudomonas* sp. KKS102 株由来 BphC と 92% の相同性を示した。これらの結果から精製したビフェニル分解酵素は BphC であることが確認できた。

精製した BphC の K_m は 12.0 μM , V_{max} は 154 mM/min であった。報告されている BphC の K_m 値は 1.0~141.8 であり, SK-2 株の K_m 値は比較的高い親和性を有することが判明した。最適温度の検討結果から, BphC は幅広い温度領域において 2,3-DHBP の分解が可能であることが判明した。また, 芳香族化合物の分解実験から, BphC はオルト位のヒドロキシ基を認識し触媒反応を示すと推測した。以上の結果を考慮すると, *Aquamicrobium* sp. SK-2 株を用いた PCB の生物学的処理への工学的応用が期待できる。

参考文献

- 1) 国際化学物質安全性カード(<http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssc/icss0106.c.html>), 2006
- 2) 宮田秀明: PCB, *環境技術*, Vol. 21, pp. 319-327, 1992
- 3) Furukawa, K. Tomizuka, N. Kamibayashi, A.: Effect of chlorine substitution on bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 38, pp. 3001-310, 1979.
- 4) Takashi, H. Mitsuhiro, W. Kenichiro, N.: concentration and characteristics of polychlorinated biphenyls in the sediments of sea and river in Nagasaki Prefecture, *J. Health Sci.*, Vol. 54, pp. 400-408, 2008.
- 5) Zami, H. Shojasadati, A. Vashghani, S. A. Farahani, E. Hosseinkhani, S. Emamzadeh, A.: Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, Vol. 63, pp. 788-794, 2009.
- 6) Chang, Y. C. Takada, K. Choi, D. B. Toyama, T. Sawada, K. Kikuchi, S.: Isolation of biphenyl and polychlorinated biphenyl-degrading bacteria and their degradation pathway, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 170, No. 2, pp. 381-398, 2013.
- 7) Vaillancourt, F. H. Barbosa, C. J. Spiro, T. G. Bolin, J. T. Blades, M. W. Tumer, R. F. Eltis, L. D.: Definitive evidence for monoanionic binding of 2,3-dihydroxybiphenyl to 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from UV resonance raman spectroscopy, UV/Vis absorption spectroscopy, and crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 124, pp. 2485-2496, 2002A.
- 8) Vaillancourt, F. H. Labbe, G. Drouin, N. M. Fortin, P. D. Eltis, L. D.: The mechanism-based inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase by catecholic substrates. *J Biol Chem* Vol. 277, pp. 2019-2027, 2002B.
- 9) 張容喆, 宮森有司, 高田和紀, 裴一相, 丁權, 菊池真太郎: 耐塩性ビフェニル類分解菌の単離とビフェニル分解経路の推定, *土木学会論文集G(環境)*. Vol.67, No.7, III475-III483, 2011.
- 10) Bian, L. Shuai, J. J. Xiong, F. Peng, R. H. Yao, Q. H. Xiong, A. S.: Expression, purification, and characterization of a 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Bacillus* sp. JF8 in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, Vol. 419, pp. 339-343, 2012.
- 11) Hatta, T. Mukerjee, D. G. Damborsky, J. Kiyohara, H. Kimbara, K.: Characterization of a novel thermostable Mn(II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from a polychlorinated biphenyl and naphthalene degrading *Bacillus* sp. JF8, *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, No. 24, pp. 21483-21492, 2003.
- 12) Cao, L. Gao, Y. Wu, G. Li, V. Xu, J. He, J. Li, S. Hong, Q.: Cloning of three 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes from *Achromobacter* sp. BP3 and the analysis of their roles in the biodegradation of biphenyl, *J. Hazard. Mater.*, Vol. 261, pp. 246-252, 2013.
- 13) 千田俊哉, Nandhagopal. N, 杉本敬佑: ビフェニル - PCB 分解代謝系の酵素群に関する立体構造的研究, *構造生物*, Vol. 3, No.3, 1997.
- 14) Yang, X. Xie, F. Zhang, G. Shi, Y. Qian, S.: Purification, characterization, and substrate specificity of two 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. R04, showing their distinct stability at various temperature, *Biochimie*, Vol. 90, 2008.
- 15) Taira, K. Hirose, J. Hayashida, S. Furukawa, K.: Analysis of bph operon from the Polychlorinated Biphenyl-degrading Strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, No.7, pp. 4844-4853, 1992.
- 16) Fei, X. Shuai, J. J. Peng, R. H. Tian, Y. S. Zhao, W. Yao, Q. H. Xiong, A. S.: Expression, purification and functional characterization of a recombinant 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous*, *Mol Biol.*, Vol. 38, No.7, pp. 4303-4308, 2011.
- 17) Maeda, M. Chung, S. Y. Song, E. Kudo, T.: Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, Isolated from a Termite Ecosystem, *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 61, No. 2, pp. 549-555, 1995.

(2015. 5. 22 受付)

Purification and degradation characteristics of Biphenyl degrading enzyme BphC from *Aquamicrobium* sp. SK-2

Hideto SUGAWARA¹, Daiki KOYAMA¹, Ken SAWADA², Young-Cheol CHANG¹, Shintaro KIKUCHI¹

¹Division of Sustainable and Environmental Engineering,
Muroran Institute of Technology

²Division of Production Systems Engineering, Muroran Institute of technology

In the present study, we purified the biphenyl-degrading enzyme 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase (BphC) from the bacteria *Aquamicrobium* sp. SK-2. The BphC was dimer and had molecular weight of 65 kDa. This enzyme showed activity at wide range of temperatures, and from a neutral to an alkali pH, it showed highest activity, at 30°C and pH 8, respectively. The BphC showed K_m (12.0 μ M) and V_{max} (154 mM/min) values with the substrate 2,3-dihydroxybiphenyl. This result indicated that the BphC had a relatively high affinity with the substrate 2,3-dihydroxybiphenyl. We analyzed the N-terminal amino acid sequence of the purified enzyme. Sequencing results denoted that the enzyme BphC from SK-2 had high homology (92%) with the enzyme of *Pseudomonas* sp. KKS102. Based on these results we concluded that BphC was involved in the ring-opening reactions of 2,3-dihydroxybiphenyl and catechol.