

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21858

研究課題名(和文)環境配慮型処理に向けた含窒素環境負荷毒性化合物分解メカニズムの解明

研究課題名(英文)Studies on mechanism for microbial degradation of a nitrogen-containing environmentally hazardous compound

研究代表者

橋本 義輝 (HASHIMOTO, Yoshiteru)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00323254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：アジ化物は猛毒性の物質であり、その多くが爆発性を有する。また、アジ化物の代謝(およびそれに関わる酵素および遺伝子)は未解明である。本研究では、アジ化物変換酵素がどのようにアジ化物を変換するか分子レベルで解析することを目的とする。
アジ化物変換酵素の大量発現系を構築し、本酵素の精製酵素標品の大量調製方法の確立に成功した。種々の解析から、アジ化物の変換触媒に大きく寄与する活性アミノ酸残基の特定に成功するなど、生物による猛毒性・爆発性を示す化合物の分解メカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、これ迄に報告例のないアジ化物分の分解に関わるアジ化物変換酵素について分解メカニズムを世界で初めて詳細に解析することに成功した。
著しいアジ化物変換能力をもつ新たな微生物の育種に成功したことで、将来的には、爆発処理などによらない環境に優しい方法で、環境負荷物質であるアジ化物を安全に分解し無毒化する新規廃棄物処理技術の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The N3 compounds composed of three nitrogen atoms joined together by double bond, are known to be extremely toxic and explosive. However, the metabolic pathway of N3 compounds has been unknown. We have isolated a microorganism that degrades an N3 compound from soil and discovered a novel enzyme involved in the N3 compound degradation.
Also, we constructed an overexpression system for the enzyme and established a method for the preparation of a large amount of the purified enzyme. Some properties of this enzyme, including the identification of the active amino acid residues that contribute significantly to the catalytic mechanism, were determined.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アジ化ナトリウムはヘモグロビンの鉄原子と強く結合し酸素運搬を妨げるため防腐剤などとして使用されてきたように、アジ化物は極めて毒性が高い化合物である。アジ化物は多方面で利用され多くの化合物が毒性や爆発性を有するが、処理技術が不十分である。一方、アジ化物は天然物としても存在することが見いだされている。しかし、アジ化物が如何にして生合成・生分解されるかといった自然界での物質循環についての報告は微生物を含めて全く無く、その代謝(およびそれに関わる酵素および遺伝子)は未解明であった。

我々は、炭素-窒素結合切断酵素、特に、ニトリル化合物がもつC≡N三重結合の変換・切断に関わる酵素(ニトリルヒドラターゼやニトリラーゼ)やC-N単結合を切断する酵素(アミダーゼ)、さらに、イソニトリル化合物がもつN≡C三重結合の変換に関わる酵素(イソニトリルヒドラターゼ)や、その分解産物N-置換ホルムアミドがもつN-C単結合を分解する酵素(N-置換ホルムアミドデフォルミラーゼ)の分子レベルでの解析研究を行ってきた。我々はこれらの炭素-窒素結合切断酵素研究をさらに発展させ、窒素-窒素結合(アジ化物)を分解する酵素も新たに対象として研究を進め、アジ化物分解菌を世界で初めて単離し、アジ化物代謝に関わる酵素の精製および諸性質の一部の解明などに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、毒性の高いアジ化物の代謝に関わる酵素(アジ化物変換酵素)の反応機構を分子レベルで詳細に解析することを目的としている。さらに、得られる情報を基に、環境負荷物質を効率よく低減・無害化あるいは有用物質に安全に変換する生物機能をもつ新たな微生物の育成についても検討する。

3. 研究の方法

(1) アジ化物変換酵素遺伝子のクローニングと大量発現系の構築

アジ化物分解菌からゲノムDNAを大量に抽出し、ドラフトゲノムDNA配列を決定した。アジ化物分解菌から精製した酵素標品を用いて決定したアジ化物変換酵素のN末端部分アミノ酸配列情報とドラフトゲノムDNA配列情報を基に、本酵素遺伝子を同定することに成功した。アジ化物変換酵素を大量発現させるべく、PCR増幅したアジ化物変換酵素遺伝子を、強力なプロモーター支配下に連結した発現プラスミドを構築した。大腸菌を宿主として、アジ化物変換酵素の大量発現系を構築した。

(2) アジ化物変換酵素の活性アミノ酸残基の同定

アジ化物変換酵素はこれ迄に報告例のない酵素であるため、反応機構は未知である。アジ化物変換酵素の触媒に関わるアミノ酸残基の情報を得るべく、本酵素の金属分析や本酵素に対する阻害実験を行った。

部位特異的変異法により変異アジ化物変換酵素発現プラスミドを構築し、大腸菌を宿主として大量発現後、変異酵素の精製酵素標品を調製し、変異酵素の諸性質を解析した。アジ化物変換酵素の活性測定は、株式会社島津製作所の高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)システムを用い、基質であるアジ化物の減少量あるいは産物増加量を定量することで行った。サンプルのタンパク質濃度はブラッドフォード法に従って測定した。

(3) アジ化物変換酵素の結晶化

高純度に精製したアジ化物変換酵素溶液に種々の沈殿剤を用いてハンギングドロップ法やシッティングドロップ法などにより、アジ化物変換酵素の結晶化を試みた。

(4) アジ化物変換酵素遺伝子破壊株の作成

アジ化物変換酵素の生理的役割を解明するため、アジ化物分解菌野生株からアジ化物変換酵素遺伝子を欠損させた遺伝子破壊株の作成を試みた。アジ化物分解菌が感受性を示す抗生物質耐性遺伝子をPCR増幅し、アジ化物変換酵素遺伝子上に挿入したDNA断片(アジ化物変換酵素遺伝子欠損DNA断片)を作成した。本DNA断片をアジ化物分解菌で複製しないプラスミドに連結し、遺伝子破壊株構築用プラスミドを構築した。本遺伝子破壊株構築用プラスミドでアジ化物分解菌を形質転換し、ダブルクロスオーバー相同組換え法により遺伝子破壊株の作成を試みた。また、PCR増幅したアジ化物変換酵素遺伝子欠損DNA断片でアジ化物分解菌を形質転換し、遺伝子破壊株の作成を試みた。

4. 研究成果

(1) アジ化物変換酵素遺伝子のクローニングと大量発現系の構築

アジ化物変換酵素の発現プラスミドを種々構築し、これらの発現プラスミドで、いくつかの発現用大腸菌を形質転換し、異種発現を行った。種々検討した結果、pET-24a(+)を用いてアジ化物変換酵素の発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21-Codonplus (DE3)-RIL 株を宿主として用い、培養液への IPTG の添加により可溶性画分にアジ化物変換酵素を誘導的に発現させることに成功した。

本酵素の精製条件についても種々検討し、硫酸アンモニウム分画、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、簡便なステップの精製酵素標品の大量調製方法の確立に成功した。本酵素の精製酵素標品の大量調製方法が確立できたことで、アジ化物変換酵素の金属分析や結晶化の検討が可能となった。

我々の単離したアジ化物分解菌はアジ化物を分解する能力を有しているが、その能力は高くない。本研究で構築したアジ化物変換酵素を誘導発現させた大腸菌は、アジ化物分解菌よりも著しく高いアジ化物分解活性をもつことを明らかにした。当該化合物分解能を大幅に向上させた微生物の育種に成功したことで、環境負荷物質であるアジ化物分を効率よく低減・無害化することが可能となった。

(2) アジ化物変換酵素の活性アミノ酸残基の同定

大量に調製したアジ化物変換酵素の精製標品を用いて金属分析を行った結果、本酵素は金属を含有しておらず、酵素活性に金属原子が不要であることを明らかにした。さらに、阻害実験結果より、特定のアミノ酸残基が触媒反応に大きく寄与すると示唆された。

部位特異的変異法により当該アミノ酸残基をそれぞれ他のアミノ酸に置換した変異アジ化物変換酵素遺伝子を PCR 増幅し、pET-24a(+)を用いて変異酵素発現プラスミドを構築した。野生酵素と同様に、大腸菌 BL21-Codonplus (DE3)-RIL 株を宿主として用い、培養液への IPTG の添加により変異酵素を可溶性画分に誘導発現させた。変異酵素についても野生酵素と同様の精製方法を用いて精製酵素標品を調製した。

調製した変異酵素精製標品を用いて円偏光二色性解析を行った結果、変異酵素は野生酵素と同様のスペクトルを示したことから、アミノ酸置換による変異導入は変異酵素の立体構造に変化を及ぼさないことが示唆された。変異酵素精製標品を用いてアジ化物変換酵素活性を測定した結果、活性が減少あるいは活性を示さない変異酵素があったことから、触媒反応に大きく寄与する活性アミノ酸残基の特定に成功した。

(3) アジ化物変換酵素の結晶化

アジ化物変換酵素およびその変異酵素に種々の平衡化溶液（沈殿剤や有機溶媒、高分子化合物溶液）を加えて母液とし、これと過剰量の平衡化溶液とを同一容器中に密封し、結晶化を試みた。いくつかの条件で細かい多数の結晶が得られたため、アジ化物変換酵素溶液や平衡化溶液の最適化を行った結果、X線結晶構造解析に十分な大きな結晶を得ることに成功した。

(4) アジ化物変換酵素遺伝子破壊株の作成

アジ化物変換酵素遺伝子を欠損させた遺伝子破壊株の作成するため、遺伝子破壊株構築用プラスミドを作成した。アジ化物変換酵素遺伝子に挿入する（アジ化物分解菌が感受性を示す）抗生物質耐性遺伝子や、アジ化物分解菌で複製しないプラスミドをそれぞれ検討し、種々の当該プラスミドを構築した。

まず、これらの遺伝子破壊株構築用プラスミドで形質転換した接合伝達用大腸菌をドナーとして、接合伝達によりアジ化物分解菌を形質転換した。複数の抗生物質耐性遺伝子を検討したが、いずれのプラスミドでもアジ化物分解菌の 1st シングルクロスオーバー株は得られなかった。次に、アジ化物変換酵素遺伝子欠損 DNA 断片のみを PCR で増幅・精製後、アジ化物分解菌をエレクトロポレーションにより形質転換を試みたが、ダブルクロスオーバー相同組換えを起こした遺伝子破壊株は得られなかった。

以上の結果より、アジ化物分解菌のもつ制限修飾系により形質転換頻度が低いことが原因と考えられた。そのため、アジ化物分解菌で複製するプラスミドを用い、制限修飾系の異なる大腸菌を形質転換後、それぞれからプラスミドを抽出した。これらの制限修飾系の異なるプラスミドにより同一条件でエレクトロポレーションを行い、アジ化物分解菌の形質転換頻度が最も高い制限修飾系の大腸菌を選抜した。本大腸菌から調製したプラスミドを用いてもアジ化物分解菌の形質転換頻度は低いため、アジ化物分解菌の形質転換体から調製したプラスミドを用いて、エレクトロポレーションの種々の条件検討を行い、最適形質転換条件を決定した。種々構築した種々の遺伝子破壊株構築用プラスミドを、アジ化物分解菌の形質転換頻度が最も高い制限修飾系の大腸菌にそれぞれ導入し、その形質転換体から調製したプラスミドを用いて最適形質転換条件でエレクトロポレーションを行った結果、1st シングルクロスオーバー株を取得した。今後は、本株を複数回継代培養し、ダブルクロスオーバー相同組換えを起こした遺伝子破壊株の構築を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------