

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658070

研究課題名(和文)新規N3化合物分解酵素の機能解明

研究課題名(英文)Characterization of an N3 compound-degrading enzyme

研究代表者

小林 達彦(KOBAYASHI, Michihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70221976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：N3化合物は、極めて猛毒性の高い物質であり、その多くが毒性や爆発性を有する。また、N3化合物の代謝(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、N3化合物を分解する酵素を分子レベルで解析することを目的とする。

N3化合物分解酵素は非常に不安定であったため、本酵素の安定化条件を検討したが、見つかっていない。そのためN3化合物分解菌を最適培養条件で何度も大量培養を行い、大量に調製した菌体からN3化合物分解酵素の精製を行った。精製標品を用いて、サブユニット構造、至適反応温度、温度安定性など本酵素の諸性質を一部、解明した。

研究成果の概要(英文)：The N3 compounds composed of three nitrogen atoms joined together by double bond (R-N3), are known to be extremely toxic and explosive. However, the metabolic pathway of N3 compounds has been unknown. We isolated a microorganism that degrades an N3 compound from soil and discovered a novel enzyme involved in the N3 compound metabolism. Also, we examined the culture conditions to increase enzyme production in the cells, and found the optimum culture condition. Because the enzyme was very unstable, we carried out the purification of the enzyme many times. As a result, the enzyme was purified to homogeneity, through several steps from a cell-free extract of the strain cultured under the optimum culture condition. Some properties of this enzyme were investigated, and its subunit structure, optimum temperature and thermal stability were determined.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 酵素 代謝 分解

1. 研究開始当初の背景

N₃化合物は、アジ化ナトリウム混入事件で知られるように、極めて猛毒性の高い物質である。N₃化合物は多方面で利用されている化合物ではあるが、その多くが毒性や爆発性を有する。一方、N₃化合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、それらが如何にして生合成・生分解されるかについての報告(微生物を含む)は無く、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、C≡N三重結合を切断する酵素(ニトリラーゼやニトリルヒドラーゼ)やC-N単結合を切断する酵素(アミダーゼ)の分子レベルでの解析研究を行っている。さらに、N≡C三重結合(イソニトリル)を切断する酵素(イソニトリルヒドラーゼ)や、その分解産物でありN-C単結合(N-置換ホルムアミド)を分解する酵素(N-置換ホルムアミドデフォルミラーゼ)についても研究を行っている。最近、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(N₃化合物)を分解する酵素も新たに対象として研究を進めている。

2. 研究の目的

本研究では、(N₃化合物を含む培地を用いて、液体培養と固体培養によって生育して)スクリーニングで既に得られているN₃化合物分解菌を対象とする。本菌から、N₃化合物分解酵素の精製と性質の解析、本酵素遺伝子の単離を行うことによって、タンパク質・遺伝子両レベルでN₃化合物代謝機構を詳細に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) N₃化合物分解酵素の精製と諸性質の解析

N₃化合物分解に関わる微生物・酵素の探索を行い、N₃化合物分解菌のスクリーニングに成功し、本菌からN₃化合物分解産物の一部を同定していた。さらに、様々な培養条件の検討を行い、本菌のN₃化合物分解酵素活性が高くなる最適培養条件(誘導剤を含む培地で3日間ほど振盪培養を行う)を確立していた。本条件で大量に培養し、(N₃化合物分解活性を測定しながら)各種クロマトグラフィー操作によって、SDS-PAGE上で単一バンドになるまでN₃化合物分解酵素を単離精製する。得られる精製酵素標品を用いて酵

素化学的諸性質を明らかにする。

(2) N₃化合物分解菌からのN₃化合物分解酵素遺伝子のクローニング

ショットガンクローニング法によるN₃化合物分解酵素遺伝子のクローニングを行った。まず、N₃化合物分解菌からゲノムDNAを調製し、このゲノムDNAを制限酵素により部分消化後、アガロースゲル電気泳動やショ糖密度勾配超遠心法により断片の大きさで分画し回収した。これら分画した断片を、(抗生物質耐性遺伝子を保持し、大腸菌で複製する)プラスミドに連結する。N₃化合物分解菌が生育可能なN₃化合物濃度で生育できない大腸菌株、すなわちN₃化合物に感受性を示す大腸菌株を宿主として、プラスミドと連結したN₃化合物分解菌のゲノムDNA断片を導入し、ゲノムDNAライブラリーを構築する。多数の抗生物質耐性株の中から、N₃化合物に耐性を示す大腸菌株を選択する。大腸菌株の「薬剤耐性 + N₃化合物耐性」の表現型は、N₃化合物分解に関与するタンパク質をコードする遺伝子断片が導入された大腸菌を意味する。本形質転換大腸菌株からプラスミドを抽出し、導入された断片の塩基配列を調べることで、N₃化合物分解酵素遺伝子の同定を行う。

4. 研究成果

(1) N₃化合物分解酵素の精製と諸性質の解析

N₃化合物分解酵素の活性測定は、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) LC-10ADvp システムを用い、基質であるN₃化合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。

以前確立していたN₃化合物分解酵素活性が高くなる最適培養条件で本菌を大量に培養した。培養液を遠心することにより集菌を行い、バッファーで2回洗浄後、同バッファーに懸濁した。株式会社久保田製作のINSONATOR 201Mを使用し、細胞懸濁液を超音波破碎機に供することで細胞を破碎した。破碎後、得られた画分を遠心し、上清を無細胞抽出液として調製した。

目的とするN₃化合物分解酵素の精製を行ったが、本酵素は非常に不安定であった。そこで、酵素活性に対するバッファーの検討や、安定化材や金属イオンの添加効果などを検討した。いくつかのバッファーで無細胞抽

出液を調製し活性測定を行ったが、いずれのバッファーでも本酵素の不安定さは改善されなかった。また、様々の金属イオンや安定化材をいくつかの濃度で添加し条件検討を行ったが、本酵素の安定化条件は見つからなかった。

そこで、N3化合物分解菌を以前確立していた最適培養条件で何度も大量培養を行い、本酵素の精製条件の検討を行った。無細胞抽出液を硫酸アンモニウムで分画し、疎水クロマトグラフィーに供した。バッファー中の硫酸アンモニウム濃度を減少させることでタンパク質を溶出させ、回収した画分についてN3化合物分解活性を測定し、活性の高い画分を混合した。混合した酵素液を透析膜(20φ)に移し、塩を含まないバッファーを外液として透析を行った。遠心後の上清をイオン交換クロマトグラフィーに供した。バッファー中の塩化カリウム濃度を増加させることでタンパク質を溶出させ、回収した画分の酵素活性を測定した。活性の高かった画分を限外ろ過に供して遠心し、さらに、0.15 M 塩化カリウムを含むバッファーを加えて遠心することにより、脱塩およびバッファー交換を行いながらタンパク質の濃縮を行った。濃縮した酵素液をゲルろ過クロマトグラフィーに添加し、280 nm の波長に吸収を示す画分を回収し、N3化合物分解活性を測定した。SDS-PAGE を行うことにより単一バンドにまでN3化合物分解酵素を精製したことを確認したが、本酵素の収量は非常に低かった。

得られた精製標品が非常に少量で、本酵素の諸性質を解明するには十分な量ではないため、本酵素遺伝子のクローニングに用いることにした。精製酵素を SDS-PAGE に供した後、ポリアクリルアミドゲルを PVDF 膜に 15 V 一定電圧で 90 分転写した。PVDF 膜をバッファーで洗浄、乾燥した後、N3化合物分解酵素のバンドを切り出して、アプライドバイオシステムズジャパン株式会社のアミノ酸シーケンサー Procise 492HT に供し、精製酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定することに成功した。しかし、決定した本酵素の内部部分アミノ酸配列では N3 化合物分解酵素遺伝子クローニング用のプライマーの作成が困難であった。

さらに、N3化合物分解菌を最適培養条件で何度も大量培養を行い、大量に調製した菌体から精製した N3 化合物分解酵素標品を用いて、サブユニット構造、至適反応温度、温度安定性など本酵素の諸性質を一部、解明した。

(2) N3化合物分解菌からのN3化合物分解酵素遺伝子のクローニング

N3化合物分解菌を培養し、MagExtractor-Genome-キット(東洋紡株式会社)を用いてN3化合物分解菌のゲノム DNA を抽出した。本ゲノム DNA を制限酵素 MboI で部分消化後、アガロースゲル電気泳動により 4-6 kb の部分消化断片を回収し、BamHI で切断したベクター pUC19 と T4 DNA ligase を用いて連結した。コンピテントセル法により N3 化合物分解菌が生育可能な N3 化合物濃度で生育できない大腸菌に導入した。N3 化合物分解菌のゲノム DNA 断片を意味する抗生物質耐性株は得られたが、目的とする (N3 化合物分解菌が生育可能な N3 化合物濃度で生育可能な) 大腸菌株は取得できなかった。

そこで、次に、N3化合物分解菌を大量に培養し、ゲノム DNA を大量に再調製した。さらに超遠心機を用いて N3 化合物分解菌のゲノム DNA を高度に精製した。

制限酵素 MboI により部分消化後したゲノム DNA をショ糖密度勾配超遠心法により断片の大ききで分画した。6-9 kb の部分消化断片を含む画分をアガロースゲル電気泳動により確認し、6-9 kb の部分消化断片を大量に回収した。BamHI で切断したベクター pHSG298 と T4 DNA ligase を用いて連結し、エレクトロポレーション法により、N3 化合物分解菌が生育可能な N3 化合物濃度で生育できない大腸菌に導入した。N3 化合物分解菌のゲノム DNA 断片を意味する抗生物質耐性株は得られたが、目的とする N3 化合物に耐性を示す形質転換株は残念ながら取得できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 達彦 (KOBAYASHI, MICHIIHIKO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70221916

(2) 研究分担者

熊野 匠人 (KUMANO, TAKUTO)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：70585025

(3) 連携研究者

なし