

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550057

研究課題名(和文) 含窒素環境負荷毒性化合物の分解代謝研究

研究課題名(英文) Studies on 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：極めて猛毒性の高いアジ化物の代謝は、それに関わる酵素および遺伝子も含め解明されていない。本研究では、アジ化物を分解する酵素および遺伝子を分子レベルで解析することを目的とする。アジ化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アジ化物分解酵素標品を用いて、基質特異性、至適pH、pH安定性など本酵素の諸性質を一部、解明した。さらに、精製標品を用いて、本酵素のN末端部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基に構造遺伝子全長をクローニングし、その塩基配列を決定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The azide compounds composed of three nitrogen atoms joined together by a double bond ($R-N=N=N$), are known to be extremely toxic and explosive. However, metabolic pathways of azide compounds have been unclear. We isolated a microorganism that degrades an azide compound from soil and discovered a novel enzyme involved in the metabolism of the azide compound.

Through several steps from a cell-free extract of the strain cultured under the optimum culture condition, we purified the azide compound-degrading enzyme to homogeneity. Some properties of this enzyme including substrate specificities, optimum pH and pH stability, were determined. Based on the N-terminal amino acid sequences of the purified enzyme, the structure gene coding for the enzyme was cloned.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 酵素

1. 研究開始当初の背景

アジ化物は、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。アジ化物は多方面で利用されている化合物であり、その多くが毒性や爆発性を有するが、それらの処理技術は十分とは言えない。一方、アジ化物は数少ないが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、それらがどのように生合成・生分解されるかについての報告は微生物を含めて無く、その代謝(およびそれに関わる酵素および遺伝子)は解明されていなかった。

我々は、炭素-窒素結合切断酵素、特に、 $C\equiv N$ 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ターゼ)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、 $N\equiv C$ 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ターゼ)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。最近では、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ている。

2. 研究の目的

本研究では、(アジ化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アジ化物分解菌を対象とする。本菌から、アジ化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・遺伝子両レベルでアジ化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) アジ化物分解酵素の精製と諸性質の解析

アジ化物分解に関わる微生物・酵素の探索を行い、既にアジ化物分解菌のスクリーニングに成功している。さらに、様々な培養条件の検討を行い、本菌のアジ化物分解酵素活性が高くなる最適培養条件を確立している。本条件で3日間ほど大量に培養し、(アジ化物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アジ化物分解酵素を単離精製することに成功し、精製できた極くわ

ずかなアジ化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、解明している。

精製酵素は失活しやすく非常に不安定であり、精製酵素の収率が著しく低い問題点が残っていた。そこで、様々な条件検討を行うことで、本酵素の安定化方法の確立を図るとともに、精製酵素標品を用いて本酵素の諸性質の解析を試みた。

(2) アジ化物分解菌からのアジ化物分解酵素遺伝子のクローニング

精製が完了したアジ化物分解酵素の N 末端および内部アミノ酸配列の決定を試みた。その情報を基にオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、アジ化物分解菌の染色体DNAを鋳型としてPCR法を用いて、本分解酵素構造遺伝子の部分断片のクローニングを試みた。また、この断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーション法により構造遺伝子全長をクローニングし塩基配列の決定を試みた。

4. 研究成果

(1) アジ化物分解酵素の精製と諸性質の解析

アジ化物分解酵素の活性測定は、株式会社島津製作所的高速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。

これまでに諸条件を検討し確立した最適培養条件でアジ化物分解菌を培養し、複数ステップのクロマトグラフィー操作によって、アジ化物分解酵素をSDS-PAGE上で単一バンドになるまで単離精製することに成功していたが、精製酵素は失活しやすく非常に不安定であり、精製酵素の収率も著しく低かった。

そこで、精製に用いるバッファーへの各種化合物の添加効果や、精製に用いるバッファーの変更など、様々な条件検討を行った。しかし、本酵素の安定化方法は確立できなかった。また、本酵素の精製条件の検討を行ったが、これまで確立した精製条件よりアジ化物分解酵素精製量の収率が上がる条件や、短期間で本酵素標品が精製できるより効果的な精製条件を見いだすことができなかった。

そのため、これまでに確立した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これまでに確立した精製方法によりアジ化物分解酵素の精製を行った。精製できた精製標品を用いて、基質特異性、至適pH、pH安定性など本酵素の諸性質を一部、解明した。

(2) アジ化物分解菌からのアジ化物分解酵

素遺伝子のクローニング

アジ化物分解菌を栄養培地で培養し、遠心して集菌後、菌体よりアジ化物分解菌の染色体 DNA を抽出した。染色体 DNA の抽出には MagExtractor -Genome- キット(東洋紡株式会社)を使用した。

精製酵素は失活しやすく非常に不安定であり、精製酵素の収率が著しく低いため、何度も最適培養条件下で大量培養を行い、大量に調製した菌体からアジ化物分解酵素の精製を行った。精製酵素標品を SDS-PAGE に供した後、ポリアクリルアミドゲルを PVDF 膜 (Sequi-Blot PVDF Membrane : 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社) に 15 V 一定電圧で 1.5 h 転写した。その後、PVDF 膜を洗浄、乾燥した後、アジ化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クエンサー Procise 492HT を使用して、アジ化物分解酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定することに成功した。

決定したアミノ酸配列情報を基にオリゴヌクレオチドプライマーを作成した。アジ化物分解菌の染色体 DNA を鋳型として PCR 反応を行った。増幅した PCR 産物のクローニングを pHSG298 を用いて行い、DNA sequencing Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いたジデオキシ法により、増幅した PCR 産物の全塩基配列を決定した。その結果、プライマー作成に利用していない精製酵素の N 末端アミノ酸配列へと翻訳される DNA 配列を確認したことから、本断片をアジ化物分解酵素遺伝子の部分配列と同定した。

一方、アジ化物分解菌の染色体 DNA を各種制限酵素で切断した。1%アガロースゲルで電気泳動で分離した後、変性溶液、中和溶液で処理し、ナイロン膜 (Hybond-N+ : GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社) に転写した。アジ化物分解酵素遺伝子の部分配列をプローブとして用い、AlkPhos Direct labeling and Detection System (GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、いくつかの制限酵素断片においてシグナルがみられた。

プローブに用いたアジ化物分解酵素遺伝子の部分配列の内部で切断せず、かつ、サザンハイブリダイゼーションで比較的小さい大きさにシグナルがみられた制限酵素を選択した。本制限酵素でアジ化物分解菌の染色体 DNA を切断し、アガロースゲル電気泳動で分離後、サザンハイブリダイゼーションでシグナルがみられた長さの DNA 断片を抽出し、ライゲーション反応 (セルフライゲーション) を行った。本反応液を鋳型として、アジ化物分解酵素遺伝子の部分配列の情報を基に作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてインバース PCR を行った。増幅した

PCR 産物を MagExtractor-PCR & Gel clean up-キット(東洋紡株式会社)で抽出・回収し、塩基配列を決定することで、アジ化物分解酵素の構造遺伝子全長の塩基配列を決定することに成功した。

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)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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 : 0 0 3 2 3 2 5 4

(2) 研究分担者

小林 達彦 (KOBAYASHI, Michihiko)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号 : 7 0 2 2 1 9 7 6

熊野 匠人 (KUMANO, Takuto)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号 : 7 0 5 8 5 0 2 5

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし