

## ニトリル化合物の微生物分解および環境浄化への応用

### Microbial degradation of nitrile compounds and its application to environmental purification

代表研究者 京都大学農学部助手

小林 達彦

Assist. Prof., Faculty of Agriculture, Kyoto Univ.

Michihiko KOBAYASHI

The peptides by cleavage of a *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase, which acts on nitriles, have been sequenced. The data allowed the design of oligonucleotide primers which were used to clone a nitrilase encoding gene polymerase chain reaction. A 750 base DNA fragment thus amplified was used as the probe to clone a 5.4-kb *Pst*I fragment coding for the whole nitrilase. The nitrilase gene modified in the sequence upstream of the presumed ATG start codon was expressed to about 50% of the total soluble protein in *Escherichia coli*, leading to the establishment of a simple purification of the nitrilase. The amino acid sequence homology between *Rhodococcus* nitrilase and the *Klebsiella ozaenae* bromoxynil nitrilase was 42.7%. The 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) modification of the nitrilase from *R. rhodochrous* J1 resulted in inactivation with the loss of one sulfhydryl group per enzyme subunit. Of four cysteine residues in the *Rhodococcus* nitrilase, only Cys-165 is conserved in the *Klebsiella* nitrilase. Mutant enzymes containing Alanine or Serine instead of Cys-165 did not exhibit nitrilase activity, clearly indicating that this cysteine residue is essential for the catalytic activity.

#### 研究目的

ニトリル化合物は、溶媒・プラスチック・合成樹脂・医薬そして産業的に重要な化学合成の出発物質として広く合成されている。Dichlobenil, Bromoxynil, Ioxynil, Buctril などのニトリル系除草剤も広く、小麦・大麦・とうもろこし・水田などで用いられている。生態系に必要以上に撒き散らされたニトリル化合物を含む産業廃水や残留農薬は環境汚染の大きな元凶と考えられ、それゆえ、ニトリル分解のタンパク質レベルおよび遺伝子レベルでの基礎的解析は、生物による環境浄化・改善に役立つものと期待される。本研究では、微生物におけるニトリル分解機構を遺伝子レベルで解明することを目的とした。

#### 研究経過

ニトリルの微生物による分解は二つの酵素系により進むことが知られている。ニトリラーゼはニトリルを直接、対応する酸とアンモニアに加水分

解し、一方、ニトリルヒドラーゼはニトリルを水和してアミドに変換する反応を触媒する。これまで筆者らは、土壌より分離した *Rhodococcus rhodochrous* J1 がニトリラーゼを生成することを明らかにし、本酵素を単離精製するとともに、その諸性質を明らかにしてきた。また本菌がニトリルヒドラーゼをも生成することを明らかにし、本遺伝子をクローン化し塩基配列を決定している。

#### 研究成果

##### (i) ニトリラーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

*R. rhodochrous* J1 からニトリラーゼを精製し、N 末端およびペプチターゼ消化による内部ペプチドのアミノ酸配列の情報をもとに 2 種類のプライマーを作製し、PCR 法により 750 bp の増幅断片を得た。さらに全長を得るために全 DNA に対して、PCR 増幅断片をプローブとしてサザン

ハイブリダイゼーションを行ったところ 5.4 kb のバンドが全 DNA の *Pst*I 消化物から検出された。このフラグメントを回収し pUC19 に挿入後、*E. coli* JM105 に導入しコロニーハイブリダイゼーションを行い、5.4 kb の *Pst*I 断片を含む pNJ10 を得た。塩基配列決定の結果、メチオニンで始まり TGA コドンで終わる 366 アミノ酸を含むオープンリーディングフレームが存在し、これは精製ニトリラーゼより決定されたアミノ酸配列と完全に一致する配列を含んでいた。塩基配列から予想されるアミノ酸組成は精製酵素の化学的分析により得られたものと類似しており、計算された分子量も SDS-PAGE の結果とよく一致していた。開始コドン上流 8 bp に典型的な SD 配列が存在し、強力なヘアピン構造 ( $\Delta G = -44.6$  kcal/mol) がニトリラーゼ遺伝子の終止コドンのすぐ下流に位置していた。

*R. rhodochrous* J1 ニトリラーゼのアミノ酸配列を *K. ozaenae* のニトリラーゼのそれと比較したところ 42.7% の相同性が認められた。*K. ozaenae* のニトリラーゼは、二つのメタ位にハロゲン原子のついたベンゾニトリル誘導体に特異的に作用し、*R. rhodochrous* J1 ニトリラーゼの良好な基質であるベンゾニトリルには全く作用しないことから、両ニトリラーゼ間のアミノ酸配列の小さな差異が基質特異性における大きな差異をもたらしていると考えられる。

#### (ii) *E. coli* でのニトリラーゼの大量生産と精製

*E. coli* JM105 でニトリラーゼを大量生産するため、PCR 法で開始コドン上流の SD 配列を改良したニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミド pNJ20 を構築した。pNJ20 をもつ *E. coli* を IPTG の存在下で培養するとニトリラーゼ活性が無細胞抽出液の遠心上清に認められたが、沈殿には認められなかった。上清のニトリラーゼの最大活性は 8.04 U/mg に達し、この値は親株の精製酵素の比活性の 50.6% に相当した。したがって無細胞抽出液を硫酸分画および Cellulofine-GCL2000 カラムのわずか 2 ステップで単一バンドにまで精製することが可能となった。この組み

換え体酵素と親株由来の精製酵素とは、比活性、分子量などの物理化学的性質などの点で変化は認められなかった。

#### (iii) ニトリラーゼの活性システイン残基の同定

*R. rhodochrous* J1 ニトリラーゼは SH 試薬により阻害を受け、それゆえスルフヒドリル酵素に分類される。本精製酵素を 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB) と 10 min, 0°C で反応させると活性が 92.2% 失われる。8 M 尿素の存在下、2 h 0°C で本酵素を DTNB と反応させるとサブユニット当たり 3.82 mol の TNB が検出された。アミノ酸組成と塩基配列の解析から、本酵素サブユニットは 4 個のシステインを含有しており、上記の結果と考え合わせると各サブユニットは四つのフリーのシステイン残基を含みジスルフィド結合は持たないことが判明した。次に酵素を尿素の非存在下で DTNB と反応させるとサブユニット 1 mol が DTNB 1 mol と反応した時完全に失活した。ところで本ニトリラーゼは 4 個のシステイン残基を含んでおり、これらのシステイン残基のうち Cys165 だけが *K. ozaenae* の対応する位置に保存されている。しかもこのシステインの周辺は高い相同性があり、両ニトリラーゼ間の全アミノ酸配列を比較すると、かなりの構造的な類似性があるものと考えられた。そこで Cys165 がニトリラーゼ活性に必須かどうか決定するためにこの残基を部位特異的変異法により置換した。

Cys165 を Ala あるいは Ser に置換した二つの変異遺伝子を作製し、*E. coli* JM105 で発現させた結果、共に SDS-PAGE 上で野生型酵素遺伝子と同様の発現量を示した。両変異酵素を SDS-PAGE で単一になるまで精製し、野生型酵素と免疫化学的に区別できないことを確認した。円二色性スペクトルや分子量も野生型酵素と同一であった。このことは Cys165 を Ser や Ala に置換しても酵素タンパク質の全体的な立体構造には変化がないことを示している。野生型酵素がベンゾニトリルを安息香酸に 25°C, 5 min で変換するのに対し変異酵素は 24 h の反応でも安息香酸は検

出できなかった。つまり、変異酵素の比活性は、Cys165をAlaあるいはSerに換えることで検出限界以下となり、Cys165が酵素の触媒活性に必須であることが初めて明らかとなった。

#### 今後の課題と発展

筆者は、上記の成果以外に、ニトリル系除草剤分解微生物の分離にも成功しており、現在、その分解機構を酵素レベルで解明している。また *R. rhodochrous* J1を始め、他のニトリル分解菌を用いて、アクリロニトリルおよびアジポニトリルを

ターゲット化合物として、連続曝気培養を行い、これらのニトリルが分解代謝されることを認めており、今後さらにニトリル含有排水処理に関する応用研究を進めていく必要があると考えている。

#### 発表論文リスト

- 1) M. Kobayashi, H. Komeda, N. Yanaka, T. Nagasawa and H. Yamada: Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1: Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *J. Biol. Chem.*, 267, 20746-20751 (1992).