

環境上有害な有機化合物の酵素による微量分析ならびに分解除去に関する研究

Studies on enzymatic microanalysis and degradation of environmental harmful organic compounds

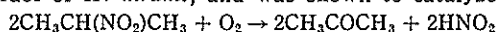
代表研究者 京都大学化学研究所助教授 左右田 健次
Assoc. Prof., Inst. for Chem. Res., Kyoto Univ. Kenji SODA

協同研究者 京都大学化学研究所技官 平沢 敏子
Res. Assis., Inst. for Chem. Res., Kyoto Univ. Toshiko HIRASAWA

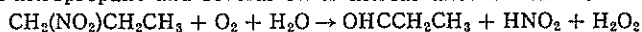
京都薬科大学薬学部助教授 田中英彦
Assoc. Prof., Kyoto College of Pharmacy Hidehiko TANAKA

高知大学農学部助教授 味園 春雄
Assoc. Prof., Dept. Agric. Chem., Kochi Univ. Haruo MISONO

Nitroalkanes-decomposing microorganisms were screened by comparing growth in the medium containing nitroethane as a sole nitrogen source. Of the 66 microbial strains tested, 30 failed to grow, 11 grew slightly and moderately utilized nitroethane. Six strains of yeasts (*e.g.*, *Endomyces fibuliger*), 3 fungal strains (*e.g.*, *Penicillium notatum*) grew well in the medium. The following 3 strains of yeasts and one fungal strain were most active in assimilating nitroethane: *Hansenula mrakii*, *H. beijerinckii*, *Candida utilis* and *Penicillium chrysogenum*. A nitroalkane-oxidizing enzyme was purified to homogeneity from a cell-free extract of *H. mrakii*, and was shown to catalyze the following reaction.



The enzyme (2-nitropropane dioxygenase) oxidatively decomposes also 1-nitropropane, nitroethane, 3-nitro-2-pentanol and several other nitroalkanes, and contains FAD as a prosthetic group. O_2^- is generated in the reaction and participates in the oxygenation of 2-nitropropane. Another nitroalkane-oxidizing enzyme was purified to homogeneity from *Fusarium oxysporum*. This enzyme (nitroalkane oxidase) catalyzes the oxidative denitrification of 1-nitropropane and several other nitroalkanes as follows.



In addition to 1-nitropropane, 3-nitro-2-pentanol, 2-nitropropane, and nitrocyclohexane are good substrates. The enzyme has a molecular weight of about 185,000 and contains FAD as a cofactor. O_2^- is not generated in this enzyme reaction. Various nitroalkanes are decomposed efficiently by both the enzymes, and also are determined specifically by measuring one of the products formed enzymatically.

The nitroalkane oxidase was immobilized by photo-crosslinking resin method, and used to analyze nitroethane, 1-nitropropane, 2-nitropropane, nitrocyclohexane and some other nitroalkanes with success.

Several strains of actinomycetes (*e.g.*, *Mycobacterium abium*, *Nocardia gardneri* and *Streptomyces aureus*) grew well on a medium containing ethylamine as a sole nitrogen source, and oxidatively deaminated alkylamines to the corresponding carbonyl compounds.

The cells of several bacterial strains such as *Escherichia coli*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus leicheniformis*, *Corynebacterium sepeidonicum*, *Pseudomonas striata* and *Arthrobacter atrocyaneus* decomposed efficiently diethyldisulfide added to the growth medium as a sole carbon sources.

Organic halogen-containing compounds were found to be decomposed effectively by cells

of bacteria isolated from soil, one of which was identified as *Pseudomonas* sp. 2-Chloro-propionate was dehalogenated enzymatically to lactate.

研究目的

高度に工業化された現代の社会において、産業廃棄物などに由来する諸種の有害化合物が環境に蓄積して人類の生存に多大の影響を与えつつあることは周知の事実である。環境上有害な物質のうち、特に有機態の化合物は突然変異源性、発がん性、慢性中毒性など生物に重大な作用を及ぼすが、一方、その種類や構造は極めて複雑で多岐にわたっている。これらの実態を把握するためには

正確にして簡便な分析法の確立が必要であり、その上に立って高能率にして省エネルギー的な処理法が開発されなければならない。

本研究はニトロ化合物、硫黄化合物、アミン化合物をはじめとする環境上有害な有機化合物を対象にして、酵素のもつ高い基質特異性を利用し、特別の分離操作なしに選択的に分析を行なってその構造、性質、濃度を知るとともに、酵素のもつ高い触媒能を利用して有害物質の分解除去の方法

Table 1. Microbial growth on nitroethane

Group	Growth	Microorganisms
I	0	<i>Achromobacter polymorph</i> ICR 0880, <i>Achromobacter liquidum</i> IFO 3084, <i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3525, <i>Micrococcus flavus</i> IFO 3242, <i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458, <i>Pseudomonas marginalis</i> IFO 3925, <i>Pseudomonas taetrolens</i> IFO 3460, <i>Brevibacterium linens</i> IFO 12141, <i>Mycobacterium phlei</i> IFO 3158, <i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849, <i>Proteus morganii</i> IFO 3848, <i>Saccharomyces fragilis</i> IFO 0288, <i>Saccharomyces logos</i> IFO 0278, <i>Saccharomyces marxianus</i> IFO 0277, <i>Endomyces hordei</i> IFO 0140, <i>Endomyces lindncri</i> IFO 0106, <i>Zygosaccharomyces soya</i> IFO 0495, <i>Rhodotorula marina</i> IFO 0879, <i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 0389, <i>Rhodotorula texensis</i> IFO 0932, <i>Lipomyces starkeyi</i> IFO 0678, <i>Mucor racemosus</i> IFO 4581, <i>Mucor mucedo</i> IFO 5776, <i>Mucor fragilis</i> IFO 6449, <i>Rhizopus japonicus</i> IFO 4758, <i>Rhizopus usanii</i> IFO 5440, <i>Monascus anka</i> IAM 8001, <i>Monascus purpureus</i> IFO 8010, <i>Oospora viscosa</i> IFO 4604, <i>Gibberella fujikuroi</i> IFO 6356
II	~0.12 ~1 g	<i>Escherichia coli</i> ICR 0010, <i>Sarcina aurantiaca</i> IFO 3064, <i>Brevibacterium protophormiae</i> IFO 12128, <i>Serratia marcescens</i> IFO 3046, <i>Flavobacterium aquatile</i> IFO 3772, <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3022, <i>Hansenula suavelens</i> IFO 0992, <i>Rhodotorula rubra</i> IFO 0932, <i>Aspergillus niger</i> IFO 3304, <i>Penicillium purpurogenum</i> ICR 3402, <i>Neurospora crassa</i> IFO 6068
III	0.13~0.25 1.1~4.0 g	<i>Sarcina lutea</i> IAM 1009, <i>Corynebacterium sepedonicum</i> IFO 3306, <i>Pseudomonas iodinum</i> IFO 3558, <i>Aerobacter aerogenes</i> IFO 3320, <i>Hansenula anomala</i> IFO 0118, <i>Hansenula octospora</i> IFO 0145, <i>Hansenula petersolnii</i> IFO 1337, <i>Hansenula matritensis</i> IFO 0954, <i>Rhizopus oryzae</i> ICR 3101, <i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>globosus</i> ICR 3311, <i>Aspergillus niger</i> IFO 4416, <i>Fusarium oxysporum</i> IFO 5942
IV	0.26~0.40 4.1~6.0 g	<i>Hansenula miso</i> IFO 0146, <i>Hansenula silvicola</i> IFO 0807, <i>Hansenula fabianii</i> IFO 1371, <i>Endomyces fibuliger</i> IFO 0103, <i>Debaryomyces japonicus</i> IFO 0039, <i>Rhodotorula lactosa</i> IFO 1006, <i>Rhizopus batatas</i> ICR 3104, <i>Penicillium oxalicum</i> IFO 5748, <i>Penicillium notatum</i> IFO 4640
V	0.41~ 6.1 g~	<i>Hansenula mrakii</i> IFO 0895, <i>Hansenula beijerinckii</i> IFO 0891, <i>Candida utilis</i> IFO 0396, <i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 4897

Bacterial and yeast growth is shown in terms of turbidity. *Endomyces fibuliger* and fungal growth is expressed as wet weight of mycelia.

を開発することを主な目的としている。さらに、微生物細胞、その物の利用や酵素の固定化を行なって実用化の可能性を高める。

研究経過と成果

I. ニトロアルカンの微生物分解とその酵素化学並びに酵素的定量

(1) 微生物によるニトロアルカン分解資化

ニトロエタンを単一窒素源としたグリセリン培地を用いて好氣的にニトロエタンを資化する微生物のスクリーニングを行なった。その分解資化性によって供試微生物は次の5群に大別される (Table 1)。供試菌株のうち、約半数がニトロエタン分解能を示した。一般にバクテリアは比較的低い資化性しか示さない。数株の酵母とカビが高い分解能を示し、なかでも *Hansenula* 属酵母は分解速度が高いが、*Saccharomyces* 属、*Zygosaccharomyces* 属酵母ではニトロエタン資化性は認められない。

(2) ニトロエタン資化菌株による 1-ニトロプロパン、2-ニトロプロパンの分解と酵素反応による亜硝酸の生成

高いニトロエタン分解能を示す微生物を 1-ニトロプロパンおよび 2-ニトロプロパン含有ペプトン-グリセリン培地に生育させ資化性を調べた。2-ニトロプロパンは *Sarcina lutea*, *Brevibacterium protophormiae*, *Hansenula mrakii*, *Rhizopus batatas* 以外のすべての菌株の生育を阻害した。一方、大部分の供試微生物は 1-ニトロプロパン含有培地で良好な生育をしたが、*Hansenula suaveolens*, *Hansenula matritensis* は生育が完全に阻害された。

微生物がニトロアルカン含有培地に生育した場合にはいずれも培地中に亜硝酸の生成が認められた。*Hansenula mrakii* のニトロエタン、1-ニトロプロパン、および 2-ニトロプロパン培地上での生育と亜硝酸の蓄積を調べた (Fig. 1)。本菌はニトロエタン培地で最も速く生育し、その生育誘導期は 7 時間であるが、他の培地では約 10 時間であった。亜硝酸の蓄積は本菌の生育が対数増殖期に入ってから開始され、その後、増殖の進行とともに増加する。細胞増殖が最高に達すると亜硝酸

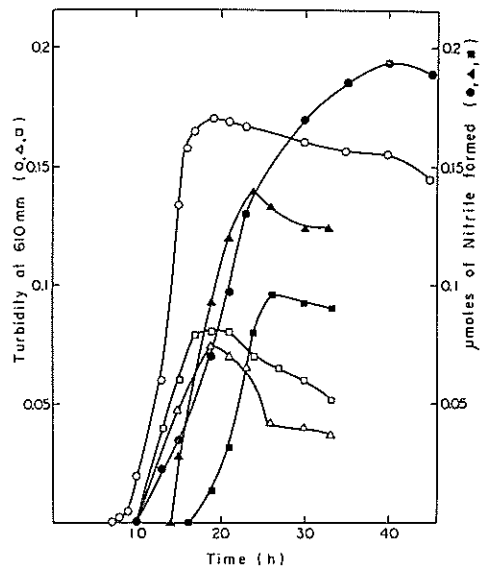


Fig. 1. Time course of growth and nitrite formation (*H. mrakii*).

○, growth on nitroethane; □, growth on 1-nitropropane; △, growth on 2-nitropropane; ●, nitrite formed from nitroethane ($\mu\text{moles/ml}$ of culture fluids); ■, nitrite formed from 1-nitropropane ($\mu\text{moles/ml}$ of culture fluids); ▲, nitrite formed from 2-nitropropane ($\mu\text{moles/ml}$ of culture fluids).

量は減少する。これらはおそらくニトロアルカンから代謝産物 (亜硝酸など) によって亜硝酸分解酵素が誘導されることを示している。ニトロアルカン培地に生育した各種細胞の抽出液を用いてニトロアルカンからの亜硝酸の生成を調べた。嫌気的条件下では亜硝酸の生成は認められないが、好気的条件下では上記 3 種のニトロアルカンはいずれも酸化的に分解されて亜硝酸を生成した。

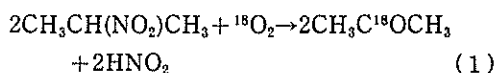
(3) *Hansenula mrakii* の 2-ニトロプロパンジオキシゲナーゼ

高い資化性を示す酵母 *Hansenula mrakii* よりニトロアルカン酸化酵素を単離し、2-ニトロプロパンの分解反応を調べたところ、反応生成物として亜硝酸以外にアセトンが同定された。化学量論的關係から本酵素は次の (1) の反応を触媒することが明らかになった。さらに $^{18}\text{O}_2$ 中での酵素反応の結果、分子状酸素が基質に取り込まれることが証明された。

Table 2. Purification of nitroalkane-oxidizing enzyme^{a)}

Steps	Total vol (ml)	Total activity (units)	Protein (g)	Sp act	Yield (%)
1. Cell extract	8,300	34.7×10 ⁵	310	12.0	100
2. Ammonium sulfate fractionation (60-90% saturation)	1,000	32.2×10 ⁵	64	56.0	92.8
3. DEAE-cellulose chromatography	115	27.0×10 ⁵	2.4	900	77.8
4. Hydroxyapatite chromatography	7	21.8×10 ⁵	0.65	2,300	63.4
5. Bio-Gel P-150 chromatography	5	7.6×10 ⁵	0.07	15,500	21.9

^{a)} 2-Nitropropane was used as a substrate.



つまり本酵素は分子状酸素の2原子の酸素が2分子の受容体基質に取り込まれる新しいタイプの分子間2原子酸素添加酵素反応を触媒し、2-ニトロプロパンジオキシゲナーゼと命名された。

本酵素は Table 2 に示すような方法で約 130 倍に精製され、精製酵素は超遠心分析、ディスク電気泳動によって均一性が証明された。本酵素は分子量が約 40,000 のモノマーであり、補欠分子族としては1モルの FAD を含有している。その吸収スペクトルは 274, 370, 440 nm に吸収極大

を、470 nm に吸収の肩を示し、結合 FAD は嫌気的条件下で 2-ニトロプロパンによって還元される。本酵素の基質特異性は Table 3 に示されるように 2-ニトロプロパン以外にニトロエタン、1-ニトロプロパンなどが酸化分解をうけて、亜硝酸と対応するカルボニルに変化する。

これらのニトロアルカン酸化反応は HgCl₂ のような SH 阻害剤によって阻害されるとともに、チロン、オキシシン、システインのようなスーパーオキシドスカベンジャー (Table 4) やスーパー

Table 3. Substrate specificity of 2-nitropropane dioxygenase

Nitro compounds	Relative activity ^{a)}
2-Nitropropane	100
Nitroethane	88.7
3-Nitro-2-pentanol	40.6
1-Nitropropane	23.4
3-Nitro-2-butanol	13.8
3-Nitropropionate	11.7
2-Nitro-1-butanol	2.7
Nitromethane	0

^{a)} Relative activities were calculated from the values obtained at the following optimum pH for each substrate. 2-Nitropropane, 3-nitro-2-pentanol, 1-nitropropane, 3-nitro-2-butanol, and 2-nitro-1-butanol (pH 8.0); 3-nitropropionate (pH 7.5); and nitroethane (pH 7.0). When nitromethane was used, the activity was determined at pH 7.0, 7.5, and 8.0.

Table 4. Effect of inhibitors

The standard reaction mixture was used except that the mixture contained an inhibitor listed. The concentration of inhibitors was 1 mM. The reaction was started by the addition of enzyme.

Addition	Relative activity
None	100
Tiron	0
Oxine	17.5
EDTA	87.0
TPTZ	111.1
α, α' -Dipyridyl	128.3
O-Phenanthroline	126.9
Cysteine	0
2-Mercaptoethanol	28.2
Glutathione	0
NaHSO ₃	15.1
β -Chloromercuribenzoate	63.0
N-Ethylmaleimide	62.0
Iodoacetate	92.2
HgCl ₂	2.2

Table 5. Purification of nitroalkane oxidase

Step	Total vol (ml)	Total activity (units)	Protein (g)	Sp act	Yield (%)
(i) Mycelium extract	810	26.2×10 ³	1.62	16.2	100
(ii) Ammonium sulfate fractionation (30-60% saturation)	86	15.9×10 ³	0.30	52.4	65.7
(iii) Diethylaminoethyl-cellulose chromatography	55	11.7×10 ³	0.078	149	44.7
(iv) Hydroxyapatite chromatography	2.5	7.59×10 ³	0.025	310	29.0
(v) Sephadex G-200 chromatography	10	5.37×10 ³	0.013	460	20.4

オキシドデヒスルターゼによって著しい阻害を受ける。NADH や NADPH によっても阻害を受け、反応中に O₂⁻ が中間体として生成し、基質の酸素添加に重要な役割を果たしていることが証明された。

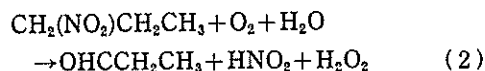
(4) *Hansenula mrakii* の固定化菌体によるニトロアルカンの分解

Hansenula mrakii の凍結乾燥または生細胞 (湿量, 1 g) をアクリルアミド (750 mg) *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (40 mg), 5% β-ジメチルアミノプロピオンニトリル (0.5 ml), 2.5% K₂S₂O₈ (0.5 ml) と pH 7.5 で処理し、生成したゲルを破碎してから 2-ニトロプロパンの分解能を調べた。乾燥菌体による分解能が最も高く、以下乾燥-固定化菌体、固定化生細胞、生細胞の

順であったが、分解能の持続性は乾燥-固定化菌体が最高で、1 週間の連続使用でも活性の低下はわずかであり、ニトロアルカンの分解処理の実用的な可能性が示された。

(5) *Fusarium oxysporum* のニトロアルカンオキシダーゼ

不完全菌, *Fusarium oxysporum* もニトロエタンをはじめとする各種ニトロアルカンを好氣的条件下で能率良く分解資化する。ニトロエタン培地で誘導生成させたニトロアルカン酸化酵素を本菌の菌糸より抽出し、Table 5 に示すような方法で約 30 倍に精製した。精製酵素は超遠心分析、ディスク電気泳動によって均一性が証明された。化学量論的研究から本酵素は (2) 式のように 1-ニトロプロパンなどを酸化してカルボニル、亜硝酸、過酸化水素を生成する反応を触媒し、ニトロアルカンオキシダーゼと命名された。本酵素の基質特異性は Table 6 に示してあるように、



1-ニトロプロパン以外に 3-ニトロ-2-ペンタノール、ニトロシクロヘキサン、2-ニトロプロパンなど広い範囲の脂肪族ニトロ化合物に作用する。その分子量は約 185,000 で同一のサブユニット (分子量, 47,000) 4 個から構成される。補酵素としては比較的結合の弱い FAD を含む。本酵素反応においてはスーパーオキシドラジカルの生成は認められない。

(6) ニトロアルカンオキシダーゼによるニトロアルカンの定量

本酵素は基質に対する *K_m* 値が 1.54 mM (1-ニトロプロパン) と比較的 low, 3 種の反応生成

Table 6. Substrate specificity of nitroalkane oxidase^{a)}

Nitroalkanes	Relative activity
1-Nitropropane	100
2-Nitropropane	96.9
Nitroethane	51.8
Nitromethane	7.3
2-Nitroethanol	8.4
3-Nitro-1-butanol	15.7
3-Nitro-2-butanol	6.5
3-Nitro-2-pentanol	116
3-Nitropropionate	0.5
Nitrocyclohexane	99.8

^{a)} The reaction mixture consisted of 50 μmol of the substrates, 0.1 μmol of FAD (0.01 μmol for 2-nitropropane), 200 μmol of Tris-hydrochloride buffer (pH 8.0), and enzyme in a final volume of 1.0 ml. The activity was assayed by determining nitrite formed.

物のいずれを測ることによってもニトロアルカンを定量することができる。

(6)-a. 亜硝酸による方法

各種ニトロアルカン (0.0-0.1 μmol), トリス緩衝液 (pH 8.0), FAD (0.01 μmol), ニトロアルカンオキシダーゼ (50 単位) を含む反応液 (1.0 ml) を 37°C で 60 分間反応後, 25% 三塩化酢酸 0.1 ml を添加し遠心分離する。上澄み液 0.6 ml, 水 0.4 ml, 1% スルファニルアミド 0.2 ml, 0.02% *N*-(1-ナフチル) エチレンジアミン・

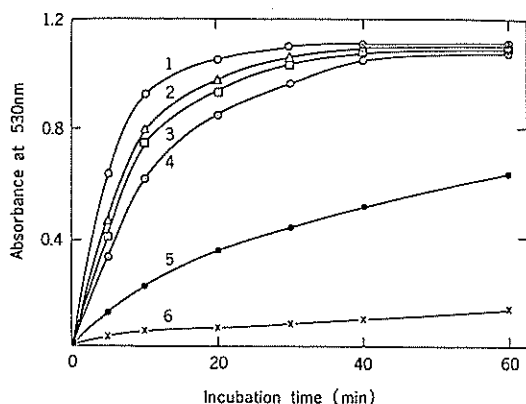


Fig. 2. Time course of formation of nitrite from nitroalkanes. The reactions were carried out as described in Method A with 0.05 μmol of 1-nitropropane (1, \circ), 3-nitro-2-pentanol (2, \triangle), nitrocyclohexane (3, \square), 2-nitropropane (4, \odot), nitroethane (5, \bullet), or nitromethane (6, \times).

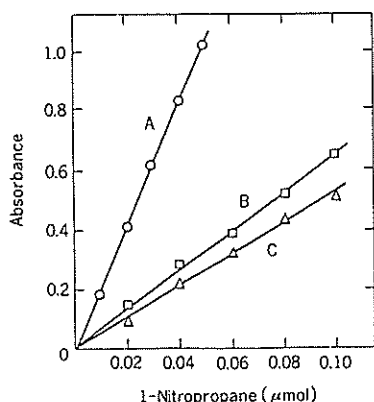


Fig. 3. Calibration curves for 1-nitropropane with Methods A (\circ), B (\square), and C (\triangle).

2 HCl 0.2 ml を含む反応混液を室温で 10 分間反応後, 530 nm の吸光度を測定した。Fig. 2 のようにこの条件下で 1-ニトロプロパン, 3-ニトロ-2-ペンタノール, ニトロシクロヘキサン, 2-ニトロプロパンの 4 種は最大値の吸光度を示す。ニトロエタンの場合は約 2.5 倍量の酵素を必要とし, ニトロメタンは数倍の酵素量を必要とする。1-ニトロプロパンは 0.005-0.05 μmol の範囲で吸光度に対して直線関係が得られた (Fig. 3-A)。

(6)-b. カルボニルの定量による方法

(6)-a. の酵素反応停止後の上澄み液 0.6 ml に酢酸緩衝液 (pH 5.0, 200 μmol), 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン (1 μmol) を加えた反応液 (1.0 ml) を 50°C で 30 分間反応させ, 310 nm の吸光度を測定する。Fig. 3-B のように 0.01-0.1 μmol の範囲で吸光度と直線関係が得られた。

(6)-c. 過酸化水素の定量による方法

トリス緩衝液 (pH 8.0, 200 μmol), FAD (0.01 μmol), ジメチルアニリン (3.3 μmol), 4-アミノアンチピリン (1.5 μmol), ペルオキシダーゼ (20 単位), ニトロアルカンオキシダーゼ (50 単位), ニトロアルカンを含む反応液 (1.0 ml) を 37°C で 60 分間反応させた後, 565 nm の吸光度を測定する。その結果, Fig. 3-C に示されるように 0.01-0.1 μmol の範囲で吸光度と直線関係が得られた。

(6)-d. 妨害物質の影響

(6)-a. の方法に基づく 1-ニトロプロパン定量に及ぼすいろいろな化合物の影響を調べた (Table 7)。1-ニトロプロパンから生成するプロピオンアルデヒド, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} などは妨害作用を示す。シアン化物や HgCl_2 , *N*-エチルマレイミドなどのチオール試薬は強い阻害効果を示す。一方, アミノ酸, 糖, ケレート試薬, チオール化合物, 芳香族ニトロ化合物は影響を与えない。妨害金属イオンはケレート試薬の添加, またチオール試薬はチオール化合物の添加で妨害作用を除去し得る。このように本酵素を用いるニトロアルカンの定量法は比較的感度が高く, 特に分離操作を行なうことなく各種のニトロアルカンに分

Table 7. Effect of various compounds on nitroalkane determination

Compounds	Concentration (mM)	Relative absorbance ^{a)}
None		100
L-Alanine	5	98
L-Glutamate	5	100
L-Lysine	5	100
MgCl ₂	5	100
NaCl	5	100
Glucose	5	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	98
CuSO ₄	5	65
FeSO ₄	5	37
FeCl ₃	5	54
NH ₄ NO ₃	5	100
Acetaldehyde	5	98
Propionaldehyde	5	63
NADH	5	100
NADPH	5	100
HgCl ₂	0.1	0
KCN	1	7
5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoate)	1	29
p-Chloromercuribenzoate	0.1	0
N-Ethylmaleimide	1	4
L-Cysteine	5	100
2-Mercaptoethanol	5	100
Ethylenediamine-tetraacetate	5	100
Pyrocatechol-3, 5-disulfonate	5	100
Epinephrine	5	100
o-Nitrobenzoate	5	100
p-Nitrobenzoate	5	100

^{a)} The reaction mixture (Method A) containing 0.05 μmol of 1-nitropropane was incubated in the presence of the compounds listed.

析できるだけでなく、妨害化合物への配慮をすれば廃液、生体試料中のニトロアルカンの定量も十分可能である。

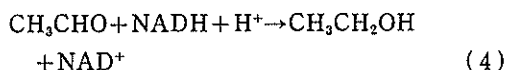
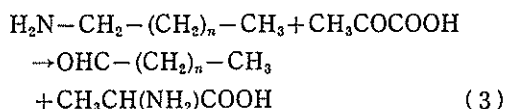
II. アミンの酵素的定量と微生物分解

アミンはそれ自体の毒性とともに、しばしば亜硝酸との反応によるニトロソアミン生成など間接的にも環境上、重要な化合物である。

(1) 細菌 ω-アミノ酸-ピルビン酸トランスアミナーゼによるアミンの定量

我々が先に *Pseudomonas* sp. F-126 に存在を見いだし、精製結晶化した ω-アミノ酸-ピルビン

酸トランスアミナーゼ (*FEBS Lett.*, 71, 21 (1976), *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1701 (1977)) の触媒能を利用してアルキルアミンを (3) 式のようにアルデヒドに転換し、これをアルコール脱水素酵素による (4) 式の (エチルアミンの例) の反応と共役させ、NADH の減少を 340 nm の吸収減少により追跡する方法を確立した。



このような反応終点測定法とともに、(3) (4) の両反応を一つの系で行なって、基質アミン量に酵素反応の速度が依存することを利用して5分間の 340 nm における吸光度変化をエチルアミン量に対しプロットすると、Fig. 4 のように 0.1-1.0 μmol の範囲で直線性が得られた。

(2) 放線菌アミン酸化酵素によるアミンの分解と定量

Mycobacterium abium や *Streptomyces* などの放線菌はアルキルアミンを酸化的に分解してアンモニアと相当するカルボニルを生成することを

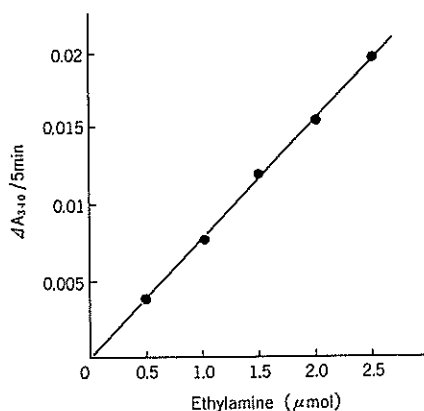
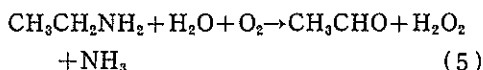


Fig. 4. Calibration curve for ethylamine
The reaction mixture contained 20 μmol of sodium pyruvate, 100 μmol of potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 μmol of NADH, 1 mg of ω-amino acid-pyruvate transaminase, 0.1 mg of alcohol dehydrogenase in a final volume of 1.0 ml. The reaction was performed at 25°C.

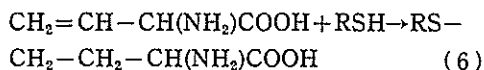
見いだした。この酸化分解反応は各種のアルキルアミンについて高能率で起こるので固定化菌体の利用によってアミンの分解処理に利用できる。*Mycobacterium abium* より単離したアミノキシダーゼは (5) 式のような一連の酸化反応を触媒する。本反応を利用してエチルアミンより生成するアセトアルデヒドを 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンで定量することにより 0.01-0.1 μ mol の範囲で直線性が得られた。本定量法はカルボニル化合物、カルボニル試薬で妨害を受けるが、他のアミノ酸、有機酸、無機塩などによる影響は認められない。



III. メルカプタンの微生物分解と酵素的処理

化学工業における合成原料などとして広く利用されるメルカプタンは悪臭、毒性両面で環境科学的に大きな問題になっている。まず微生物による資化性を調べたところ、*Escherichia coli*, *Bacillus sphaericus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas striata* などの細菌がエチルメルカプタンの酸化生成物、ジエチルジスルフィドを炭素源として良好な生育を示すことを見いだした。分解の機構や関与する酵素系は現在、研究中であるが、これらの細菌はメルカプタンを分解除去するのに有効なことが示された。

一方、*Pseudomonas putida* (= *Ps. ovalis*) のメチオニン γ -リアーゼが本来の反応 (含硫アミノ酸の α , γ -脱離, α , β -脱離, γ および β -置換) の他に (6) 式のようなビニルグリシンへのメルカプタン付加を触媒することを見いだした。

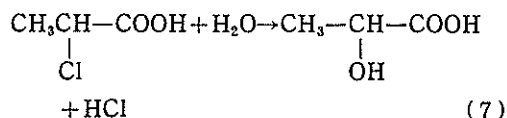


この反応によってメルカプタンは酵素的に除去されるだけでなく、光学活性含硫アミノ酸が同時に合成される点でユニークである。

IV. ハロゲンカルボン酸の微生物分解

2-クロロプロピオン酸を単一炭素源として分解資化する細菌を広く検索した。資化性の高い一菌株 (*Pseudomonas* sp.) は次のように脱ハロゲン反応 (7) 式を行なって毒性をもつハロゲノカ

ルボン酸を分解、無毒化することが明らかになった。



今後の課題

我々生物を取りまく環境の中に存在する有害な有機化合物は複雑多岐にわたる。本研究で取り上げたのはその中の数種のみであり、全体的に見れば研究の端緒を開いたにすぎないが、ニトロアルカンをはじめとする化合物は難易はあってもいずれも微生物、ひいては微生物酵素によって分解され、その分解反応を利用して目的とする有害化合物を特異的に定量することが可能となった。この結果は広く各種の有害有機化合物を酵素によって分解あるいは定量し得る可能性を示唆している。本研究で得られた成果に立脚して、今後、他の化合物、例えばニトロソ化合物、シアン化合物などについても研究を広げる予定である。またメルカプタン、ハロゲン化合物などについては本研究で十分究明し得なかった部分が残されている。酵素のより効果的な固定化法の開発とともに今後の課題である。

謝 辞

2年間にわたり本研究をご援助頂いた日産科学振興財団並びに暖いご理解とご支援を頂いた選考委員の諸先生に心から御礼申し上げます。

発表論文

- 1) Purification and Properties of Nitroalkane Oxidase from *Fusarium oxysporum*. Toshiko Kido, Katsumi Hashizume and Kenji Soda: *J. Bacteriology*, 133-1, 53 (1978).
- 2) Properties of 2-Nitropropane Dioxygenase of *Hansenula markii*. Toshiko Kido and Kenji Soda: *J. Biol. Chem.*, 253-1, 226 (1978).
- 3) Generation and Participation of O_2^- in 2-Nitropropane Dioxygenase Reaction. Toshiko Kido, Katsumi Hashizume, Kenji Soda and Koji Asada: *Photochemistry and Photobiology*, 28, 729 (1978).
- 4) Suicide Inactivation of Bacterial Cystathionine γ -Synthase and Methionine γ -Lyase during Processing of α -propargylglycine. Michael Jhonston, Dorian Jankowski, Patrick

Marcotte, Hidehiko Tanaka, Nobuyoshi Esaki, Kenji Soda and Christopher Walsh: *Biochemistry*, 18, 4690 (1979).

- 5) 細菌の L-Methionine γ -Lyase.
田中英彦, 江崎信芳, 左右田健次: 含硫アミノ酸, 2, 235 (1979).
- 6) 細菌の L-Methionine γ -Lyase による Methionine 定量.
田中英彦, 今原廣次, 江崎信芳, 左右田健次: 含硫アミノ酸, 2, 313 (1979).
- 7) Enzymatic Microdetermination of Nitroalkanes.
Katsuyuki Tanizawa, Toshiko Hirasawa and

Kenji Soda: *Anal. Lett.*, 13(A7), (1980).

口頭発表

- 1) *Fusarium* ニトロアルカンオキシダーゼを用いるニトロアルカンの酵素分析.
左右田健次, 谷沢克行, 平沢敏子: 日本分析化学会, 昭和 53 年 10 月.
- 2) *Hansenula mrakii* の 2-ニトロプロパン酸素添加酵素: 一級および二級ニトロアルカンにおける反応様式.
谷沢克行, 石田雅昭, 浅田浩二, 左右田健次: 日本農芸化学会大会, 昭和 54 年 4 月.