

シアン分解酵素の機能解析とその改変

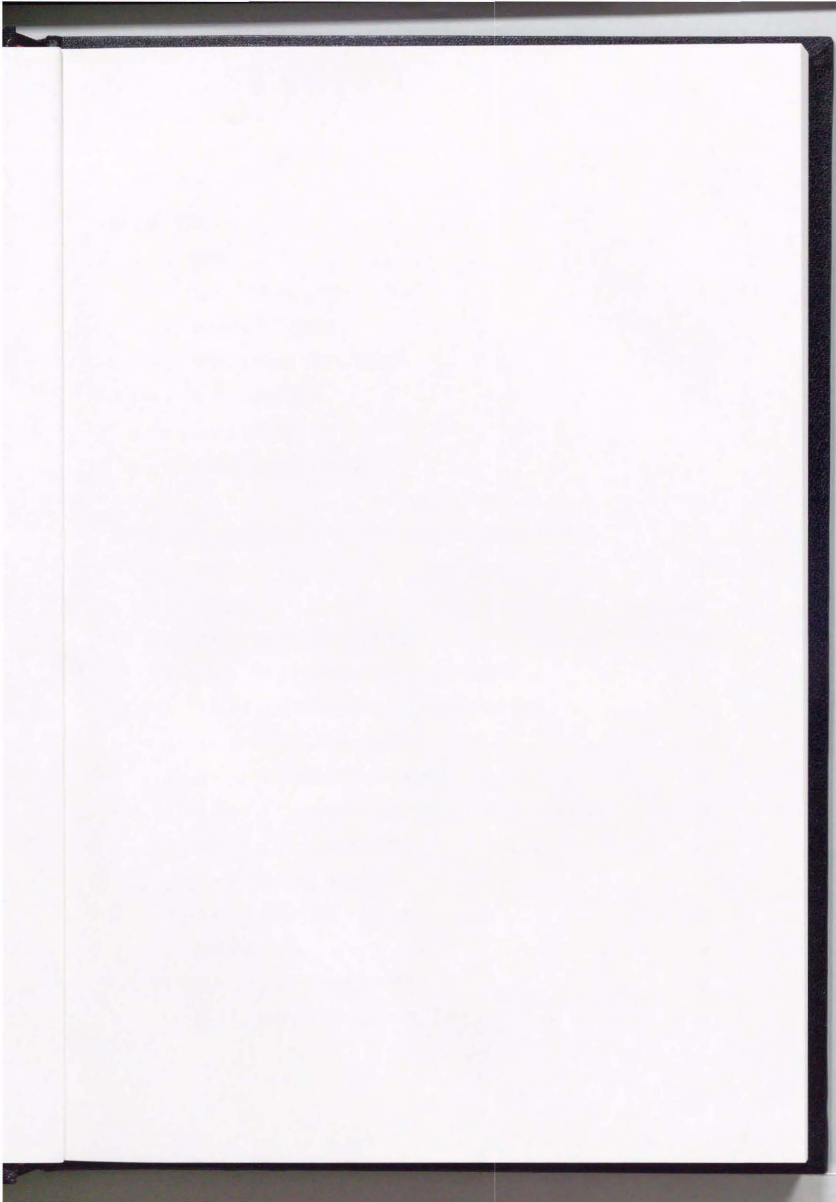
渡 邊 博

①

学位論文

シアン分解酵素の機能解析とその改変

東京大学大学院  
工学系研究科  
先端学際工学専攻  
渡邊 淳



第1章 緒言	1
1-1 研究の背景	1
1-2 研究の目的	2
1-3 研究の意義	3
1-4 研究の範囲	4
1-5 研究の方法	5
1-6 研究の結果	6
1-7 研究の結論	7
第2章 基礎理論	8
2-1 基礎理論	8
2-2 基礎理論	9
2-3 基礎理論	10
2-4 基礎理論	11
2-5 基礎理論	12
2-6 基礎理論	13
2-7 基礎理論	14
2-8 基礎理論	15
2-9 基礎理論	16
2-10 基礎理論	17
2-11 基礎理論	18
2-12 基礎理論	19
2-13 基礎理論	20
2-14 基礎理論	21
2-15 基礎理論	22
2-16 基礎理論	23
2-17 基礎理論	24
2-18 基礎理論	25
2-19 基礎理論	26
2-20 基礎理論	27
2-21 基礎理論	28
2-22 基礎理論	29
2-23 基礎理論	30
2-24 基礎理論	31
2-25 基礎理論	32
2-26 基礎理論	33
2-27 基礎理論	34
2-28 基礎理論	35
2-29 基礎理論	36
2-30 基礎理論	37
2-31 基礎理論	38
2-32 基礎理論	39
2-33 基礎理論	40
2-34 基礎理論	41
2-35 基礎理論	42
2-36 基礎理論	43
2-37 基礎理論	44
2-38 基礎理論	45
2-39 基礎理論	46
2-40 基礎理論	47
2-41 基礎理論	48
2-42 基礎理論	49
2-43 基礎理論	50
2-44 基礎理論	51
2-45 基礎理論	52
2-46 基礎理論	53
2-47 基礎理論	54
2-48 基礎理論	55
2-49 基礎理論	56
2-50 基礎理論	57
2-51 基礎理論	58
2-52 基礎理論	59
2-53 基礎理論	60
2-54 基礎理論	61
2-55 基礎理論	62
2-56 基礎理論	63
2-57 基礎理論	64
2-58 基礎理論	65
2-59 基礎理論	66
2-60 基礎理論	67
2-61 基礎理論	68
2-62 基礎理論	69
2-63 基礎理論	70
2-64 基礎理論	71
2-65 基礎理論	72
2-66 基礎理論	73
2-67 基礎理論	74
2-68 基礎理論	75
2-69 基礎理論	76
2-70 基礎理論	77
2-71 基礎理論	78
2-72 基礎理論	79
2-73 基礎理論	80
2-74 基礎理論	81
2-75 基礎理論	82
2-76 基礎理論	83
2-77 基礎理論	84
2-78 基礎理論	85
2-79 基礎理論	86
2-80 基礎理論	87
2-81 基礎理論	88
2-82 基礎理論	89
2-83 基礎理論	90
2-84 基礎理論	91
2-85 基礎理論	92
2-86 基礎理論	93
2-87 基礎理論	94
2-88 基礎理論	95
2-89 基礎理論	96
2-90 基礎理論	97
2-91 基礎理論	98
2-92 基礎理論	99
2-93 基礎理論	100



# 目次

	ページ
第1章 緒論	1
1-1 緒言	1
1-2 シアン化水素およびシアン化物	2
1-3 従来のシアン処理法	3
1-4 シアン分解能を有する微生物	4
1-5 シアンの生物処理	5
1-6 シアン分解酵素	5
1-7 本研究の目的および意義	7
第2章 シアン分解細菌のスクリーニングとシアン分解酵素の精製	9
2-1 緒言	9
2-2 実験方法	10
2-2-1 シアン分解細菌の単離	10
2-2-2 シアン分解細菌のシアン分解活性	11
2-2-3 シアン分解細菌のシアン分解活性の誘導	11
2-2-4 シアン分解酵素の精製	11
2-2-5 ゲル濾過による分子量測定	12
2-2-6 シアン分解酵素の活性測定	13
2-2-7 シアン分解酵素の性質	13
2-2-8 SDS-PAGE	13
2-2-9 ギ酸の測定	14
2-3 結果および考察	14
2-3-1 シアン分解細菌の単離	14
2-3-2 AK61株によるシアン分解	15

2-3-3	シアン分解活性の誘導	15
2-3-4	シアン分解酵素の精製	16
2-3-5	シアン分解酵素の速度論的解析	17
2-3-6	シアン分解に伴う生成物	18
2-4	結言	19
第3章	シアン分解酵素のクローニングと塩基配列の決定	35
3-1	緒言	35
3-2	方法実験	36
3-2-1	宿主とベクター	36
3-2-2	シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の決定	36
3-2-3	プローブの作成	36
3-2-4	シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニング	37
3-2-5	シアンジヒドラターゼ遺伝子のサブクローニング	38
3-2-6	塩基配列の決定	38
3-3	結果および考察	38
3-3-1	シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の決定	38
3-3-2	シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニング	39
3-3-3	シアンジヒドラターゼ遺伝子の塩基配列の決定	40
3-3-4	シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の相同性	41
3-4	結言	42
第4章	シアン分解酵素の大量発現系の構築	52
4-1	緒言	52
4-2	実験方法	53
4-2-1	シアンジヒドラターゼの大量発現系の構築	53

4-2-2	シアンジヒドラターゼの発現	53
4-2-3	シアンジヒドラターゼの精製	53
4-2-4	シアンジヒドラターゼの活性測定	54
4-2-5	至適温度および至適 pH	54
4-2-6	基質特異性	54
4-2-7	阻害物質の検討	54
4-2-8	安定性	55
4-3	結果および考察	55
4-3-1	大量発現系の構築	55
4-3-2	シアンジヒドラターゼの精製	56
4-3-3	シアンジヒドラターゼの活性測定	56
4-3-4	基質特異性	57
4-3-5	阻害物質の検討	58
4-3-6	安定性	58
4-4	結言	59
第5章	部位特異的変異によるシアンジヒドラターゼの機能部位の検討	72
5-1	緒言	72
5-2	実験方法	73
5-2-1	宿主とベクター	73
5-2-2	部位特異的変異の導入	73
5-2-3	変異シアンジヒドラターゼの発現	73
5-2-4	変異シアンジヒドラターゼの精製および活性測定	74
5-3	結果および考察	74
5-3-1	部位特異的変異の導入	74
5-3-2	変異シアンジヒドラターゼの発現	75

5-3-3	変異シアンジヒドラターゼの活性	75
5-3-4	変異シアンジヒドラターゼの精製	76
5-3-5	変異シアンジヒドラターゼの速度論的解析	77
5-4	結言	78

第6章	結論	90
-----	----	----

参考文献	93
------	----

論文リスト	97
-------	----

謝辞	98
----	----

## 第1章 緒論

### 1-1 緒言

近年、経済が発展するとともに高度に産業化された社会が形成され、われわれの生活も豊かになってきた。しかし、その一方で産業化に伴い深刻な環境汚染が表面化し、大きな社会問題となっている。環境汚染には、大気汚染として成層圏のオゾン層の破壊、排ガスによる酸性雨、炭酸ガスによる地球温暖化などが挙げられ、また、水質汚染として、生活排水による富栄養化、工業排水による河川などの汚染などが挙げられる。特に、われわれの生活の源である河川への毒物の混入による汚染は、直接生命が危険に曝されるため深刻な問題となる。河川へ混入する可能性のある毒物の一つとしてシアン化水素、シアン化カリウムやシアン化ナトリウムなどのシアン化物(シアン)がある。これらのシアンは生体に対して毒性が強く、その濃度によっては、生物を死に至る危険がある(1)。しかし、シアンは猛毒でありながら、工業的には多くの用途があり、金属精錬や金、銀のメッキによく用いられている。また、青酸系の樹脂および繊維、ニトリル、農薬の合成原料としても使用される(2, 3)。これらの工業からの排水にはシアンが含まれているため、自然界に排出する前に除去もしくは無毒化しなければならない。

現在、工業排水のシアンの処理には、おもに次亜塩素酸または塩素水による酸化分解などの化学的処理が用いられている(3, 4)。このような処理法は、次亜塩素酸や塩素などの有害物質を必要とし、設備や処理運営に費用もかかる。したがって、これらの方法に変わる処理法が求められている。この化学的処理法に変わるものの一つとして、生物的に処理する方法が考えられる。これは、微生物や酵素などを利用してシアンを分解または無毒化する方法であり、一般に安価に処理できる利点がある。しかし、生物処理にはシアンを分解する能力のある微生物または酵素が必要であり、そのスクリーニングが必須となることから、現在まで実用化はされていない。

シアンの生体に対する毒性にも関わらず、ある種の植物や微生物はシアンの生成が行われていることは以前から知られている(5, 6)。また、活性汚泥中で排水に含まれる

シアンが分解されていくという報告もされている(7,8)。これらは、自然界にはシアンを代謝することのできる生物および酵素が存在することを示唆している。実際に、シアンを分解する微生物または酵素が報告され、その性質などが検討されている(4,5)。

本研究では、シアンの処理に応用可能な微生物の単離とシアン分解に関与する酵素の精製および機能の解析を行うことを目的とした。また、この酵素の遺伝子をクローニングし、大量発現系の構築を行うとともに遺伝子に部位特異的変異の導入による酵素への影響も検討する。

## 1-2 シアン化水素およびシアン化物

シアン化水素は青酸水素とも呼ばれ、アーモンドに似た特異微臭のある気体または液体である。また、シアン化水素の塩はシアン化物と呼ばれ、シアン化カリウム、シアン化ナトリウムなどがこれに含まれる。

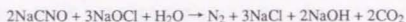
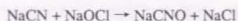
シアン化水素およびシアン化物は、生体内に吸収されると呼吸活性を阻害することが知られている(1,9-12)。これは、細胞中のミトコンドリアに存在する呼吸酵素、シトクロム酸化酵素複合体とシアン化合物が結合することによる。シアン化合物がこの酵素に結合することにより、酵素の機能は失われる。この結果、この酵素を介するすべての酸化還元反応は阻止され、その生物は呼吸困難に陥ることになる。その毒性は、シアン化水素で成人の経口致死量が50 mg～60 mgといわれている(13)。このため、シアン化水素、シアン化カリウムおよびシアン化ナトリウムなどは、毒物及び劇物取締法において毒物に指定され、水道水の水質基準として“検出されないこと”および工業などからの排出基準として“ $1 \text{ mg l}^{-1}$ ”が設定されている(13)。

シアンの重金属塩は水に難溶性のものが多く、アルカリ溶液中で過剰のシアニオンと反応させるとシアノ錯塩を形成し、水に可溶となることが多い。この錯体を利用し、工業的に銅、亜鉛、銀および金などの電気メッキが広く行われている(14)。また、シアンは青酸系の樹脂および繊維、ニトリル、農薬の合成原料として、さらにシアンそのものも殺虫剤や消毒剤として用いられている。その他、シアン化水素は塩化シア

ン、エチレンジアミン四酢酸などの製造時やコークス炉や石炭ガスの精製の際の残留物として生じる。これらの工業排水には、高濃度のシアンが含まれているため、自然界に排出する前に処理が必要である。

### 1-3 従来のシアン処理法

工業排水中の遊離のシアンを処理法として、次亜塩素酸塩または塩素水による酸化分解、電解酸化、オゾンによる酸化分解などがある(3, 4)。これらの処理法のうち、次亜塩素酸塩または塩素水による酸化分解が最も広く用いられている。この方法は、次のような一次反応と二次反応の2種類の反応に分けられる。



一次反応はシアンをシアン酸に酸化する反応であり、pH 10以上で行われる。二次反応はシアン酸をさらに酸化し、窒素と炭酸ガスに分解する。このときの反応はpH 7.5～8.0で行われ、一次反応より反応に時間を要する。これらの処理法では処理条件の管理が必要である。また、処理に次亜塩素酸塩または塩素を使用するため安全面で問題があり、運営にも費用がかかる。

これらの処理法についてよく用いられる方法は電解酸化である。シアンを含む排水にグラファイトを陽極、ステンレスを陰極として直流を流すと陽極から酸素が発生する。電解酸化では、この発生する酸素によってシアンをシアン酸に酸化する方法である(3)。電解酸化による処理は、塩素による酸化より安価に行えるが、シアンの濃度が $1,000 \text{ mg l}^{-1}$ 以下になると反応が著しく緩慢になる。このため、シアンの電解酸化は、高濃度のシアン排水にしか使用できず、処理された排水はさらに塩素などによるシアンの酸化分解を行わなければならない。

このように現在のシアン排水の処理法には、安全面や費用の面から問題が多く、これらの処理法より安全で安価で行える処理法が求められている。



#### 1-4 シアン分解能を有する微生物

シアンの分解能を有する微生物は、サクラ属やマメ科のシアン配糖体を含むシアン発生植物に対する植物病原菌で数多く確認されている。Shimizuらは、シアンを酸化分解し、炭酸ガスとアンモニアを生成する不完全菌 *Fusarium solani* を報告している(15)。この糸状菌は、前培養においてシアンに適応することによって、シアンに不感受性の電子伝達系を形成し、シトクローム酸化酵素を阻害するシアンを酸化分解することを示した。また、Fryらは、シアンを分解してホルムアミドを生成する *Stemphylium loti* をおよび *Gloeocercospora sorghi* を単離した(16, 17)。さらに、31種類の糸状菌についてシアンの分解活性を確認したところ、シアン発生植物に対する病原菌で11種類、シアン発生植物以外の植物に対する病原菌で9種類、植物病原菌以外の糸状菌で6種類について、*S. loti* と同様のシアンを分解活性を有することを示した(16)。これらのうち、特に *G. sorghi* と *Helminthosporium turcicum* に高いシアン分解活性が確認されている。

シアン分解能を有する細菌として、Knowlesらは活性汚泥からシアンを唯一の窒素源として増殖することのできる *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 を単離した(18)。この細菌は、シアンにあらかじめ適応させておくと、シアンをアンモニアと炭酸ガスに分解する。この細菌はシアンの存在下で急速に酸素を消費することから、シアンを酸化分解すると予想されている(19)。また、この反応には補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)が必要であると考えられているが(20, 21)、その反応の詳細はまだ明らかにされていない。

また、シアン分解能を有する細菌の中には、シアンを異なる反応系で分解するものが報告されている。Whiteらは、シアンを加水分解して乙酸とアンモニアを生成する細菌を活性汚泥から初めて単離した(22)。また、最近、同様のシアン分解反応を示す細菌が、IngvorsenらおよびMeyersらによってそれぞれ報告された(23, 24)。Ingvorsenらは土壌からシアン分解細菌を単離し、それが *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 であると同定した。また、Meyersらは、シアンを含む排水から *Bacillus pumilus* C1 を単離した。*P. fluorescens* NCIMB 11764 および *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 のシアン分解活性は、培養中にシアンの存在によって誘導されることが示された。これに対

し、*B. pumilus* C1はシアンの添加によってシアン分解活性の誘導が阻害されることが明らかとなった。この細菌では、栄養培地での培養において対数増殖期後半および静止期前半にシアン分解活性が確認されている(24)。

#### 1-5 シアンの生物処理

シアン分解活性のある活性汚泥やシアン分解細菌を用いたシアンの生物処理に関する検討が、いくつか報告されている。Pettetらは、汚泥にシアンを含む溶液を通すことによって、シアンの分解を検討した(8)。これにより、100 ppmのシアンを99%以上除去できることを示している。しかし、この活性汚泥から、シアンを分解する微生物などの単離は検討されておらず、詳しいシアンの分解機構は明らかにされてはいない。

Basheerらは、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3からのシアニダーゼを用いたバイオリアクターを作成した(25, 26)。これは、シアニダーゼを膜に固定化し、シアンを含む溶液をその固定化膜に循環してシアンの分解を行った。その結果、160 ppmのシアン溶液300 mlを24 hでほぼ完全に分解することが報告されている。しかし、このバイオリアクターに用いた*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3由来の酵素はシアンによってその生合成が誘導されるため、この酵素を調製するためにはこの細菌をあらかじめシアンに適応させておかなければならないという問題がある。また、このリアクターのシアン分解の処理能力も充分であるとはいえない。

このように、シアンの生物処理に対していくつか検討されているが、実用的に充分なプロセスは開発されていない。

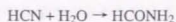
#### 1-6 シアン分解酵素

これまでに、シアンを分解する酵素は数例報告されている。これらのうち、ロダネーゼ(EC 2.8.1.1)は、次のような反応を触媒し、シアンを毒性の低いチオシアンに分解する。



この酵素は、動物、植物、糸状菌および細菌など幅広く生物にみられる(27)。しかしながら、この酵素の反応には、チオ硫酸が必要であり、工業排水中のシアンの処理に用いるには適さない。

Fryらは、*S. loti*の胞子をシアン化カリウム溶液中で適応させて得た無細胞抽出液から、次の式に示すようにシアンの加水分解を触媒するシアンヒドラターゼ(EC 4.2.1.66)を確認している(15)。

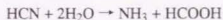


この酵素のシアンに対するMichaelis 定数( $K_m$ )は、15 mM~20 mMであると求められた。

また、最近、Wangらによって*G. sorghi*から(28)、Clunessらによって*F. lateritium* (29)からシアンヒドラターゼが相次いで精製された。これらの酵素は、分子量が約40 kDaのポリペプチドからなる多量体で活性を持つ酵素の分子量は、300 kDaを超えることが明らかとなっている。また、いずれの酵素もシアンに対する $K_m$ は、10 mM以上である。現在までに精製されたシアンヒドラターゼのシアンに対する $K_m$ はいずれも10 mM以上と高く、シアンの低濃度までの処理は困難であると考えられる。

なお、*G. sorghi*および*F. lateritium*由来のシアンヒドラターゼの遺伝子の塩基配列が決定され、これらの酵素がニトリルをアンモニアと酸に加水分解するニトリラーゼ(EC 3.5.1.1)と相同性が高いことが示された(29, 30)。また、同時に*Escherichia coli*中での大量発現も試みられたが、活性のある酵素は得られていない。

シアンヒドラターゼの他に、次の式に示すようなシアンを加水分解し、アンモニアとギ酸を生成する酵素シアンジヒドラターゼ(シアニダーゼ)が、IngovorsenらおよびMeyersらによってそれぞれ、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3と*B. pumilus* C1から精製された(23, 31)。



これらの酵素は、約40 kDaの分子量を持つ2種類または3種類のポリペプチドから構成される多量体であり、シアンに対する $K_m$ は3 mM前後であることが示された。この $K_m$ の値から、これらの酵素はシアンヒドラターゼより基質(シアン)に対して親和性が高

く、これらの酵素を用いる方が排水処理などには適していると考えられる。しかしながら、これらの酵素の詳しい機能解析および遺伝子の解析はほとんど行われていない。

#### 1-7 本研究の目的と意義

将来、シアンを含む工業排水の生物による処理プロセスを開発する場合には、シアン分解能を有する微生物の単離はもちろん、その反応に関与する酵素について遺伝子の塩基配列を含めた機能解析が不可欠である。また、シアン分解酵素を用いる場合、大量の酵素を必要とするためにシアン分解酵素の遺伝子のクローニングとともに大量発現系の構築が必要となる。現在までに、シアンを分解する微生物がいくつか報告されている。しかしながら、それらの微生物はシアン分解活性の誘導にシアンが必要であるものがほとんどである。これらの微生物をシアンの生物処理プロセスに用いるためにはあらかじめシアンに順応させる必要があり、実用的であるとはいえない。また、シアン分解酵素は数種類の微生物から精製されているものの、シアン分解酵素の塩基配列を含めた詳しい機能解析を行った報告はほとんどない。さらに、このような酵素の大量発現系の構築によって活性のある酵素の発現はいまだ行われていない。

本研究では、シアン分解能を有する新しい微生物の単離を行い、シアン分解酵素の精製および機能解析を行うことを目的とした。また、シアン分解酵素の遺伝子のクローニングおよび大量発現系の構築し、さらに部位特異的変異による酵素への影響も検討する。

以下に本論文の構成を示す。

第2章では、シアン分解活性を有する細菌の単離とその性質について検討を行う。さらに、この細菌からシアン分解酵素を精製し、その諸性質について検討する。

第3章では、シアン分解酵素の遺伝子をクローニングおよびその塩基配列の決定を行う。

第4章では、クローニングされたシアン分解酵素の遺伝子の大量発現を行う。また、大量発現された酵素の活性をシアン分解細菌由来のものと比較する。

第5章では、クローニングしたシアン分解酵素の遺伝子に部位特異的に変異を導入し、アミノ酸残基の置換による酵素に与える影響を検討する。

第6章は、結論であり、本研究を要約し得られた研究成果をまとめる。

以上のように、本研究は、微生物およびその反応に関わる酵素について重要な情報を提供し、シアンの生物処理プロセスの開発に大きく寄与するものと考えられる。

## 第2章 シアン分解細菌のスクリーニングとシアン分解酵素の精製

### 2-1 緒言

シアンの生物処理プロセスを開発するためには、シアンを分解できる微生物または酵素が必須であり、その単離が必要である。シアンを分解する微生物は、糸状菌および細菌でいくつか報告されている。特にシアン発生植物に対する植物病原菌である糸状菌についてシアン分解能が報告されている。シアンを分解する糸状菌としてWangらによって*G. sorghi*が、またClunessらによって*F. lateritium*がそれぞれ単離されている。また、これらの糸状菌からは、シアンをホルムアミドに加水分解するシアンヒドラーゼ(EC 4.2.1.66)が精製されている(28, 29)。これらの酵素は、分子量が約40 kDaのポリペプチドからなる多量体でその分子量は300 kDaを越えることが報告されている。しかし、これらの酵素のシアンに対する $K_m$ は、10 mM以上と高く、シアンの生物処理プロセスにおいてシアンの低濃度までの処理は困難であると考えられる。また、この酵素は糸状菌によって生産されるため、培養に時間がかかることも問題である。

シアン分解することのできる細菌としては、Knowlesらによって活性汚泥からシアンを唯一の窒素源として増殖することのできる*P. fluorescens* NCIMB 11764が単離されている(17)。また、この細菌とは異なるシアン分解の反応系を持つ細菌が数種類報告されている。Whiteらは、シアンを加水分解してギ酸とアンモニアを生成する細菌を活性汚泥から単離した(22)。生理学的試験の結果、この細菌は*Pseudomonas*属であることが確認されている。また、同様のシアン分解反応を示す細菌として、IngvorsenらおよびMeyersらによってそれぞれ*A. xylooxidans* subsp. *denitrificans* DF3と*B. pumilus* C1が単離されている(23, 24)。さらに、*A. xylooxidans* subsp. *denitrificans* DF3および*B. pumilus* C1から、シアンを加水分解し、アンモニアとギ酸を生成するシアンジヒドラーゼ(シアンニダーゼ)が精製された(12, 31)。これらの酵素は、約40 kDaの分子量を持つ2種類また



は3種類のポリペプチドから構成される多量体であり、シアンに対する $K_m$ は3 mM前後であることが求められている。シアンジヒドラターゼはシアンに対する親和性から、シアンの生物処理プロセスへの応用には適していると考えられる。しかしながら、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3のシアン分解活性は培養中にシアンの存在によって誘導されるために、この細菌をこのプロセスに導入するためには、あらかじめ細菌をシアンに順応させる必要がある。*B. pumilus* C1のシアン分解活性はシアンの存在しない培地中で、対数増殖期後半から静止期前半にのみ観察されている。また、培地にシアンを添加することによって*B. pumilus* C1のシアン分解活性の誘導が阻害されることが報告されている。これは、シアンを含む排水中において、この細菌のシアン分解酵素の生合成が行われないことを示し、連続的なシアンの生物処理には適さないと考えられる。このように、シアンの生物処理プロセスに応用可能なシアン分解能を有する微生物はいくつか単離されているものの、このプロセスの開発に十分な能力であるとはいえない。

本章では、まず、シアンを分解する能力のある新しい微生物の単離を行い、シアンの生物処理への応用の可能性を検討した。さらに、この細菌から、シアン分解酵素の精製およびその諸性質について検討した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 シアン分解細菌の単離

シアン分解細菌を単離するために、メッキ工場の排水を採取した。この排水を1 mM シアン化カリウムを含む分離用液体培地(Table 2-1)に接種し、30℃で48 h振盪培養した。増殖した細菌を単離するために、この培養液をTYG寒天培地上(Table 2-1)に塗抹し、30℃で培養した。寒天培地上に形成されるコロニーの形状をもとに細菌を単離し、各細菌についてシアンの分解活性を2-2-2に示す方法で確認した。単離された細菌のうち、



シアン分解活性のあるものをシアン分解細菌とした。

単離された細菌をグラム染色、形状および生理学的試験を試みた。グラム染色は、Huckerの変法に従って行った(32)。また、その他の試験は、Barrowらの方法(33)に従って、またはapi 20 NE(BIO MERIEUX S.A.)を用いて行った。

#### 2-2-2 シアン分解細菌のシアン分解活性

シアン分解細菌を1 mMシアン化カリウムを含む分離用培地に接種し、30℃で12 h培養した。この培養液を5000×g、15 min遠心することによって集菌した。集菌した細菌を50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)を用いて2回洗浄し、同じ緩衝液で600 nmの吸光度(OD<sub>600</sub>)が1.0になるように再懸濁した。シアンの分解活性の測定は、この懸濁液に濃度が1 mMになるようにシアン化カリウムを添加し、反応温度30℃で行った。この反応液から経時的に試料を採取し、2倍量の1 M NaOHで反応を停止させた後、反応液中のシアン濃度またはアンモニア濃度を測定した。シアンおよびアンモニアの濃度はそれぞれ、ピリジンカルボン酸ピラゾロン法(34)およびインドフェノール法(35)を用いて決定した。

#### 2-2-3 シアン分解細菌のシアン分解活性の誘導

単離した細菌のシアン分解活性がシアンによって誘導されるか検討するために、1 mMシアン化カリウムを含む分離用培地とシアン化カリウムを含まない培地にこの細菌をそれぞれ接種して、30℃で振盪培養した。この培養液のOD<sub>600</sub>が0.3になるまで培養し、培養後2-2-2の方法でシアン分解活性を確認した。

#### 2-2-4 シアン分解酵素の精製

分離用培地31を用いてAK61株を培養し、実験方法2-2-2に示した方法で洗浄した細胞

を調製した。この細胞を同じリン酸緩衝液で再懸濁し、超音波破砕器を用いて破砕した。破砕した懸濁液を10,000×g、20 min遠心し、その上澄みを細胞抽出液として、シアン分解酵素の精製に用いた。

調製された細胞抽出液をFig. 2-1に示すような方法で精製を行った。なお、各精製の操作は、4℃で行った。まず、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の結晶を細胞抽出液に35%飽和溶解度になるように添加し、遠心によってその上清みを回収した。さらにその溶液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を飽和溶解度の47.5%に達するまで添加し、その沈殿を10,000×g、20 minの遠心によって回収した。回収した沈殿を50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)に溶解し、0.4 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で平衡化したDEAMカラム(YAMAZEN, Co.)に負荷した。吸着した蛋白質を0.5 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で溶出し、同じ体積の1.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)を加えた。この溶液を0.9 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で平衡化したphenyl-TOYOPEARL 650カラム(TOSOH, Co.)に負荷した。このカラムに吸着した蛋白質のうち、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の濃度が0.54~0 Mで溶出される蛋白質を回収し、2倍量の1 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を添加した。この溶液を1 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したDEAE-TOYOPEARL 650カラム(TOSOH, Co.)に負荷した。吸着した蛋白質を0~1 M NaClの勾配によって溶出した。活性のある分画を回収して、0.3 M NaCl/1 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(Macro-Prep ceramic Hydroxyapatite: Bio-Rad)に負荷した。リン酸濃度1 mM~250 mMの勾配によって溶出し、シアン分解活性のある分画を精製されたシアン分解酵素とした。

## 2-2-5 ゲル濾過による分子量測定

精製されたシアン分解酵素の分子量を決定するためにゲル濾過を行った。ゲル濾過カラムは、排除限界が分子量100 kDaであるTSK-GEL G2000SWXL(TOSOH Co.)を用いた。溶離液は、0.3 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)を用い、流速1 ml min<sup>-1</sup>で行った。

溶出される蛋白質は、280 nmの吸収によって検出した。また、蛋白質の標準分子量は、リボヌクレアーゼA、キモトリプシノーゲンA、オボアルブミン、牛血清アルブミン、アルドラーゼ、フェリチンおよびチログロブリンを用いた。

#### 2-2-6 シアン分解酵素の活性測定

シアン分解酵素によるシアン分解活性の測定は、50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中で行った。酵素を含む緩衝液中に終濃度で10 mMになるようにシアン化カリウム溶液を添加した。反応は30℃で3 min~10 min行い、発生するアンモニアの量を測定した。反応液中のアンモニアの濃度はインドフェノール方法を用いた。また、蛋白質の濃度は、Bradfordらの色素法に従って行った(36)。なお、この酵素のシアン分解活性の1 unitは、上記の条件で1 minに1  $\mu$ molのアンモニアを精製するのに必要な蛋白質量と定義した。

#### 2-2-7 シアン分解酵素の性質

シアン分解酵素について、至適温度および至適pHの検討を行った。至適温度については、活性測定はシアン化カリウム10 mMを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中で行い、反応温度は15℃から45℃の範囲で測定した。また、至適pHについては、pHを6から10の範囲で行った。反応は30℃で行い、pH 6~8は50 mMリン酸緩衝液中で、pH 8~10は50 mMホウ酸緩衝液中で行った。いずれの測定も発生するアンモニア濃度を定量し、相対活性を求めた。

#### 2-2-8 SDS-PAGE

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmliの方法に従って、アクリルアミド12%のゲルで行った(37)。泳動後の蛋白質は、0.2% Coomassie brilliant blue R-250(50% エタノール-10% 酢酸溶液)で染色した。また、ポリペプチドの分子量は、標準ポリペプチドの分子量(SDS-PAGE Molecular Weight Standards,

Low Range; Bio-Rad)と比較して決定した。

## 2-2-9 ギ酸の測定

ギ酸の定量は、Quayleらの方法に従って(38)、ギ酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.2.1.43)を用いて、反応に伴い増加するNADHの量を定量することによって決定した。ギ酸デヒドロゲナーゼの反応は、30℃で30 min行い、この反応に伴い増加するNADH濃度340 nmの吸光度を測定した。

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 シアン分解細菌の単離

シアン分解細菌を単離するために、メッキ工場の排水を採取し、シアン化カリウムを含む分離用培地に接種して30℃で培養を行った。48 hの培養により、微生物の増殖と培地中のシアン濃度の減少が観察され、この培養液にシアンを分解する微生物が存在していることが示唆された。そこで、増殖した微生物を平板塗抹法により単離し、シアンの分解活性のある細菌(AK61株)を選択した。このAK61株の生理学的試験の結果をTable 2-2に示す。この株は、グラム陰性の好気性桿菌であることが確かめられた。また、電子顕微鏡による観察の結果から、この細菌には鞭毛はみられず(Fig. 2-2)、非運動性であることが明らかとなった。シアンを分解する細菌は*Pseudomonas*属、*Alcaligenes*属および*Bacillus*属について報告がみられる。Knowlesらは、シアンをアンモニアと二酸化炭素に分解する*P. fluorescens* NCIMB 11764を単離している(17)。また、シアンをアンモニアとギ酸に分解する細菌として、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3と*B. pumilus* C1が報告されている(23, 24)。すでに報告されているこれらのシアン分解細菌は、いずれも極毛または周鞭毛を持つ運動性の細菌である(39)。Table 2-2に示す生理学的試験の結果では、単離されたAK61株の属および種の決定には至らなかったが、AK61株は、鞭毛を持っていないということから*Pseudomonas*、*Alcaligenes*および*Bacillus*に属さない新

しいシアン分解細菌であることがいえる。

### 2-3-2 AK61株によるシアン分解

Fig. 2-3にこのAK61株を1 mMシアン化カリウムを含む分離用培地で培養した場合の増殖とシアン濃度の経時変化を示す。AK61株の培養開始後、速やかにシアン濃度の減少が確認され、15 h後にはほとんどのシアンが分解されていることがわかる。しかしながら、AK61株の増殖はシアン濃度が小さくなってからみられ、シアンによって増殖の阻害が観察される。これらの結果は、AK61株はシアンを分解する代謝系を持っているものの、シアンに対しては感受性であり、高濃度のシアンによって増殖が阻害されていることが予想される。

AK61株によるシアン分解活性を検討した結果をFig. 2-4に示す。シアンを含むリン酸緩衝液中に懸濁したAK61株は、その反応液中のシアンを速やかに分解することがわかる。この実験では、反応液中に特別な補酵素や有機物を添加していないことから、この細菌のシアン分解は、補酵素などを必要としない代謝系であることが示唆される。したがって、AK61株は、シアンの分解に補酵素としてNADHを必要とする*P. fluorescens* NCIMB 11764の代謝系とは異なる系を持っていると考えられる。

また、シアン分解に伴い反応液中にアンモニアの蓄積が確認され、シアン分解による生成物のひとつがアンモニアであることが示唆された。シアンの分解に特別な補酵素を必要とせず、分解に伴いアンモニアを発生することから、AK61株のシアン分解は*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3および*B. pumilus* C1と同様の反応系によって行われている可能性がある。なお、最終的なアンモニアの収率は73%と低かったが、これは反応中に細胞内で消費または1 M NaOHの添加による反応の停止時に一部が揮散したのものと考えられる。

### 2-3-3 シアン分解活性の誘導



シアン分解細菌として報告されている細菌のうち、*P. fluorescens* NCIMB 11764および *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3のシアン分解活性は、培養中にシアンの存在によって誘導されることが示されている(17, 23)。また、*B. pumilus* C1は、培養中のシアンの添加によってシアン分解活性の誘導が阻害されることが報告されている(24)。そこで、AK61株のシアン分解活性の誘導がシアンによって行われるか検討した。シアンを添加して培養したAK61株およびシアンを添加していないで培養したAK61株についてそれぞれシアン分解活性を確認した。培養中にシアンを添加しないで培養したAK61株でも、反応開始直後からシアン濃度の減少がみられ、この細菌のシアン分解活性が確認された(Fig. 2-5)。これは、AK61株のシアン分解活性の誘導が培養中のシアンによらないことを示している。AK61株のこのような性質は、この細菌をシアンの生物処理プロセスなどに応用する場合、あらかじめシアンで順応させる必要がなく、非常に有効であると考えられる。

#### 2-3-4 シアン分解酵素の精製

AK61株の細胞抽出液のシアン分解活性は $1.11 \text{ unit mg}^{-1}$ であり、3 lの培養液から182 unitのシアン分解酵素が確認された。一連の精製の操作によって、最終的に酵素の比活性は $54.6 \text{ unit mg}^{-1}$ となり、約49倍に精製された。また、その収率は約13%であった(Table 2-3)。各精製課程のSDS-PAGE (Fig. 2-6)の結果から、ヒドロキシアパタイトのカラムから溶出した後では、ほぼ単一のバンドになるまで精製されていることがわかる。また、標準蛋白質の分子量と比較したところ、この酵素のポリペプチドの分子量は約38 kDaであると求められた。この精製された酵素のN末端のアミノ酸配列は、次のような1種類のアミノ酸配列のみが確認された：Ala-His-Tyr-Pro-Lys-Phe-Lys-Ala-Ala-Ala-Val-Gln-Ala-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Asn-Leu-Asp-Ala-Thr-Val-Glu。これは、精製されたシアン分解酵素が約38 kDaの1種類のポリペプチドから構成される蛋白質であることを示してい

る。また、精製された酵素についてゲル濾過クロマトグラフィーによってその分子量を検討したところ、この酵素の溶出時間は5.67 minであり、分子量約440 kDaのフェリチンの同程度の分子量を持っていることが確かめられた(Fig. 2-7)。ここで使用したゲル濾過カラムの排除限界の分子量が100 kDaであったために、この酵素の正確な分子量は求められなかった。しかし、その分子量はSDS-PAGEで求められたポリペプチドの分子量より10倍近く大きいものであることがわかる。これらの結果は、AK61株からのシアン分解酵素は、1種類のポリペプチドから多量体を構成しての蛋白質であることを示している。

#### 2-3-5 シアン分解酵素の速度論的解析

精製された酵素のシアンに対する $K_m$ を求めるために、シアンの初期濃度0.6 mMから10 mMの範囲における初期反応速度からLineweaver-Burkプロットを作成した(Fig. 2-8)。このプロットから、シアンの初期濃度0.6 mMから10 mMの範囲で直線が得られ、この酵素のシアンに対する $K_m$ は1.7 mMと求められた。糸状菌から精製されたシアンヒドラーゼのシアンに対する $K_m$ は10 mM以上であり、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 および *B. pumilus* C1 から精製されたシアンジヒドラーゼの $K_m$ は3 mM付近であることから、この酵素のシアンに対する親和性はシアンヒドラーゼよりは高く、シアンジヒドラーゼと同程度であるといえる。しかしながら、1.7 mMという $K_m$ は、一般的な酵素の $K_m$ に比べて大きいと思われる。これは、シアンの構造が単純であるために、基質と相互作用できる酵素のアミノ酸残基が限られているためと考えられる。

精製されたシアン分解酵素の活性の温度依存性およびpH依存性をそれぞれFig. 2-9、2-10に示す。これらの図から、本酵素の至適温度は約30℃であり、15℃でも30℃の活性の60%以上を保持している。しかし、35℃ではその活性が急に低下することが明らかとなった。また、この酵素の至適pHは7.5付近にあることがわかる。この値以上のpHでは

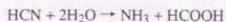


活性は低下し、pH 10ではシアンからアンモニアの発生は確認されなかった。

## 2-3-6 シアン分解に伴う生成物

AK61株によるシアンの分解では、反応に伴いアンモニアの発生が確認されているが、シアンの炭素に由来する生成物は確認されていない。そこで、この酵素によるシアンの分解に伴う生成物を検討した。シアン分解細菌として報告されている *P. fluorescens* NCIMB 11764、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 および *B. pumilus* C1 は、シアンの分解に伴いアンモニアと炭酸ガスまたはギ酸を生成することが報告されている。また、AK61株のシアンの分解は *P. fluorescens* NCIMB 11764 の代謝系と異なることが示唆されている。そこで、AK61株によるシアンの分解に伴う生成物としてギ酸に注目し、シアン分解後のギ酸の発生を確認した。

反応液中のギ酸濃度の定量は、ギ酸デヒドロゲナーゼを用いて、この酵素の反応に伴い増加する NADH を 340 nm の吸光度を測定することによって行った。しかしながら、高濃度の遊離シアンの存在下では、 $\text{NAD}^+$  はシアンと結合し、320 nm 付近に極大吸収を持つようになる(40)。そこで、反応液の初期シアン濃度を変えて反応終了後のギ酸とアンモニアの濃度を測定した。その結果を Fig. 2-11 に示す。アンモニアは、初期シアン濃度に対して比例的に発生していることがわかる。同様にギ酸濃度も初期シアン濃度に依存して増加し、シアン分解に伴う生成物がギ酸であることが確かめられた。これらの結果から、本酵素によるシアン分解反応は次の式のように進行すると考えられる。



この結果から、AK61株から精製された酵素は、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 および *B. pumilus* C1 から精製されているシアンジヒドラターゼと同様にシアンの加水分解を触媒することが明らかとなった(23, 31)。

これらのシアンジヒドラターゼを比較すると、いくつかの類似した性質を持ってい

ることが確かめられた。活性のある酵素の分子量はいずれも100 kDa以上であり、これらの酵素を構成するポリペプチドは、SDS-PAGEの結果から、38 kDa付近であることが確認されている。また、シアンに対する $K_m$ は、いずれも3 mM付近であり、A.

*xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3からのシアニダーゼのN末端のアミノ酸配列は、AK61株から精製された酵素のアミノ酸配列と相同性が高いことがわかった。

しかしながら、これらの酵素は、明らかに異なる性質も持っていることが明らかとなった。AK61株由来のシアンジヒドラターゼの至適温度は30℃であるのに対し、A. *xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3および*B. pumilus* C1由来の酵素は、それぞれ26℃と37℃であった(23, 31)。また、AK61株から精製されたシアンジヒドラターゼは、1種類のポリペプチドから構成されていることが確かめられているが、A. *xylosoxidans* subsp. *denitrificans*および*B. pumilus* C1から精製されたシアンジヒドラターゼはそれぞれ、少しづつ分子量の異なる2種類および3種類のポリペプチドからなると報告されている。AK61株から精製されたシアンジヒドラターゼのような1種類のポリペプチドからなる蛋白質は、その遺伝子のクローニングや大量発現系の構築を行う場合、数種類のポリペプチドから構成される蛋白質よりクローニングすべき遺伝子が短く、クローニングなどが容易に行うことができると考えられる。

## 2-4 結言

シアン分解細菌の単離とその細菌からシアン分解酵素の精製を行った。シアン分解細菌を単離するために、メッキ工場の排水を採取し、この排水から、シアン分解能を有する細菌AK61株を単離した。この細菌は、グラム陰性、非運動性の好気性桿菌であり、すでに報告されているシアン分解細菌とは異なる属であることが示された。AK61株によるシアンの分解は特別な補酵素等を必要とせず、また、そのシアン分解活性は、培養中のシアンの存在に関わらず誘導されていることが明らかとなった。これ

らの性質は、この細菌をシアンの生物処理プロセスに応用する場合に有利であると考えられた。しかし、AK61株が高濃度のシアンに対して感受性であることが示唆され、この細菌を用いて連続的な高濃度のシアンの処理は困難である可能性がある。

このAK61株から、シアン分解酵素が精製された。精製された酵素は、シアンを加水分解し、アンモニアとギ酸を生成するシアンジヒドラターゼであることが明らかとなった。この酵素は、約38 kDaのポリペプチドからなる分子量100 kDa以上の蛋白質であることが確認された。反応速度論的解析から、この酵素のシアンに対する $K_m$ および至適温度、至適pHが求められた。

この酵素は、*A. xylooxidans* subsp. *denitrificans*および*B. pumilus* C1から精製されたシアンジヒドラターゼとポリペプチドの分子量や酵素の分子量などの性質が類似していた。しかしながら、この酵素を構成するポリペプチドの種類がそれぞれ異なることが確かめられた。すなわち、*A. xylooxidans* subsp. *denitrificans*および*B. pumilus* C1由来のシアンジヒドラターゼは、それぞれ2種類および3種類のポリペプチドから構成されているのに対し、AK61由来の酵素は1種類のポリペプチドから構成されていた。本研究で精製された酵素は、1種類のポリペプチドから構成されているため、クローニングや大量発現系の構築などが容易であると考えられた。

AK61株が高濃度のシアンに対して感受性であることから、連続的な高濃度のシアン処理のプロセスには適当ではないと思われる。今後、シアンの生物処理プロセスを開発するためには、AK61株そのものを用いる系ばかりではなく、酵素を用いる系やシアンに非感受性の細菌にこの酵素を発現させて利用する系を構築していく必要がある。これらを実現するためには、シアンジヒドラターゼの機能解析および遺伝子のクローニングは不可欠である。

Table 2-1 Media.

1. Isolation medium

$K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	1 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g/l
$CaCl_2$	0.01 g/l
NaCl	0.01 g/l
$MnSO_4$	0.2 mg/l
$CuSO_4$	0.2 mg/l
$ZnSO_4$	0.2 mg/l
Glucose	2 g/l
Tryptone (Difco)	1 g/l
	adjusted at pH 7.6

2. TYG Agar

Tryptone	5 g/l
Yeast Extract	5 g/l
Glucose	1 g/l
$K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	1 g/l
Agar	17 g/l
	adjusted at pH 7.0

Table 2-2 Physiological tests for identification of strain AK61.

Tests	Results	Tests	Results
Gram stain	—	Growth with glucose	+
Shape	rod	arabinose	—
Spore	—	mannose	—
Mobility	—	mannitol	—
O/F test	o	N-acetylglucosamine	—
Oxidase	+	maltose	+
Catalase	+	gluconate	+
Nitrate reduction	+	caprate	+
Indole fermentation	—	adipate	+
Acid from glucose	—	malate	+
Arginine dihydrolase	—	citrate	+
Urease	—	phenylacetate	—
Hydrolysis of gelatin	—	Growth at 4°C	+
of esculin	—	at 41°C	+
$\beta$ -galactosidase	—		

Table 2-3 Purification of the cyanide-degrading enzyme from strain AK61.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit mg <sup>-1</sup> )	Yield (%)	Purification (fold)
Cell extract	164	182	1.11	100	1.00
DEAM	1.41	47.2	33.5	26.0	30.1
DEAE-TOYOPEARL 650	0.78	34.5	44.2	18.9	39.7
Hydroxyapatite	0.43	23.3	54.6	12.8	49.0

\*: 1 unit is the amount of enzyme which catalyzes the formation of 1  $\mu$  mol of ammonia for 1 min.

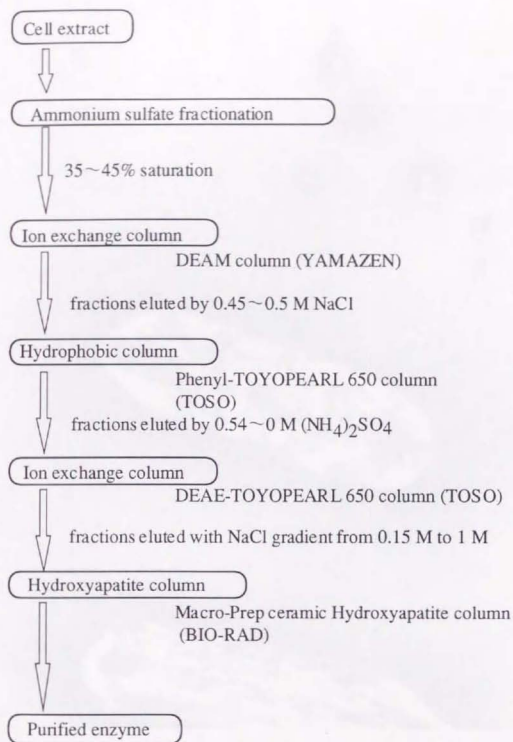


Fig. 2-1 Procedure for purification of the cyanide-degrading enzyme.



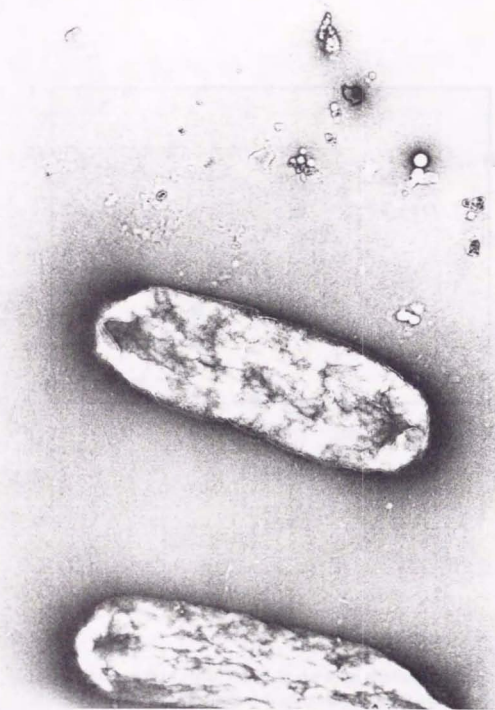


Fig. 2-2 Electron microscopy of strain AK61. Magnification,  $\times 30,000$ .

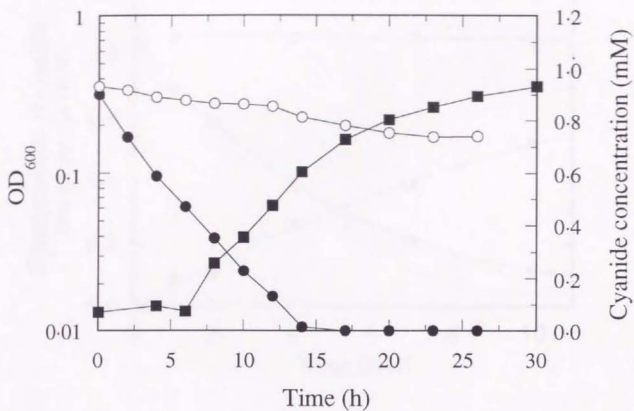


Fig. 2-3 Growth of strain AK61 in isolation medium including 1 mM cyanide. Symbols: ■, optical density; ●, cyanide concentration in growth medium; ○, cyanide concentration in control medium uninoculated.

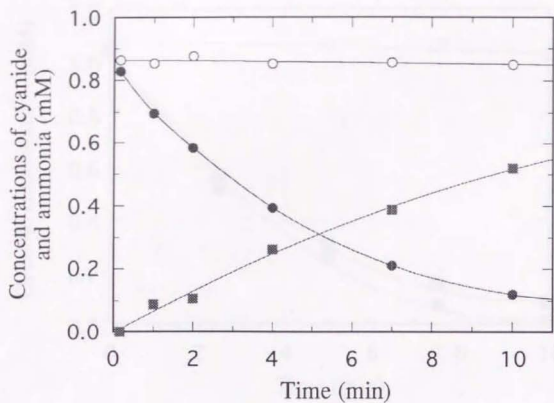


Fig. 2-4 Degradation of cyanide by whole cell. The reaction was carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) at 30°C. Symbols: ● and ■, cyanide concentration and ammonia concentration, respectively; ○, cyanide concentration in a control experiment.

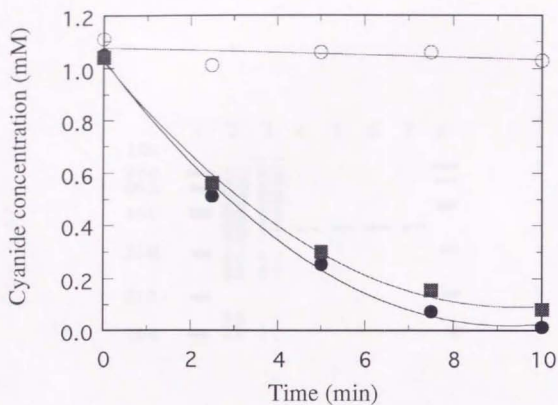


Fig. 2-5 Effect of cyanide on the induction of the cyanide-degrading activity of strain AK61. Symbols: ●, cell grown with 1 mM cyanide; ■, cell grown without cyanide; ○, control experiment without cell.



Fig. 2-6 SDS-PAGE of steps during the purification of the cyanide-degrading enzyme from strain AK61. Lanes: 1 and 8, molecular mass standards (rabbit muscle phosphorylase b, bovine serum albumin, hen egg white ovalbumin, bovine carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor and hen egg white lysozyme); 2, cell extract; 3, salt-out; 4, DEAM elute; 5, Phenyl-TOYOPEARL elute; 6, DEAE-TOYOPEARL elute; 7, Hydroxyapatite elute.

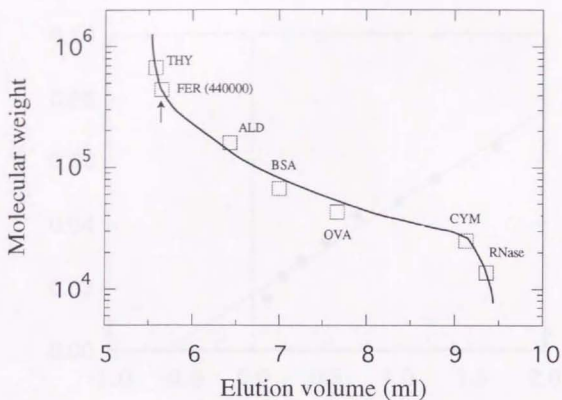


Fig. 2-7 Size determination of active form of the cyanide-degrading enzyme. Molecular weight standards were ribonuclease A (RNase), chymotrypsinogen A (CYM), ovalbumin (OVA), bovine serum albumin (BSA), aldolase (ALD), ferritin (FER) and thyroglobulin (THY). Arrow shows elution volume for the cyanide-degrading enzyme.



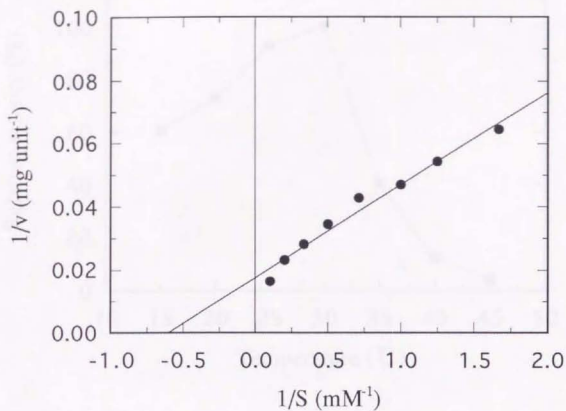


Fig. 2-8 Lineweaver-Burk plot for cyanide degradation by the purified cyanide-degrading enzyme. Reactions were carried out in 1.4 ml of 50 mM phosphate buffer containing  $2 \mu\text{g}$  enzyme and various concentrations of cyanide at  $30^\circ\text{C}$ .

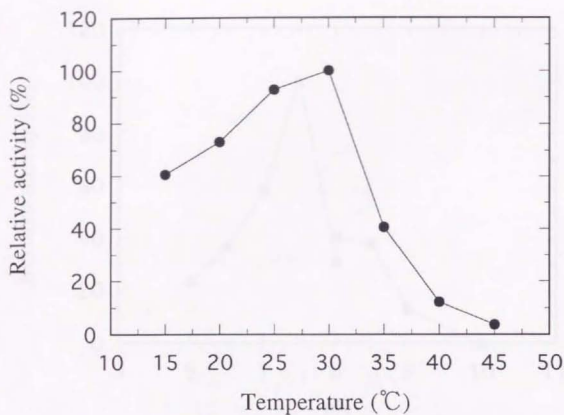


Fig. 2-9 Temperature optimum for the cyanide-degrading enzyme from strain AK 61. Assays were carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 2  $\mu$ g enzyme and 10 mM cyanide.

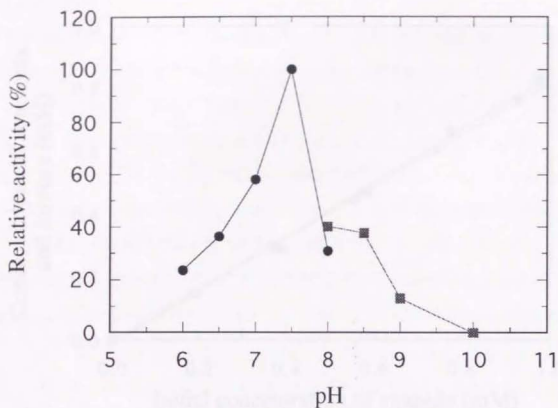


Fig. 2-10 pH optimum for the cyanide-degrading enzyme from strain AK61. Assays were carried out in 50 mM phosphate (●) or sodium borate (■) buffer containing  $2 \mu\text{g}$  enzyme and 10 mM cyanide at  $30^\circ\text{C}$ .

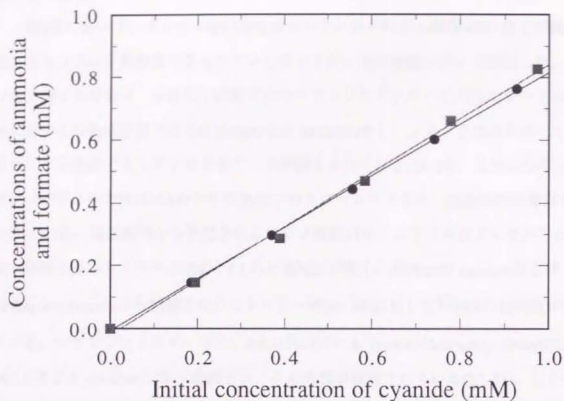


Fig. 2-11 Production of formate and ammonia after degradation of various concentrations of cyanide by the purified enzyme. Reactions were carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) with various concentrations of cyanide at 30°C for 30 min. Symbols: ■, ammonia concentration; ●, formate concentration.

### 第3章 シアン分解酵素の遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

#### 3-1 緒言

第2章において、メッキ工場の排水からシアンを分解する細菌AK61株を単離し、それからシアン分解酵素であるシアンジヒドラターゼの精製について報告した。シアンを分解する酵素は、本研究で精製されたシアンジヒドラターゼ以外にシアン生成植物に対する植物病原菌である *G. Sorghit* と *F. lateritium* から、シアンを加水分解してホルムアミドを生成するシアンヒドラターゼが報告されている(28, 29)。これらのうち、シアンヒドラターゼはcDNAからその遺伝子がクローニングされ、塩基配列が報告されている(29, 30)。塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、ニトリルをアンモニアと酸に加水分解するニトリラーゼ (EC 3.5.5.1) と相同性が高く、*Klebsiella ozaenae* および *Alcaligenes faecalis* から精製されたニトリラーゼ(41-44)に対して約35%の相同性が示されている。シアンジヒドラターゼは、AK61株以外に *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 および *B. pumilus* C1 から精製され、その性質が検討されている(23, 31)。しかしながら、これらのシアンジヒドラターゼについては、その遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定は行われていない。

シアンの生物処理にシアン分解酵素を応用するためには、酵素の性質を明らかにするとともに塩基配列を含めた詳しい機能解析を行う必要がある。また、今後、酵素を利用した生物処理プロセスを開発していくためには、大量に酵素を調製できる酵素の発現系の構築が必要となってくる。そこで、AK61株のゲノム遺伝子からシアンジヒドラターゼの遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定を行うことを目的とした。

### 3-2 実験方法

#### 3-2-1 宿主とベクター

シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニングの宿主として、*E. coli* XL1-Blue MRF( $\Delta$  (*mcrA*)183  $\Delta$  (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [*F' proAB lacI<sup>f</sup>Z*  $\Delta$  M15 Tn10(*Ter<sup>f</sup>*)] ) (Stratagene Inc.)および*E. coli* XL0LR ( $\Delta$  (*mcrA*)183  $\Delta$  (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [*F' proAB lacI<sup>f</sup>Z*  $\Delta$  M15 Tn10(*Ter<sup>f</sup>*)]  $\lambda^+$  Su)(Stratagene Inc.)を用いた。また、クローニング用のベクターとして、プラスミド pBK-CMV(Stratagene Inc.)を使用した。

#### 3-2-2 シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の決定

第2章で示した方法でAK61株からシアンジヒドラターゼを精製した。精製した酵素(0.1 mg)を0.4  $\mu$ g リシルエンドペプチダーゼ(Takara shuzou)によって消化した。反応は、0.1% SDSを含む40 mM Tris-HCl (pH 9.0)中で、37°Cで6 h行った。消化されたペプチドをトリシンSDS-PAGEによって分離した。トリシンSDS-PAGEは、Schaggerらの方法に従って16%アクリルアミドゲルを用いて行った(45)。この分離したペプチドをフッ化ボリビニリデン(PVDF)膜(Immobilon-PSQ; MILLIPORE)にトランスファーし、0.2% Coomassie brilliant blue R250で染色した。分離された各ペプチド断片についてN末端のアミノ酸配列をエドマン分解を利用したアミノ酸シーケンサー(LF3000 Protein Sequencer; BECKMAN)を用いて決定した。

#### 3-2-3 プローブの作成

シアンジヒドラターゼの決定されたアミノ酸配列のうち、Ala-His-Tyr-Pro-Lys-Phe-Lys-AlaとMet-Gln-Val-Ser-Val-Ala-Glu-Glnの配列をもとにして、それぞれ5'-GC(C/G)CAGTACCC(C/G)AAGTTCAA(A/G)G-3'と5'-(C/G)TC(C/G)GC(C/G)AC(C/G)GA(C/



G)AC(A/G)CGCAT-3'のプライマーを合成した。

これらのプライマーを用い、AK61のゲノム遺伝子を鋳型としてポリメラーゼチェインリアクション(PCR)を行った。PCRは、94℃で1 minの変性、50℃で1 minのアニーリング、72℃で1 minの伸長反応のサイクルを30回行った。なお、AK61株のゲノム遺伝子は、Sambrookらの方法に従って調製した(46)。増幅された遺伝子断片をGeneclean II Kit (BIO 101, Inc.)を用いて精製し、ジゴキシゲニン-dUTP(DIG DNA Labeling Mix 10x konz.; Boehringer Mannheim GmbH)を含むdNTPを用いて、上記の条件で再びPCRを行いジゴキシゲニンで標識されたプローブを作成した。

### 3-2-4 シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニング

シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニング方法をFig. 3-1に示す。AK61株のゲノム遺伝子をSall、KpnIおよびSacIで消化し、上記のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、0.1% SDSを含む2× SSC (0.3 M NaCl, 30 mMクエン酸ナトリウム)中で、37℃で5 h行った。プローブとハイブリダイゼーションの検出は、DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim GmbH)を用いて行った。Sallを用いて消化されたゲノム遺伝子の断片のうち、ハイブリダイゼーションによって検出された遺伝子断片をGeneclean II Kitを用いて回収した。回収した遺伝子断片をあらかじめSallで消化したZAP express(Stratagene, Inc.)に挿入した。遺伝子断片のZAP expressへの連結は、Ligation Kit ver. 2 (Takara shuzou)を用いて行った。遺伝子断片を挿入したZAP expressをGigapackII XL (Stratagene, Inc.)を用いてλファージを形成させ、*E. coli* XL1-Blue MRF'に感染させた。得られたライブラリから、目的の遺伝子が挿入されたZAP expressを選択するために、ジゴキシゲニンで標識したプローブを用いてブラークハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは上記した条件で行い、このブラークから、シアンジヒドラターゼ遺伝子を含むZAP expressを回収し、は*E. coli* XL0LRに感染させた。さらにヘルパーファージ(ExAssist: Stratagene,

Inc.)も感染させることによって *in vivo* でpBK-CMVへ切り出しを行った。

### 3-2-5 シアンジヒドラターゼ遺伝子のサブクローニング

pBCH3から、シアンジヒドラターゼ遺伝子をサブクローニングするために、クローニングされた遺伝子のEcoRIサイトとpBK-CMV由来のPstIサイトによって切り出される3.2 kbの遺伝子断片をpBK-CMVのEcoRIサイトとPstIサイトに挿入したプラスミドpBCHD0を作成した(Fig. 3-2)。このプラスミドを用いて、シアンジヒドラターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

### 3-2-6 塩基配列の決定

pBK-CMV中にクローニングされたシアンジヒドラターゼ遺伝子は、pBK-CMVにサブクローニングされ、その塩基配列を決定した。塩基配列は、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia Biotech)を用いてジデオキシ法によって決定した(47)。塩基配列の決定は、Fig. 3-2に示すようにシアンジヒドラターゼ遺伝子のセンス鎖、アンチセンス鎖双方について決定した。

## 3-3 結果および考察

### 3-3-1 シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の決定

シアンジヒドラターゼ遺伝子をスクリーニングするためには、シアンジヒドラターゼ遺伝子に相補的なプローブが必要である。このプローブを作成するために、ここでは、AK61株のゲノム遺伝子を鋳型としてPCRによって増幅される遺伝子断片を利用した。まず、このPCRを行うために必要なプライマーを合成するために、シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の一部の決定を試みた。ここでは、精製したシアンジヒドラターゼのN末端およびリシルエンドペプチダーゼによる消化によって得られたペプチド断片のN末端のアミノ酸配列を決定した。この結果、シアンジヒドラターゼのN末端の

アミノ酸配列としてAla-His-Tyr-Pro-Lys-Phe-Lys-Ala-Ala-Ala-Val-Gln-Ala-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Asn-Asp-Ala-Thr-Val-Glu、内部のアミノ酸配列としてLeu-Val-Ala-Phe-Glu-Ala-Phe-Ile-Phe-Gly-Tyr-Pro-Trp-Phe-Ala-Phe-Leu-Leu-Gly-His-Pro-Glu-Tyr-Thr-Arg-Arg-Phe-Tyr-His-Tyr-Leu-Asn-Ala-Val-GluおよびMet-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Glu-Arg-Leu-Cys-Trp-Gly-Aspの2種類が決定された。

### 3-3-2 シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニング

3-3-1で決定した配列うち、縮重の少なく繰り返しの少ないアミノ酸配列を用いてPCR用のプライマーを合成した。ここでは、N末端のアミノ酸配列のAla-His-Tyr-Pro-Lys-Phe-Lys-AlaとMet-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Glu-Argの配列から5'-GC(C/G)CAGTACCC(C/G)AAGTTCAA(A/G)G-3'および5'-(C/G)TC(C/G)GC(C/G)AC(C/G)GA(C/G)AC(A/G)CGCAT-3'のプライマーを合成した。このプライマーを用い、AK61株のゲノム遺伝子を鋳型としてPCRを行ったところ、約400 bpの遺伝子断片の増幅が確認された(Fig. 3-3)。この増幅した遺伝子断片の塩基配列を一部決定した(Fig. 3-4)。決定された塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、3-3-1で決定したアミノ酸配列を含んでいることが確かめられ、この増幅した遺伝子断片がシアンジヒドラターゼの遺伝子の一部であることが明らかとなった。

この増幅した遺伝子断片をプローブとして、*SaII*、*KpnI*および*ScaI*で消化したAK61株のゲノム遺伝子に対してそれぞれサザンハイブリダイゼーションを行った。標識したプローブは*KpnI*および*ScaI*によって消化したゲノム遺伝子に対して、19 kb以上の断片とハイブリダイゼーションした。これは、シアンジヒドラターゼ遺伝子付近には*KpnI*および*ScaI*の制限酵素サイトがないことを示している。また、*SaII*で消化したゲノム遺伝子に対しては、6.1 kb付近の断片および19 kb以上の断片とハイブリダイゼーションすることが確かめられた(Fig. 3-5)。プローブとハイブリダイゼーションした19 kb以上の断片は、*SaII*による消化が不十分であったために未消化の*SaII*サイトが存在していたた

めと考えられる。非常に長い遺伝子断片のクローニングは困難であるので、シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニングには *SaII* の消化して得られた 6.1 kb 付近の遺伝子断片を用いた。*SaII* で消化して得られた 6.1 kb 付近の遺伝子断片を回収し、ZAP express に挿入してライブラリを作成した。この ZAP express のライブラリからシアンジヒドラターゼ遺伝子を含んだものをブラックハイブリダイゼーションによって選択した。さらに、回収したシアンジヒドラターゼ遺伝子を含む ZAP express から、ヘルパーファージを用いて pBK-CMV へ切り出しを行い、シアンジヒドラターゼ遺伝子を含む約 6.1 kb の遺伝子断片が挿入されたプラスミド pBCH3 を作成した。

作成された pBCH3 は、挿入された AK61 株のゲノム遺伝子の断片は 6.1 kb と長いので、このプラスミドの取り扱いは不便である。そこで、この pBCH3 から、シアンジヒドラターゼ遺伝子をサブクローニングを行った。サブクローニングを行うために、pBCH3 を *EcoRI* と *PstI* によって消化し、得られた遺伝子断片を pBK-CMV の *EcoRI* サイトと *PstI* サイトの間に挿入した。このように作成したプラスミド pBCHD0 を塩基配列の決定などに用いた。

### 3-3-3 シアンジヒドラターゼ遺伝子の塩基配列の決定

プラスミド pBCHD0 を用いて、シアンジヒドラターゼ遺伝子を含む 1,224 bp の塩基配列を決定した (Fig. 3-6)。この塩基配列中には、メチオニンを開始コドンとし、TAA を終止コドンとする 334 のアミノ酸に相当する読みとり枠 (ORF) が確認される。この塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、精製したシアンジヒドラターゼから決定されたアミノ酸配列を含んでおり、決定された塩基配列がシアンジヒドラターゼ遺伝子の塩基配列であるといえる。また、このアミノ酸配列からシアンジヒドラターゼを構成するポリペプチドの分子量は、37,518 kDa であると求められた。この分子量は、SDS-PAGE によって求められたシアンジヒドラターゼのポリペプチドの分子量と近い値である。また、この ORF の 9 bp 上流には、リボソーム結合部位である Shine-Dalgarno 配列 (SD 配列)

に相同性の高い配列も確認できる(48)。しかしながら、シアンジヒドラターゼ遺伝子の  
上流の領域にはプロモーターと思われる塩基配列は確認できなかった(49)。

AK61株のシアン分解活性の誘導から、この酵素の遺伝子の発現はシアンによって誘  
導されないことが明らかとなっている。しかし、この酵素がある一連の代謝系に属し、  
この遺伝子があるオペロン上に存在しているかについては、今回の塩基配列の結果か  
らは明らかにされていない。これについて考察するためには、さらにこの遺伝子の前  
後の塩基配列の決定が必要である。

### 3-3-4 シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の相同性

決定された塩基配列から予想されるアミノ酸配列に対して相同性の蛋白質を検索し  
たところ、ニトリラーゼ(41-44, 50-55)およびシアンヒドラターゼに対して相同性が高  
いことが明らかとなった。これらのうち、シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列を  
*Rhodococcus rhodochrous* K22由来のアリファティックニトリラーゼ(50-52)および  
*lateritium*由来のシアンヒドラターゼ(30)のアミノ酸配列とFig. 3-7に比較した。AK61株  
由来のシアンジヒドラターゼは、アリファティックニトリラーゼおよびシアンヒドラ  
ターゼとそれぞれ、35.1%および26.4%のアミノ酸配列の相同性がみられた。これらの  
酵素のアミノ酸配列を比較すると、特にN末端付近および内部の領域で高いアミノ酸配  
列の一致が観察される。しかしながら、C末端の領域(286-334)では、アミノ酸配列はほ  
んど保存されていない。シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列には、6個のシ  
ステイン残基が確認されるが、これらのシステイン残基のうちCys-163のみアリファ  
ティックニトリラーゼおよびシアンヒドラターゼに保存されていることがわかる。他  
のシステイン残基は、相同性の低い領域に分散している。

Kobayashiらは、部位特異的変異によってアリファティックニトリラーゼのCys-170が、  
このニトリラーゼの反応に重要な役割を果たしていることを示している(50)。また、*R.*  
*rhodochrous* J1由来のニトリラーゼについても同様の結果が得られている(53)。これらの



ニトリラーゼのアミノ酸配列とシアンジヒドラターゼのアミノ酸配列の比較から、シアンジヒドラターゼに含まれる6個のシステイン残基のうち、Cys-163がアリファティックニトリラーゼのアミノ酸配列(Cys-170)に保存されていることが確かめられた。シアンジヒドラターゼでも、このCys-163が反応の重要な機能を果たしている可能性がある。ニトリラーゼとシアンジヒドラターゼは加水分解を触媒する基質は異なるものの、その反応はよく似ている。また、いくつかのアミノ酸配列の領域で相同性の高い配列が確認されており、これらの酵素は類似した反応機構によって基質の加水分解を触媒している可能性がある。

シアンをホルムアミドに加水分解するシアンヒドラターゼは、植物病原菌である糸状菌(*G. sorghi*, *F. lateritium*) から精製され、その塩基配列が決定されている(29, 30)。これらのうち、*F. lateritium*からのシアンヒドラターゼとは、26.4%の相同性がみられた。本酵素とシアンヒドラターゼの相同性の高い領域は、ニトリラーゼと相同性の高い領域に集中し、それ以外の領域で両者の特徴的な相同性はみられなかった。また、シアンヒドラターゼは、シアンジヒドラターゼのCys-163に相当するシステイン残基を保存しており、このシステイン残基の酵素反応への関与が予想される。これらの酵素の反応の差は、酵素の活性部位でのアミノ酸残基の立体的な配置の差によって生じると思われる。これについて詳しく検討するためには、今後、立体構造などの解析が必要である。

### 3-4 結言

第2章で単離したシアン分解細菌AK61株のゲノム遺伝子から、シアンジヒドラターゼの遺伝子のクローニングおよびその塩基配列の決定を行った。AK61株のゲノム遺伝子から、6.1 kbの遺伝子断片をクローニングしたpBCH3を構築し、さらにこの遺伝子断片のうち3.1 kbをサブクローニングしたpBCHD0を作成した。このpBCHD0を用いて、シアンジヒドラターゼ遺伝子を含む1,224 bpの塩基配列を決定した。シアンジヒドラ



ターゼの推定されるアミノ酸配列から、本酵素のポリペプチドの分子量が37,518 Daであることが求められた。また、本酵素のアミノ酸配列が、シアンヒドラターゼやニトリラーゼと相同性が高いことも確認された。

シアンジヒドラターゼは、AK61株以外で *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 および *B. pumilus* C1 から精製されているが、これらの細菌からシアンジヒドラターゼの遺伝子をクローニングに関する報告はない。すなわち、シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニングは、本研究が初めてであるといえる。

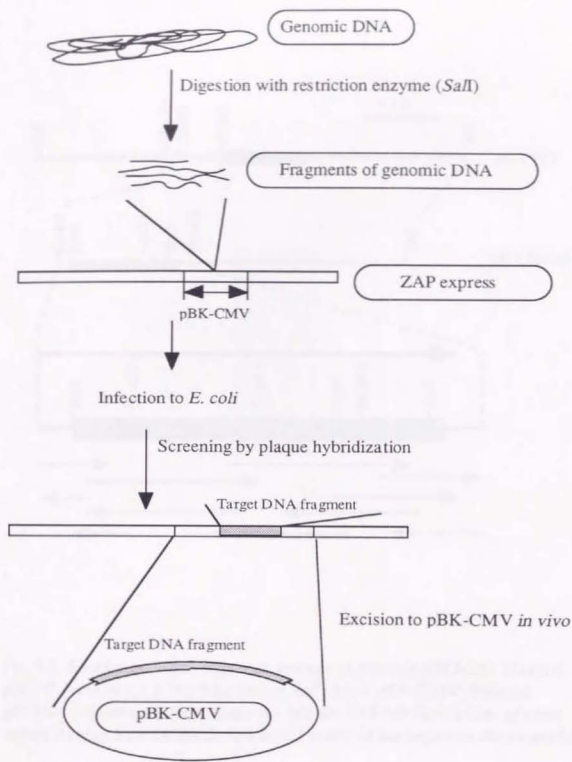


Fig. 3-1 Procedure for cloning of the gene encoding cyanide dihydratase.

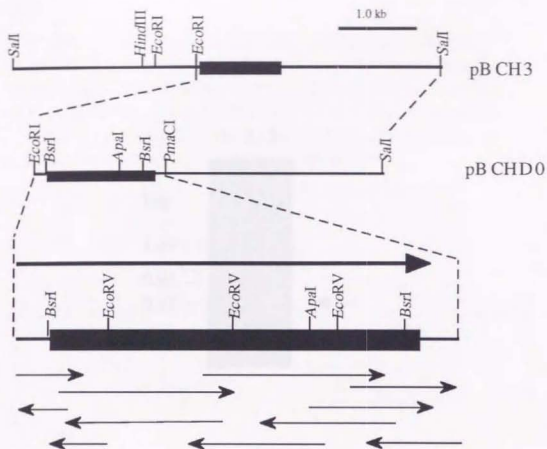


Fig. 3-2 Restriction maps, sequence strategy of plasmid pBCHD0. Plasmid pBCH3 contains a 6.1 kbp fragment at *SalI* site of pBK-CMV. Plasmid pBCHD0 contains a 3.2 kbp fragment into the *SalI* and *EcoRI* sites of same vector. Arrows indicate the direction and extent of the sequence determination.

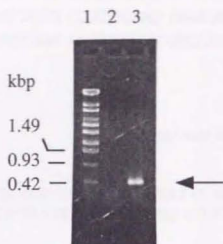


Fig. 3-3 PCR product from the genomic DNA of strain AK61. Lane: 1, DNA marker; 2, control experiment; 3, PCR product with genomic DNA as the template.

CCTXTTATC TGAATCTGGA CGCAACTXTC GAGAAGTGG TGAACITXAT  
 CGAAGAAGCT GCATCGAAG GTGCCAAGCT AGTGGCGTTC CCGGAGGCAT  
 TTATTCCGGG ATATCCATGG TTCGCATTCC TTGGACATCC GGAATACACA  
 AGGCGGTTC ATCACACACT CTATCTGAAC GCAGTCGAGA TTCCGAGOGA  
 GGCCTGCCAG AAGATCAGTG CGGCAGCGAG AAAAGAACAA AGXTTTACGX  
 CTXTTATTTC CTGTAGOGAG AAGGCGGGTG GTCXXTCTXC



Amino acid sequence

PXYLNLDATX EKSVKLIEEA ASNGAKLVAF PEAFIPGYPW FAFLGHPEYT  
 SRFYHTLYLN AVEIPSEAVQ KISAAASKEQ SFTXXISCSE KAGGXS

Fig. 3-4 Nucleotide sequence of PCR product and its putative amino acid sequence. Under lines show the amino acid sequences which were determined from the purified cyanide dihydratase.

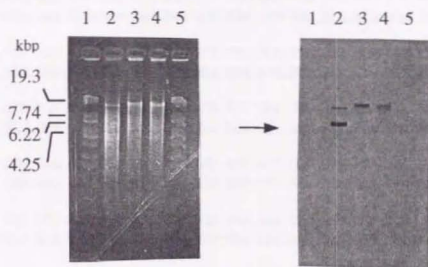


Fig. 3-5 Southern hybridization of the genomic DNA from strain AK61. The genomic DNA was digested with *SalI* (2), *KpnI* (3) or *SacI* (4), electrophoresed in 1% agarose gel, transferred onto PVDF membrane and hybridized to digoxigenin-labeled DNA probe. Lane 1 and 5 are DNA markers.



EcoRI

GAATTCAGGTACAGTTTACCTTGAGCATGGATGGGCATCAAAACGGGCACTGCTCGAAGGA 59  
 TCGTGTTCCGGCACTGTTGGGGGGTAAGCGATCTCACTTCAAAATGACAATCAGGGAGACTGG 122

Bst

SD

ATC ATG GCG CAT TAC OCT AAA TTC AAG GGT GCG GCA GTA CAG GCA GCA 170  
Met Ala His Tyr Pro Lys Phe Lys Ala Ala Val Gln Ala Ala

OCT GTT TAT CTG AAT CTG GAC GCA ACT GTC GAG AAG TCG GTG AAA CTG 218  
Pro Val Tyr Leu Asn Leu Asp Ala Thr Val Glu Lys Ser Val Lys Leu

ATC GAA GAA GCT GCA TCG AAC GGT GGC AAG CTA GTG GCG TTC CCG GAG 266  
Ile Glu Glu Ala Ala Ser Asn Gly Ala Lys Leu Val Ala Phe Pro Glu

GCA TTT ATT CCG GGA TAT CCA TGG TTC GCA TTC CTT GGA CAT CCG GAA 314  
Ala Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Trp Phe Ala Phe Leu Gly His Pro Glu

TAC ACA AGG CCG TTC TAT CAC ACA CTC TAT CTG AAC GCA GTC GAG ATT 362  
Tyr Thr Arg Arg Phe Tyr His Thr Leu Tyr Leu Asn Ala Val Glu Ile

CCG AGC GAG GCT GTC CAG AAG ATC AGT GCG GCA GCG AGA AAG AAC AAG 410  
Pro Ser Glu Ala Val Gln Lys Ile Ser Ala Ala Ala Arg Lys Asn Lys

ATT TAC GTC TGT ATT TCC TGT AGC GAG AAG GAC GGT GGT TCG CTC TAC 458  
Ile Tyr Val Cys Ile Ser Cys Ser Glu Lys Asp Gly Gly Ser Leu Tyr

CTT GCG CAG CTC TGG TTC AAT CCG GAA GGG GAT CTG ATC GGC AAA CAC 506  
Leu Ala Gln Leu Trp Phe Asn Pro Glu Gly Asp Leu Ile Gly Lys His

CGC AAG ATG CGC GTG TCC GTC GCG GAG CGC CTT TGT TGG GGC GAT GGC 554  
Arg Lys Met Arg Val Ser Val Ala Glu Arg Leu Cys Trp Gly Asp Gly

AAT GGC AGC ATG ATG CCG GTG TTC GAG ACG GAA ATC GGT AAT CTC GGA 602  
Asn Gly Ser Met Met Pro Val Phe Glu Thr Glu Ile Gly Asn Leu Gly

GGC CTG ATG TGC TGG GAA CAC AAT GTG OCT CTG GAT ATC GCT GCG ATG 650  
Gly Leu Met Cys Trp Glu His Asn Val Pro Leu Asp Ile Ala Ala Met

AAC TCA CAG AAC GAG CAG GTT CAT GTG GCT GCA TGG CCC GGA TTC TTC 698  
Asn Ser Gln Asn Glu Gln Val His Val Ala Ala Trp Pro Gly Phe Phe

GAC GAT GAA ACA GCA AGC AGC CAC TAC GCA ATC TGC AAT CAG GCG TTC 746  
Asp Asp Glu Thr Ala Ser Ser His Tyr Ala Ile Cys Asn Gln Ala Phe

GTG CTG ATG ACG TCG TOC ATC TAT TCA GAA GAA ATG AAG GAC ATG CTG 794  
 Val Leu Met Thr Ser Ser Ile Tyr Ser Glu Glu Met Lys Asp Met Leu  
  
 TGC GAG ACG CAG GAA GAG AGA GAT TAC TTC AAC ACA TTC AAA AGC GGT 842  
 Cys Glu Thr Gln Glu Glu Arg Asp Tyr Phe Asn Thr Phe Lys Ser Gly  
  
 CAC ACC AGG ATC TAT GGG CCC GAT GGC GAG CCG ATC AGC GAT CTG GTC 890  
 His Thr Arg Ile Tyr Gly Pro Asp Gly Glu Pro Ile Ser Asp Leu Val  
  
 CCC GCC GAA ACG GAA GGA ATC GCC TAT GCC GAG ATC GAT ATC GAG AAG 938  
 Pro Ala Glu Thr Glu Gly Ile Ala Tyr Ala Glu Ile Asp Ile Glu Lys  
  
 ATC ATC GAC TTC AAA TAC TAT ATC GAT CCG GTA GGG CAT TAT TOC AAT 986  
 Ile Ile Asp Phe Lys Tyr Tyr Ile Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Asn  
  
 CAA AGC CTG AGC ATG AAT TTC AAT CAG AGC CCC AAT CCG GTT GTG AGA 1034  
 Gln Ser Leu Ser Met Asn Phe Asn Gln Ser Pro Asn Pro Val Val Arg  
  
 AAG ATT GGT GAA AGG GAC AGT ACC GTC TTC ACT TAT GAC GAT CTG AAT 1082  
 Lys Ile Gly Glu Arg Asp Ser Thr Val Phe Thr Tyr Asp Asp Leu Asn  
  
 CTG TCA GTC AGC GAT GAA GAG CCA GTC GTT CCG AGC TTG CCG AAG TAA 1130  
 Leu Ser Val Ser Asp Glu Glu Pro Val Val Arg Ser Leu Arg Lys \*\*\*  
  
 TTTTCTTGCGCGTGATGTCATGGTGCGGTGAGGAAAGCATGCTTTTCTCTCTCAAGA 1193  
 TGCTGATTTTGCCCATGCGGGACGATTGCG 1224

Fig. 3-6 Nucleotide sequence of the cyanide dihydratase gene from strain AK61. A relevant stop codon is indicated by asterisks. The underlined amino acid sequences were determined by Edman degradation. Potential ribosome-binding sequence are marked as SD.

cdh	-----MAHY PKFKAAAVQA APVYLNLDAE VEKSVKLEIE AASNGAKLVA FPEAFIPGYP	54
aln	MSSNPGLKYT GKVKVATVQA EPVILDADAT IDKAIGFIEE AAKNGAEFLA FPEVWIPGYP	60
chy	-----MAI TKYKAAAVTS EPGWFDLEGG VRKTIIDFINE AGEAGCKEVA FPEVWIPGYP	53
	* * * * *	
cdh	WFAFLGHPEY -TRRFYHTLY LNAVEIPSEA VQKISAAARK NKIYVCISCS EKDGGSLYLA	113
aln	YWAWIGDVKN AVSDFIPKYH ENSLTGLGDDR MRRLQLAARQ NNIALVVMGYS EKDGAASRYS	120
chy	YMWKVTYLLQ -SLPMLKRYR ENSMAVDSEE MRIRRAARD NQIFVSLGFS EIDHATLYLS	112
	* * * * *	
cdh	QLWNPPEGDL IGKHKRMVRS VAERLCWGDG NGSMMPV--F ETEIGNLGGL MCWEHNVPLD	171
aln	QVFIDQNGDI VANRRKLKPT HVERTIYGEG NGTDFLT--H DFGFGRVGGGL NCWEHFQPLS	178
chy	QVLIGPDGAR HQPPPDQAP LMLRSSPTVM DPVTPSCLSV RLRLAASQGL NCWENMNPFL	172
	* * * * *	
cdh	IAAMNSQNEQ VHVAAWPGFF DDETASS--- ----HVAICN QAFVLMTSSI	214
aln	KYMMYSLNEQ IHVASWPAMF ALTPDVHQLS ----VEAND TVTRSYAIEG QTFVLASTHV	233
chy	KSLNVSAGEQ VHVAAWPVYP GRSARFTPTL LPTMPIQPLT WLLLSMLSRL ARGLLLPSSV	232
	* * * * *	
cdh	YSEEMKMLC ETQEERDYFN TFKSGHTRIY GPDGEPISDL VPAETEGIAY AEIDIEKIID	274
aln	IGKATQDLFA GDDDAKRAL PLGQGWARIY GPDGKSLAEP LPEDAEGLLY AELDLEQIIL	293
chy	SRLEGLKINT PEGVEPETDP SVYNGHARIY RPDGSLV-VK PEKDFDGLLF VDIDLNECHL	291
	* * * * *	
cdh	FKYYIDPVGH YSNQSLSMNF NQSPNPVVRK IGERDSTVFT YDDLNLVSVD EEPVVRSLRK	334
aln	AKAAADPAGH YSRPDVLSLK IDTRNHTPVQ YITADGRTSL NSNSRVENYR LHQLADIEKY	353
chy	TKVLADFAGH YMRPDLIRLL VDTRRKKLIT EADPNGSIAT YSTRQLGLD SLFRRRREMR	351
	* * * * *	
cdh	-----	
aln	ENAEAAATLPL DAPAPAPAPE QKSGRAKAEA	383
chy	QLTCSE----	357

Fig. 3-7. Comparison of the deduced amino acid sequence of the cyanide dihydratase (cdh) from strain AK61 with the aliphatic nitrilase (aln) from *R. rhodochrous* K22 and the cyanide hydratase (chy) from *F. lateritium*. Identical residues are indicated by asterisks, and similar amino acids are indicated by dots (A=S=T=G=P, D=E=N=Q, R=K=H, I=L=M=V, F=Y=W).

## 第4章 シアン分解酵素の大量発現系の構築

### 4-1 緒言

微生物由来のシアン分解酵素は、第1章に示したように、シアンジヒドラターゼおよびシアンヒドラターゼが報告されている。シアンジヒドラターゼについては、本研究で単離されたAK61株以外では、*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3および*B. pumilus* C1の2種類の細菌から精製されている。しかしながら、これらの細菌からは、シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定は行われてはいない。シアンヒドラターゼの精製は、*G. sorghi*と*F. lateritium*の2種類の糸状菌について行われ、その遺伝子のクローニングと塩基配列が決定されている(28, 29)。同時にClunessらは、*F. lateritium*のcDNAからクローニングしたシアンヒドラターゼ遺伝子を発現用ベクターであるpGEX-2Tに挿入し、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として*E. coli*中で発現を試みている(29)。この結果、グルタチオン S-トランスフェラーゼの一部(26 kDa)と融合した66 kDaのポリペプチドの発現が確認されている。しかし、この発現した蛋白質にはシアン分解活性は確認されなかった。このように、シアンを加水分解する酵素の発現系の構築は、まだ成功したとはいえない。

第3章において、AK61株のゲノム遺伝子から、シアンジヒドラターゼ遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定された。そこで、このクローニングされたシアンジヒドラターゼ遺伝子を用いてシアンジヒドラターゼの発現系の構築を試みた。発現系を構築する宿主としては、シアンの生物処理に応用するためにはシアンに非感受性の細菌が好ましいが、ここでは発現用のベクターが数多くあり一般的に使用されている宿主である*E. coli*を用いた。

## 4-2 実験方法

### 4-2-1 シアンジヒドラターゼの大量発現系の構築

シアンジヒドラターゼ遺伝子の発現を行うために、pKK223-3(Pharmacia Biotech)をベクターとして使用した。pKK223-3のtacプロモーター下流にあるマルチクローニングサイトのEcoRIとPstIサイトにpBCHD0のBsrIおよびPstI(PstIサイトは、シアンジヒドラターゼ遺伝子のpBK-CMVのマルチクローニングサイト由来)によって切り出された遺伝子を挿入し、*E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>に形質転換した(Fig. 4-1)。

### 4-2-2 シアンジヒドラターゼの発現

酵素の発現は、形質転換した*E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>をアンピシリン( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ )を含むLB培地(Tryptone  $10 \text{ g l}^{-1}$ , Yeast extract  $5 \text{ g l}^{-1}$ , NaCl  $10 \text{ g l}^{-1}$ ) 50 ml中で37℃で振盪培養した。培養液のOD<sub>600</sub>が0.6付近に達したら、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトシド (IPTG)を1 mMになるように添加してさらに4 h振盪培養し、酵素の発現を行った。

### 4-2-3 シアンジヒドラターゼの精製

シアンジヒドラターゼを発現した*E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>は、2-2-3に示した方法で洗浄、破碎し、細胞抽出液を調製した。調製された細胞抽出液をFig. 4-2に示すような方法で精製を行った。まず、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の結晶を細胞抽出液に添加して飽和溶解度35%にし、遠心によってその上清みを回収した。さらに(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を飽和溶解度の47.5%に達するまで添加し、その沈殿を遠心によって回収した。回収した沈殿を50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)に溶解し、0.4 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で平衡化したDEAMカラムに負荷した。カラムに吸着した蛋白質を0.5 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で溶出した。溶出液に2倍量の1 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を添加し、1 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したDEAE-TOYOPEARL650カラムに負荷した。吸着した蛋白質を0~1 M NaCl



の勾配によって溶出した。活性のある分画を回収して、0.3 M NaCl/1 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに添加した。リン酸濃度1 mM~250 mMの勾配によって溶出し、シアン分解活性のある分画を精製したシアンジヒドラターゼとした。

#### 4-2-4 シアンジヒドラターゼの活性測定

シアンジヒドラターゼの活性測定は2-2-5の方法に従って行った。

#### 4-2-5 至適温度および至適pH

*E. coli*中で発現したシアンジヒドラターゼについての至適温度および至適pHの検討は、2-2-6に示す方法に従って行った。

#### 4-2-6 基質特異性

シアンジヒドラターゼの基質特異性を検討するために、アセトニトリル、アクリロニトリル、シアン酢酸、プロピオニトリル、n-ブチルニトリル、イソブチルニトリル、クロトンニトリル、メタクリロニトリル、ヘキサニトリル、n-吉草酸ニトリルを基質としてアンモニアの発生を確認した。反応は、50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中で各基質濃度10 mMで行った。反応は30℃で10 min行い、反応液に発生したアンモニアの量をインドフェノール法によって定量した。

#### 4-2-7 阻害物質の検討

シアンジヒドラターゼの反応に対する阻害物質を検討するために、Table 4-3に示す物質について検討した。各阻害剤を10 mMシアン化カリウムを含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 1.4 mlに添加した。この反応液にシアンジヒドラターゼ(2  $\mu$ g)を加え、30℃で反応を行った。なお、酵素の反応の活性測定は、2-2-5に従って行った。



#### 4-2-8 安定性

シアンジヒドラターゼの安定性を検討するために、酵素(約 $0.4 \text{ mg ml}^{-1}$ )を含む $30 \text{ mM NaCl}/50 \text{ mM}$ リン酸緩衝液(pH 7.0)を $30^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ および $4^\circ\text{C}$ で保温した。経時的にサンプリングし、シアン分解活性を確認してその残存活性を求めた。なお、酵素の活性測定は、2-2-5に従って行った。

#### 4-3 結果および考察

##### 4-3-1 大量発現系の構築

発現用ベクターpKK223-3のEcoRI、PstIサイトにシアンジヒドラターゼ遺伝子を含む $3.1 \text{ kb}$ のBsrI-PstIの遺伝子断片を挿入したpKCH3-10を構築した。このプラスミドでは、シアンジヒドラターゼ遺伝子はpKK223-3のtacプロモータの下流に挿入され、このプロモーターによって発現が制御されている。また、リボソーム結合部位はpKK223-3由来のものをを用いた。このプラスミドを*E. coli* XL1-Blue MRF を宿主として形質転換した。形質転換した*E. coli*をIPTGを含むLB液体培地中で培養し、シアンジヒドラターゼを発現を試みた。SDS-PAGEの結果から、シアンジヒドラターゼを発現させた*E. coli*の細胞抽出液には、pKK223-3を形質転換した*E. coli*にはみられない約 $38 \text{ kDa}$ のポリペプチドが発現していることが確認された(Fig. 4-3)。このシアンジヒドラターゼを発現した*E. coli*にはシアン分解活性が確認され(Fig. 4-4)、発現した蛋白質の一部はシアン分解活性を維持していることが明らかとなった。

シアンを分解する酵素の*E. coli*中での大量発現系の構築は、Clunessらによって、*F. lateritium*由来のシアンヒドラターゼについて報告されている(29)。*F. lateritium*のcDNAからクローニングしたシアンヒドラターゼ遺伝子をグルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子中に挿入し、融合蛋白質としてシアンヒドラターゼの発現が試みられている。

しかしながら、この発現系によって発現した蛋白質にはシアンの分解活性はみられなかった。すなわち、シアンを加水分解する酵素の発現系の構築し、活性のある酵素が得られたのは、本研究が初めてであるといえる。

#### 4-3-2 シアンジヒドラターゼの精製

pKCH3-10を形質転換した細胞抽出液のシアン分解活性は $14.3 \text{ unit mg}^{-1}$ であり、一連の精製の操作によって、本酵素は約4.1倍に精製された。また、その収率は36.1%であった(Table 4-1)。最終的な酵素の比活性は $59 \text{ unit mg}^{-1}$ となり、AK61株から精製した場合とほぼ同じであった。Fig. 4-5に各精製操作後のSDS-PAGEを示す。ヒドロキシアパタイトのカラムから溶出した後では、分子量約38 kDaのポリペプチドの単一のバンドが確認できる。なお、精製された酵素の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーによって確認したところ、その溶出時間(5.76 min)はAK61株から精製したシアンジヒドラターゼとほぼ同じであることが確かめられた。この結果は、*E. coli*中で発現したシアンジヒドラターゼは、AK61株から精製したものと同様に分子量は、100 kDa以上であることを示している。

#### 4-3-3 シアンジヒドラターゼの活性測定

pKCH3-10によって発現されたシアンジヒドラターゼの性質をAK61株由来のシアンジヒドラターゼと比較するために、シアンに対する $K_m$ 、至適温度および至適pHを検討した。まず、*E. coli*中で発現したシアンジヒドラターゼのシアンに対する $K_m$ を求めるために、シアンの初期濃度0.6 mMから10 mMの範囲について酵素の反応速度を求めた。得られた各初期シアン濃度における反応速度から、Lineweaver-Burkプロットを作成した(Fig. 4-6)。この図から、シアンに対する $K_m$ が2.8 mMと求められ、AK61株から精製されたシアンジヒドラターゼの $K_m$  (1.7 mM)とほぼ同じであることが確かめられた。

シアンジヒドラターゼの活性の温度依存性およびpH依存性をそれぞれFig. 4-7、4-8に示す。これら結果から、*E. coli*中で発現したシアンジヒドラターゼの至適温度および至適pHは、それぞれ約30℃およびpH 7.5付近であると求められた。この発現された酵素の至適温度および至適pHも、AK61由来のものと同じでることが確かめられた。これらの結果から、pKCH3-10を形質転換した*E. coli*が発現するシアンジヒドラターゼはAK61株由来のものとはほぼ同じ性質を持っていることが示された。

#### 4-3-4 基質特異性

AK61株からのシアンジヒドラターゼは、そのアミノ酸配列からニトリラーゼと相同性が高いことが明らかとなっている。そこで、シアンジヒドラターゼの基質特異性について検討するために、最も相同性の高かったアリファティックニトリラーゼの基質(Table 4-2)に対する加水分解活性を検討した。Table 4-2に示したニトリルのうち、シアノ酢酸を基質とした場合のみアンモニアの発生が確認された。しかしながら、シアノを基質とした場合のアンモニア発生速度と比較すると、その相対活性は4%以下であり、非常に活性が低いことが示された。シアノ酢酸以外のニトリルでは、アンモニアの発生は確認されず、本酵素がシアンに対する基質特異性が高いことが確かめられた。

本研究におけるシアンジヒドラターゼの活性測定条件(pH 7.5)では、シアンはそのほとんどがシアン化水素として存在している。シアン化水素は、非常に小さい分子であり、これと相互作用できる酵素のアミノ酸残基は限られたもののみであると考えられる。したがって、シアンジヒドラターゼの基質特異性は低いことが予想される。また、ニトリラーゼとシアンジヒドラターゼの反応はよく似ており、さらにアミノ酸配列の相同性が高いことから、これらの酵素は類似した反応機構によって基質の加水分解を触媒している可能性がある。基質特異性を検討するために用いた基質には、アセトニトリルのような小さい分子も含まれており、このような基質はシアンジヒドラターゼによって加水分解される可能性は十分にある。しかしながら、この酵素は数種

類のニトリルに対してその活性をほとんど示さなかった。アリファティックニトリラーゼは、これらのニトリルに対して基質特異性は低く、加水分解を触媒することが報告されている。シアンジヒドラターゼにおいても、シアンの水素とアセトニトリルのメチル基などを識別することができるとは考え難い。この酵素のシアンに対する基質特異性は、活性部位付近の構造が関与している可能性が考えられる。活性部位付近が空間的に非常に密集している場合、シアン化水素のような非常に小さい分子しか活性部位に到達できず、シアン化水素より分子量の大きいニトリルに対しては触媒活性を示すことができない可能性がある。

#### 4-3-5 阻害物質の検討

各物質に対するシアンジヒドラターゼ活性の影響をTable 4-3に示す。阻害剤として0.1% SDSを用いた場合のみ、顕著な活性の低下が確認され、その相対活性は約4.2%であった。それ以外の物質については、Table 4-3に示した濃度ではシアンジヒドラターゼの活性を大きく阻害することはなかった。この酵素のシアン分解の生成物のひとつであるホルムアミドに対しては、10 mMの濃度でその影響はほとんどみられなかった。1 mMのEDTAに対しても影響はみられず、本酵素が金属酵素ではないことが示唆された。

また、システイン残基のチオール基に特異的に修飾するイソアセトアミドおよび $\alpha$ -エチルマレイミドを含む反応液においても酵素の活性は阻害されなかった。これは、活性にシステイン残基が関与しない可能性もあるが、4-3-4で述べたように酵素の活性部位が空間的に密であり、これらの修飾剤が活性部位に到達できない可能性も考えられる。シアンジヒドラターゼの基質特異性を含め、これら結果に対して検討を行うためには、今後シアンジヒドラターゼの構造解析が必要である。

#### 4-3-6 安定性

各温度で保存したアンジヒドラターゼの残存相対活性の経時変化をFig. 4-9に示す。

本酵素の活性は、4℃の保存では約300 h後でも初期の活性の約80%が残存していた。しかし、30℃で保存した場合では、約100 hで初期の半分の活性しか残っていないことが明らかとなった。

#### 4-4 結言

第3章でクローニングしたシアンジヒドラターゼ遺伝子を用いて、*E. coli*中での大量発現系を構築した。この遺伝子を発現された*E. coli*の細胞抽出液のSDS-PAGEには、約38 kDaのポリペプチドの発現が確認された。また、発現された酵素にたいしてシアン分解活性が確認され、その性質はAK61株由来の酵素とほぼ同じであることが確かめられた。シアンを特異的に分解する酵素で、*E. coli*中での大量発現系を構築し、活性のある酵素が得られたことは、シアンを含む排水の生物処理プロセスの開発への大きな前進になると考えられる。

実際に生物処理プロセスの開発を行うためには今後異なるホストを用いての発現系の構築が必要となってくると考えられる。また、この酵素の反応機構や立体構造などの詳しい機能解析も必要になると思われる。

Table 4-1 Purification of the cyanide dihydratase  
from *E. coli* harboring pKCH3-10.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit mg <sup>-1</sup> )	Yield (%)	Purification (fold)
Cell extract	18.6	265	14.3	100	1.0
DEAM	2.17	104	47.8	39.2	3.4
DEAE-TOYOPEARL 650	1.95	103	52.9	39.0	3.7
Hydroxyapatite	1.62	95.7	59.0	36.1	4.1

\* 1 unit is the amount of enzyme which catalyzes the formation of 1  $\mu$  mol of ammonia for 1 min.



Table 4-2 Substrate specificity of the cyanide dihydratase.

Substrate	Relative activity	Substrate	Relative activity
Acetonitrile	N.D.*	Hexanenitrile	N.D.
Propionitrile	N.D.	Cyanoacetic Acid	<4%
<i>n</i> -Butyronitrile	N.D.	Acrylonitrile	N.D.
Isobutyronitrile	N.D.	Crotononitrile	N.D.
<i>n</i> -Valeronitrile	N.D.	Methacrylonitrile	N.D.

\*N.D.: The activity was not detected.

Table 4-3 Effect of various compounds on the activity of the cyanide dihydratase.

Compound	Concentration	Relative activity (%)
None		100
NaCl	10 mM	82.0
KCl	10 mM	82.9
MgCl <sub>2</sub>	0.1 mM	105.9
CaCl <sub>2</sub>	0.1 mM	97.2
Formate	10 mM	96.9
EDTA	1 mM	101.8
Urea	10 mM	98.2
NaN <sub>3</sub>	10 mM	129.5
SDS	0.1%	4.2
Acetonitrile	10 mM	87.9
Acrylonitrile	10 mM	93.9
Iodoacetoamide	1 mM	99.6
<i>n</i> -Ethylmaleimide	1 mM	103.8
Diethylpirocarbamate	1 mM	95.0

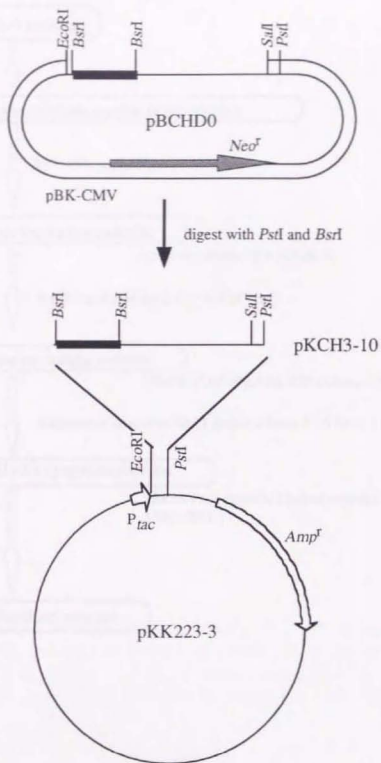


Fig. 4-1 Strategy for the expression of the cyanide dihydratase gene.

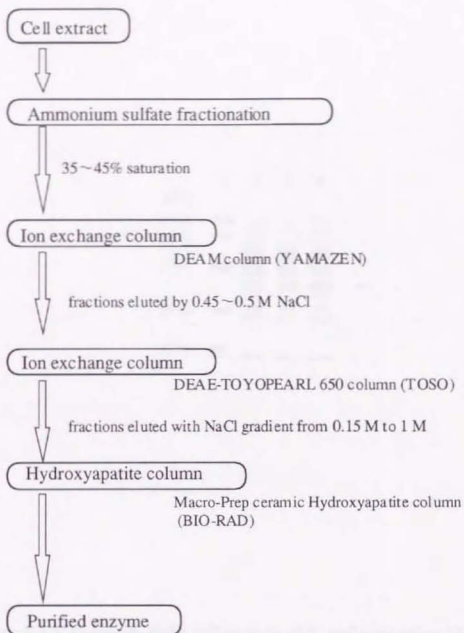


Fig. 4-2 Procedure for purification of the cyanide dihydratase from *E. coli* XL1-blue containing pKCH3-10.



Fig. 4-3 SDS-PAGE of the cell extracts of *E. coli* containing pKK223-3 and pKCH3-10. Lanes are as follows: 1, molecular weight standards; 2, *E. coli* containing pKK223-3; 3, *E. coli* containing pKCH3-10; 4, *E. coli* containing pKCH3-10 (cell was incubated with 1 mM IPTG) .

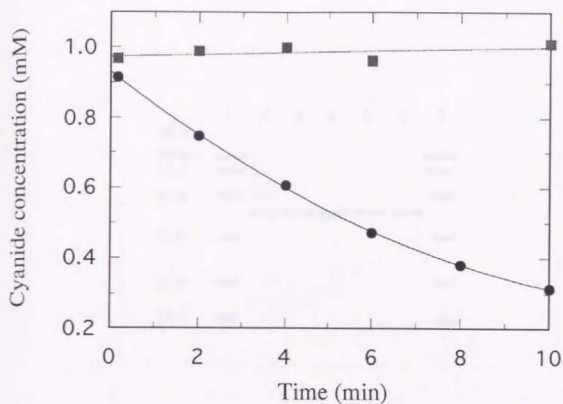


Fig. 4-4 Degradation of cyanide by *E. coli* expressing the cyanide dihydratase. Reactions were carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) with 1 mM cyanide. Symbols: ●, pKCH3-10/*E. coli*; ■, pKK223-3/*E. coli*.



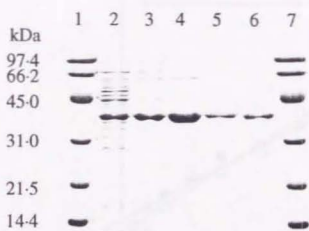


Fig. 4-5. SDS-PAGE of steps during purification of the cyanide dihydratase from *E. coli* containing pKCH3-10. Lanes: 1 and 7, molecular mass standards; 2, cell extract; 3, salt-out; 4, DEAM elute; 5, DEAE TOYOPEARL elute; 6, Hydroxyapatite elute.

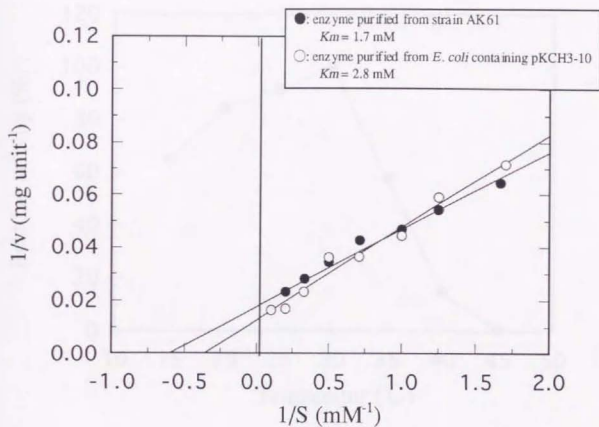


Fig. 4-6 Lineweaver-Burk plot for cyanide degradation by the cyanide dihydratase. Reactions were carried out in 1.4 ml of 50 mM phosphate buffer containing  $2 \mu\text{g}$  enzymes and various concentrations of cyanide at  $30^\circ\text{C}$ .

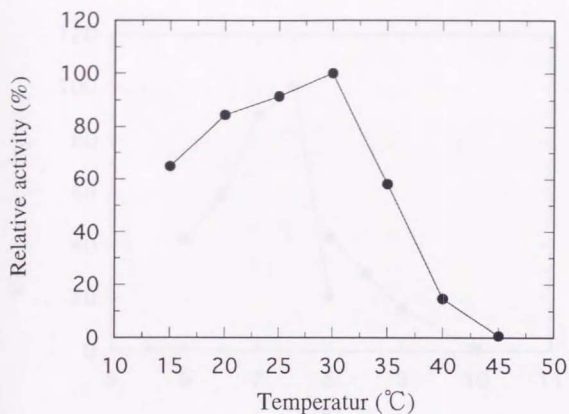


Fig. 4-7 Temperature optimum for the cyanide dihydratase expressed in *E. coli*. Assays were carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 10 mM potassium cyanide and 2  $\mu$ g enzyme.

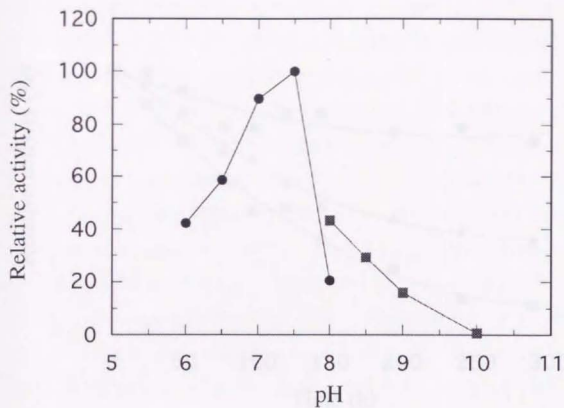


Fig. 4-8 pH optimum for the cyanide dihydratase expressed in *E. coli*. Assays were carried out in 50 mM phosphate (●) or sodium borate (■) buffer containing 10 mM potassium cyanide and 2  $\mu$ g enzyme at 30°C.

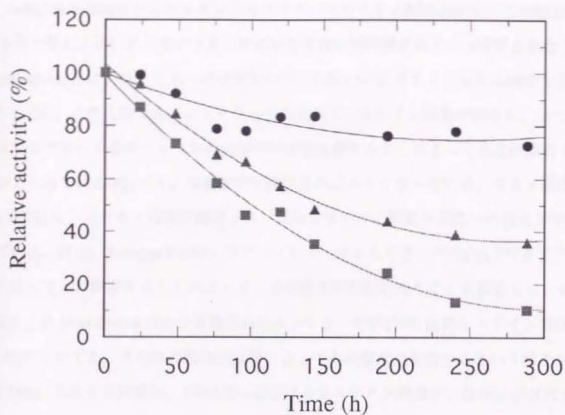


Fig. 4-9 Stability of the cyanide dihydratase. Assays were carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) with 10 mM cyanide. The enzymes were incubated at 4°C (●), 20°C (▲) and 30°C (■) for various time prior to each assay.

## 第5章 部位特異的変異によるシアンジヒドラターゼの機能部位の検討

### 5-1 緒言

AK61株から精製されたシアンジヒドラターゼのアミノ酸配列から、この酵素がニトリラーゼおよびシアンヒドラターゼに対して高い相同性があることが示された(第3章)。Mahadevanらは、ニトリラーゼの反応についてFig. 5-1に示すような反応機構を提唱している(56)。この反応では、ニトリラーゼの活性にシステイン残基が関与し、このシステインのチオール基がニトリルの炭素への求核攻撃することによって反応が進行すると考えられている(Fig. 5-1)。塩基配列が決定されたニトリラーゼには、アミノ酸配列の170付近にシステイン残基が確認され、このシステイン残基の反応への関与が予想されている。最近、Kobayashiらは、アリファティックニトリラーゼのCys-170をアラニンまたはセリンに置換することによって、その酵素が活性を失うことを報告している(51)。また、*R. rhodochrous* J1から単離されたニトリラーゼの170付近のシステイン残基(Cys-165)についても、その部位特異的変異によってその酵素が失活するという結果が示された(53)。これらの結果は、170付近に存在するシステイン残基が、活性に不可欠であることを示し、Mahadevanらによって提唱された反応機構を支持するものであった。

アミノ酸配列の比較から、シアンジヒドラターゼに含まれる6個のシステイン残基のうち、アリファティックニトリラーゼのCys-170に相当するシステイン残基(Cys-163)が保存されていた。この結果から、Cys-163がシアンジヒドラターゼの活性の発現に対して重要であることが予想される。また、これらの酵素のアミノ酸配列を比較したところ、Cys-163以外にも保存されているアミノ酸残基が確認されている(Fig. 3-7, Fig. 5-2)。これらのアミノ酸残基がシアンジヒドラターゼおよびニトリラーゼの活性の発現または構造の維持に重要である可能性がある。

そこで、本章では、シアンジヒドラターゼ遺伝子に部位特異的変異を導入し、アミノ酸残基の置換によるシアンジヒドラターゼの活性および構造への影響を検討するこ



とを目的とした。

## 5-2 実験方法

### 5-2-1 宿主とベクター

シアンジヒドラターゼ遺伝子の変異導入用の宿主として、*E. coli* MV1184 ( $\Delta(lac-proAB)$ , *ara*, *rpsL*, *thi*( $\phi$  80*lacZ*  $\Delta$  M15),  $\Delta(srl-recA)360::Tn10(ter^r)/F$  [*traD36*, *proAB*<sup>+</sup>, *lacF*<sup>+</sup>, *lacZ*  $\Delta$  M15])を用いた。また、部位特異的変異導入用のベクターとして、pKF18-k(Takara Shuzou)を用いた。

### 5-2-2 部位特異的変異の導入

第3章で示されたシアンジヒドラターゼ遺伝子に部位特異的変異を導入するために、Fig. 5-2に示すようなプラスミドpKFCH3-10を作成した。pKFCH3-10を*Bam*HIと*Pma*CIによって消化し、得られた遺伝子断片をGeneCleanII Kitを用いて回収した。この遺伝子断片をpKF18-kの*Bam*HIと*Hinc*IIの間に挿入した。このプラスミドを用いて、シアンジヒドラターゼ遺伝子の部位特異的変異の導入を行った。置換するアミノ酸残基は、3種類のニトリラーゼおよび2種類のシアンヒドラターゼのすべてに保存されているアミノ酸残基のうち、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、ヒスチジン、チロシンおよびセリンに対して13種類について行った(Fig. 5-3)。シアンジヒドラターゼに部位特異的変異を導入するために、変異を導入する部位にミスマッチのあるDNAプライマー(Table 5-1)を13種類合成した。変異の導入は、Mutan-Super Express Km(Takara shuzou)を用いて行った。なお、変異の導入後にシアンジヒドラターゼ遺伝子の塩基配列を決定し、目的の核酸塩基が置換されていることを確認した。

### 5-2-3 変異シアンジヒドラターゼの発現

変異を導入したシアンジヒドラターゼ遺伝子の発現を行うために、pKK223-3をベクターとして用いて発現系を構築した。pKK223-3のBamHIとPstIサイトに変異を導入したプラスミドpKFCH3-10のBamHIおよびPstI(PstIサイトは、シアンジヒドラターゼ遺伝子の下流に存在するpKF18kのマルチクローニングサイト由来)の遺伝子断片を挿入し、*E. coli* XL1-Blue MRF に形質転換した。

形質転換した*E. coli*を4-2-2の方法に従って培養し、変異シアンジヒドラターゼの発現を行った。また、変異シアンジヒドラターゼを発現した*E. coli*のシアン分解活性およびSDS-PAGEは、それぞれ2-2-2および2-2-8に従って行った。

#### 5-2-4 変異シアンジヒドラターゼの精製および活性測定

*E. coli*中で発現した変異シアンジヒドラターゼは、4-2-3の方法に従って精製を行った。また、精製された変異シアンジヒドラターゼのシアン分解活性の測定は、2-2-5の方法に従って50 mMリン酸緩衝液中(pH 7.5)、30℃で行った。

### 5-3 結果および考察

#### 5-3-1 部位特異的変異の導入

第3章において、シアンジヒドラターゼのアミノ酸配列はニトリラーゼおよびシアンヒドラターゼに相同性が高いことが示された。シアンジヒドラターゼと3種類のニトリラーゼと2種類のシアンヒドラターゼおよびシアンジヒドラターゼのアミノ酸配列を比較すると、おもに5箇所の領域ですべての網の酵素に対して保存されているアミノ酸残基が確認される(Fig. 5-3)。これらのアミノ酸残基には、アリファティックニトリラーゼの活性の発現に重要であるシステイン残基も保存されている。また、このシステイン残基以外にも活性に関与する可能性のあるヒスチジンやグルタミン酸などのアミノ酸残基が保存されていることが明らかとなった。そこですべての酵素に保存されているアミノ酸残基のうち、活性の発現に関与する可能性のある13種類のアミノ酸残基、

システイン、セリン、チロシン、リシン、ヒスチジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸残基について部位特異的変異を導入し、これらのアミノ酸残基のシアンジヒドラターゼの活性または構造に対する影響を検討した。なお、これらのアミノ酸の置換は、もとのアミノ酸と分子の大きさが近いアミノ酸へと行った。すなわち、システインはセリン、セリンはアラニン、チロシンはフェニルアラニン、リシンおよびグルタミン酸はグルタミン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸はアスパラギンに置換した。これらの変異を導入したシアンジヒドラターゼ遺伝子について、その塩基配列を決定し、アミノ酸残基が置換されていることを確認した。

### 5-3-2 変異シアンジヒドラターゼの発現

変異を導入したシアンジヒドラターゼ遺伝子を *E. coli* 中で発現するために、変異を導入したプラスミド pKFCH3-10 を *Bam*HI および *Pst*I で消化し、この遺伝子断片を pKK223-3 に挿入したプラスミド E47Q~Y285F を作成した。これらのプラスミドを *E. coli* XL1-Blue MRF に形質転換した。この *E. coli* を IPTG を含む LB 液体培地で培養し、変異の導入したシアンジヒドラターゼを発現させた。これらの細胞破碎液を用いた SDS-PAGE からの結果から (Fig. 5-4)、いずれの *E. coli* にも約 38 kDa 付近にポリペプチドの発現が確認され、変異を導入したすべてのシアンジヒドラターゼ遺伝子が *E. coli* 中で発現していることが確かめられた。

### 5-3-3 変異シアンジヒドラターゼの活性

変異を導入したシアンジヒドラターゼ遺伝子を発現した *E. coli* を用いて、そのシアン分解活性を確認した。Fig. 5-5 に Y53F、E104Q、C163S、E180Q、D247Q によるシアン分解の経時変化を示す。これらの *E. coli* のうち、C163S は 1 h の反応ではシアンの減少はほとんどみられなかった。また、Fig. 5-5 には示さないが、E47Q、S103A、E165Q、H183N、K276Q、D280N、H284N および Y285F も C163S と同様の結果が得られ、これら

の変異シアンヒドラーゼを発現した*E. coli*にはシアン分解活性が確認されなかった。この結果から、これらのアミノ酸残基の置換がシアンヒドラーゼの活性の発現または構造の維持に影響を与えると示唆された。これ以外の4種類を発現した*E. coli*には、シアンの分解活性が確認された。これらのうち、E104Qを発現した*E. coli*のシアンの分解速度は他の3種類の変異シアンヒドラーゼを発現したものより遅いことがわかる。

これらの蛋白質を発現した*E. coli*を超音波破碎した後、10,000×g 20 minで遠心した上清についてSDS-PAGEを行った(Fig. 5-6)。E104Q、E165Q、H183NおよびK276Qの上清には、38 kDa付近のポリペプチドがほとんど確認されなかった。これは、発現した蛋白質のほとんどが細胞質中に存在せず、そのほとんどが不溶性の蛋白質として存在していることを示している。これらのアミノ酸の置換によって、蛋白質の構造が不安定になり、発現した蛋白質は細胞質の内ペプチダーゼによる分解や非特異的な会合が起こりやすくなっていることが予想される。すなわち、これらのアミノ酸残基は、少なくともシアンヒドラーゼの構造の維持にサブユニットの会合に重要であることを示している。また、E104Qを発現した*E. coli*の低いシアン分解活性は、細胞内で活性を維持した蛋白質の量が少なかったためであると考えられる。

#### 5-3-4 変異シアンヒドラーゼの精製

変異を導入したシアンヒドラーゼのうち、E165Q、H183N、K276Q以外のものについて、精製を試みた。これらのうち、活性のみられた4種類とC163Sのみ、精製することができた(Fig. 5-7)。しかしながら、E104Qは精製されたものの、得られた蛋白質量は他の4種類より少なかった。精製した蛋白質についてゲル濾過を行ったところ、その溶出時間は変異を導入していない酵素(WT)とほとんど差はなく(WT, 5.67 min; Y53F, 5.66 min; E104Q, 5.66 min; C163S, 5.67 min; 180Q, 5.67 min; D247N, 5.67 min)、いずれも分子量が100 kDa以上であることが確かめられた。これらの変異シアンヒドラーゼは、

WTと同様に四次構造が形成されていることが示された。なお、Y53F、E104Q、C163S、E180Q、D247N以外の変異シアンジヒドラターゼ(E47Q、S103A、D280N、H284NおよびY285F)は、4-2-3の方法では精製できなかった。これらの変異シアンジヒドラターゼは、アミノ酸残基の置換により酵素の構造に影響を与え、WTの精製法では精製できなくなった可能性がある。

#### 5-3-5 変異シアンジヒドラターゼの速度論的解析

精製された変異シアンジヒドラターゼ(Y53F、E104Q、C163S、E180Q、D247N)について、シアンに対する反応速度論的解析を行った。C163Sは、シアン濃度0.6 mMから10 mMの範囲でアンモニアの発生は検出されず、この蛋白質のシアン分解活性は確認されなかった。Fig. 5-8にY53F、E104Q、E180Q、D247NおよびWTのシアンに対するLineweaver-BurkプロットおよびTable 5-2にWTに対する相対活性と $K_m$ を示した。これらの結果から、E180QおよびD247Nは、WTに対して $V_{max}$ や $K_m$ に大きな差はみられないことが確かめられた。これらのアミノ酸残基は、活性部位や基質の親和性に対して重要なアミノ酸残基ではないことを示している。

Lineweaver-Burkプロットから求められるE104Qのシアンに対する $K_m$ は2.6 mMと求められ、この値はWTとほぼ同じであり、基質の親和性に対してGlu-104は影響を与えないことがわかる。この変異シアンジヒドラターゼの $V_{max}$ はWTに比べて相対活性で0.57倍であった。これは、Glu-104の置換によって構造またはサブユニットの会合が不安定になることが予想されているので、精製および活性測定中に酵素が一部失活したものと考えられる。Glu-104のアミノ酸残基の置換は、シアンジヒドラターゼの構造を不安定にはするものの活性には影響を与えないと予想される。

Y53Fのシアンに対する $K_m$ はWTと比較して約4倍の11.3 mMであった(Table 5-2)。また、Y53Fの $V_{max}$ は、相対活性で約0.7倍であり、WTと大きな差はないことが示された。本



実験の活性測定の下では、基質であるシアンはほとんどがシアン化水素である。シアン化水素の構造は単純であるために、多くのアミノ酸残基と相互作用することはできず、この酵素の基質に対する親和性はもともと低いと考えられる。Y57Fの $K_m$ はWTと比較してあまり大きな差とはいえないものの、明らかに基質に対しての親和性の低下がみられた。これは、Tyr-57が基質の親和性に何らかの関与をしている可能性があることを示している。しかし、このTyr-57が、基質に対して実際に相互作用しているかを検討するためには立体構造の解析などが必要である。

また、精製されたC163Sについてシアンの分解活性を検討したところ、そのシアン分解活性は確認されなかった。精製された蛋白質のゲル濾過クロマトグラフィーから、その分子量が100 kDa以上であることが確かめられており、WTと同様に四次構造を形成していることがわかる。Cys-163を置換することによって、構造に対してWTと顕著な差がみられないにも関わらず、酵素の活性が失うことが明らかとなった。これは、このシステイン残基がシアンジヒドラターゼの活性の発現に重要なアミノ酸であることを示している。Kobayashiらは、ニトリラーゼのCys-170(51)およびCys-165(53)の部位特異的変異によって、酵素の活性が失なわれることを報告している。AK61株から精製されたシアンジヒドラターゼについても同様の結果が得られ、これらの酵素は類似した反応機構によって基質(シアン)の加水分解を触媒していることが予想される。

#### 5-4 結言

シアンジヒドラターゼ遺伝子に部位特異的変異を導入し、アミノ酸残基の置換によるシアンジヒドラターゼの活性および構造に対する影響を検討した。変異の導入は、シアンジヒドラターゼ、ニトリラーゼおよびシアンヒドラターゼに保存されている13種類のアミノ酸残基について行った。この結果、E104Q、E165Q、H183NおよびK276Qは、発現した蛋白質のほとんどは不溶性の状態となって存在していることが示された。



また、E47Q、S103A、D280N、H284NおよびY285Fは、第4章に示した精製法では精製することはできず、これらのアミノ酸残基の置換がシアンジヒドラターゼの構造に影響を与えることが示唆された。C163Sは、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果はWTと差がみられなかったにもかかわらず、そのシアン分解活性は確認されなかった。すなわち、このシステイン残基が活性の発現に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、Y57Fのシアン分解活性から、Tyr-57の置換によって基質の親和性に関与する可能性があることが示された。

本章で部位特異的変異を導入した13種類のアミノ酸残基のうち、9種類についてはそのアミノ酸残基の置換がシアンジヒドラターゼの構造またはサブユニットの会合に影響を与えていることが示唆された。これは、シアンジヒドラターゼ、ニトリラーゼおよびシアンヒドラターゼに保存されている領域は、活性の発現ばかりでなく構造の維持に重要な領域であることが予想される。

Table 5-1 Oligonucleotides for the site directed mutagenesis.

Mutation primer	Nucleotide sequence (5'-3') <sup>a</sup>								Position in cyanide dihydratase gene <sup>b</sup>
E47Q	GCG	TTC	CCG	cAG	GCA	TTT	ATT	C	255-276
Y53F	CAT	TTA	TTC	CGG	GAT	tTC	CAT	GGT TC	268-293
S103A	GTA	TTT	CCT	GTg	cCG	AGA	AGG	AC	421-443
E104Q	CCT	GTA	GCc	AGA	AGG	ACG	GTG		427-447
C163S	GGC	CTG	ATG	aGC	TGG	GAA	CAC		603-623
E165Q	GAT	GTG	CTG	GcA	ACA	CAA	TGT	G	608-629
E180Q	CTC	ACA	GAA	CcA	GCA	GGT	TCA	TG	653-675
H183N	CGA	GCA	GGT	TaA	TGT	GGC	TGC		662-682
D247N	CTA	TGG	GCC	CaA	TGG	CGA	GCC	G	654-675
K276Q	CAT	CGA	CTT	CcA	ATA	CTA	TAT	C	941-962
D280N	CAA	ATA	CTA	TAT	CaA	TCC	GGT	AGG G	950-974
H284N	CGG	TAG	GGa	ATT	ATT	CCA	ATC		967-987
Y285F	GTA	GGG	CAT	TtT	TCC	AAT	CAA	AG	969-991

a: Mismatches with the original sequence of cyanide dihydratase gene are indicated in *lower case*.

b: The position of oligonucleotides is numbered according to the cyanide dihydratase gene in chapter 3.

Table 5-2 Kinetic properties of the mutants  
of the cyanide dihydratase.

Mutants	$K_m$ (mM)	Relative $K_m$	Relative $V_{max}$
Wild-type	2.8	1.0	1.0
Y53F	11.3	4.0	0.68
E104Q	2.6	0.9	0.57
C163S	N.D.*	—	—
E180Q	3.5	1.3	1.2
D247N	6.1	2.2	1.7

\*The cyanide-degrading activity was not detected.

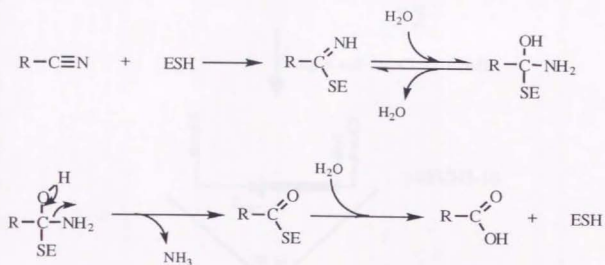


Fig. 5-1 The scheme for the nitrilase reaction mechanism.

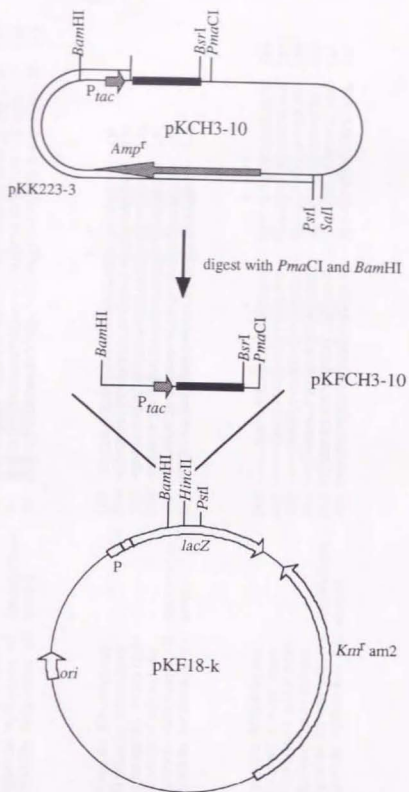


Fig. 5-2 Construction of pKFCH3-10 for the site directed mutagenesis of the cyanide dihydratase gene.



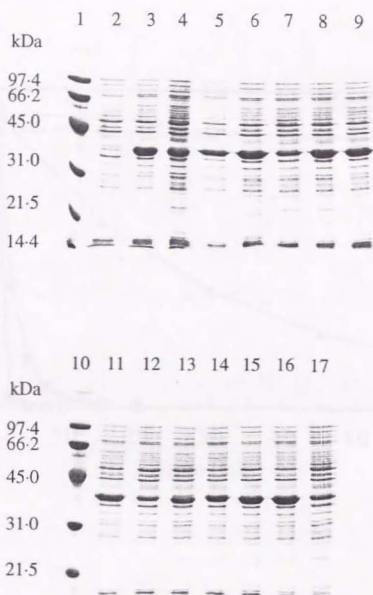


Fig. 5-4 SDS-PAGE of sonicated cells of *E. coli* expressing the cyanide dihydratase mutants. Lanes are as follows: 1, and 10, molecular weight standards; 2, pKK223-3; 3, pKCH3-10; 4, E47Q; 5, Y53F; 6, S103A; 7, E104Q; 8, C163S; 9, E165Q; 11, E180Q; 12, H183N; 13, D247N; 14, K276Q; 15, D280N; 16, H284N; 17, Y285F.



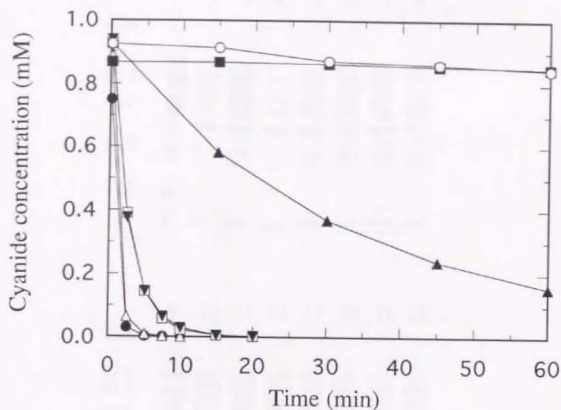


Fig. 5-5 Degradation of cyanide by *E. coli* expressing the mutated cyanide dihydratases. The reactions were carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) at 30°C. Symbols: ●, wild-type; ▼, Y53F; ▲, E104Q; ■, C163S; □, E180Q; △, D247Q; ○, a control experiment.

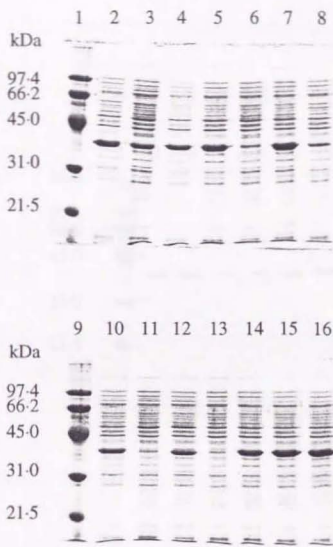


Fig. 5-6 SDS-PAGE of cell extracts of *E. coli* expressing the cyanide dihydratase mutants. Lanes are as follows: 1, and 9, molecular weight standards; 2, pKCH3-10; 3, E47Q; 4, Y53F; 5, S103A; 6, E104Q; 7, C163S; 8, E165Q; 10, E180Q; 11, H183N; 12, D247N; 13, K276Q; 14, D280N; 15, H284N; 16, Y285F.

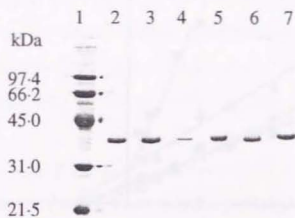


Fig. 5-7 SDS-PAGE for the purified mutants of the cyanide dihydratase. Lanes are as follows: 1, molecular weight standards; 2, wild-type; 3, Y53F; 4, E104Q; 5, C163S; 6, E180Q; 7, D247N.

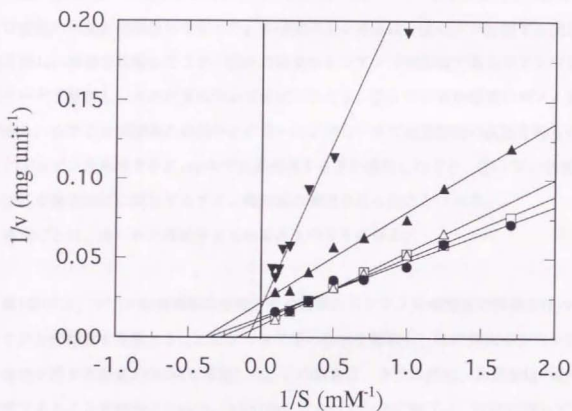


Fig. 5-8 Lineweaver-Burk plot for cyanide degradation by the purified mutants of the cyanide dihydratase. Reactions were carried out in 1.4 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 2  $\mu$  g enzymes and various concentrations of cyanide at 30°C. Symbols: ●, wild-type; ▼, Y53F; ▲, E104Q; ■, C163S; □, E180Q; △, D247Q.

## 第6章 結論

以上、第5章までに述べてきたように、本研究では、シアン分解能を有する微生物および酵素の単離と機能解析を行った。本研究の主な成果は、①シアン分解する能力のある新しい細菌を単離したこと、②その細菌からシアン分解酵素であるシアンジヒドラーターゼを精製し、その性質について検討したこと、③シアン分解細菌のゲノム遺伝子から、シアン分解酵素の遺伝子をクローニングし、その塩基配列の決定を行ったこと、④シアン分解酵素を *E. coli* 中で大量発現する系を構築したこと、⑤シアン分解酵素の活性や構造維持に関与するアミノ酸残基の検索を行ったことである。

各章ごとに、得られた成果をまとめると次のようになる。

第2章では、シアン分解細菌の単離とその細菌からシアン分解酵素の精製を行った。シアン分解細菌を単離するためにメッキ工場の排水を採取し、この排水中からシアン分解能を有する細菌AK61株を単離した。この細菌は、グラム陰性、非運動性の好気性桿菌であることが確かめられた。AK61株によるシアンの分解では、反応に伴ってアンモニアの蓄積が確認された。このAK61株のシアン分解活性は、培養中のシアンの存在に関わらず誘導されていることが明らかとなり、シアンの生物処理プロセスに有用な微生物であることが示された。

AK61株の細胞抽出液から、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーなどによってシアン分解酵素が精製された。精製された酵素は、シアンを加水分解し、アンモニアとギ酸を生成するシアンジヒドラーターゼであることが明らかとなった。この酵素は、約38 kDaのポリペプチドからなる分子量100 kDa以上の蛋白質であることが示された。また、反応速度論的解析から、このシアン分解酵素のシアンに対する  $K_m$  および至適温度、至適pHが求められた。

第3章では、シアンジヒドラターゼ遺伝子のクローニングと*E. coli*中での大量発現を行った。AK61株のゲノム遺伝子からシアンジヒドラターゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸配列から、本酵素のポリペプチドの分子量が37,518 Daであることが求められた。また、そのアミノ酸配列は、ニトリラーゼおよびシアンヒドラターゼと相同性が高いことが明らかとなった。特に、*R. rhodochrous* K22から精製されたニトリラーゼとの相同性が高く35.1%であることが示された。

第4章では、*E. coli*中でシアンジヒドラターゼの大量発現を行うために、この遺伝子の大量発現系の構築を行った。この酵素を発現した*E. coli*の細胞抽出液のSDS-PAGEの結果から、分子量約38 kDaのポリペプチドが発現していることが確かめられた。また、この酵素を発現した*E. coli*は、シアンの分解活性が付与されたことが確認され、発現した酵素が活性を持っていることが示された。さらに、発現した酵素の分子量、シアンに対する $K_m$ 、至適温度および至適pHは、AK61株由来の酵素とはほぼ同じであることが確かめられた。

シアンジヒドラターゼの基質特異性について検討した結果、ニトリラーゼとの相同性に関わらず、この酵素の数種類のニトリルに対する活性は示さないことが確かめられ、シアンに対する基質特異性が高いことが示された。また、この酵素の安定性についても言及した。

第5章では、シアンジヒドラターゼに部位特異的変異を導入し、活性や構造に対する影響を検討した。変異の導入は、ニトリラーゼやシアンヒドラターゼの相同性をもとに、これらの酵素すべてに保存されているアミノ酸残基のうち13種類について行った。

変異シアンジヒドラターゼの活性を検討したところ、シアンジヒドラターゼの活性の発現に重要なシステイン残基が確認された。また、基質の親和性に関与する可能性のあるチロシン残基が示された。さらに、アミノ酸残基の置換によってシアンジヒドラターゼの構造に影響を与えると思われる9種類のアミノ酸残基が示された。

以上の研究成果は、シアンの生物処理プロセスの研究および開発において、重要な知見を提供するものと考えられる。さらに今後、本研究によって得られた微生物または酵素がこのようなプロセスに応用されれば、工業排水中のシアンの新しい処理法となることが期待される。



## 参考文献

1. Solomonson, L. P. and Spehar, A. M. (1981). Cyanide as a metabolic inhibitor, 11-28. In B. vennesland, E. E. Conn, C. J. Knowles, J. Westley, and F. Wissing (ed.), Cyanide in biology. Academic Press. Inc. (London), Ltd., London.
2. Klenk, H., Griffiths, A., Huthmacher, K., Itzel, H., Knorre, H., Voigt, C. and Weiberg, O. (1988) Cyano compounds, inorganic. In: Gerhartz, W. (Ed) Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH publishers, New York.
3. 友野理平 (1981) 「公害用語辞典 (第2版)」 オーム社, 東京
4. Raybuck, S. A. (1992). Biodegradation 3, 3-18.
5. Knowles, C. J., and Bunch, A. W. (1986). Adv. Microb. Physiol. 27, 73-111.
6. Macadam, A., M. and Knowles, C. J. (1983). FEMS Microbiol. lett. 20, 91-95.
7. Sang, M., K. and Deog, J., K. (1993). Biotech. Lett. 15, 201-206.
8. Pettet, A., E., J. and Mills, E., V. (1954). J. appl. Chem. 4, 434-444.
9. Nicholls, P. (1983) Trends Biochem. Sci. 8, 353.
10. Klaassen, C., D., Amder, M., O. and Douk, J. /福田英臣 内山充 佐藤哲夫監訳 (1988) 「トキシコロジー I、II」 同文書院, 東京
11. Timbrell, J., A. /藤田正一監訳 (1991) 「毒性学入門」 技報堂, 東京
12. 医学大事典 南山堂, 東京
13. 荒木峻 沼田眞 和田攻編集 (1982) 環境科学事典 東京化学同人, 東京
14. Shimizu, T. and Taguchi, H. (1969). J. Ferment. Technol. 47, 639-643.
15. Fry, W. E., and Millar, R. L. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 151, 468-474.
16. Fry, W. E. and Munch, D. C. (1975). Physiol. Plant Pathol. 7, 23-33.
17. Harris, R. and Knowles, C. J. (1983). J. Gen. Microbiol. 129, 1005-1011.
18. Harris, R. and Knowles, C. J. (1983). FEMS Lett. 20, 337-341.

19. Dorr, P. K. and Knowles, C. J. (1989). *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 289-294.
20. Kunz, D., A., Nagappan, O., Silva-Avalos, J. and Delong, G., T. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2022-2029.
21. Kunz, D., A., Wang, C. and Chen, J. (1994). *Microbiol.* 104, 1705-1712.
22. White, J. M., Jones, D. D., Huang, D., and Gauthier, J. J. (1988). *J. Ind. Microbiol.* 3, 263-272.
23. Ingvorsen, K., Hojer-Pedersen, B., and Godtfredsen, S. E., (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1783-1789.
24. Meyers, P. R., Gokool, P., Rawlings, D. E., and Woods, D. R. (1991). *J. Gen. Microbiol.* 137, 1397-1400.
25. Basheer, S., Kut, O., M., Prenosil, J., E. and Bourne, J., R. (1991). *Biotechnol. Bioeng.* 39, 629-634.
26. Basheer, S., Kut, O., M., Prenosil, J., E. and Bourne, J., R. (1992). *Biotechnol. Bioeng.* 41, 465-473.
27. 丸尾文治 田宮信雄 (1982). *酵素ハンドブック* 朝倉書店, 東京
28. Wang, P., Matthews, D., E. and VanEtten, H., D. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 569-575.
29. Cluness, M. J., Turner, P. D., Clements, E., Brown, D., T. and O'reilly, C. (1993). *J. Gen. Microbiol.* 139, 1807-1815.
30. Wang, P. and VanEtten, H., D. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1048-1054.
31. Meyers, P., R., Rawlings, D., E., Woods, D., R., and Lindsey, G., G. (1993). *J. Bacteriol.* 175, 6105-6112.
32. Hucker, G., J. and Conn, H., J. (1923). *Tech. Bull. N.Y. St. agric. Exp. Sta.* No.93.
33. Barrow, G., I. and Feltham, R., K., A. 坂崎利一監訳 (1993) *医学細菌同定の手びき* (第3版) 近代出版, 東京

34. Lambert, J. L., Ramasamy, J. and Paukstells, J. V. (1975). *Anal. Chem.* 47, 916-918.
35. Fawcett, J. K. and Scott, J. E. (1960). *J. Clin. Pathol.* 13, 156-159.
36. Bradford, M. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
37. Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)* 227, 680-685.
38. Quayle, J. R. (1966). *Methods Enzymol.* 9, 360-364.
39. Holt, J., G., Noel, R., K., Sneath, P., H., A., Staley, J., T. and Williams, S., T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th Ed.), Williams & Wilkins, USA.
40. Imai, T. and Suzuki S. (1970). *Protein, Nucleic acid and Enzyme.* 15, 162-173.
41. Stalker, D. M., Malyj, L. D., and McBirde, K. E. (1987). *J. Bacteriol.* 169, 955-960.
42. Stalker, D. M., Malyj, L. D., and McBirde, K. E. (1988). *J. Biol. Chem.* 263, 6310-6314.
43. Nagasawa, T. Mauger, J., and Yamada, H., (1990). *Eur. J. Biochem.* 194, 765-772.
44. Kobayashi, M., Izui, T., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 247-251.
45. Schägger, H. J., and Von Jagow, G. (1987). *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
46. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
47. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
48. Shine, J., and Dalgarno, L. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1342-1346.
49. Rosenberg, M., and Court, D. (1979). *Annu. Rev. Genet.* 13, 319-353.
50. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1990). *J. Bacteriol.* 172, 4807-4815.
51. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1992). *Biochem. J.* 31, 9000-9007.

52. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1990). *Tetrahedron* 46, 5587-5590.
53. Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 20746-20751.
54. Bartling, D., Seedorf, M., Mithoesr, A. and Weiler, E.,W. (1992). *Eur. J. Biochem.* 205, 417-424.
55. Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R., C. and Weiler, E.,W. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6021-6025.
56. Harper, D., B. (1977). *Biochem. J.* 165, 309-319.

## 論文リスト

- 1) Atsushi Watanabe, Kazuyoshi Yano, Kazunori Ikebukuro and Isao Karube,  
Cyanide hydralysis in a novel cyanide-degrading bacterium by a cyanide dihydratase.  
Microbiol., submitted.
- 2) Atsushi Watanabe, Kazuyoshi Yano, Kazunori Ikebukuro and Isao Karube,  
Cloning and expression of a cyanide dihydratase gene from a gram-negative  
bacterium. J. Bacteriol., submitted.
- 3) Atsushi Watanabe, Kazuyoshi Yano, Kazunori Ikebukuro and Isao Karube,  
Investigation of the potential active site of a cyanide dihydratase using site-directed  
mutagenesis. Biochem. Biophys. Acta., submitted.

## 塩基配列の登録

日本DNAデータベースに登録(Accession No. : D82961)。

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご激励、ご指導を賜りました東京大学先端科学技術研究センター 軽部征夫教授に衷心より感謝申し上げます。

ご多忙にもかかわらず学位論文の審査を引き受けて下さいました東京大学先端科学技術研究センター 藤正巖教授、二木鋭雄教授、山本順寛助教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり多くの貴重なご教示とご激励を賜りました、東京大学先端科学技術研究センター 池袋一典講師、矢野和義助手、北陸先端科学技術大学院大学 横山憲二助教授に心よりお礼申し上げます。

本研究の実験および解析にご指導を賜りました東京大学先端科学技術研究センター 佐々木聰助手、野村陽子博士、澤田慎矢博士、松川律子博士、増地矢恵子博士に心から感謝申し上げます。

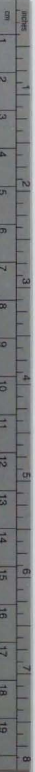
また終始温かく見守り、ご激励並びにご助言をいただきました東京大学先端科学技術研究センター 軽部研究室の皆様方各位に深謝いたします。

最後に、本論文をまとめるにあたり、日々の研究活動ばかりではなく精神的にも支えていただきました日本女子大学、長久保香女史に心より感謝申し上げます。









# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

