

助成年度：平成7年度

[所属] 京都大学 農学部

[役職] 講師

[氏名] 小林 達彦 (他計2名)

[課題]

シアン系化合物の土壌微生物による分解処理に関する基礎研究

[内容]

シアン化カリウムを含む培地を用いた集積培養によりシアン解毒分解菌の取得を試みた。すなわち、土壌分離菌株および研究室保存菌株を用いてシアン分解酵素活性を指標にしたスクリーニングを行った結果、明らかにシアンを分解する微生物が見出された。シアン解毒機構としては、アミノ酸とシアン化カリウムが縮合してニトリルを生成することが判明した。また、アミノ酸としては、システイン、0-フォスフォセリン、ベータ-クロロアラニン、0-アセチルセリンなどを基質とする微生物が自然界に広く存在することが明らかとなった。

その中で、高いシアン分解活性を示した *Pseudomonas ovalis* 細菌より、0-アセチルセリンとシアン化カリウムからベータ-シアノアラニンを生産する酵素、すなわち、ベータ-シアノアラニン合成酵素の単離を試みた。本菌を超音波破碎処理することにより無細胞抽出液を調製した。続いて、硫安分画(10-90%)・DEAE-Sephacel・Octyl-Sepharose CL4B・Sephacryl S-300HR・Phenyl-Superose・Hydroxylapatite・FPLC Mono-Qなどの各種クロマトグラフィーを行うことにより、収率3.61%で1040倍に精製し、電気泳動的に単一の標品を得ることに成功した。本精製酵素は同一分子量(35,000)のサブユニット2個から成る分子量60,000の酵素であり、至適温度40-45度、至適pH8.5-9.0、また、温度50度以下、pH5.5-9.5において安定であることが判明した。さらに、本酵素遺伝子の一部をクローン化した。

一方、耐熱性 *Bacillus* 細菌も高いベータ-シアノアラニン合成酵素活性を与えたことから、本菌についても本酵素を単離精製しつつある。すなわち、*Bacillus* sp. を大量培養し、得られた菌体を超音波破碎処理することにより無細胞抽出液を調製し各種カラムクロマトグラフィーを行うことにより、ベータ-シアノアラニン合成酵素を電気泳動的に単一の標品にまで精製した。本精製酵素は同一分子量(34,000)のサブユニット2個から成る分子量70,000の酵素であり、至適温度45度、至適pH8.0、また、温度70度以下、pH6.0-10.0において安定であることが判明した。さらに、本酵素遺伝子の一部をクローン化した。