

中高温域における 新規ニトリルヒドラーゼ生成菌の探索

和田 裕・大嶋 厚子・杉尾 剛・長澤 透^{a)}

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Survey of Newly-found Nitrile Hydratase-Producing Microorganisms Grown at Higher Temperatures

Hiroshi Wada, Atsuko Oshima, Tsuyoshi Sugio
and Toru Nagasawa^{a)}

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

We surveyed some novel nitrile hydratase-producing microorganisms through the enrichment culture technique at higher temperatures. We isolated several spore-forming filamentous bacteria from soil samples. One of them, strain 45A40 exhibited the highest nitrile hydratase activity. Based on taxonomical studies, strain 45A40 was identified to be genus *Streptomyces*. It was the first example of a *Streptomyces* strain exhibiting high nitrile hydratase activity. We optimized the culture conditions of *Streptomyces* 45A40 to enhance the nitrile hydratase activity. The formation of nitrile hydratase was constitutive and was highly enhanced by the addition of cobalt ions. The enzyme acted on various nitriles and showed low K_m value for 3-cyanopyridine. The enzyme exhibited tolerance against a high concentration of 3-cyanopyridine; however, its heat stability was not outstanding.

Key words : nitrile hydratase, *Streptomyces* enzyme

諸 言

ニトリルヒドラーゼは、温和な条件下でニトリルを水和し、極めて効率的にアミドを生産蓄積する反応を触媒することから、ポリマーの原料であるアクリルアミドの工業生産に応用されてきた (Fig. 1 (1)). またごく最近、ビタミン剤として家畜の飼料添

加に用いられるニコチンアミドの工業生産にも本酵素の水和反応プロセスが応用されるようになった (Fig. 1 (2))¹⁻³⁾. 本酵素は今日のバイオインダストリーにおいて、最もポテンシャルの高い酵素の一つであると言える。現在、アクリルアミド、ニコチンアミドの工業生産は、長澤ら⁴⁻⁶⁾によって確立された方法、即ち *Rhodococcus rhodochrous* J1 をコバルトイオンと尿素を添加した培地で培養し、著量のニトリルヒドラーゼを誘導生成させた菌体を直接触媒的に用いる生産プロセスが実用化されている。

これまでニトリル分解菌の分離は、ニトリルが一般的に低沸点で揮発性であることから、30℃以下の

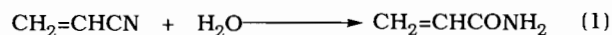


Fig. 1 Production of acrylamide and nicotinamide by nitrile hydratase

Received October 1, 1997

a) 現 岐阜大学・工学部・生命工学科

温度域で集積培養し、分離することが一般的であった。これまで報告されている高活性を示すニトリルヒドラーゼ生成菌としては、*Pseudomonas* 属⁷⁾、*Rhodococcus* 属^{6,8)}の細菌が知られている。新規ニトリルヒドラーゼ生成菌の探索を目的として、今回、我々は比較的高沸点のニトリル化合物を単一炭素、窒素源として用いてこれまで試みられなかった37℃—50℃の中高温域で集積培養を行う新たなニトリル分解菌の探索を試みた。

材料と方法

ニトリル分解菌の分離

比較的高沸点のニトリル化合物、グルタロニトリル、アジポニトリル、アゼラニトリル、セバコニトリル、スクシノニトリル、シアノ酢酸、オクタノニトリル、イソカプロニトリル、バレロニトリルを単一炭素、窒素源として用いて集積培養を行った。集積用培地として、これらのニトリル類を0.2% (w/v)、0.7%リン酸二水素カリウム、0.01%硫酸マグネシウム、0.0002%塩化コバルト、0.0002%硫酸第一鉄を含む培地Aを用いた。集積用培地Aに各種土壤標品を添加し、37℃、45℃、50℃で振盪培養を行った。約10日間培養した後、培養液の数滴を同じ組成の培地に植え継いだ。この操作を4—5回繰り返した後、2% (w/v) 寒天を含む培地Aに広げ、生成したコロニーを取り上げた。

活性菌体の調製

分離菌のニトリルヒドラーゼ活性を評価する培地として次の2種の培地BとCを用いた。培地Bは0.4% (w/v) ϵ -カプロラクタム、1.0%スクロース、1.0% L-グルタミン酸ナトリウム、0.2%硫酸マグネシウム、0.5%リン酸水素二ナトリウム、0.2%リン

酸二水素カリウム、0.0003%塩化コバルト、0.0002%硫酸第一鉄を含み、pHを7.0に調整した。培地Cは0.5% (w/v) クロトンアミド、0.2%酵母エキス、0.02%ペプトン、1.5% L-グルタミン酸ナトリウム、0.2%硫酸マグネシウム、0.0003%塩化コバルト、0.0002%硫酸第一鉄を含み、pHを7.0に調整した。

Streptomyces 45A40の培養条件の検討においては、さらに次の培地D、培地E、培地Fを基礎培地として各種炭素源、窒素源、塩化コバルト、硫酸第一鉄、インデューサー（各種アミド類）の添加効果を検討した。培地Dは1.0% (w/v) 可溶性デンプン、0.05%リン酸二カリウム、0.05%塩化アンモニウムを含み、pHを7.0に調整した。培地Gは1.0% (w/v) グルコース、0.05% L-アスパラギン酸、0.05%リン酸水素二カリウムを含み、pHを7.0に調整した。培地Eは1.0% (w/v) グリセリン、0.2%硝酸ナトリウム、0.1%リン酸水素二カリウム、0.05%硫酸マグネシウムを含み、pHを7.0に調整した。培地Fは1.0% (w/v) グルコース、0.05% L-アスパラギン、0.05%リン酸水素二カリウムを含み、pHを7.0に調整した。

分離菌を上記各種培地に植菌し、37℃で3—4日間振盪培養した後、遠心分離して得られた菌体を0.85% NaClで洗浄したあと、休止菌体のニトリルヒドラーゼ活性を測定した。

活性測定

ニトリルヒドラーゼ活性の測定は、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) と適量の休止菌体を含む液に500 mM 3-シアノピリジンを添加し、30℃で10—30分間振盪反応させた。反応は3規定塩酸0.2mlを添加させることにより止めた。反応液を遠心分離し、その上清液を分析に処した。本標準反応条件下で30℃で1分間に生成するニコチンアミドを算出し

Table 1 Isolated filamentous bacteria

Strain	Nitrile ^{a)}	Growth (OD _{610nm})	Total activity (μ mol/ml/min)	Specific activity (μ mol/ml/min/OD _{610nm})
E3731	Adiponitrile	2.68	0.38	0.14
E3733	Adiponitrile	1.62	0.35	0.21
E3736	Adiponitrile	1.36	3.00	2.21
45A32	Azelanitrile	5.81	18.8	3.23
45A40	Azelanitrile	5.92	33.0	5.57
45O1	<i>n</i> -Octanonitrile	7.24	32.2	4.45
C15	Cyanoacetic acid	2.04	7.01	3.43

^{a)}Nitriles used for the enrichment culture

た。

ニコチンアミド、3-シアノピリジンの分析、定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。カラムは M&S PACK C₁₈ (4.6×150mm) を使用し、移動相として 10 mM リン酸緩衝液 (pH2.8)/アセトニトリル (9/1 v/v) を用いた。流速は 1.0 ml/min とし、230 nm で検出した。

結果及び考察

中高温度域での集積培養

ニトリル分解菌の探索は、ニトリルの沸点が低いことから 28℃ 以下で集積培養を行うのが常とされ、これまでに報告されてきたニトリルヒドラーゼ高活性菌株はもっぱら *Rhodococcus* 属細菌^{6,8)}と

Pseudomonas 属細菌⁷⁾である。本検討では、37℃、40℃、45℃において集積培養を試み、これまでとは異なった属のニトリル分解菌が得られることを期待した。

比較的高沸点のニトリル化合物を単一炭素、窒素源として集積培養に用いた。約 1—1.5ヶ月にわたる集積培養の結果、数多くのニトリル分解菌を取得した。これらの分解菌のニトリルヒドラーゼ活性を測定し、比較的高活性菌を選んだ。これらの活性菌の大半はピンク色をしており、主に *Rhodococcus* 属菌と判断された。このような中高温度域の集積培養では *Pseudomonas* 属菌はまったく見いだされなかった。胞子を形成する明らかに放線菌と判断される菌株が比較的高頻度で見つかった。これらの放線菌

Table 2 Effects of the addition of metal ions on the formation of nitrile hydratase by *Streptomyces* 45A40

Metal ions	Growth (OD _{610nm})	Total activity (μmol/ml/min)	Specific activity (μmol/ml/min/OD _{610nm})
None	7.97	0.10	0.01
FeSO ₄ · 7H ₂ O	8.32	3.36	0.40
CoCl ₂ · 6H ₂ O	8.41	47.8	5.68

Table 3 Effects of various amides on the formation of *Streptomyces* 45A40

Inducer	Growth (OD _{610nm})	Total activity (μmol/ml/min)	Specific activity (μmol/ml/min/OD)
None	1.26	20.9	16.6
ε-Caprolactam	0.66	9.52	14.5
Crotonamide	3.41	22.9	6.72
Methacrylamide	3.33	2.46	0.74
Butylamide	2.19	0.19	0.88
Propionamide	1.91	0.92	0.48
Urea	1.72	2.97	1.73

Table 4 Enhancement of nitrile hydratase activity by the optimization of the culture medium

	Growth (OD _{610nm})	Total activity (μmol/ml/min)	Specific activity (μmol/ml/min/OD _{610nm})
Basal medium	5.92	33.0	5.57
Cobalt ions	8.41	47.8	5.68
Carbon Source	9.79	209	21.3
Nitrogen source	12.9	303	23.5
Optimized medium	15.2	169	31.1

Medium E was used as the basal medium. Glucose and meat extract were added as carbon and nitrogen sources, respectively.

はこれまでの28℃以下の温度域では見いだされなかったニトリル分解菌株であることから、これらの菌株に着目した。

Table 1に孢子を形成する放線菌と判断される菌株のニトリルヒドラーゼ活性をまとめた。アゼラニトリルを単一炭素、窒素源として用い、45℃での集積培養によって得られた45A40株と45A32株が最も高いニトリルヒドラーゼ活性を示した。

菌株の同定

45A40株の菌学的諸性質を検討した。放線菌45A40株は、よく発達した分岐する基生菌糸と気菌糸を形成し、気菌糸上に文節胞子を連鎖状に形成した。胞子の表面構造は、平滑であった。化学分類学的には細胞壁はペプチドグリカン中にLL-ジアミノピメリン酸を主に含み、グリシンの架橋を有した。メナキノン、MK-9 (H6)、MK-9 (H8)を主に含み、リン脂質はホスファチジルエタノールアミンを特徴とするP II型であった。菌体脂肪酸組成は主に飽和のイソ、アンチイソ分岐酸と直鎖脂肪酸から構成される。このような特徴から、本菌は典型的な *Streptomyces* 属放線菌であると判断された。

Streptomyces 45A40のニトリルヒドラーゼ生成条件

Streptomyces 45A40は培地B、Cのいずれの培地においてもニトリルヒドラーゼ活性を示したが、その生育はあまりよくなかった。そこで、*Streptomyces* 属菌に適した基礎培地として、培地D、E、Fを用い、これらに0.0004% (w/v) 鉄イオンあるいはコバルトイオンを添加し、またアミド類を0.4% (w/v) 添加し、最適基礎培地を検討した。この結果 *Streptomyces* 45A40は基礎培地Eが最適であることが明らかとなった。そこで、基礎培地Eをもとにさらにグリセリンに代わる炭素源、硝酸ナトリウムに代わる窒素源を検討した。炭素源としては、グリセリンよりもグルコースの添加が、窒素源としては、硝酸ナトリウムよりも肉エキスあるいはC.S.L.の添加が生育を促進させ、総活性を高めた。比活性は硝酸ナトリウムを用いた時とで大差はなかった。それぞれ炭素源、窒素源の最適添加濃度を検討した。また活性発現には、コバルトイオン添加が必須(Table 2)であり、本 *Streptomyces* 45A40の酵素はコバルトイオンをコファクターとすると予想された。次に本酵素の最適インデューサーを検討した。Table 3に示

したように、これまでのニトリルヒドラーゼの代表的なインデューサーとして知られている各種のアミド類を0.4% (w/v) 添加して培養し、活性菌体を調製した。この結果、*Streptomyces* 45A40は、インデューサーを添加しない時、最も高い活性を示すことから、構成的に生成されることが明らかとなった。これらの培養条件の検討によって、Table 4に示したように当初に比べて大幅な活性の増加が達成された。

これらの培養条件の検討から、*Streptomyces* 45A40のニトリルヒドラーゼ生成の最適培地として、4.5% (w/v) グルコース、0.5% 肉エキス、0.1% リン酸水素二カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、0.001% 塩化コバルトを含む培地 (pH7.0) と決定した。本最適培地で培養して得られる培養液当たりの *Streptomyces* 45A40の3-シアノピリジンに対する活性は、303 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ を示し、*R. rhodochrous* J1のその値 (314 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$) にほぼ匹敵する強い活性を示した。

Streptomyces 45A40のニトリルヒドラーゼの諸性質

本菌のニトリルヒドラーゼの諸性質を休止菌体を用いて検討した。各種ニトリルに対する基質特異性をTable 5にまとめた。本酵素は脂肪族ニトリルをよい基質とし、さらに芳香族ニトリルにも広く作用した。

R. rhodochrous J1の生成するニトリルヒドラーゼは3-シアノピリジンに対する親和性が低くその K_m 値は約250 mMである。一方、*Streptomyces* 45A40のニトリルヒドラーゼは3-シアノピリジンに

Table 5 Substrate specificity

Nitrile	Relative activity
Acetonitrile	No activity
Propionitrile	105
Methacrylonitrile	130
n-Butyronitrile	194
3-Cyanopyridine	100*
2-Cyanopyridine	128
4-Cyanopyridine	168
Benzonitrile	51
Crotonitrile	52
Acrylonitrile	115

*22.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ cells/min

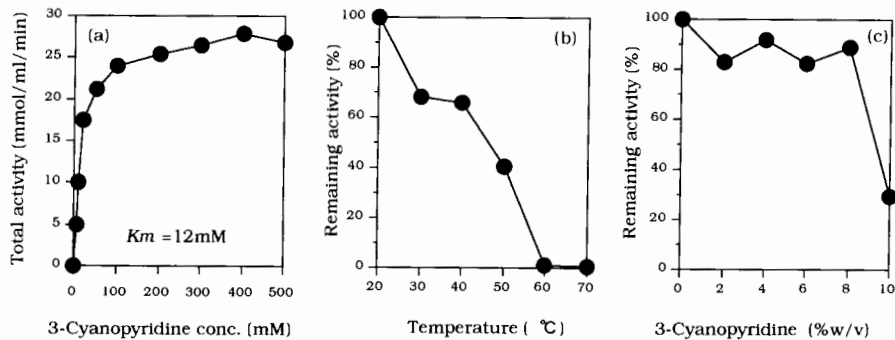


Fig. 2 K_m value, thermal stability and 3-cyanopyridine tolerance of *Streptomyces* 45A40 nitrile hydratase

に対する親和性は高く、その K_m 値は、12 mM と極めて小さな値を示した (Fig. 2(a)). これは、ニコチンアミドの生産において *Streptomyces* 45A40 酵素の優れた特性を示唆している。

Streptomyces 45A40 のニトリルヒドラーゼの 3-シアノピリジン濃度に対する耐性を検討した。Fig. 2(c) に示したように、8% (w/v) の濃度に対しても阻害が認められず、高い耐性を示した。熱安定性については、J1 株の方が安定性に優れていた (Fig. 2(b))⁶⁾。

このように、中高温度域に集積培養を行うことにより、これまで見いだせなかった *Streptomyces* 属のニトリルヒドラーゼ生成菌を初めて見いだせた。今後このような集積培養を行うことにより、さらに新しい属のニトリルヒドラーゼ生成菌の分離が可能となろう。またより熱安定性に優れたニトリルヒドラーゼの発見も大いに期待される。

謝 辞

この研究は平成 6 年度から 8 年度までの 3 年間に亘る岡山大学内特定研究『特殊環境生物の機能開発と物質生産への応用』を分担して行ったものである

文 献

- 1) Nagasawa, T., H. Yamada : Microbial Transformations of Nitriles. Trends Biotechnol., **7**, 153-158 (1989)
- 2) 長澤 透 : ニトリル水和酵素—アクリルアミドの工業生

産への応用. 生物無機化学の新展開. 季刊化学総説, **24**, 180-189 (1994)

- 3) Nagasawa, T., H. Yamada : Microbial Production of Commodity Chemicals. Pure Appl. Chem., **67**, 1241-1256 (1995)
- 4) Nagasawa, T., C.D. Mathew, J. Mauger and H. Yamada : Nitrile Hydratase Catalyzed Production of Nicotinamide from 3-Cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochromis* J1. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1766-1769 (1988)
- 5) Nagasawa, T., K. Takeuchi, V. Nardi-Dei, Y. Mihara and H. Yamada : Optimum Culture Conditions for the Production of Cobalt-Containing Nitrile Hydratase by *Rhodococcus rhodochromis* J1. Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 783-788 (1991)
- 6) Nagasawa, T., H. Shimizu and H. Yamada : The Superiority of the Third-Generation Catalyst, *Rhodococcus rhodochromis* J1 Nitrile Hydratase, for Industrial Production of Acrylamide. Appl. Microbiol. Biotechnol., **40**, 189-195 (1993)
- 7) Yamada, H., K. Ryuno, T. Nagasawa, K. Enomoto and I. Watanabe : Optimum Culture Conditions for Production by *Pseudomonas chlororaphis* B23 of Nitrile Hydratase. Agric. Biol. Chem., **50**, 2859-2865 (1986)
- 8) Nagasawa, T. and K. Takeuchi and H. Yamada. Characterization of a New Cobalt-Containing Nitrile Hydratase Purified from Urea-Induced Cells of *Rhodococcus rhodochromis* J1. Eur. J. Biochem., **196**, 581-589 (1991)