

(0114) シアン化合物分解細菌の単離とそのシアン分解酵素

○小松大祐¹・寺田彩音²・養王田正文²

¹株式会社アイ・エス・ソリューション・²東京農工大学

1. シアン化合物の微生物分解について

シアン化合物は金属との親和性が高く、メッキ工場や金属表面加工工場等、産業的に様々な用途で使われている。しかしながら、シアン化合物は、生体内で細胞内呼吸阻害を引き起こす等生体にとって毒性の高い物質でもあり、生分解を受けにくい。また、安定した構造のため、化学的な分解も受けにくく、土壌・地下水に漏えいしてしまった場合、難分解性で、長期間、環境中に残留してしまう。

シアン化合物で汚染された土壌・地下水における対策方法は国内においては、現状、原位置浄化例は少なく、物理的に汚染の除去を行う掘削除去がほとんどである。理由として、シアン化合物が生物学的もしくは化学的に分解することが困難であり、原位置浄化の適用が難しいことが挙げられる。しかし、既存の報告等から、シアン化合物は微生物分解が可能であることは知られている。特に排水処理の分野について、古くから微生物を用いたシアン化合物の処理方法の検討はされており、微生物分解が適用できることが分かっている¹。また、シアンを分解する微生物によって生成される酵素も多くわかってきている。これらの酵素は、シアンを基質としてアラニンやグルタミン酸、 α -アミノ酪酸、 β -シアノアラニンなどを生成する働きを持つもの等が知られており、シアン化合物の生分解経路は、加水分解的経路と酸化的経路、還元的経路、置換・転移経路、合成経路の5つの経路が知られている^{2), 3), 4), 5)}。

以上から、筆者らは、シアン汚染地下水には少なからずシアン分解菌が存在する可能性があると考え、シアン分解菌の検出、単離を試みた。また、単離した分解菌について、実際の汚染地下水における遊離シアンの分解能について検討を行った。具体的には、微生物によるシアン分解が一部確認されたシアン汚染地下水を対象とし、16S rRNA 及びシアン分解酵素遺伝子の解析を行った。その結果、地下水中でシアン分解を担う微生物は *Pedobacter* 属細菌であることが示唆された。さらに、この微生物の単離培養を行い、分解能の測定を試みた。

2. 実験方法

2.1 地下水中におけるシアン分解菌の確認

シアン汚染地下水からゲノム DNA 抽出を行い、抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。次に、増幅産物を精製後、プラスミドに挿入し、大腸菌を用いて形質転換を行った。できたコロニーについて、コロニーPCR を行い、形質転換されていることを確認後、コロニーからプラスミドを抽出し、目的の配列（地下水から抽出した 16SrRNA 遺伝子）について、シークエンス解析を行った。得られた結果について、データベースにおいて相同性検索を行った。

2.2 シアン化合物分解酵素遺伝子の確認

既存データから、*Pedobacter heparinus* strain DSM 2366 はシアン加水分解酵素であるニトリラーゼを有することが知られている。そこで、*Pedobacter heparinus* strain DSM 2366 由来のニトリラーゼ遺伝子配列に特異的に結合するプライマーを設計し、地下水から抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR による遺伝子の増幅を行った。これにより、地下水中に *Pedobacter heparinus* strain DSM 2366 由来のニトリラーゼが存在するかどうかの確認を行った(図 1)。

Isolation and characterization of Cyanide degrading bacteria and analysis of its enzyme
Daisuke komatsu¹, Ayane Terada² and Masafumi Yohda² (¹ In Situ Solutions Co., Ltd.,

²Tokyo University of Agriculture and Technology)

連絡先：〒101-0024 東京都千代田区神田須田町 2-5-2 須田町佐志田ビル 9 階

株式会社アイ・エス・ソリューション

TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail d_komatsu@is-solution.com

2.3 目的のシアン化合物分解細菌の単離

地下水を寒天培地に塗布し、生成された単一コロニーを採取した。この際、*Pedobacter* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子配列及びニトリラーゼ遺伝子配列を基に設計したプライマーを用いて PCR を行い、増幅された遺伝子を解析することで、目的微生物の単一コロニーを選択的に採取した。次に、採取したコロニーを、液体培地へ移植し、培養を行った。培養液を用いて、同様のコロニー生成と液体培地での培養の操作を繰り返すことで、目的微生物の単離を試みた。

2.4 単離されたシアン化合物分解細菌のシアン化合物分解

得られたシアン化合物分解細菌について、シアン化合物の分解活性や系統解析を行った。また、既存の情報を基に、当該細菌が保有する可能性があるシアン化合物分解酵素についての検討も行った。

3. 結果と考察

3.1 地下水水中におけるシアン分解菌の確認

地下水水中から抽出した DNA を解析し、シアン化合物の分解に関与していると考えられる情報を調べた結果、既存のデータベースからシアン分解能を有することが知られている *Pedobacter heparinus* strain DSM 2366 (以後、*P. heparinus* strain DSM 2366) と 97% の高い相同性を示す菌種が、地下水水中に存在していることが分かった。そのため、その菌のシアン分解酵素について詳細に調べることとした。

3.2 シアン化合物分解酵素遺伝子の確認

地下水から抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR による遺伝子の増幅を行った。

その結果、目的配列と同塩基長の遺伝子断片の増幅が確認された。増幅した配列についてシーケンス解析を行い、得られた配列について、データベース上において相同性検索を行った。その結果、*P. heparinus* strain DSM 2366 由来のニトリラーゼ遺伝子と 84% の高い相同性を示した。ニトリラーゼ遺伝子の配列の比較を図-1 に示す。このことから、地下水水中において、ニトリラーゼを保有している

P. heparinus strain DSM 2366 の近縁種が存在していることが示唆された。

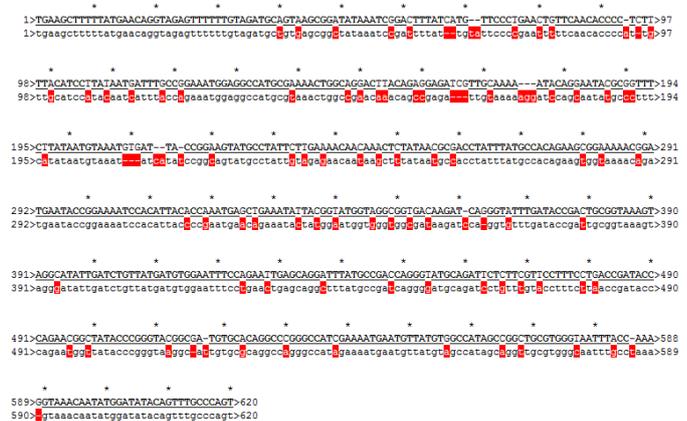


図-1 ニトリラーゼ遺伝子のシーケンスアライメント
(上) 地下水水中微生物由来 PCR 増幅 DNA
(下) *P. heparinus* strain DSM 2366 由来ニトリラーゼ遺伝子

3.3 目的のシアン化合物分解細菌の単離

汚染地下水水中でシアン分解を担う菌種は、ニトリラーゼを有する *Pedobacter* 属細菌であることが示唆された。そこで、*Pedobacter* 属細菌の単離を試みた。

その結果、ある *Pedobacter* 属細菌の単離を行うことができた。コロニー写真を図-2 に示す。なお、単離された細菌から抽出した DNA を鋳型として、*Pedobacter* 属細菌やニトリラーゼに特有のプライマーを用いて PCR を行った結果、バンドが確認された (図-3)。以上から、単離された細菌は、*Pedobacter* 属細菌であり、ニトリラーゼを保有していることも確認された。



図-2 単離された細菌のコロニー

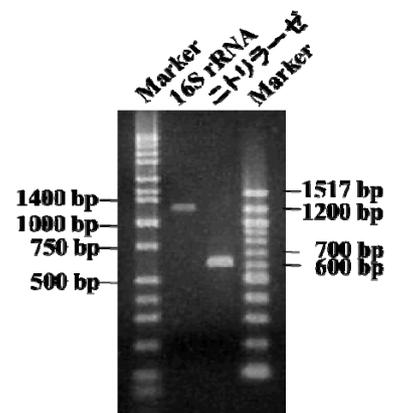


図-3 PCR の結果

3.4 単離されたシアン化合物分解細菌のシアン化合物分解

単離されたシアン分解細菌について、シアン分解活性を確認した。生菌数が約 $3E+9$ cells/ml の液体培地中にシアン化濃度が およそ 25 mg/l となるようにシアン化カリウムを添加し、濃度推移の測定を行った結果、シアン濃度の降下が確認された。このことから、獲得した *Pedobacter* 属細菌はシアン分解能を有することが判明した (図-4)。

次に、実際のサイトから採取したアルカリ性 (pH10) のシアン汚染地下水に対して、シアン化カリウムを添加し、生菌数が約 $3E+9$ cells/ml となるように分解菌を添加した結果を図-5 に示す。その結果、地下水の滅菌有無に関わらず、シアン化カリウム濃度が減少した。このことから、実際の汚染サイトの水であってもシアン化カリウムの分解が可能であることが示された。また、pH10 というアルカリ環境においても性能を発揮することが分かった。シアン化合物は酸性側に傾くと、シアン化水素となって揮発する可能性がある。シアン化水素は猛毒のため、危険であることから、アルカリ環境下でシアン化合物が処理できればより安全である。

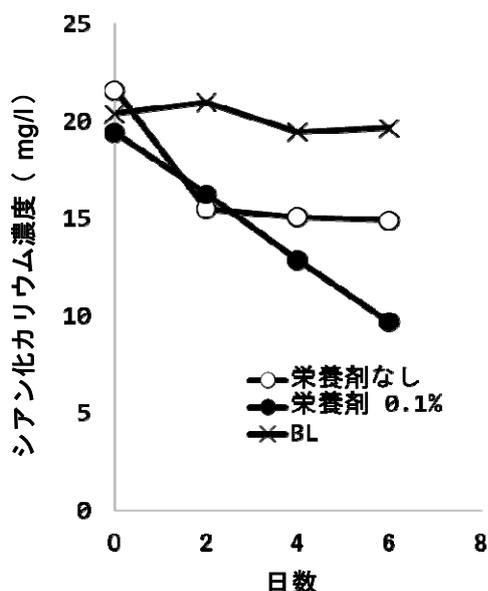


図-4 生理食塩水中のシアン濃度推移

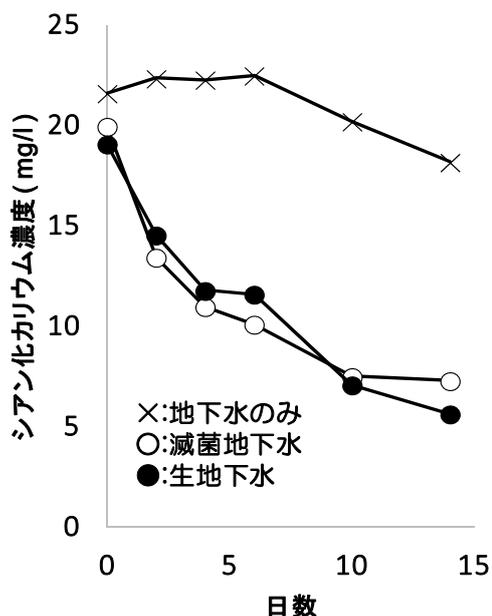


図-5 汚染地下水中のシアン濃度推移

4. まとめ

シアン汚染地下水を対象として、16S rRNA 及びシアン分解酵素遺伝子の解析によりシアン分解菌の同定を行った。その結果、地下水でシアン分解を担う微生物は *Pedobacter* 属細菌である可能性が示された。更に、この微生物はシアン加水分解酵素であるニトリラーゼを所有していることが示唆された。そこで、*Pedobacter* 属細菌の単離を試みた結果、シアン分解能を有する微生物が獲得された。今後は、単離菌のさらなる詳細な解析や分解活性について調べ、将来的には、バイオレメディエーション利用指針の取得等、オーグメンテーションの検討についても行っていく予定である。

5. 参考文献

- 1) Stephen Ebbs, Biological degradation of cyanide compounds, *Current Opinion in Biotechnology* 2004, 15:231–236
- 2) Neha Gupta*, Chandrajit Balomajumder, V.K. Agarwal, Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation, *Journal of Hazardous Materials* 176 2010, 1–13
- 3) Ludmila Martı́nkova´ and Vladimı́r Krı́en, Biotransformations with nitrilases, *Current Opinion in Chemical Biology* 2010, 14:130–137
- 4) Fernandes BCM, Mateo C, Kiziak C, Chmura A, Wacker J, van Rantwijk F, Stolz A, Sheldon RA. Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Adv Synth Catal* 2006, 348:2597-2603.
- 5) Ludmila Martı́nkova´ and Vladimı́r Krı́en, Biotransformations with nitrilases, *Current Opinion in Chemical Biology* 2010, 14:130–137

Q：シアンのパイオレメディエーションは今すぐに適用可能か。

A：すぐにできるわけではない。今後、研究開発を続け、補足データは必要。

Q：シアンはいろいろな形態で存在していると考えられるか？

A：そう考えている。遊離シアンは少なく、銅や鉄、ニッケル等と錯イオンを形成していると考えられる。

Q：今回の菌は遊離シアンのみしか分解できないのか？

A：銅シアンも分解できることが確認できている。しかし、鉄シアンは分解できない。

今後、鉄シアンの分解もできるような菌の単離等を検討している。

Q：この菌は大量培養できるのか。

A：大量培養は容易と考えられるが、現時点では大量培養する設備等の保有がない。今後の検討課題である。

Q：この菌はアルカリ環境下で生育できるのか？

A：実験データからそう考えている。今回の菌の間にもアルカリ環境下で生育できるものがあるとの報告がある。

Q：アルカリ環境下だと何が良いのか？

A：シアンは酸性環境下だと遊離して青酸ガスになる可能性がある。青酸ガスは毒性が極めて強く危険である。

従って、アルカリ環境下で処理できるのが望ましいと考えている。