

氏名	かな 金	もり 森	たけし 武
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)		
学位記番号	工 博 第 2436 号		
学位授与の日付	平成 16 年 11 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	工学研究科合成・生物化学専攻		
学位論文題目	Identification of <i>Oleomonas sagaranensis</i> gen. nov., sp. nov., and studies on a novel urea assimilating pathway in Bacteria (新属新種細菌 <i>Oleomonas sagaranensis</i> の同定及び細菌における新規尿素資化経路に関する研究)		
論文調査委員	(主 査) 教授 今 中 忠 行 教授 青 山 安 宏 教授 森 泰 生		

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、静岡県相良油田より単離されたグラム陰性細菌 HD-1 株の系統解析を行うとともに、その代謝のうち、窒素源の資化に焦点を絞り、これに関わる酵素として細菌でこれまでに報告のない ATP 依存的な尿素分解酵素 urea amidolyase の酵素学的特性解析を行ったものであり、序論、本論 3 章、結論から構成されている。

序論では細菌の分類学の基礎、本研究の対象である細菌 HD-1 株の過去の研究の経緯、生物的尿素資化に関わる酵素の研究の現状などがまとめられている。

第 1 章は、グラム陰性細菌 HD-1 株の同定についてまとめたものである。HD-1 株は静岡県相良油田から単離された細菌であるが、その進化的位置づけに関してはほとんど議論されていなかった。そこで、16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析や DNA-DNA hybridization によるゲノム DNA 相同性比較を行い、本菌が分類学上、 α -Proteobacteria 中の新たな「属」に属することを明らかにした。また、炭素源資化性などの基礎的性質もこれを支持するものであったので、新しい属として *Oleomonas* を定義し、本菌を *Oleomonas sagaranensis* strain HD-1 と命名した。

第 2、3 章では *O. sagaranensis* の窒素源資化性に着目し、その資化に関わる酵素として、原核生物で初めて ATP 依存的な尿素分解酵素 urea amidolyase (UALase) をコードする遺伝子を取得し、その発現産物の酵素学的特性解析を行った。UALase の触媒機能は、実質的には urea carboxylase と allophanate hydrolase の 2 つの独立した酵素活性から成っている。

第 2 章はこれらの酵素のうち、urea carboxylase について、遺伝子クローニング及びその生化学的特徴をまとめたものである。尿素を単一窒素源として培養した *O. sagaranensis* 中に UALase 様の活性があったことから、これに対応する酵素をコードする遺伝子として、酵母では urea amidolyase として一体になっている urea carboxylase と allophanate hydrolase が隣りあった別々の ORF にコードされている遺伝子構造を本菌に見出した。このうち urea carboxylase 相同遺伝子の発現産物は尿素の他、構造類似体であるアセトアミドやホルムアミドに対してもカルボキシラーゼ活性を示した。また、これまで細菌の尿素資化は専ら urease によると考えられてきたが、ゲノムの全塩基配列が明らかになっている生物について、*O. sagaranensis* に見出されたような urea amidolyase 相同遺伝子の有無を調べ、多くの細菌が urea amidolyase を尿素資化に利用している可能性があることを示す結果を得た。

第 3 章は urea carboxylase 遺伝子のすぐ下流に見出された allophanate hydrolase 相同遺伝子について、発現産物の生化学的特徴をまとめるとともに、両遺伝子の発現産物を混合することで得られる urea amidolyase 活性について、その基質特異性を検討したものである。まず、allophanate hydrolase 相同遺伝子の発現産物がアロファン酸に対して高い加水分解活性を示す一方、ビウレットなどの構造類似体に対しては全く活性をもたないことを明らかにした。また、urea carboxylase と allophanate hydrolase を混合することで、ATP 依存的に尿素からアンモニアを生じる活性が得られることを確かめ、両者が UALase として機能し得ることを *in vitro* において示した。しかし、urea carboxylase がアセトアミドやホルムアミドを基質としたにも拘らず、この混合系はこれらの化合物からアンモニアを生成する活性を持たず、トータルの UALase

活性としては尿素を特異的基質とすることが示された。

結論では、本論文で得られた成果について要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、環境サンプルから得られた細菌に関して同定を行うとともに、この細菌由来の ATP 依存的尿素分解酵素 urea amidolyase (UALase) について研究を行い、その成果についてまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

1. グラム陰性細菌 HD-1株が新属新種であることを示し、本菌を *Oleomonas sagaranensis* strain HD-1 と命名した。
2. *O. sagaranensis* の尿素資化性に着目し、*O. sagaranensis* から原核生物としては初めて、UALase 反応の前半部分を触媒する urea carboxylase に対応する遺伝子を見出した。
3. Urea carboxylase 遺伝子の異種大量発現、発現産物の精製、ならびに生化学的解析を行い、本酵素が尿素、アセトアミド、ホルムアミドを基質とすることを明らかにした。
4. Urea carboxylase 遺伝子の下流に、urea amidolyase 反応の後半を触媒する allophanate hydrolase に対応する ORF を見出した。
5. Allophanate hydrolase 遺伝子の異種大量発現、発現産物の精製、ならびに生化学的解析を行い、本酵素がアロファン酸に対して加水分解活性を示すことを示した。
6. Urea carboxylase と allophanate hydrolase とを混合することで UALase 活性が示されることを確かめた。
7. 様々な細菌の全ゲノムデータを調べ、UALase 相同遺伝子が *O. sagaranensis* に限らず様々な細菌に分布していることを明らかにした。

以上、本論文は属レベルでの新種細菌の存在を示したものであり、原核生物由来 UALase の最初の解析報告でもある。得られた成果は、細菌の窒素代謝に新たな知見を与えるだけでなく、新種生物が持つ新規遺伝子のソースとしての可能性を裏付けるものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成16年10月25日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。