

| | |
|----------|---|
| 氏名 | こ たに てつ や 小 谷 哲 也 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学) |
| 学位記番号 | 農 博 第 1578 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 18 年 7 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 | 農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻 |
| 学位論文題目 | Novel metabolic pathways for microbial oxidation of propane and ethyl <i>t</i> -butyl ether as volatile organic compounds (揮発性有機化合物プロパン及びエチル <i>t</i> -ブチルエーテルの微生物における新奇な酸化代謝経路) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教 授 阪 井 康 能 教 授 清 水 昌 教 授 喜 多 恵 子 |

論 文 内 容 の 要 旨

揮発性有機化合物 (VOC) は常温で揮発しやすい有機化合物の総称で、硫黄酸化物や窒素酸化物と共に大気汚染の主要な原因物質であることから、VOC の排出抑制または分解除去に関する技術開発が望まれている。プロパンなどのガス状 *n*-アルカンはその自身に強い毒性はないものの大気中では窒素酸化物と反応して光化学オキシダントを生成する。一方、エチル *t*-ブチルエーテル (ETBE) はガソリンのオクタン価向上基材としての利用が予定されている VOC である。従来、利用されていたメチル *t*-ブチルエーテル (MTBE) は、大規模な地下水汚染を起こし発ガン性が疑われたこともあって現在は利用禁止となった。ETBE の利点は、その生産が MTBE 合成プラントを利用できること、バイオマスエタノールを原料として合成可能なことである。本研究は VOC であるプロパンもしくは ETBE を資化する微生物を自然界より分離し、これら VOC の酸化的分解代謝について酵素並びに遺伝子レベルでの解析を行ったものである。

VOC としてプロパンと ETBE に着目し、微生物による分解代謝経路を明らかにする目的で、プロパン資化性菌並びに ETBE 資化性菌を自然界より分離し解析を進めた。その酸化的分解代謝に関わる酵素を精製・当該遺伝子をクローン化するとともに、発現解析、遺伝子破壊などを行った。得られた結果は以下の点に要約できる。

1) プロパン資化性細菌を自然界より多数分離して同定したところ、*Gordonia* 属、*Pseudonocardia* 属、*Mycobacterium* 属のいずれかに属していた。プロパン酸化反応の生成物を調べたところ、*Gordonia* sp. TY-5 株ではサブターミナル酸化により、また *Mycobacterium* sp. TY-6 株はターミナル酸化により、*Pseudonocardia* sp. TY-7 株は両酸化経路によりプロパンを代謝していることを明らかにした。

2) 3 種のプロパン資化性細菌から、プロパン酸化反応を触媒している *prm* オペロン遺伝子をクローン化し遺伝子構造を決定した。その遺伝子発現について調査し、いずれの菌株でもガス状アルカンにより *prm* オペロンが顕著に誘導されることを明らかにした。

3) *Gordonia* sp. TY-5 株において *prm* オペロン遺伝子を破壊したところ、プロパン生育能を失ったことから、*prm* オペロンはプロパン酸化に必須であることを明らかにした。

4) *Gordonia* sp. TY-5 株より 3 種の二級アルコール脱水素酵素、Adh1, Adh2, Adh3 を精製し、それぞれ酵素学的諸性質について検討し、基質特異性など、反応特性の異なる酵素であることを明らかにした。

5) Adh1 をコードする *adh1* 遺伝子は *prm* オペロンの下流にあり、プロパン生育時に誘導された。*adh1* 遺伝子を破壊したところプロパンに生育不能となったことから、プロパン酸化により生じた 2-プロパノールは、アセトンに酸化されることを明らかにした。

6) アセトン誘導・非誘導時における菌体より無細胞抽出液を調製し、二次元電気泳動によるプロファイル比較から、アセトン誘導される複数のタンパク質の遺伝子をクローン化、それらの遺伝子構造について決定したところ、そのうちのひとつが Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼと高い相同性を有しており、当該遺伝子産物をアセトンモノオキシゲナーゼ

(Acm), その遺伝子を *acm* と名付けた。

7) *acm* を大量発現させた大腸菌の休止菌体にアセトンを与えると, アセトンの減少に伴って酢酸メチルの生成が確認された。以上の事実から, プロパン酸化代謝により生じたアセトンは Acm により酢酸メチルに酸化されることが明らかとなった。

8) ETBE を単独の炭素・エネルギー源として成育できる細菌を多数分離・同定したところ, これらは, *Rhodococcus* 属, *Arthrobacter* 属, *Pseudomonas* 属に属していた。

9) *Rhodococcus* sp. ET-1 株を用いて, その ETBE 代謝について検討したところ, 代謝中間体として *t*-ブチルアルコールを検出した。さらに, 本反応の酸素要求性, メチラポンによる反応阻害から, P450 モノオキシゲナーゼであることが示された。

10) ETBE で特異的に誘導され, かつ, 420 nm に吸収を示すタンパク質を *Rhodococcus* sp. ET-1 株の無細胞抽出液に見だし, その一次配列をもとに本タンパク質をコードする遺伝子 EtcA を含む P450 遺伝子クラスターを発見した。EtcA は P450 モノオキシゲナーゼ, EtcB はフェレドキシンレダクターゼ, EtcC は, [2Fe-2S] 型フェレドキシンとそれぞれ高い相同性を示していた。

11) EtcA は, その一次構造から, 従来, 1例しか報告されていない CYP249 ファミリーに属していたが, その酵素学的諸性質については不明であった。Etc 遺伝子クラスターを大腸菌内で活性型で発現させることに成功し, ETBE 分解活性を示す本 EtcA が, 420 nm における吸収ピークをもつこと, 還元状態で CO 処理しても吸収スペクトルに変化を示さないことなどの酵素学的性質からも, CYP249 ファミリーが新奇な P450 ファミリーであることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

プロパンなどの気体状アルカンやエチル *t*-ブチルエーテル (ETBE) など, いわゆる揮発性有機化合物 (VOC) の微生物代謝については, 従来, ほとんど知見はなく, その分解代謝の詳細については明らかではなかった。近年, VOC が大気汚染の主要な原因物質であることから, 微生物を用いた VOC の排出抑制または分解除去に関する技術開発が望まれている。本論文は, プロパンと ETBE を対象として, 新たにこれらの VOC を単一の炭素・エネルギー源として成育できる微生物を多数分離し, 生化学的手法と遺伝子操作技術を駆使して, プロパンと ETBE の分解代謝を解析したものであり, 評価すべき点は以下の7点である。

1) プロパン資化能を有する *Gordonia* sp. TY-5 株を分離し, これを用いてプロパン代謝について検討したところ, 反応代謝産物として 2-プロパノールを認め, 本菌におけるプロパン酸化がサブターミナル酸化で起こることを明らかにした。

2) 3種のプロパン資化性細菌から, プロパン酸化反応を触媒する *prm* オペロン遺伝子をクローン化し, これらの遺伝子構造を決定した。全ての *prm* オペロンはメタンを除く気体状アルカンにより誘導されており, *prm* 遺伝子産物の気体状アルカン代謝への関与を示した。さらに微生物におけるプロパン代謝の多様性について初めて明らかにした。

3) *Gordonia* sp. TY-5 株において, *prm* オペロンを破壊すると, プロパン生育能を失ったことから, *prm* オペロンがプロパンでの生育に必須であることを初めて明らかにした。

4) *Gordonia* sp. TY-5 株より3種の二級アルコール脱水素酵素, Adh1, Adh2, Adh3 を精製, さらに当該遺伝子をクローン化した。さらに, このうち Adh1 がプロパン酸化により生じたアセトンを酸化していることを, *adh1* のプロパン生育時における誘導と遺伝子破壊実験から明らかにした。

5) アセトン誘導・非誘導時におけるタンパク質プロファイル解析から, アセトン誘導される複数のタンパク質を見出した。そのうちの1つ, アセトンモノオキシゲナーゼ (Acm) をコードする遺伝子 *acm* をクローン化し, 当該遺伝子産物が Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼと高い相同性を有していることを明らかにした。さらに大腸菌での活性発現に成功し, プロパン酸化代謝により生じたアセトンは, Acm により酢酸メチルに酸化されることを明らかにした。

6) 自然界より ETBE を分解する微生物を多数単離し, その中の *Rhodococcus* sp. ET-1 株を用いて ETBE 代謝について検討したところ, 代謝中間体として *t*-ブチルアルコールを検出した。さらに, 本反応の酸素要求性, メチラポンによる反応阻害から, P450 モノオキシゲナーゼが ETBE 代謝に関与していることを示した。

7) ETBE 生育時に特異的に誘導され、かつ、420 nm に吸収を示すタンパク質を *Rhodococcus* sp. ET-1 株の無細胞抽出液に見いだし、その一次配列をもとに本タンパク質をコードする遺伝子 EtcA を含む P450 遺伝子クラスターを発見した。EtcA は、その一次構造から、従来、1 例しか報告されていない CYP249 ファミリーに属していた。本遺伝子クラスターを大腸菌内で発現させると ETBE に対して P450 モノオキシゲナーゼ活性を示し、その無細胞抽出液が 420 nm における吸収ピークをもつこと、還元状態で CO 処理しても吸収スペクトルに変化を示さないなどの酵素学的諸性質からも、CYP249 ファミリーが新奇な P450 ファミリーであることを明らかにした。

以上のように本論文は、VOC である気体状アルカン・プロパンの分解代謝経路解明のために、生化学的手法・分子生物学的手法を駆使し、プロパンから、2-プロパノール、アセトン、酢酸メチルに至る新しいプロパン代謝経路を初めて明らかにしてその全体像を把握するとともに、関連酵素のプロパン代謝における生理機能を明示したものである。同時に VOC の一種である ETBE の酸化的分解に関わる P450 モノオキシゲナーゼの酵素学的性質を初めて明らかにしたものである。従って、本研究は、環境から VOC を除去する微生物技術の開発のための基盤的知見を与えるものであり、制御発酵学、応用微生物学、微生物生化学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年6月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。