

氏名	おおしろ たかし 大 城 隆
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2070号
学位授与の日付	平成8年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	MICROBIAL SULFUR METABOLISM OF HETEROCYCLIC SULFUR COMPOUNDS (微生物における含硫複素環式化合物の硫黄代謝に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 加藤 暢夫 教授 熊谷 英彦

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は硫黄を含む複素環式化合物、ジベンゾチオフェン (DBT) とピオチンの微生物による硫黄代謝の解明を目的として行われたもので、DBT からの硫黄の除去、ピオチンへの硫黄の導入に関与する酵素系の解析、酵素の精製と諸性質の解明、反応機構の解析についてまとめたものである。主な内容は次のとおりである。

1. DBT から選択的に硫黄原子を脱硫できる微生物を検索し *Rhodococcus erythropolis* D-1 株を単離した。本菌株は 0.125mM (23mg/l) の DBT を 2 日間で完全に脱硫し、DBT スルホンを経て末端代謝物 2-ヒドロキシビフェニル (2-HBP) を定量的に生成した。さらに休止菌体反応では、2.2mM (405mg/l) での DBT ならば 150 分以内に完全に脱硫され、ほぼ定量的に 2-HBP が生成することを明らかにした。
2. 炭化水素存在下でも DBT 脱硫能を示す微生物の検索を行い、*R. erythropolis* H-2 を得た。本菌株は 40% *n*-テトラデカン (TD) 存在下で 0.27mM (50mg/l) の DBT を 1 日で完全脱硫し等モル量の 2-HBP を生成した。凍結乾燥菌体による休止菌体反応では、TD の添加で脱硫速度は上昇し、40% TD 添加の場合に DBT 脱硫速度は最大となった。また、本菌株はアルキル側鎖を有する DBT 誘導体に対しても脱硫活性を示し、その生成物はモノヒドロキシ体と推定された。
3. *R. erythropolis* D-1 の無細胞抽出液を用いる反応系において、NADH を添加すると DBT から 2-HBP への転換反応が起こることを見いだした。部分精製標品を用いて本酵素反応を検討し、DBT から 2-HBP へ至る変換酵素系のうち DBT から DBT スルホンへの変換に関与する酵素系を分離することができた。本酵素反応にはフラビン化合物が関与することと明らかにした。
4. DBT アナログであるチオキサンテン9-オンなどを硫黄源とした時に DBT 分解酵素系が誘導され、これに対し硫酸イオンが存在すると、DBT を培地に添加しても DBT 分解酵素系は抑制されることを明らかにした。
5. DBT から DBT スルホンへの反応を触媒する酵素 DBT oxygenase system を 2 つのタンパク質画分

に分離し、そのうち fraction B と名付けた画分を電気泳動的に均一な標品として得た。精製標品 component B は分子量250,000サブユニット分子量45,000で6量体構造を有すると推定された。もう一方の fraction A は2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを電子受容体とするいわゆる reductase 活性を有していた。阻害剤実験より component B の活性には SH 基や金属が関与していると考えられた。

6. ビチオン生合成に関与する酵素反応で、唯一未解明なデチオビチオン (DBT) に硫黄原子を導入してピオチンを生成する反応について、この反応に関与する *bioB* 遺伝子を高発現する *Bacillus sphaericus*, *Escherichia coli* の無細胞抽出液を用いて検討し、S-アデノシルメチオニン (AdoMet) が必須であること、NADPH, FAD が活性を促進することを見出した。この際、無細胞系タンパク質濃度を高く (15mg/ml 以上) する必要があることも認めた。

7. すでに硫黄原子が存在する DBT チオールからピオチンへの反応にも AdoMet の添加効果が認められ、さらに DBT からのピオチン生成反応には AdoMet 存在下でもシステインの添加効果が認められた。これに基づき AdoMet は本酵素反応の硫黄源ではなく、むしろシステインあるいはその関連化合物が硫黄源である可能性が高いことを示した。

論文審査の結果の要旨

石油が燃焼する際、生成する亜硫酸ガスは酸性雨の原因となるために石油精製の過程においてはいわゆる脱硫プロセスが必須となる。しかし、DBT を骨格とする複素環式化合物の脱硫は従来のプロセスでは多大なエネルギーを要するため、DBT に効率よく働く新規脱硫法の開発が望まれている。また、ピオチン生合成の最終段階である DBT 硫黄原子を導入する酵素反応についてはほとんど解明されていない。本論文はこれら合硫複素環式化合物の特異な硫黄代謝に関与する酵素系の解析、酵素の精製と諸性質の解明、反応機構の解析についてまとめたものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. DBT を単一硫黄源として生育できる新規微生物 *R. erythropolis* D-1 および H-2 を単離し、これらの菌株が DBT の炭素骨格を破壊せず選択的に硫黄原子のみを除去し、末端代謝産物として 2-HBP を生成することを明らかにした。DBT の脱硫は菌体反応系で迅速に進行し、特に *R. erythropolis* H-2 は炭化水素存在下でも高い脱硫能を発揮することを認めた。本菌株はいくつかの DBT 誘導体に対しても脱硫活性を示し、石油の微生物脱硫を実際に行う上で優れていると考えられた。

2. *R. erythropolis* D-1 の無細胞系でも DBT 脱硫活性を検出することに成功し、各種硫黄化合物による本酵素系の生産調節機構の一端を解明した。DBT から 2-HBP への変換に関与する酵素系から DBT スルホンまでの変換に関与する酵素系を分離することに成功し、本酵素系が2つ以上のタンパク質からなることを明らかにした。そのうちの1つの酵素タンパク質を単一に精製し、その性質を明らかにした。さらにこの酵素系を構成するタンパク質の機能と役割について提晶した。

3. DBT からピオチンへの酵素反応に関与する諸因子を検索し、AdoMet がピオチン生成に必須であること、酸化還元に関与する補酵素が反応を促進することを明らかにした。また、AdoMet は反応の硫黄源ではなく、システインあるいはその関連化合物が硫黄源となる可能性を示した。

以上のように本論文は微生物学的、生化学的手法を用いて微生物による DBT の脱硫能力を評価し、こ

の反応に関与する酵素系の一部を解明するとともに、ビオチンへの硫黄導入反応についても反応に関与する諸因子を明らかにしたものであり、応用微生物学および発酵生理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8年4月10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。