

氏 名	谷 明 生
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1160 号
学位授与の日付	平成 13 年 1 月 23 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	Divergent enzyme systems for oxidation of long-chain <i>n</i> -alkanes in <i>Acinetobacter</i> sp. strain M-1 (<i>Acinetobacter</i> sp. M-1 株の長鎖 <i>n</i> -アルカン酸化経路における多様な酵素系)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

化学物質による環境汚染を修復する方法のひとつとして、微生物の多様な分解能を利用するバイオレメディエーション法があり、様々な汚染の様態に対応する技術開発が進められている。この技術開発に当たっては、処理技術の適用による生態系の変動や二次汚染を最小限にすることが重要であり、そのためには、活用する微生物の分解過程を詳細に把握する必要がある。また、分解過程を明らかにすることによって、処理能力の向上が期待でき、さらに、その素反応を有用物質生産のために利用することも可能となる。これまでに、バイオレメディエーション法を原油流出などによる環境汚染の修復に適用した成功例はあるが、高沸点石油留分に対する微生物の分解能が処理工程の制限要素となることも知られており、特に長鎖アルカン類に対する微生物分解代謝については未解明の領域であった。

本論文では、原油あるいは石油化学製品による環境汚染を修復するための高効率で安全な技術を開発するための基盤的知見を得ることを目的として、*Acinetobacter* sp. M-1 株が示す広範囲な *n*-アルカン分解能を、関与する酵素の性質や相当する酵素遺伝子の発現調節機構の観点から明らかにするとともに、その代謝経路上に物質変換に有用な酵素が存在することも同時に示したものであり、得られた結果は以下のように要約できる。

1) *Acinetobacter* sp. M-1 株に 2 種のアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子 (*parA* および *parB*) を見出し、それぞれの推定一次構造中にヒドロキシラーゼに特徴的なモチーフが存在することを認めた。次いで、中鎖アルカン資化性の *A. calcoacetica* ADP1 株よりアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子破壊株を構築し、そのアルカン資化能が *parA* および *parB* によって相補される事実を得、それぞれの遺伝子産物が活性を有することを確かめた。また、Northern 解析によって、*parA* は炭素鎖が 22 以上の *n*-アルカンによって、他方 *parB* は炭素鎖が 22 以下の *n*-アルカンによってそれぞれ特異的に発現誘導が起こる新しい現象を見出した。さらに、ヒドロキシラーゼと共に *n*-アルカン酸化を触媒するための 3 成分系を構成するルブレドキシンおよびルブレドキシンレダクターゼの遺伝子がそれぞれ 1 種ずつのみ存在することを認め、当該遺伝子を形質転換した大腸菌から各遺伝子産物を精製し、性質を明らかにした。すなわち、本菌が 2 種のアルカンヒドロキシラーゼと 1 種ずつのルブレドキシンおよびルブレドキシンレダクターゼによって 2 種のアルカン酸化酵素系を形成し、これによって広範囲な鎖長の *n*-アルカンを効率よく分解することが可能になることを示した。

2) *n*-アルカンの酸化によって生じた脂肪酸は β -酸化系に導かれるが、その主要な酵素であるアシル CoA デヒドロゲナーゼを M-1 株より精製し、基質特異性を異にする 2 種の酵素が存在することを明らかにした。次いで、両酵素に相当する遺伝子 (*acdA* および *acdB*) をクローニングし、大腸菌で発現した酵素の性質から、AcdA は中鎖の、AcdB はより長鎖のアシル CoA に高い触媒活性を有することを見出した。この酵素の多様性も本菌による広範囲な鎖長の *n*-アルカンの利用性を裏付けるものである。

3) 本菌は、*n*-アルカン生育時に多量のワックスエステルを細胞内に蓄積する。*n*-アルカン酸化によって生じるアルデヒドからワックスエステルのアルコール部分を合成するために必要な NADPH 関与のアルデヒド還元酵素の高い活性を見出

し、酵素を精製してその性質を明らかにした。本酵素は、脂肪族アルデヒドや各種の置換基を有する芳香族アルデヒドに対して幅広い基質特異性を示し、分子活性が極めて高く、しかも熱に安定であった。この酵素の物質生産への利用を考慮して、当該遺伝子のクローニング、大腸菌での大量発現、および簡便な酵素精製法を確立した。

論文審査の結果の要旨

微生物による炭化水素の利用は、従来物質生産を目的に研究が進められてきたが、最近その知見は、原油や石油化学品によって引き起こされる環境汚染を修復するための技術開発に活用されている。原油の主要成分のひとつである常温で固体の長鎖アルカン類は、物質生産の研究ではほとんど取り扱われることがなかったために、その微生物分解は未知の領域であった。しかし、環境修復ではその分解が律速要因となるため、微生物分解の詳細を明らかにする必要がある。本研究は、広範囲な鎖長のアルカン類を分解できる細菌、*Acinetobacter* sp. M-1 株を用い、長鎖アルカンの分解代謝を酵素とその遺伝子発現の観点から明らかにしたものであり、評価すべき点は以下の3点である。

1) *Acinetobacter* sp. M-1 株にアルカン酸化の初期反応に関与するアルカンヒドロキシラーゼに相当する2種の遺伝子(*parA* および *parB*)を見出し、その推定一次構造上の特徴、触媒機能および遺伝子発現調節を明確にした。まず、他の *Acinetobacter* 属細菌からアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子破壊株を構築し、その *n*-アルカン資化能が M-1 株の *parA* および *parB* により相補される事実から、両遺伝子産物が触媒活性を有することを確かめた。さらに、*parA* は炭素鎖22以上の *n*-アルカンによって、*parB* は炭素鎖22以下の *n*-アルカンによってそれぞれ特異的に誘導発現することを見出し、これが転写レベルでの調節によることを明らかにした。一方、ルブレドキシンおよびルブレドキシンレダクターゼに相当する遺伝子はそれぞれ1種ずつのみ存在することを認め、これらが2種のヒドロキシラーゼとともに2種のアルカン酸化酵素の3成分系を形成することを明確にした。このことは、本菌が幅広い鎖長の *n*-アルカンを効率よく分解・資化できることを分子レベルで明らかにした新しい知見である。

2) β -酸化系の酵素であるアシル CoA デヒドロゲナーゼが、M-1 株の *n*-アルカン生育菌体中に2種存在することを見出した。相当する遺伝子をクローニングし、大量発現させた大腸菌から酵素を精製してその性質を調べ、それぞれが鎖長の異なるアシル CoA に作用することを明らかにした。このことも、本菌が広範囲な鎖長の *n*-アルカンを資化できることを裏付ける新事実である。

3) 本菌の *n*-アルカン生育菌体より、NADPH 関与のアルデヒド還元酵素を精製し、その諸性質を明らかにするとともに、相当する遺伝子をクローニングした。本酵素は、脂肪族アルデヒドや芳香族アルデヒドなどの多様な基質の還元反応に高い触媒活性を有し、顕著な熱安定性を示した。さらに、大腸菌形質転換体を用いる当該遺伝子の高発現系を構築するとともに、簡便な精製方法を確立して、本酵素を有用物質生産の生体触媒として利用することを可能にした。

以上のように本論文は、原油あるいは石油化学品による環境汚染を修復するための微生物利用技術を開発するための基盤的知見を得、物質生産にも有用な新規な酵素を見出したもので、制御発酵学、応用微生物学、微生物生態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12年12月21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。