

氏 名	いし げ た ける 石 毛 た ける
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1213 号
学位授与の日付	平 成 13 年 9 月 25 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	Enzymatic and genetic studies on bacterial oxidation of long-chain and gaseous <i>n</i> -alkanes (細菌による長鎖およびガス状 <i>n</i> -アルカンの酸化に関する酵素的および遺伝 学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

500

n-アルカンは、その炭素鎖に応じて気体から固体まで様々な形状をとり、原油はもとより自然界に広く存在し、エネルギー源や化成品の原料として広く用いられている。その微生物代謝に関しては、常温で液体のものについては、これまで多くの研究があるが、固体の長鎖 *n*-アルカンやガス状の短鎖 *n*-アルカンを分解する微生物に関する知見は限られており、特にその分解代謝に関してはほとんど明らかにされていないのが現状である。最近、長鎖 *n*-アルカンは環境修復の立場から自然界での分解速度が遅いことが問題視され、また、ガソリンなどに含まれるガス状 *n*-アルカンは大気汚染の一因とされている。

本研究は、微生物代謝の理解が未だ十分でなく、用途開発も進展していない極長鎖とガス状短鎖 *n*-アルカンの微生物分解を取り上げ、その代謝特性を酵素と遺伝子の観点から明らかにし、環境修復や物質生産の技術開発に有用な基盤的知見を提供したものであり、得られた結果は以下のように要約できる。

1) 長鎖 *n*-アルカンに生育した *Acinetobacter* sp. M-1 株に、長鎖アルキルアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) を見出し、その部分精製酵素標品から得たアミノ酸配列の情報を基に、当該遺伝子をクローニングし、組換え大腸菌より本遺伝子産物を精製して酵素化学的性質を明らかにした。組換え ALDH は NAD^+ 関与の細胞質酵素であり、テトラデカナールに最も高い活性を示した。

2) 当該遺伝子 (*ald1*) は鎖長が $\text{C}_{16\sim 22}$ の *n*-アルカンによって誘導発現することを親株に対するノザンハイブリダイゼーションにより明らかにした。さらに本酵素遺伝子破壊株 (*ald1Δ*) を構築し、その増殖特性を親株と比較したところ、*n*-アルカンに対する菌体収率は親株の約70%に減じ、菌体内貯蔵物質であるワックスエステルの蓄積量も親株の50%以下であった。以上のことは、*n*-アルカン酸化に細胞質酵素が関与することを明らかにした新しい知見である。

3) 栄養培地に増殖した *Acinetobacter* sp. M-1 株を *n*-アルカンを加えた窒素制限培地に移すと、著量のワックスエステルを蓄積することを見出した。生産条件の最適化をはかり、乾燥菌体重量あたり約17%のワックスエステルの蓄積を達成した。ワックスエステルを多量に蓄積した細胞の電子顕微鏡観察の結果、ワックスエステルは厚さ 30~50nm の平板な層を多数形成し、細胞内に充満していることを認めた。

4) ワックスエステルの合成に関与するアシル-CoA レダクターゼ遺伝子 (*acrM*) を *Acinetobacter* sp. M-1 株よりクローニングした。大腸菌に形質転換した当該遺伝子産物とその膜画分に局在し、炭素鎖長が $\text{C}_{10\sim 22}$ のアシル-CoA を、NADPH の存在下に相当するアルデヒドに変換する反応を触媒することを見出した。また、*acrM* 破壊株では、*n*-アルカンや対応するアルコール、アルデヒドから親株と同程度のワックスエステルを合成したが、カルボン酸からはその蓄積が認められない事実より、この酵素がワックスエステルの構成要素であるアルコールを供給する経路に関与することを明らかにした。

5) プロパンを単一炭素源として生育する多数の細菌を自然界より分離し、16S rDNA の塩基配列による系統分類によって、これらが *Gordonia* や *Pseudonocardia* 属の新しい菌種であるとした。そのうちの *Gordonia* sp. TY-5 株は、ガス状 *n*-アルカンとしてはプロパンのみを資化し、これに加えて長鎖 *n*-アルカン (C₁₄-22) を利用する特異な基質利用性を有していた。

6) *Gordonia* sp. TY-5 株より、オペロン様のプロパンモノオキシゲナーゼ系遺伝子群をクローニングし、その遺伝子配座とそれぞれの遺伝子産物の推定一次構造を明らかにした。本遺伝子群はヒドロキシラーゼの2つのサブユニットとレダクターゼおよびカップリングタンパク質をコードしていることを認めた。その要素は可溶性メタンモノオキシゲナーゼと類似であったが、各推定一次構造には大きな違いが認められた。さらに、このレダクターゼ遺伝子の破壊株がプロパンの利用性を欠失していることから、このオペロン上の遺伝子産物が本菌のプロパン酸化に関与することを明らかにした。さらに、分離したプロパン資化性菌のほとんどの TY-5 株のものと高い相同性を有するモノオキシゲナーゼ系遺伝子群が存在することを確認し、ガス状 *n*-アルカン資化性菌におけるこの酸化系の一般性を明確にした。

論文審査の結果の要旨

石油の主成分である *n*-アルカンには広範な用途があり、微生物の培養基質としても一般的である。しかし、微生物による代謝研究の対象となっているもののほとんどは中鎖の液状 *n*-アルカンであり、常温で固体の長鎖 *n*-アルカンやガス状の短鎖 *n*-アルカンの微生物代謝についての知見は限られている。最近、これらの *n*-アルカンは難分解性であることや、大気汚染の原因物質であることから、その微生物分解に関心が高まっている。

本論文では、微生物代謝の理解が未だ十分ではない極長鎖とガス状短鎖 *n*-アルカンを取り上げ、その分解系に関与する酵素系と相当する遺伝子群の機能を明らかにしたもので、評価すべき点は以下の6点である。

1) 極長鎖 *n*-アルカンに生育した *Acinetobacter* sp. M-1株の細胞質画分に NAD⁺ 関与の長鎖アルキルアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) を見出した。相当する遺伝子をクローニングして、組換え大腸菌より精製した当該酵素を用い、長鎖のアルデヒドに高い活性をもつ新しい性質を見出した。

2) ALDH をコードする遺伝子が長鎖 (C₁₆-22) *n*-アルカンによって誘導発現すること、および当該遺伝子破壊株が親株に比べて、*n*-アルカンからの菌体収率および細胞内貯蔵物質であるワックスエステルの蓄積量が著しく減じることを見出した。これは、細胞質の酵素が *n*-アルカンの酸化に関与することを明確にした新知見である。

3) 本菌が *n*-アルカンを含む窒素制限培地で著量のワックスエステルを菌体内に蓄積することを見出し、その細胞の電子顕微鏡観察からワックスエステルは層状の新しい形態の封入体として蓄積していることを明らかにした。

4) *Acinetobacter* sp. M-1株よりアシル-CoA レダクターゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌で得た組換え酵素の性質と当該遺伝子破壊株の特性より、本酵素がワックスエステルの構成要素であるアルコールを供給する経路に関与することを明確にした。

5) ガス状 *n*-アルカンであるプロパンを利用する多数の細菌を自然界より分離し、これらが *Gordonia* や *Pseudonocardia* 属の新しい菌種であること、およびその中の *Gordonia* sp. TY-5 株が、プロパンと長鎖 *n*-アルカンを利用する特異な基質利用性を有することを見出した。

6) *Gordonia* sp. TY-5 株に、プロパンモノオキシゲナーゼ系をコードするオペロン様の遺伝子クラスターを見出し、これがヒドロキシラーゼの2種のサブユニット、レダクターゼおよびカップリングタンパク質に相当する遺伝子をコードすると推定した。さらに、レダクターゼ遺伝子破壊株がプロパン資化能を失ったことから、このオペロンがプロパン資化に関与することを明確にした。また、他の分離菌にも TY-5 株と相同性のあるプロパンモノオキシゲナーゼ系が存在することを確認し、プロパン資化性菌における当該酵素系の共通性を見出した。

以上のように本論文は、環境保全上の対象物質であり、また用途開発が十分に進展していない極長鎖とガス状の *n*-アルカンの微生物代謝を明らかにするとともに物質生産への応用の可能性を示したもので、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13年7月19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。