

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Anoop Vasudevan
論文題目	Studies on the metabolism of 2-chloroacrylate in <i>Burkholderia</i> sp. WS (<i>Burkholderia</i> sp. WS における 2-クロロアクリル酸の代謝に関する研究)		
(論文内容の要旨) 有機ハロゲン化合物の中には環境汚染の原因物質として問題視されるものがあり、その変換反応を触媒する酵素は環境工学の観点から重要である。一方、有機ハロゲン化合物の変換酵素は有機ハロゲン化合物を原料とする化学工業プロセス上も有用と考えられる。こうした観点から有機ハロゲン化合物に作用する種々の酵素が単離され機能解析されてきたが、その多くは飽和脂肪族有機ハロゲン化合物または芳香族有機ハロゲン化合物に作用するものであり、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物に作用する酵素についての知見は限定的である。本論文は、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物の一種である 2-クロロアクリル酸 (2-CAA) を資化する細菌 <i>Burkholderia</i> sp. WS における 2-CAA 代謝に関する研究をまとめたものであり、特に、2-CAA を資化する際に誘導生産される二種類のタンパク質 CAA67 と CAA43 の機能を解析したものである。それらの成果は以下のように要約される。 1. <i>caa67</i> および <i>caa43</i> 近傍の遺伝子構造を解析した。<i>caa67</i> は <i>caa43</i> の上流に隣接して存在し、周辺配列の特徴から両者がオペロンを形成しているものと考えられた。これらの遺伝子上流には LysR 型転写調節因子の遺伝子、および α/β ヒドロラーゼフォールドをもつタンパク質の遺伝子が存在し、下流にはフェレドキシン NAD(P)⁺ レダクターゼおよび NAD(P)⁺ トランスヒドロゲナーゼの遺伝子が見いだされた。これらの遺伝子にコードされるタンパク質が、遺伝子の発現制御、補酵素の生成、2-CAA の代謝に関与するものと考えられた。 2. <i>Burkholderia</i> sp. WS から CAA67 を精製するため、本タンパク質の生産条件を検討した。その結果、2-CAA と (S)-2-クロロプロピオン酸 ((S)-2-CPA) を添加した培地でもっとも高い生産性が得られた。この培地で生育させた菌体から各種クロマトグラフィーによって CAA67 を精製し、諸性質を調べた。その結果、FADH₂ または FMNH₂ の存在下で 2-CAA をピルビン酸に変換する活性をもつことが示された。CAA67 が 2-CAA への水付加を触媒し、反応の結果生じる 2-クロロ-2-ヒドロキシプロピオン酸からの自発的脱塩化水素反応によってピルビン酸が生成するものと考えられた。本酵素を 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼと命名した。同様の反応を触媒する酵素が <i>Pseudomonas</i> sp. YL に見いだされているが、<i>Pseudomonas</i> sp. YL 由来の酵素は FMNH₂ を補酵素とせず、補酵素要求性の点で互いに異なることが示された。また、<i>Pseudomonas</i> sp. YL 由来の酵素は NADH 依存的に FAD を還元する酵素活性をあわせもつが、CAA67 には同様の活性は認められなかった。 3. <i>Burkholderia</i> sp. WS には、2-CAA に作用する酵素として、2-ハロアクリル酸ヒドラターゼ (CAA67) のほかに、NADPH 依存的に 2-CAA の還元反応を触媒する 2-ハロ			

アクリル酸レダクターゼ (CAA43) が存在する。この反応で生成する (S)-2-CPA は L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの作用で乳酸に変換されうる。CAA67 と CAA43 の 2-CAA 代謝への関与を調べるため、両酵素の遺伝子破壊を行った。その結果、*caa67* を破壊した変異株では 2-CAA 培地での生育速度が著しく低下したのに対し、*caa43* を破壊した変異株では、2-CAA 培地での生育速度が低下することなく、むしろ向上する傾向が見られた。一方、(S)-2-CPA 培地ではいずれの破壊株でも生育速度が低下した。これらの結果は、2-CAA の代謝には CAA67 が主要な役割を担っており、一方、(S)-2-CPA の代謝には CAA43 と CAA67 の両者が関与することを示している。この可能性を検討するため CAA43 の (S)-2-CPA への作用を調べたところ、CAA43 が (S)-2-CPA 依存的に NADP^+ を NADPH に変換する活性をもつことが見いだされた。以上のことから、CAA43 の生理的意義は (S)-2-CPA の 2-CAA への変換反応にあるものと考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

有機ハロゲン化合物の変換反応を触媒する酵素は環境浄化や物質生産への応用といった観点から注目され、種々の酵素について研究が進められているが、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物に作用する酵素に関する知見はきわめて限定的である。本論文は、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物の一種である 2-CAA の酵素的分解機構を解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *Burkholderia* sp. WS において 2-CAA によって誘導生産される二種類のタンパク質 CAA43 と CAA67 の遺伝子はゲノム上で隣接して存在する。これらを含む遺伝子クラスターの構造を明らかにした。2-CAA の代謝機構や代謝関連酵素の発現制御機構を解析する基盤となる知見を与えたものとして評価できる。

2. *Burkholderia* sp. WS の CAA67 を精製し、酵素化学的特徴を明らかにした。本酵素が 2-CAA への水付加反応を触媒し、この反応に FADH_2 または FMNH_2 が要求されることを示した。フラビン補酵素は酸化還元反応に関与するのが一般的であるが、本酵素反応は水付加反応であり、酸化還元反応ではない。フラビン補酵素の新しい機能を示した結果として注目に値する。また、*Pseudomonas* sp. YL 由来のホモログとは補酵素要求性や補酵素を還元する触媒活性の有無という点で違いがあることを見いだした。酵素化学的観点から意義深い研究成果といえる。

3. *Burkholderia* sp. WS の CAA67 と CAA43 はいずれも 2-CAA の変換反応を触媒するが、これらのうち CAA67 が 2-CAA の代謝において主要な役割を果たしていることを遺伝子破壊実験によって明らかにした。一方、(S)-2-CPA の代謝には CAA67 と CAA43 の両者が関与することを明らかにした。(S)-2-CPA は CAA43 によって 2-CAA に変換され、これが CAA67 によってさらに代謝されるものと考えられた。(S)-2-CPA の新しい代謝経路を示したものとして評価できる。

以上のように本論文は、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物の酵素的分解機構の一端を明らかにしたものであり、分子微生物科学、生化学、酵素化学に寄与するところが多い。

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24年2月9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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降