

氏名(本籍)	篠原優子(京都府)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,821号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Studies on Biochemistry and Physiology of a Trichloroethylene-Degrading Bacterium, <i>Methylocystis</i> sp. M (トリクロロエチレン分解菌 ( <i>Methylocystis</i> sp. M) の生化学および生理学に関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	日下部 功
副査	筑波大学教授	農学博士	祥雲 弘文
副査	筑波大学教授	農学博士	関 文威
副査	筑波大学併任助教授 (食品総合研究所)	農学博士	小林 秀行
副査	国立環境研究所総合研究官	農学博士	矢木 修身

### 論文の内容の要旨

メタンを唯一の炭素源、エネルギーとして生育するメタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M (M株) の有する可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) は、基質特異性が広く、環境汚染物質であるトリクロロエチレン (TCE) も分解することができる。sMMO は、NADH-依存性レダクターゼ、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3つのサブユニットからなり活性中心に鉄を保持しているヒドロキシラーゼ、そしてコンポーネント B の3つのコンポーネントからなるマルチコンポーネントエンザイムであり、既にレダクターゼとヒドロキシラーゼは精製されその諸性質が明らかにされている。そこで本研究では、未だ解明されていないコンポーネント B の精製を行いその諸性質を明らかにすると共に、sMMO における役割を検討した。さらに、各種ストレス存在下における応答についても検討し、ストレスタンパクの存在を明らかにした。

コンポーネント B の諸性質を明らかにするため、M株の菌体をフレンチプレスで破碎後、超遠心分離し、得られた可溶性画分を無細胞抽出液としこれを DEAE-Sepharose カラム、Hi Load Superdex 75カラム、Mono Q カラムにかけることにより精製し、電気泳動的に単一な標品を得た。コンポーネント B は、分子量32 kDa で分子量15 kDa の二量体からなり、等電点4.4の酸性タンパクで、金属、補欠分子団は保持していなかった。さらに、コンポーネント B は、レダクターゼよりもヒドロキシラーゼに高い親和性を示した。sMMO 中におけるコンポーネント B の役割を明らかにするために熱安定性を検討したところ、コンポーネント B は熱に安定なタンパクであり、ヒドロキシラーゼと共存することによりその熱安定性を向上させた。また透析試験より、ヒドロキシラーゼの活性中心にある鉄の遊離をコンポーネント B が抑制していることが示唆された。これらの結果より、コンポーネント B は、ヒドロキシラーゼの構造安定化に関与していると考えられた。

sMMO が最大活性を示すためには3つのコンポーネントが必須である (sMMO 系)。一方、ヒドロキシラーゼに  $H_2O_2$  を添加した系 ( $H_2O_2$ /ヒドロキシラーゼ系) においても酸化反応が認められた。sMMO 系では、ヒドロキシラーゼとコンポーネント B のモル比が1:1の時に最大活性を示し、コンポーネント B の増加につれ活性は低下した。 $H_2O_2$ /ヒドロキシラーゼ系では、コンポーネント B の添加は阻害効果を示した。炭素数4以上の直鎖

アルカン (*n*-ブタン, *n*-ペンタン) と枝分かれ構造のイソペンタンを基質とした場合, 両系における生成物構成比に差異が認められ, また H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ヒドロキシラーゼ系ではコンポーネント B の添加によって生成物構成比が変化し, コンポーネント B の結合によりヒドロキシラーゼの気質結合部位の立体構造が変化して構成比が変化するものと考えられた。

これまでに, M 株は TCE を分解することによりその分解活性が低下することが明らかとなっている。そこで, TCE 分解時に, M 株菌体内でどのような応答が起こっているかを二次元電気泳動により調べた。その結果, メタン酸化細菌において有機塩素化合物で特異的に誘導生成されるストレスタンパクの存在が初めて明らかになった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

メタン酸化細菌である *Methylocystis* sp. M (M 株) の可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) は, レダクターゼ, ヒドロキシラーゼ, コンポーネント B の 3 つからなるマルチコンポーネント酵素である。これ迄に, レダクターゼとヒドロキシラーゼは精製され, 諸性質が明らかにされているが, コンポーネント B の諸性質と役割などについては不明である。これらを明らかにするにあたり, sMMO のコンポーネント B を精製する必要がある。しかし, 精製過程において, コンポーネント B は sMMO に内在するプロテアーゼにより低分子化されることが判明し, 精製に大変苦勞している。これを回避するために, 同プロテアーゼの阻害剤である Pefabloc SC を使うことにより, コンポーネント B を単一蛋白とみなし得る段階にまで見事に精製した。一方, コンポーネント B が関与した場合の sMMO の簡便かつ迅速な活性測定法は現在でも見当たらないため, 活性測定法に大変苦勞している。しかし, 著者は, これらの困難を自己の努力により乗り越え, 精製コンポーネント B の理化学的諸性質を解明した。特に, sMMO 活性はレダクターゼとヒドロキシラーゼのみでも認められるが, コンポーネント B の添加により 3 倍に上昇すること, さらに, コンポーネント B はレダクターゼよりもヒドロキシラーゼに親和性が高いことを明らかにした点は高く評価できる。

著者が提示した一連の結果は, コンポーネント B の理化学的諸性質を解明した点に止まらず, 農学分野 (特に酵素化学と環境科学) との関連性が極めて高い。今後, 環境浄化に対する応用性を期待する。

よって, 著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。