

氏名(本籍)	おいぬまけんいち 老沼研一(千葉県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4025号		
学位授与年月日	平成18年3月24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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Discovery and Characterization of A Novel Aliphatic Aldoxime Dehydratase Involved in Carbon-Nitrogen Triple Bond Synthesis</b> (炭素-窒素三重結合形成に関わる新規脂肪族アルドキシムデヒドラターゼの発見と解析)		
主査	筑波大学教授	農学博士	小林達彦
副査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場忠
副査	筑波大学助教授	博士(農学)	中村顕

### 論文の内容の要旨

*Pseudomonas chlororaphis* B23 はかつてのアクリルアミド工業生産菌であり、現在も農薬の中間原料であるシアノバレリアミドの工業生産に使用されている実用菌である。本菌では、ニトリルは Nitrile hydratase によってアミドに変換され、生じたアミドはさらに Amidase により、酸とアンモニアにまで分解される。両酵素遺伝子はクラスターを形成していることが既に明らかとなっているが、さらに上流領域は解析されておらず、その全貌は未解明のままであった。そこで、ニトリル代謝の全容を解明すべく Amidase 遺伝子上流の未知領域のシーケンスを行った結果、世界で2例目となる Aldoxime dehydratase 遺伝子 *oxdA* を発見した。Aldoxime dehydratase はアルドキシム ( $R-CH=N-OH$ ) からニトリル ( $R-C\equiv N$ ) への脱水反応を触媒するユニークな酵素である。しかし、本酵素はこれまで *Bacillus* 属の1例しか報告されておらず、詳細な解析は行われていなかった。そこで、本酵素の反応機構解析に取り組むことにした。まず、OxdA の大腸菌での発現検討を行った結果、微量に OxdA を生成させる系を確立することに成功した。続いて、本酵素を精製し、酵素化学的諸性質を解析した結果、OxdA はブチルアルドキシムなどの脂肪族アルドキシムに良好に作用することが判明し、Aliphatic aldoxime dehydratase と命名した。本酵素に対し、国際生化学連合酵素命名委員会 (NC-IUBMB) から新しい EC 番号 (EC 4.99.1.5.) が与えられ、OxdA は新規酵素として認定された。OxdA は補欠分子族としてプロトヘムⅨを含有していた。また、精製 OxdA のヘムは3価型であり、還元剤により2価に還元可能であることが判明した。還元前後の酵素活性を比較したところ、ヘムの還元に伴い OxdA の活性は250倍以上にまで上昇した。従って、OxdA は生体内では還元された状態で機能しているものと推測した。

続いて、本酵素の反応サイクルに関する情報を得るべく、反応中間体の分光学的解析に取り組んだ。酵素溶液とブチルアルドキシム(基質)を混合し2ミリ秒毎に吸収スペクトル測定を行った結果、混合直後に新規な吸収スペクトルが現れ、その後次第に元のスペクトルに戻っていく様子が観察された。さらに、本スペクトルは、ブチルアルドキシム濃度を高くするほど長時間観察されたことから、OxdA の何らかの反応中間

体に由来するものであると推察した。一方、OxdA のヘム近傍には 320 番目のヒスチジン残基が存在し、酵素活性に重要な働きを担っていることが既に明らかとなっていることから、(反応が進まない) H320A 変異体 (320His を Ala に代えた変異体) に基質を添加しスペクトル解析を行ったところ、アルドキシムが (反応の第一段階として) ヘムに結合した状態のスペクトルが安定に観察された。本スペクトルは野生型 OxdA において観察された反応中間体スペクトルとほぼ同一であったことから、両者は反応サイクル中の同じステップにあることが強く示唆された。これらのことから、野生型 OxdA において観察された反応中間体は、(H320A-基質複合体と同じく) 基質がヘムに結合した直後の状態であると推察し、「OxdA-substrate complex I」<sup>1</sup>と命名した。以上の結果を基に、OxdA の反応機構モデルを提案した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

水溶液中での脱水反応を触媒し、(容易には作れない)  $C\equiv N$  三重結合を形成する反応を触媒する新規酵素 Aldoxime dehydratase を発見するとともに、本酵素のユニークな特性と機能を解明した本学位論文研究は極めて意義深いものである。特に、Aldoxime dehydratase における、(i) 「基質が直接ヘムにアプローチする」(ii) 「本反応は酸化還元反応ではない」現象の発見は、これまでのヘム酵素触媒機構の概念を覆す画期的な成果である。また、本酵素の微生物における生理的役割を解明したことも高く評価できる。さらに、これらの基礎的知見は今後、酵素のタンパク質工学的改良や代謝工学による微生物育種改良等を行う上で有効な情報を与え、最終的には、本酵素あるいは (本酵素を含む) 微生物を用いた有用物質 (ニトリル) の生産が期待される。

以上のように、本研究の成果は、酵素科学領域のみならず応用微生物学領域においても大きく貢献するものと判定される。

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。