【198】

氏　名（本籍）	深　津　　寛（茨 城 県）
学 位 の 種 類	博　　士（農　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4338　号
学位授与年月日	平成 19 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	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Discovery and Characterization of a Novel *N*-Substituted Formamide Deformylase** （新規 *N*-置換ホルムアミドデフォルミラーゼの発見と解析）

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	馬　場　　忠
副　査	筑波大学教授	農学博士	深　水　昭　吉
副　査	筑波大学助教授	博士（農学）	中　村　　顕

論 文 の 内 容 の 要 旨

イソニトリルは，イソシアノ基（－N≡C）をもち，ニトリルと同様に，一般に高い毒性を示す。自然界において，本化合物は，海綿やカビ，細菌などの様々な生物によって生産されることが分かっているが，イソニトリルの代謝はいまだ未解明であり，これまでタンパク質・遺伝子レベルでの解析は全く行われていなかった。近年，本研究室において *Pseudomonas putida* N19-2 株からイソニトリル分解酵素であるイソニトリルヒドラターゼ（INHase）を世界で初めて発見・命名し，イソニトリル代謝の新しい領域を開拓した。

本酵素はイソニトリルを水和して *N*- 置換ホルムアミド（R-NHCHO）に変換する。しかしながら，ここで生じた *N*- 置換ホルムアミドがどのように代謝されるのかについては全く解析されていなかった。そこでまず，新たにイソニトリルおよび *N*- 置換ホルムアミドの両化合物分解活性を有する微生物の取得を試みた。*N*- 置換ホルムアミドの一種である *N*- ベンジルホルムアミド（NBFA）を単一窒素源とした培地を用いて集積培養を行った結果，土壌より数種の NBFA 分解菌を取得することに成功した。さらに，これらの分解菌に対して，ベンジルイソシアニド（NBFA に対応するイソニトリル化合物）を基質とした休止菌体反応を行うことで，最も高い NBFA 分解活性に加えて，イソニトリル分解活性を有する F164 株を取得することに成功し，*Arthrobacter pascens* と同定した。次に，本株から，NBFA 分解活性を有する電気泳動的に単一な酵素標品を得ることに成功した。本酵素は化学量論的に NBFA を加水分解してベンジルアミンとギ酸に変換したことから，*N*- 置換ホルムアミド分解酵素であると同定し，*N*- 置換ホルムアミドデホルミラーゼと命名した。本酵素の基質特異性を調べた結果，本酵素は酸アミド（R-$CONH_2$）には作用せず，数種の *N*- 置換ホルムアミドを基質とし，とくに NBFA に対して最も高い分解活性を示した。さらに，本酵素遺伝子（*nfdA*）を取得し，その推定アミノ酸配列を用いて相同性検索を行ったところ，配列全長に渡って制御タンパク質（LAF3-1，AepA）に対して最大 28％の相同性しか示さず，また，既知の酵素（デホルミラーゼ類を含む）と有意な全体的相同性を示さなかった。以上のことから，本酵素に対して新しい酵素番号（EC 3. 5. 1. 91）が国際生化学連合酵素命名委員会から与えられ，新規酵素に認定された。また，*Streptomyces* 属放線菌を用いた異種宿主での本酵素の大量発現に成功し，本組換え酵素が，天然酵素と酵素学的に同一であることを実

証した。これにより，本酵素の大量供給の道が切り開かれた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

これまでイソニトリル代謝上，イソニトリルヒドラターゼによってイソニトリルから生じた*N*-置換ホルムアミドがどのように代謝されるのかについては全く解析されていなかったが，本研究によって，新規酵素・*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼが発見され，イソニトリル代謝の全貌が初めて解明されたことは世界に先駆けた成果であり，極めて意義深いものである。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。