

【3】

氏名(本籍)	あ べ とも こ 安 部 智 子 (山 形 県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4817 号		
学位授与年月日	平成 20 年 4 月 30 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 of a New Function in Acyl-CoA Synthetase</b> (アシル CoA 合成酵素の新機能の発見)		
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

*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ル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、ニトリルはニトリルヒドラーゼによってアミドに変換され、生じたアミドはさらにアミダーゼにより、酸とアンモニアにまで分解される。両酵素遺伝子は、アルドキシムデヒドラーゼおよびアシル CoA 合成酵素 (AcsA) の構造遺伝子と遺伝子クラスターを形成していることが既に本研究室で明らかとなっている。また、アシル CoA 合成酵素の短鎖脂肪酸に対する基質特異性の傾向と本酵素の発現パターンが本菌のニトリル合成・分解酵素のそれと非常に似ていることより、本酵素がニトリルから生じる酸の代謝に関与することが実証されている。

アシル CoA 合成酵素は、脂肪酸 (R-COOH) と CoA のチオエステル結合形成を触媒してアシル CoA を合成する。従来、アシル CoA 合成酵素の基質特異性について、脂肪酸に対しては詳細に調べられてきたが、CoA に代わるチオール基質については研究が行われていなかった。そこで、各種チオール化合物を基質として脂肪酸との結合反応を調べた。CoA の代わりに、アミノ基を持つチオール化合物 L-cysteine を用いた時に新たな反応産物ピークが HPLC 分析により検出された。アシル CoA 合成酵素による新規反応産物の分離・精製を行い、各種質量分析、NMR 分析を行った結果、本反応産物は (脂肪酸基質である) イソ酪酸が L-cysteine のアミノ基と脱水縮合した “N-isobutyryl-L-cysteine” であることが判明した。これより、アシル CoA 合成酵素は CoA 以外にも L-cysteine を基質にすることができ、さらに、(本来の酵素活性である) チオエステル結合 (-CO-S-) 形成だけではなく、アミド結合 (-CO-NH-) 形成をも触媒することが判明した。また、イソ酪酸以外のいくつかの脂肪酸 (プロピオン酸、酪酸、アクリル酸) を基質として用いた場合や、L-cysteine の代わりに D-cysteine, homocysteine, cysteine methylester を基質として用いた場合にも新たな産物ピークが検出された。これらの新規反応産物についても LC-ESL-MS 分析を行い、同様の反応後に生じる質量と確認出来たことから、これらの反応産物が N-アシル化合物であることが示唆された。さらに、長鎖脂肪酸を基質とする大腸菌のアシル CoA 合成酵素 (FadD) を用いた時にも本反応の進行が示唆された。アシル CoA 合成酵素は AMP (adenylate) -forming superfamily に属し、甲虫ルシフェラーゼも本 superfamily に

含まれる。そこで、ホタルルシフェラーゼを用い、ルシフェリン L-cysteine を基質として本新規反応を検討した結果、反応産物の分離および MS 分析に成功し、新規反応産物の生成が確認出来た。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

アシル CoA 合成酵素の基質特異性について、脂肪酸に対しては詳細に調べられてきたが、CoA に代わるチオール基質については研究が行われていなかった。本研究によって、アシル CoA 合成酵素は CoA 以外にも L-cysteine を基質にすることができ、さらに、アミド結合形成を触媒する新規な機能を持ち合わせていることが明らかとなった。本発見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、ホタルルシフェラーゼにも本活性を検出し、アシル CoA 合成酵素ファミリーに限らず、AMP-forming superfamily に属する酵素において普遍的に見られる可能性を初めて示したことは生命科学研究にインパクトを与えるものである。さらにこれらの基礎的知見は今後、これらの酵素による有用物質生産へ展開できるものと期待される。

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。