

氏名(本籍)	佐藤太祐(山口県)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第6133号			
学位授与年月日	平成24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 of a Novel Isonitrile Hydratase</b> (新規イソニトリルヒドラーゼの発見)			
主査	筑波大学教授	農学博士	小林達彦	
副査	筑波大学教授	博士(農学)	高谷直樹	
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	中村 顕	
副査	筑波大学准教授	博士(工学)	橋本義輝	

### 論文の内容の要旨

イソニトリル(イソシアニド)は、有機合成において重要な出発原料であるとともに、生理活性物質の誘導体としても注目されているが、反応性の高さから毒性を示すことも知られている。イソニトリルの生物による代謝に関するタンパク質、遺伝子レベルでの解析はこれまで次の2種の酵素に関する報告のみで、イソニトリルはイソニトリルヒドラーゼ(INHase)によりN-置換ホルムアミドへ水和され、さらにN-置換ホルムアミドデホルミラーゼによりアミンとギ酸へ分解されることが明らかにされている。そこで、イソニトリル分解代謝機構を分子レベルでより詳細に解析することを目的として本研究は行われた。

まず、N-置換ホルムアミドデホルミラーゼを有する放線菌 *Arthrobacter pascens* F164 株に、イソニトリル代謝関連酵素の存在が示唆されたため、本株から新規イソニトリル代謝酵素を探索した。無細胞抽出液中に共存するN-置換ホルムアミドデホルミラーゼが、イソニトリルの分解産物・N-置換ホルムアミドをさらに分解してしまい、イソニトリル分解活性を正確に測定できないため、HPLCを用いた反応測定条件を最適化した。本活性測定条件により、F164株がイソニトリルを水和するINHase活性を有することが明らかになった。

次いで、酵素の大量発現培養条件を確立した後、各種クロマトグラフィー操作により、単一な精製酵素標品を取得した。これを用いて物理化学的・酵素学的諸性質の解析を行った。決定したF164株INHaseの物理化学的・酵素学的諸性質を *Pseudomonas putida* N19-2株由来のINHase(InhA)と比較したところ、本酵素はInhAと比べSDS-PAGE上において約14kDa大きく、(InhAが2量体構造であるのに対し)ホモ12量体の多量体構造を形成していた。また、CDスペクトルを用いて二次構造を比較したところ、両者の二次構造の構成比も大きく異なっていた。この違いをさらに詳細に調べるため、両株由来の抗INHaseポリクローナル抗体をそれぞれ作成し、ウェスタン解析等の免疫学的実験を行った。その結果、どちらの抗体も、抗原としなかった酵素に対して交差反応性を全く示さなかった。以上の結果より、両酵素が異なるアミノ酸配列を有していることが示唆された。さらに、F164株INHase遺伝子をクローニングした結果、その推定アミノ酸配列はInhAとは相同性を示さなかった。従って、F164株INHaseはInhAと同じ反応を触媒するが、その構造は全く異なる新しいタイプのイソニトリルヒドラーゼであることが判明し、本酵素をInhBと命名した。

## 審査の結果の要旨

イソニトリル代謝研究は、学術的な観点だけでなく、イソニトリルの安全な工業的利用の観点からも注目され、応用と基礎の両面において重要である。しかしながら、本代謝に関わる2つの酵素、イソニトリルヒドラーゼ (INHase) と *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼはいずれも一例づつのみの報告で、本化合物代謝系の全体像および詳細は不明のままであった。本研究によって初めてイソニトリルヒドラーゼには2つのタイプの酵素が存在することが明らかとなった。また、本酵素の諸性質の詳細が解明されるとともに、本酵素の構造遺伝子がクローン化された。さらに、本酵素がニトリラーゼと相同性を示したことから、炭素-窒素結合開裂酵素群の進化的関係が判明した。一方、本研究で大量調製が可能になった新規イソニトリルヒドラーゼによってイソニトリルから有用 *N*-置換ホルムアミドを生産し得る方法も確立された。これら一連の知見は、生命科学研究にインパクトを与えるのみならず、酵素反応によって有用物質を生産する上で重要な成果である。

以上のように、本研究の成果は、分子生物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。

また、平成24年1月16日、審査専門委員全員の出席のもとに最終試験を行い、論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、委員全員によって合格と判定された。

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。