氏名	土居　志織
学位の種類	博　士（　農学　）
学位記番号	博　乙　第　　2805　　号
学位授与年月日	平成　28年　12月　31日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on Microbial Metabolism of a Botanical Aromatic Aldehyde （植物由来芳香族アルデヒドの微生物代謝に関わる研究）
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）　中村　顕
副査	筑波大学教授　　博士（工学）　野村　暢彦
副査	筑波大学准教授　　博士（工学）　橋本　義輝

論　文　の　要　旨

植物は種々の物質を生成し、微生物の感染から防御することもあれば、一方、植物みずからが分泌する糖やアミノ酸などの栄養素を求めて微生物が集まる場合もある。このように、植物と微生物とは、拮抗あるいは共生関係を築いているが、未だ良くわかっていない点も数多く存在する。

植物由来の芳香族アルデヒドであるピペロナールは花の精油成分であるが、本香気性化合物の自然界での役割は未だよくわかってはいない。また、ピペロナールの分解経路はタンパク質・遺伝子両レベルにおいても報告はない。そこで、著者は、植物ヘリオトロープの二次代謝産物で、香気成分であるピペロナールに着目し、本化合物分解微生物によるピペロナール代謝および同代謝に関わる酵素の機能の解明を行った。本論文は、以下の成果を記載したものである。

まず、ピペロナールを単一炭素源とする最少培地を用いた集積培養スクリーニングによって得られた代謝菌77株の内、最も高いピペロナール代謝活性を示すCT39-3株の菌学的諸性質を解析した結果、*Burkholderia* sp. と同定した。炭素源・窒素源などの培地組成を検討し、ピペロナール代謝活性が最大となる最適培養条件を確立した。続いて、同条件下で培養した本菌体から、硫安分画および各種クロマトグラフィー操作により、ピペロナール代謝酵素を単離精製した。しかし、得られた酵素量は少なく諸性質の解析には十分でないため、精製酵素標品のN末端部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基に本酵素遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定に成功した。また、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上、各々20 k, 40 k, and 80 kの分子量をもつことが示唆されたサブユニットをコードする遺伝子をそれぞれ、*pceS*、*pceM*、*pceL*と命名し、186、335、

741のアミノ酸から構成されていることを明らかにした。続いて、本菌株を宿主としたHisタグ結合酵素の大量発現系を構築し、アフィニティークロマトグラフィーによる簡便な精製法を確立した。得られた精製標品を用いて物理化学的・酵素学的諸性質の詳細な解析を行った。本酵素によるピペロナールからの反応生成物をHPLCから分取・精製し、GCMSおよびNMR分析によりピペロニル酸と同定するとともに、本酵素反応のストイキオメトリーを決定した。さらに、本酵素がFADを含有することを実証するとともに、2Fe-2Sクラスターも含有することが示唆される吸収スペクトル解析の結果を得た。

また、ピペロナールまたはグルコースを単一炭素源として、濃度を変えた各炭素源を含む最少培地で培養した菌の生育およびピペロナール代謝酵素活性を測定し、本菌株における本酵素の生理学的意義を検討した。その結果、本菌株はピペロナールを単一炭素源として生育するが、培地中のピペロナール濃度が高くなるにつれ生育が阻害されることから、ピペロナールは本菌株に対し毒性を示すことが示唆された。本酵素の基質特異性の結果も鑑み、本酵素の生理学的役割はピペロナールの資化および解毒と示唆された。

審　査　の　要　旨

ピペロナールは植物由来の芳香族アルデヒドであり、花の精油の成分として私たちの生活に身近なものとして有名な化合物である。しかし、ピペロナールの微生物による分解経路は未だ報告がない。そこで、ピペロナールの自然界での代謝を解明すべく、ピペロナールを単一炭素源とした培地で代謝菌のスクリーニングが行われた。

本研究によって初めてピペロナール代謝微生物の存在が明らかとなり、同微生物からピペロナール代謝酵素が単離された。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、本酵素の生理的役割はピペロナールの資化および解毒と示唆された。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、酵素科学領域のみならず応用微生物学領域において大きく貢献するものと判定される。

平成 28 年 1 月 19 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本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、審査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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。