

氏名	山田 優駿
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	博 乙 第 2841 号
学位授与年月日	平成 29年 7月 25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	アルドキシムデヒドラターゼのユニークな触媒機能

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)	臼井 健郎
副査	筑波大学准教授	博士 (工学)	橋本 義輝

論 文 の 要 旨

アルドキシムデヒドラターゼ (OxdA) はアルドキシムを脱水しニトリルを生成する酵素である。かつてアクリロニトリルからアクリルアミド工業生産の第二世代菌として使用された *Pseudomonas chlororaphis* B23 株のニトリル分解代謝とリンクするニトリル合成に関わる OxdA はヘムを含む酵素で、基質のアルドキシムが直接ヘムに結合する等、従来のヘムタンパク質には見られない希有な現象を有することが判明している。本論文の研究ではヘム酵素特有の酸化還元反応に着目し、OxdA の詳細な機能解析が行われた。

まず、OxdA および変異酵素の精製が行われた。OxdA の遺伝子あるいは、His320 残基をアスパラギン酸やアラニンに置換した変異酵素遺伝子を pET ベクターに連結したプラスミドが各々構築され、それぞれ *Escherichia coli* BL21codonplus (DE3) RIL 株に導入することで、OxdA (WT)、OxdA (H320D) および OxdA (H320A) が大量発現され、最終的に、野生型 OxdA [OxdA (WT)] および 2 種の変異酵素 [OxdA (H320D) と OxdA (H320A)] がそれぞれ各種カラムクロマトグラフィーで単一に精製された。

本論文は、得られた精製標品を用いて主として以下のことを記述したものである。

1) 著者は、OxdA (WT) を過酸化水素に作用させ、過酸化水素の吸収 (240 nm) を測定した結果、僅かに 240 nm の吸光度の減少が認められたことから、OxdA がカタラーゼ活性を示すことが初めて明らかとなった。さらに、より精密な解析を行うために酸素電極による活性測定法を用いて、OxdA (WT)、OxdA (H320D)、OxdA (H320A) についてカタラーゼ活性の V_{max} を測定した結果、OxdA (H320D) は、OxdA (WT) や OxdA (H320A) の約 30 倍高い値を示すことが明らかとなった。

2) 著者は、基質として guaiacol もしくは ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt)]を用いて、OxdA(WT)あるいはOxdA(H320D)の反応を検討したところ、guaiacolからはTetraguaiacolが、また、ABTSからはABTS radicalが検出されたことから、OxdA(WT)とOxdA(H320D)それぞれがペルオキシダーゼ活性を示すことが初めて明らかとなった。

3) 著者は、基質として過酸化水素と1-methoxynaphthaleneを用いてOxdA(WT)の反応を行ったところ、産物の(4-methoxy-1-naphthalenolの重合体である)Russig's blueが検出されたことから、本酵素がペルオキシゲナーゼ活性を示すことが初めて明らかとなった。一方、OxdA(H320D)の反応を行ったところ、Russig's blueは検出されず、反応溶液は上述の反応とは異なる色を呈した。この未知の反応産物の同定をLC/MSおよびNMRによって試みたところ、最終的に本産物は1-methoxy-2-naphthalenolであることが明らかとなった。

4) 著者は、酸化還元触媒能の強さの指標となる還元電位を、OxdA(WT)、OxdA(H320D)、OxdA(H320A)について測定した結果、OxdA(H320D)のonsetポテンシャルは0.4 Vと、OxdA(WT)の0.28 VやOxdA(H320A)の0.28 Vより高い値を示すことが明らかとなり、OxdA(H320D)の酸化還元触媒能の強さを裏付けるデータになることが示唆された。

審 査 の 要 旨

アルドキシムデヒドラターゼ(OxdA)は水存在下であるにも関わらず、アルドキシムの脱水反応により、炭素-窒素3重結合を形成するユニークな酵素であり、その触媒機構にヘムが関わっていることが既に明らかとなっている。しかしながら、一般的にヘム酵素として機能がよく知られている酸化還元能をOxdAが有しているかの報告はこれまで全く無かった。

本研究によって、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ペルオキシゲナーゼの3種の酵素活性をOxdAが有することが初めて明らかとなった。また、野生型酵素と変異型酵素に対する各々の反応のキネティックパラメーター解析等により、OxdAのHis320残基は基質との親和性や配位と密接に関係していることが明らかとなった。これら一連の基礎的知見は酵素科学研究にインパクトを与えるものである。また、野生型OxdAの数倍~数十倍の酸化還元活性を示し、野生型には無い新たな機能を有する変異酵素OxdA(H320D)が作出され、特に本変異酵素を用いた1-methoxy-2-naphthalenolの合成法の確立は酵素反応による物質生産の観点からも重要な成果である。

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酵素学領域において大きく貢献するものと判定される。

平成29年6月18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して認める。