

氏名	大田 毅
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第2941号
学位授与の日付	平成17年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科資源管理科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular characterization of alcohol /aldehyde dehydrogenases involved in polyethylene glycol degradation in sphingomonads ( <i>Sphingomonas</i> 属細菌におけるポリエチレングリコール代謝関連アルコール/アルデヒド脱水素酵素の生化学的・分子生物学的研究)
論文審査委員	教授 河合富佐子 教授 玉田 哲男 助教授 金原 和秀

#### 学位論文内容の要旨

ポリエチレングリコール (PEG) は水溶性の合成高分子であり、その用途は医薬品、界面活性剤、潤滑油など多岐にわたる。PEG は使用后、自然環境へと自然流出的に廃棄されるので、その生分解性や代謝経路の解明は環境問題上重要である。*Sphingomonas* 属細菌は合成基質の分解能が高いことで知られ、PEG 資化菌としても多数分離されている。本研究では *Sphingomonas* 属細菌の PEG 代謝関連酵素を生化学的・分子生物学的に解明することを目的とした。

*Sphingomonas terrae* 由来 PEG 脱水素酵素 (PEGDH) は PEG の末端水酸基を酸化しアルデヒド生成反応を触媒する膜結合型酵素であり GMC グループに属している。このグループのグルコースオキシダーゼをモデルとした構造解析から、反応に関与すると推定されたアミノ酸の変異酵素を作製し、野生型酵素と比較して構造解析と反応解析を行った。その結果 His467 と Asn511 が活性部位であり、Cys379、Cys382 及び Cys297 は基質結合と反応に関与していた。また Cys379-Cys382 はジスルフィド結合を形成しユビキノン結合領域に存在した。本酵素は C 末端領域の膜結合部位で緩やかに膜に結合し、ユビキノン結合領域からユビキノンへ電子を伝達すると結論づけた。

*Sphingomonas macrogoltabidus* strain 103 株の PEG 脱水素酵素遺伝子上流にはアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 遺伝子が存在する。本遺伝子を大腸菌で発現させ、精製した ALDH は PEGDH 反応産物を基質とすることから、PEG 代謝に関与する第2段階の酵素と結論づけた。本酵素には ALDH に共通する活性中心が保存され、NADP が結合型補酵素として存在したことからニコチンプロテイン型新規酵素と結論づけた。

## 論文審査結果の要旨

ポリエチレングリコール(PEG)は水溶性高分子であり、回収やリサイクルが難しく、使用後は廃水として下水処理場や自然環境水系へ流入する。そのため、生分解性や代謝経路の解明は不可欠である。これまでPEGの分解菌はいろいろ報告されているが、4,000以上の高分子PEGは*Sphingomonas*属細菌を含む限られた分解菌でのみ報告されている。本研究は*Sphingomonas*属細菌のPEG代謝に係る主要酵素について生化学的・分子生物学的な研究を行ったものである。

まず、PEG代謝の初発酵素であるPEGDHについてはすでにクローニングされているが、本講祖がflavoprotein oxidoreductasesのGMCグループに属することから、このグループで構造解析が最もよく行われているglucose oxidaseを鋳型として構造解析が妥当かどうかを判定し、これに基づいて活性中心アミノ酸や反応に重要な意義を有すると思われるシステインに変異を導入した変異酵素を作成した。野生型と変異型酵素の反応解析から、活性部位とジスルフィド結合の位置、活性関連システインを決定し、脱水素反応機構を解明している。また、ユビキノンが実際の電子受容体であることを活性とユビキノン結合領域の存在から結論づけている。他方、PEGDH遺伝子上流に次段階の酵素と推測されるアルデヒド脱水素酵素(AIDH)遺伝子が見出されている。この遺伝子をクローニングし、酵素を大腸菌で発現させた。この酵素の特性を解析し、NADPが結合型で存在するニコチンプロテインであることを見出したが、AIDHのニコチンプロテインは初めての報告である。また、基質を調べて、本酵素がPEGの代謝に関与していることを証明した。

これらの成果は生化学、酵素学研究に寄与するところが大きく、学位に十分値する。