

Title	ナイロンオリゴマー分解酵素とそのプラスミド依存性
Author(s)	根来, 誠司
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/1276
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	根 来 誠 司
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	第 5 6 4 6 号
学位授与の日付	昭 和 57 年 3 月 25 日
学位授与の要件	工学研究科 醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ナイロンオリゴマー分解酵素とそのプラスミド依存性
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 弘輔 教授 合葉 修一 教授 田口 久治 教授 芝崎 勲 教授 大嶋 泰治 教授 原田 篤也

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では *Flavobacterium* sp. KI72 株による非天然合成化合物, 6-aminohexanoic acid cyclic dimer (以下 Acd) の分解に関与する酵素系と, その酵素系を支配する遺伝子構造について研究しており, 以下の3章に分けて論述している。

第1章では Acd 分解に関与する2種類の酵素, 6-aminohexanoic acid cyclic dimer hydrolase (以下 EI), 6-aminohexanoic acid linear oligomer hydrolase (以下 EII) のうち EI を電気泳動および超遠心分離的に均一にまで精製し, 得られた標品についてその一般性質, 分子量, 基質特異性, アミノ酸組成等を検討している。その結果, 本酵素は i) 分子量 50,000 のサブユニット 2 分子からなるホモダイマー酵素である。 ii) p-Chloromercuribenzoate で顕著に阻害されることからチオール基が活性に関係している。 iii) Acd のみを基質として分解し, 試験した 100 種以上の天然型アミド化合物やペプチドには作用しない特異性の極めて高い酵素であることを明らかにした。

第2章においては, EI と EII 酵素の遺伝子がプラスミド上に配座していることを証明している。プラスミド消去実験により EI, EII 酵素生産性が容易に欠落することから, EI, EII 遺伝子のプラスミド依存が示唆されたが, 次いで消去株を受容菌として, 親株のプラスミド DNA を用いた形質転換法により結論している。さらにプラスミド DNA の電子顕微鏡写真と制限酵素を用いる解析から, KI 72 株は3種類のプラスミド, pOAD1, pOAD2 と pOAD3 を保有しており, うち pOAD2 に Acd 分解酵素, EI と EII が支配されていると結論している。

第3章においては EI, EII のような非天然合成化合物に特異的に作用する酵素の遺伝子の出現とプラスミド構造の特殊性を調べている。まず EI と EII 遺伝子を pBR322 をベクターとして大腸菌をクロ

ーン化した。次いで部分欠失プラスミドの作製実験から両酵素の遺伝子座とその発現機構を解明している。さらにSouthern法によりEⅡ遺伝子に類似した繰り返し配列をpOAD2上の4ヶ所に同定している。

総括では以上の結果を酵素進化の観点から展望している。

論文の審査結果の要旨

非天然型の合成化合物のみに作用して天然化合物に作用しない酵素の存在は、酵素進化の観点のみならず、非天然型化合物による環境汚染に対する自然の応答の観点からも興味深い。本論文では非天然化合物、ナイロンオリゴマーの微生物分解に関与する酵素と遺伝子を扱ったもので次のような重要な結論を含んでいる。

- 1) 6-Aminohexanoic acid cyclic dimer (Ac)d hydrolase (EⅠ) がAcdのみを基質として、天然化合物には全く作用しない特殊な酵素であり、ナイロン工業成立後に工場廃棄物に適應して出現した酵素である可能性を示したこと。
- 2) EⅠおよび6-aminohexanoic acid linear oligomer hydrolase (EⅡ) 遺伝子がFlavobacterium sp. K172の保有するプラスミドpOAD2上に配座していることを明らかにした。従来から生命維持に必須でない遺伝子がプラスミドに配座している例が知られていたが、解毒の意味をもたず純粋にエネルギー獲得の機能をもつ遺伝子がプラスミドに支配されている最初の例として示された。
- 3) pOAD2のEⅠ, EⅡ遺伝子をベクターpBR322に連結して、大腸菌をクローン化した結果、EⅠとEⅡ酵素が大腸菌内で生成されたこと。すなわちFlavobacterium属由来の遺伝子が大腸菌内で表現された最初の例を示したこと。
- 4) pOAD2上に繰り返し配列が5ヶ所以上存在することを示し、この繰り返し配列と酵素蛋白の変異の相関の可能性を指摘したこと。

このように本論文は非天然合成化合物に対する微生物の適應現象に適切な概念を与え、また酵素学および遺伝子工学に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。