

平成 28 年 2 月 12 日

崇城大学大学院
工学研究科委員会

研究科長 山 川 烈 殿

論 文 審 査 委 員

主査 藤 井 隆 夫



論文審査結果の報告（甲）

論文提出者 岩 田 眞 人 （ 1 4 1 9 D 1 ）

論文題名 フタル酸ジエステル資化性菌とそれが生産するフタル酸モノエステル加水分解酵素の性質

審査委員 主 査 教 授 藤 井 隆 夫

副 査 教 授 千々岩 崇 仁

副 査 教 授 安 藤 祥 司



論文審査結果の要旨

論文題名

フタル酸ジエステル資化性菌とそれが生産するフタル酸モノエステル加水分解酵素の性質

論文の要旨

フタル酸ジエステル類は、接着剤、塗料、ボール紙、化粧品などの製造時に添加剤として用いられるだけでなく、プラスチック製品の生産時にも可塑剤として使用され、工業的に重要な有機合成化合物である。フタル酸ジエステル類は、樹脂の分子とは共有結合しておらず、製品から容易に溶け出すが、難分解性の化合物であるため環境中に蓄積する。さらに、フタル酸ジエステル類およびフタル酸モノエステル類の生物への影響として、内分泌攪乱作用と腫瘍誘発作用が懸念されている。本研究では、新たなフタル酸ジエステル類を効率よく分解する細菌とフタル酸モノエステル類加水分解酵素の取得およびその特徴の解明を目指した。

第 1 章では、金属の研磨油に汚染された土壌から di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) 資化性細菌 2 株を単離した。これら 2 株の細胞は V 字型の桿菌で培養後期に単桿ないし球菌になること等共通した性質を持っていた。一方、コロニー形態が明らかに異なること、培養の状態の観察から、両株ともに DEHP の油滴に吸着するが、その結果生じる培養液中の塊の形態がかなり異なることなど、それぞれの特徴も示した。16S rRNA 遺伝子配列から、それぞれ *Gordonia* 属と *Rhodococcus* 属の細菌と同定され、系統発生学的な側面からも放線菌門の細菌で、同じ *Corynebacteriales* 目に含まれるが、異なる *Gordoniaceae* 科と *Nocardiaceae* 科に属していることが分かった。以上から、

それぞれ、*Gordonia* sp. P8219 および *Rhodococcus* sp. EG-5 と命名した。

すでに報告されているフタル酸エステル類分解能を持つ細菌に、*Gordonia* 属細菌は 1 株 (*Gordonia* sp. strain QH-11)、*Rhodococcus* 属細菌は 3 株 (*Rhodococcus erythropolis* S-1、*Rhodococcus jostii* RHA1、*Rhodococcus* sp. JDC-11) がある。P8219 株と EG-5 株以外の菌株は DEHP を資化できないこと、一方、P8219 株と EG-5 株は DEHP を単一炭素源にできる生理的特徴を持つことから、両株は新規のフタル酸ジエステル類分解細菌であることが分かった。

第 2 章では、P8219 株と EG-5 株から、mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) の加水分解酵素 (MehpH) をそれぞれ精製した。両株の Mehph の構成は、ホモ 2 量体で分子質量が 60 kDa を少し超えるなど類似していた。MehpH の温度安定性と pH 安定性および最適反応温度と最適 pH は、それぞれ、異なっていた。また、フタル酸モノエステル類の側鎖長が長くなるほど親和性が増加する傾向が EG-5 Mehph のみに見られた。両株の Mehph をコードする ORF から推定したアミノ酸配列は、お互いの同一性が 39% とあまり高くなく、C-C hydrolase に多少の同一性を示すことが分かった。したがって、P8219 Mehph と EG-5 Mehph は新しい Mehph ファミリーの別のグループを形成していることが分かった。両 Mehph のアミノ酸配列には、serine hydrolase で保存されている pentapeptide motif 中の X_2 部位にアルギニン残基が存在することが共通していた。特に、単離され特徴づけされている serine hydrolase で、 X_2 にアルギニン残基を持つものは P8219 Mehph と EG-5 Mehph の他になく、これが MEHP などのフタル酸エステル類の加水分解に重要である可能性が考えられた。

第 3 章では、 X_2 残基を疎水性残基に変異させた組換え Mehph を大腸菌で発現させ、その特徴を調べた。 X_2 のアルギニンの活性に及ぼす影響を調べるため、EG-5 Mehph の R¹⁰⁹ を疎水性残基 (F、M、A) に変異させた酵素を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定した。これらの変異型酵素は、野生型酵素に比べ、MEHP に対する活性が著しく低下した。基質 1-ナフチル酢酸および 1-ナフチル酪酸に対する比活性が変異導入にほとんど影響されなかったことから、変異導入により酵素の構造が変化または不安定化しないことが考えられた。この活性低下の原因を調べるため、MEHP を基質にして、野生型 EG-5 Mehph と R109F 変異型 EG-5 Mehph の K_m と V_{max} の値を調べた。その結果、変異型酵素では、 V_{max} 値が大きく低下し、 K_m 値はほとんど変化せず、MEHP に対する親和性の低下はなかった。以上のことから Mehph に特異的なアルギニン残基が MEHP のカルボキシル基のマイナス電荷を中和し、エステル結合への求核攻撃を妨害しないように機能していることを初めて確認した。

以上の研究は、難分解性のため、環境に蓄積しているプラスチックの可塑剤のフタル酸エステル類 (PHAs) の生物分解について、生物学的、生化学的側面から貴重な知見を提供し、PHAs の分解技術に貢献する研究で、博士 (工学) に充分値すると認められる。

(2,000 字程度)

最終試験結果の要旨

学位論文提出者は、自然界から単離した 2 種類のフタル酸エステル類 (PHAs) 分解菌の性質を明らかにし、PHAs の代謝酵素 MEHP 加水分解酵素が新規な酵素であること、一次構造上のあるアルギニン残基が活性に重要であることを明らかにした。これらの結論を明瞭に説明し、質問に適切に答えた。以上、学位審査委員はこの論文が博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認め、論文審査に合格したと判定した。

(200 字程度)