

## 論文要旨

|  |   |             |
|--|---|-------------|
| 区分   | 甲 | 氏 名 岩 田 眞 人 |
| <p>論文題名</p> <p>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</p> <p>論文の要旨</p> <p>フタル酸ジエステル類は、プラスチック製品の生産時に可塑剤として大量に用いられるだけでなく、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も使用され、工業的に重要な有機合成化合物である。塩ビ工業・環境協会の HP (<a href="http://www.vec.gr.jp/anzen/anzen2_2.html">http://www.vec.gr.jp/anzen/anzen2_2.html</a>) によれば、2014 年の日本での年間生産量は約 20 万トンで、その約 6 割を di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) が占め、diisononyl phthalate が続いている。これらのフタル酸ジエステル類は、プラスチック樹脂などの分子間に入り込み、樹脂分子同士を遠ざけ、滑らせることで樹脂に柔軟性を付与し、加工を容易にする。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 (Bao et al, 2015)。そのため、フタル酸ジエステル類の生産工場、樹脂製品の製造工場だけでなく、多くの調査された環境で、フタル酸ジエステル類による汚染が見られる。フタル酸ジエステル類およびそのエステル結合の一つが加水分解された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。</p> <p>第 1 章では、金属の研磨油に汚染された土壌から DEHP 資化性細菌を 2 株単離した。得られた細菌の特徴を明らかにした。さらに、系統発生的分類により、異なる属に分類されることを示し、これらの菌株をそれぞれ <i>Gordonia</i> sp. P8219 と <i>Rhodococcus</i> sp. EG-5 と命名した。両株はコロニー形態や培養 DEHP を単一炭素源とする培養で、状態が少し違うが、DEHP を取り囲む細胞凝集塊を作ることから、DEHP 分解の初期代謝に共通点があると考えられた。分泌酵素ではなく、細胞表面で DEHP を加水分解するのか、あるいは細胞内に取り込んでから加水分解するのかいずれかの可能性が高いと思われる。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、<i>Gordonia</i> 属細菌は 1 株 (<i>Gordonia</i> sp. strain QH-11)、<i>Rhodococcus</i> 属細菌は 3 株 (<i>Rhodococcus erythropolis</i> S-1、<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1、<i>Rhodococcus</i> sp. JDC-11) がある。P8219 株と QH-11 株 (accession No. JN641798) の 16S rRNA 遺伝子配列の同一性は 97% で、異なる菌株と考えられた。EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、<i>R. erythropolis</i> の複数の株と完全に一致していたが、S-1 株の 16S rRNA 遺伝子配列が登録されていないため、S-1 株と同一の菌株かは不明である。</p> |   |             |

また、EG-5 株の 16S rRNA 遺伝子配列の RHA1 株 (NR\_074610) と JDC-11 株 (FJ378037) のそれらに対する同一性はそれぞれ 98% と 97% で、どちらも異なる菌株と考えられた。上記の 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 の酵素化学的特徴づけを行ったところ、酵素の構成がホモ 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。P8219 MehpH の温度安定性と pH 安定性は、45℃まで、pH 6.0~9.0、EG-5 MehpH の温度安定性と pH 安定性は、50℃まで、pH 6.0~8.5 で、多少の違いがあった。最適反応温度と最適 pH は、P8219 MehpH の場合 45℃、pH 7.5、EG-5 MehpH の場合 50℃、pH 8.0 となり、両株で若干異なっていた。MEHP に対する  $K_m$  と  $V_{max}$  は、P8219 MehpH では若干低く、EG-5 MehpH では若干高かった。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。また、P8219 MehpH をコードする 936 bp の *P8219 mehpH*、EG-5 MehpH をコードする 912 bp の *EG-5 mehpH* の塩基配列を決定した。両酵素の酵素化学的特徴は類似していたものの、推定アミノ酸配列の同一性は 39% とあまり高くなかった。しかし、serine hydrolase の特徴に加えて、既知 serine esterase よりも C-C hydrolase により高い同一性を示すこと、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。両酵素のアミノ酸配列の同一性は 39% しかなかったが、serine hydrolase の特徴および既知 serine esterase よりも C-C hydrolase に同一性を示すことが分かった。pentapeptide motif (G- $X_1$ -S- $X_2$ -G) 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。 $X_2$  のアルギニン残基は既知の酵素には見られず、フタル酸モノ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。単離され特徴づけされている serine hydrolase の中で、pentapeptide motif 中のアルギニンが P8219 MehpH と EG-5 MehpH のみに見られた。EG-5 MehpH の R<sup>109</sup> を疎水性残基 (F、M、A) に変異させた EG-5 MehpH 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る。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、 $K_m$  値はほとんど変化しないことが分かった。MEHP に対する親和性の低下はなかった。以前から、*Micrococcus* sp. YGJ1 の monoalkyl phthalate esterase E1 と E2 では、フタル酸モノエステル類のカルボキシル基の負電荷を中和し、エステル結合に対する求核攻撃への妨害を防ぐ塩基性残基の存在が推定されていたが、塩基性残基の同定には至っていない。本研究では、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ことを初めて確認した。