



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on alkane degradation and its molecular mechanisms of <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 isolated from the Mariana Trench [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	NITHIMETHACHOKE, Tanasap
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第16030号
Issue Date	2024-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92747
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NITHIMETHACHOKE_Tanasap_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学） NITHIMETHACHOKE Tanasap

審査委員	主査	教授	森川 正章
	副査	特任教授	福井 学
	副査	教授	三輪 京子
	副査	准教授	堀 千明

学 位 論 文 題 名

Studies on alkane degradation and its molecular mechanisms of
Geobacillus kaustophilus HTA426 isolated from the Mariana Trench

(マリアナ海溝から単離された *Geobacillus kaustophilus* HTA426 のアルカン分解と
その分子機構に関する研究)

本論文は、序章および4つの本章から構成されている。*Geobacillus* 属は好熱性芽胞形成グラム陽性細菌グループであり、その高温適応能力に加えて熱安定な耐熱性酵素の工業生産に利用可能という側面から基礎研究のみならず応用研究の分野でも広く研究されている。またいくつかの *Geobacillus* 属細菌株は、原油主成分である炭化水素化合物を好氣的に分解できることが報告されている。2001年に当研究室で新潟県油田から単離した *Geobacillus thermoleovorans* B23 は、広範囲の直鎖状炭化水素アルカン(C11 ~ C32) を高温で分解することおよびアルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子を3つ $LadA\alpha$, $LadA\beta$, $LadB$ 保有していることが報告されている (Kato et al. 2001; Boonmak et al. 2014)。一方、海洋研究開発機構が1997年にマリアナ海溝から単離した *Geobacillus kaustophilus* HTA426 もアルカンを分解することが当研究室で示唆されていたが、*G. kaustophilus* HTA426 のゲノムには、既知のAlkB型、Alm型、CYP型、Lad型アルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子がいずれも存在せず、研究はその後進展していなかった。

学位申請者はまず序章において HTA426 のゲノム情報を精査し、アルカン分解代謝を担うと予想される遺伝子クラスター内にアルカン分解とはまったく関係のないリボヌクレオチド還元酵素の小サブユニット(RNR2) をコードする候補遺伝子 GK2771 が存在することに注目した。GK2771 は構造上RNR2に似ているがリボヌクレオチド還元酵素活性を有さないことから、近年、R2 様リガンド結合オキシダーゼ (R2lox) という新しいタンパク質グループとして分類されたが、その機能や反応基質は不明である。学位申請者は、構造生物学分野で以前から指摘されてきた RNR2 と可溶性メタンモノオキシゲナーゼ(sMMO) の活性中心構造の類似性に基づいて、GK2771がアルカンを基質とするモノオキシゲナーゼとして機能しているのではないかという仮説を立てた。続く第1章では、*G. kaustophilus* HTA426 が栄養培地 LB で 60°Cで分解するアルカンが C11 ~ C17であることを実証した。これに対してアルカン以外に炭素源を含まない最少培地 LBM では、HTA426 がより広範囲の C10 ~ C24 アルカンを分解することも明らかにした。第2章では、T7 プロモーターの制御下で GK2771遺伝子を過剰発現する組換え大腸菌 *E. coli* (pET28a-GK2771) を作製した。組換え GK2771 粗酵素は予想どおり、C10 ~ C23 アルカンを分解した。さらに、その活性が 40°C と 60°C の間で大きな差はなかったことから、GK2771 アルカンモノオキシゲナーゼの酵素活性に大腸菌由来タンパク質が関与しているこ

とを示唆した。一方、Hisタグを付加した精製 GK2771 は 40°Cでは活性がなく、60°Cでは単独で活性を有することも証明した。また、予想される活性中心を構成する2つのアミノ酸残基 Glu202 と His205 をそれぞれ Alaに置換した二重変異酵素を作製し、その酵素活性が低下することも実証した。以上の発見は、孤立したRNR2 すなわち GK2771 (*GkR2loxI*) が、ヘテロ二核Mn-Fe活性中心で酸素による二電子酸化反応を触媒する新規アルカンモノオキシゲナーゼであることを示した画期的な成果である。また、これまで未解明であった R2lox タンパク質グループの機能と基質に関する疑問にも答えた。第3章では、GK2771 遺伝子に隣接する推定上のアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする GK2772 遺伝子を過剰発現する大腸菌 *E. coli* (pET28a-GK2771) を作製し、Hisタグ付加組換えGK2772 を精製してその活性を調べた。その結果、組換え GK2772 はアセトアルデヒド C2 に対して、30°C、40°C、および 50°Cと比較して60°Cの温度条件下でより高い活性を示した。また、脂肪族アルデヒドであるデカナール C10 に対しては、70°Cで最も高い活性を示したが、60分後には60°Cに比べて活性は低下した。テトラデカナール C14 に対してもデカナール C10とほぼ同等の活性を60°Cで確認した。これらの結果は、GK2771 と GK2772 を含む遺伝子クラスターが HTA426 のアルカン分解代謝を担っていることを強く支持するものである。第4章では、アミノ酸配列の相同性に基づいた分子系統解析によって GK2771 ホモログの細菌群での分布について調査した。その結果、*Geobacillus*属細菌以外に *Caldibacillus*属や*Neobacillus*属細菌にも当該酵素遺伝子が分布していることが判った。さらには、好熱性グラム陰性細菌 *Anaerolineae*属にも GK2771 ホモログが分布していたが、本属細菌は酸素を利用できない絶対嫌気性であることから、これはアルカンモノオキシゲナーゼではなくまた別の機能を有している酵素遺伝子であることが示唆された。

以上この論文は、R2lox型の新規アルカンモノオキシゲナーゼを発見し、細菌に分布するアルカンモノオキシゲナーゼファミリーの多様性に関する理解を深めただけではなく、共通の祖先型酵素が好熱菌のなかで核酸合成酵素（リボヌクレオチド還元酵素）とアルカン分解酵素へと進化した可能性を示唆した点において学術的に高い価値が認められる。以上により、環境科学分野における進歩性ならびに波及性は十分に高いと評価し、審査員全員の合意のもと学位申請者 NITHIMETHACHOKE, Tanasapの業績は、博士（環境科学）学位を授与するに相応しいと結論した。