

氏 名 眞本 利絵

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博乙第4244号

学位授与の日付 平成20年 3月25日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第5条第2項該当)

学位論文の題目 Polyvinyl alcohol (PVA)-degradative operon and PVA uptake in *Sphingopyxis* sp. strain 113P3  
(*Sphingopyxis*属細菌113P3株におけるポリビニルアルコール(PVA)分解オペロン及びPVA取り込みの解析)

論文審査委員 教授 河合富佐子 准教授 金原 和秀 教授 青山 勲

### 学位論文内容の要旨

ポリビニルアルコール(PVA)は、様々な分野で使用されており、無処理で放置すると環境問題を引き起こし、社会的な影響が大きい。PVAの微生物分解は、多くのグループで報告されているが、分子レベルの研究はほとんどない。水溶性高分子の処理は分解菌処理が実用的な唯一の方法である。そこで、PVA分解菌*Sphingopyxis* sp. strain113P3を用いて、PVAの微生物分解を分子レベルで解明することを目的とした。第一章では、PVAデヒドロゲナーゼ遺伝子をクローニングして、発現タンパク質の特性を明らかにし、新規なタイプIIキノヘムプロテインアルコール脱水素酵素であることを明らかにした。第二章では、*pva*オペロン中、PVADH遺伝子の下流に存在するcytochrome *c*のクローン化及び発現を行い、その生理学的な役割を明らかにした。また第三章では、既知の*pva*オペロンの下流及び上流域をシークエンスし、オペロンの最終的な遺伝子構成とサイズを決定した。また、*pva*オペロンが本菌に存在するメガプラスミドに局在することを示した。最後に、第四章では、PVAの存在下で、細胞表層に特異的な超微細構造(dent)が出現することを電顕観察から見出し、この構造がPVAの取り込みに関与していることを蛍光ラベルしたPVAを用いて強く示唆した。これらの研究を通じてPVA分解オペロンとそのPVAによる発現制御を初めて明らかにした。

## 論文審査結果の要旨

本研究は水溶性合成高分子として大量に使用されているポリビニルアルコール(PVA)の微生物分解機構の分子レベルでの解明、代謝酵素の生化学的研究及びPVA取り込みに伴う細胞表層変化の解析に関するものである。PVAの代謝経路及び分解に関連すると思われる3遺伝子の存在は知られているが、発現解析に基づく分解オペロン構成などの報告はない。また、発現酵素やタンパク質の詳細な解析は1遺伝子を除いては行われていなかった。申請者らは残りの2遺伝子、すなわちPVA脱水素酵素(PVADH)およびチトクローム*c*遺伝子の発現タンパク質を精製し、前者が新規なキノヘムプロテイン酵素であること、後者がPVADHの生理的な電子受容体であることを明らかにした。他方、3遺伝子がオペロンを構成していることを確認し、その上下流を解析してRT-PCRの結果から、*pva*オペロンは3遺伝子のみであり、上下流には転写開始点と終了配列が存在することを明らかにした。他方、これまでこれらの酵素は構成酵素であると考えられていたが、PVA培地の発現量はグルコース培地に比べてはるかに高く、PVAによる誘導がされてが推測されたので、Northern blot hybridizationにより、mRNAの発現がPVAにより誘導されることを初めて明らかにした。これらの結果から、PVAのような高分子は細胞膜を透過しにくいいため酵素の誘導は困難であるが、構成的な遺伝子発現でPVAが分解代謝されると、低分子化されたPVAは細胞質内に入り、分解オペロンのプロモーター領域を活性化して発現をさらに誘導し、分解を促進するという合理的な推論がされている。

他方、このような高分子物質の取り込みについては、TonB-dependent receptorによる澱粉やポリエチレングリコールの取り込みが推測されている。また、アルギン酸は細胞表層に発現するpit様構造にアルギン酸を吸着、取り込むことが推定されている。細胞の取り込み分子量限界は一般的には約1,000と考えられているなど、細胞外膜が取り込み障壁となっていることが考えられる。本菌をPVA培地で生育させると、栄養培地生育菌には認められない、凹状の構造が数個出現する。蛍光でラベルしたPVAを用いて洗浄菌体と反応させると、PVA培地で生育した菌体でのみ、蛍光PVAの吸着が電顕観察で認められた。PVA生育菌体をタンパク不活化剤で処理すると吸着は認められない。これらのことから、本構造はPVAで誘導発現され、取り込みに関連していると推測した。

これらの結果は国際誌4報に受理され、1報を除いて既に公表済みであることから、国際的に認知された研究成果であり、学位を取得するのに十分値すると考える。