

学 位 論 文

Pseudomonas sp. 113P3 由来の polyvinyl alcohol dehydrogenase
の諸性質について

平 成 8 年 9 月

畑中 唯史

学 位 論 文

Pseudomonas sp. 113P3 由来の polyvinyl alcohol dehydrogenase
の諸性質について

平 成 8 年 9 月

畑 中 唯 史

目次

略語表	p. 3
序章	p. 4
第1章 <i>Pseudomonas</i> sp. 113P3 の単離	
【序論】	p. 6
【実験の部】	p. 7
【結果の部】	p. 11
1. <i>Pseudomonas</i> sp. 113P3株の菌学的性状	
2. <i>Pseudomonas</i> sp. 113P3株の polyvinyl alcohol (PVA) 分解能	
3. <i>Pseudomonas</i> sp. 113P3株の pyrroloquinoline quinone (PQQ) 依存性	
4. 培地中の炭素源の及ぼす影響	
【考察の部】	p. 18
第2章 polyvinyl alcohol dehydrogenase (PVADH) の精製	
【序論】	p. 19
【実験の部】	p. 19
【結果の部】	p. 22
1. Cell-free extract から PVADH の精製	
【考察の部】	p. 24
第3章 PVADH の性状	
【序論】	p. 25
【実験の部】	p. 26
【結果の部】	p. 28
1. PVADH の吸収スペクトル	
2. PVADH の至適温度および至適pH	

3. PVADH の PQQ 依存性	
4. PVADH 活性に対する金属の影響	
5. PVADH の低分子基質に対する特異性	
6. PVADH の高分子基質に対する特異性	
7. PVADH の酵素産物の構造	
【考察の部】	p. 44
第4章 PVADH 遺伝子のクローニング	
【序論】	p. 46
【実験の部】	p. 46
【結果の部】	p. 51
1. PVADH のN末端およびプロテアーゼ消化断片の N末端アミノ酸配列	
2. PVADH 遺伝子クローニングのストラテジー	
3. pMA23 の <i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i> 1 kbp base pair (kbp) 断片の 塩基配列決定	
4. pMA23 の制限酵素地図作製	
5. PVADH の遺伝子配列および推定アミノ酸配列	
【考察の部】	p. 61
第5章 総括	p. 65
引用文献	p. 67
謝辞	p. 71

略語表

ADH	alcohol dehydrogenase
DCPIP	2,6-dichlorophenolindophenol
DNA	deoxynucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	high pressure liquid chromatography
kbp	kiro base pair
NMR	nuclear magnetic resonance
PEG	polyethylene glycol
PEGDH	polyethylene glycol dehydrogenase
PES	phenazine ethosulfate
PQQ	pyrroloquinoline quinone
PVA	polyvinyl alcohol
PVADH	polyvinyl alcohol dehydrogenase
SDS	sodium dodecyl sulfate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
TOC	total organic carbon
vvm	volume air/volume medium/minute

序章

PVA は、水溶性の合成高分子のひとつであり、ビニロン繊維の原料以外に繊維糊剤、紙加工材、接着剤および水溶性フィルム等の水溶性を生かした用途に使用されている。PVA は、各種微生物により分解されることが知られている。1973年に鈴木ら¹⁾により初めて土壌から PVA 分解菌 (*Pseudomonas* sp. 0-3株) が分離されて以来、数多くの研究者によってその分解機構や関連酵素の研究がなされている。また、実際活性汚泥による PVA 含有排水処理が採用されている。これらの事例から明らかなように、PVA は微生物分解性を有する数少ない合成高分子のひとつである。しかし、PVA は特定微生物によってのみ分解・資化されるが、その生分解性は必ずしも良い高分子化合物とは言えない。そこで著者は、PVA の生分解性とその部分構造との関係について明らかにしようとした。そこでまず、PVA の生分解にかかわる酵素の PVA 関連高分子に対する基質特異性を検討することとした。

1977年に酒井らにより単離された *Pseudomonas vesicularis* PD株は、PVA を炭素源とする無機塩培地で生育することを報告した。その分解機構は先ず PVA の水酸基の酸化を行う酵素 (secondary alcohol oxidase) により β -ジケトン構造をもつ PVA が生成し、次にこれを加水分解する酵素 (β -diketone hydrolase) の作用により鎖の切断が起き、低分子化するものと思われる (Fig. 1)²⁻⁶⁾。しかしながら、この2種の分解酵素とポリマーの部分構造との関わりについては未だ実験的証明がなされていない。

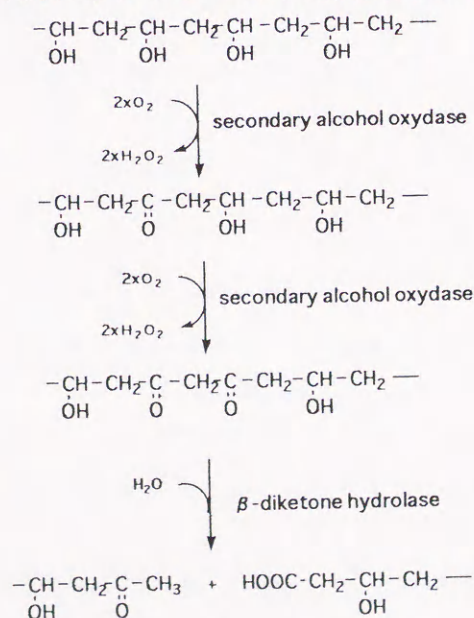


Fig. 1 Scheme of Biodegradation of PVA

また、1981年に嶋尾らは、上記の酒井らの分解様式と異なり、分解菌 *Pseudomonas* sp. VM15C株とこの株の生育に必要な補酵素 PQQ を供給する *Pseudomonas* sp. VM15A株との共生系により PVA が分解される様式のあることを報告した。そして VM15C株のペリプラズム画分中に PVA を酸化する酵素である PQQ 依存性 PVADH の存在を明らかにした (Fig. 2)⁷⁻¹⁰⁾。さらに松村らは、ビニルアルコールユニットを良分解性部分とする高分子電解質の分子設計を行っており、ビニルアルコールユニット数や PVA のタクティシティーが生分解性に影響を与えることを報告している¹¹⁻¹²⁾。また、坂井らは、PQQ 非依存性微生物の混合系により PVA が分解すると報告している¹³⁾。

このように各種 PVA 分解菌の報告がなされてきたが、PVA 分解に関与する酵素群の報告については酒井らが明らかにした以外はあまり解明されておらず、PVA の部分構造と分解酵素の反応性についての詳細な報告も現在のところなされていない。本論文は、PVA 生分解の第1段階である PVA 酸化酵素の性状を明らかにし、PVA 関連高分子に対する基質特異性、酵素産物の構造を検討することにより PVA の部分構造と生分解性との関わりを明らかにしようと試みた。

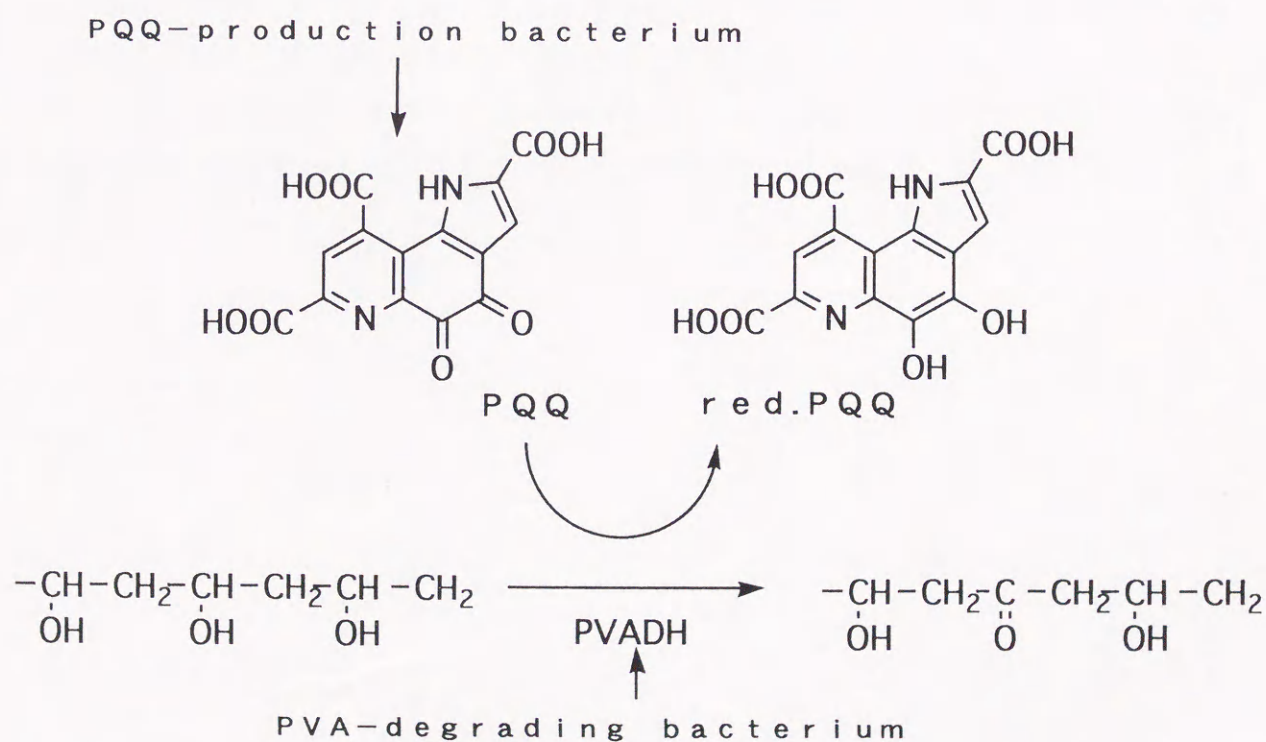


Fig. 2 Synbiotec PVA Biodegradation

【序論】

序章で述べたように、PVA の微生物分解機構は大まかに分類して、2つに分類される。それら h, 単一菌株による PQQ 非依存性の分解系と、共生系による PQQ 依存性分解系である。前者については酒井らによりその酵素の精製、反応産物の構造および反応機構等の一連の研究が終了している。しかしながら、後者の PQQ 依存性の分解系については、PVADH の部分精製しかなされておらず不明な点を多く残している。そこで著者は、PVADH の性状を明らかにすべく先ず手始めに研究材料となる PQQ 依存性 PVA 分解菌株の取得を試みることにした。繊維の糊剤として PVA が使われている染色工場の排水処理場で実際に使用されている活性汚泥をスクリーニング源とした。スクリーニング法は、PVA とヨードの複合体がヨード・デンプン反応同様に呈色することを利用した。この場合その原理は、PVA 分解菌で PVA が低分子化または資化されることによりヨード反応による呈色が失われる現象で PVA 分解菌を検索することとした。また、PQQ 依存性 PVA 分解菌を得るために培地中に PQQ をあらかじめ添加した系によりスクリーニングすることとした。以下に PVA 分解菌 (*Pseudomonas* sp. 113P3株) の取得について述べ、得られた菌株の PVADH の生成に与える炭素源の影響についても検討した。

【実験の部】

1. 試薬および機器

PQQは、関東生化学より購入した。PVAは、クレ製 PVA117（重合度1,700，ケン化度 98.5%，PVA の水酸基の立体特異性を表すタクティシティーの値は 55%[S diad]*）を使用した。Sephadex G100 は ファルマシアインキカルズ より購入した。また、培地に添加した Yeast extract は Difco 社製のものを使用した。その他の試薬は、特級試薬を用いた。PVA 分解菌のスクリーニングに用いた活性汚泥は、倉敷市児島の畑山染工所より供与して頂いた。

培養液中の全有機炭素濃度（total organic carbon [TOC]）は、島津製作所製測定装置（TOC-5000）により測定した。吸光度計は、（株）日立製作所製 U-3210 スペクトロフォトメーターを用いた。

*S diad とは隣り合った 2 つの水酸基の立体配置を基にポリマー全体の立体特異性を示すもので、S は syndio を意味し S diad 値が低い程 PVA の水酸基の立体配置は、相同性が高い（iso-tactic）ことを示す。通例として Syndio 度として表すので、本論文においてもその記載方法にて表すものとする。

2. PVA 分解菌のスクリーニング

PVA 分解菌のスクリーニングを行うに際しては、PQQ 産生菌との共生系による PVA の生分解機構が知られているので PQQ を含有した培地で検討した。Table 1. に示す無機塩寒天培地に、あらかじめ PVA で馴養した活性汚泥を滅菌蒸留水にて適宜希釈しその希釈液 0.1ml を PVA プレート（10 cmφ）へ塗布した。このプレートを 30℃，2日間空气中に静置し、生じたコロニーが 50～100 個／プレートのものを選出し、プレートを裏返した状態でこの蓋部分にヨウ素の結晶を加え、PVA とヨウ素が反応し着色し始めるまで放置した。長時間放置すると菌は死滅するので、コロニー周辺のクリアゾーン形成を確認後、直ちに菌をプレートへ塗布し、クリアゾーン形成能保持菌体を斜面寒天培地（スラント）へ接種し 30℃，5 日間静置培養し PVA 分解菌（113P3株）を単離した。この 113P3株の菌学的性質の同定は、（株）日本微生物クリニックに依頼した。

Table 1. PVA 分解菌単離培地

	プレート*	スラント	液体培地
PVA	0.2(w/v%)	0.2(w/v%)	0.2~1.0(w/v%)
NH ₄ NO ₃	0.1	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄	0.02	0.02	0.02
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	0.02	0.02
NaCl	0.01	0.01	0.01
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	0.01	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	0.001	0.001
Peptone	0.005	0.005	0.005
Yeast Extract	0.005	0.005	0.005
PQQ	1 μg/ml	1 μg/ml	1 μg/ml
Anti-foam	0.01	0.01	0.01
Agar	1.5	1.5	-
pH	7.5	7.5	7.5

*プレートは、PVA を含まない基本培地 15 ml の上層に PVA を含む層を 5 ml 重層した。

3. 培養条件

培養温度は 30 °C にて行い、液体培養の場合は 300ml 容の坂口フラスコに 100ml の培地量にて通気振とう培養を4日間行った。殖菌量は、培地 100ml 当たりスラント1本分の菌体を白金耳により殖菌した。菌株の PQQ 依存性の検討の際には、菌体内の PQQ の持ち込みの影響を除くため、LB 寒天培地 (Table 2.) に複数回プレーティングを施した後実験に供した。

Table 2. LB 寒天培地組成

Polypepton	1.0(w/v%)
Yeast Extract	0.5
NaCl	0.5
Agar	1.5

4. Cell-free extract の調製

1.0(w/v%) PVA を含む液体培地で 30℃, 4日間振とう培養して得られた菌体を、1mM Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) を含む 10mM Tris-HCl(pH8.5) に懸濁後遠心 (4℃, 8,000 × g, 30分) し菌体を回収した。これを同緩衝液に再懸濁し氷上にて 20 kHzで5秒間隔でオン・オフを繰り返す条件で15分間超音波にて破碎した後遠心 (4℃, 20,000 × g, 30分) し、その上清を Cell-free extract として使用した。

5. PVA の分解活性の確認法

PVA の分解活性の所在を明らかにする目的で、0.5(w/v%) PVA および PQQ 1μg/ml を含む 20 mM Sodium phosphate (pH 7.5)に 1/10 容の培養上清あるいは Cell-free extract を添加し、酵素による分解反応として30℃, 1日間インキュベートした。これを、PVA の分子量変化を確認する目的で、あらかじめ 20 mM Sodium phosphate (pH 7.5) で平衡化した Sephadex G100(1.6 × 89 cm)にて反応後の PVA の分子量を分析した。

6. PVA Oxidase の活性測定法

測定法は、酒井らの方法³⁾に従い、チロウム試薬^{14, 15)}による過酸化水素の定量によって行った。1.0(w/v%) PVA, 50 mM Sodium phosphate (pH 7.0)を酵素液を含め総容量 2.0 ml で 30℃, 20分間振とうさせながら反応した。反応液 2.0ml当たり 5.0ml のチロウム試薬を添加し、410nm の吸光度を測定した。酵素活性の定義は、1 分間あたり 1 μmol の H₂O₂ を生成する活性を 1 ユニットとした。

7. PVADH の活性測定法

測定法としては、嶋尾らの方法⁹⁾に従い、組成を至適化した。7.5mg PVA, 1 mM Phenazine ethosulfate(PES), 0.1 mM 2,6-Dichlorophenolindophenol(DCPIP), 1mM KCN, 0.5% Tween 80, 1mM MgCl₂, 500μM CaCl₂, 1μM PQQ, 0.1% Bovine serum albumin, 50mM Potassium phosphate (pH 7.2) を調製し、酵素液を含め総容量1.0ml で反応を行った。37℃ でプレインキュベーションした PQQ および酵素液を別途37℃ でプレインキュベーションした反応液に添加し、酵素反応を開始させ、DCPIP の還元反応による吸光度 (600 nm) の減少を観察した。酵素活性の定義は、1 分間あたり 1μmol の DCPIP を変化させる活性を 1 ユニットとした。DCPIP のモル吸光係数は、 1.91×10^4 である。

8. 炭素源の PVADH 活性に及ぼす影響

PVADH 活性が、構成的かあるいは、特定条件下でのみに存在するのかを明らかにする目的で、培地中の炭素源が 113P3株の PVADH 活性に及ぼす影響を検討した。Table 1. の PVA のかわりに glucose および種々の 1,3-ジオール類を炭素源とした場合の Cell-free extract 中の PVADH 活性を検討した。単一炭素源を含む場合の対照として LB 培地で培養した場合についても検討した。

【結果の部】

1. 113P3株の菌学的性質

単離された PVA 分解菌 113P3株の菌学的性質を Table 3. に示す。本菌株は、Bergey's manual of systematic bacteriology の分類により *Pseudomonas vesicularis* か *Pseudomonas solanacearum* に近縁の種と同定された。本論文では *Pseudomonas* sp. 113P3 株と称する。

Table 3. 113P3株の菌学的性質

形態的所見	
(1) 細胞の形態	桿菌
(2) 鞭毛	有
(3) 孢子	無
(4) グラム染色性	陰性

生育状態	
(1) 肉汁寒天平板培養	
形状	正円形
隆起	凸円状
(2) 肉汁寒天斜面培養	
発育の良否	適度
表面	潤滑
生育形状	正円
色調	クリーム色
(3) 肉汁液体培養	
濁度	適度
(4) ゼラチンの液化	液化せず

生理学的性質

(1) カタラーゼ	+
(2) オキシダーゼ	+
(3) O-Fテスト	酸化的
(4) クエン酸塩の利用	—
(5) VP反応	+
(6) MR反応	—
(7) エスクリンの加水分解	+
(8) 硝酸塩の還元	+
(9) アルギニンの加水分解	—
(10) ウレアーゼの活性	—
(11) 硫化水素の産生	—
(12) でんぷんの加水分解	—

糖類から酸の産生

(1) D-グルコース	+
(2) ラクトース	—
(3) マルトース	+
(4) D-マンニット	—
(5) サッカロース	—
(6) D-キシロース	—

+ : positive, — : negative

Table 3. の結果については、(株)日本微生物クリニックに依頼して得た。また、方法等については全て Bergey's manual of systematic bacteriology に従っている。

2. *Pseudomonas* sp. 113P3株の PVA 分解能

Pseudomonas sp. 113P3株は、PVAを 1.0(w/v%)含む液体培地で 30℃で振とう培養したところ、培養液中の TOC 濃度が約 4日間で初期の 20% まで低下し、PVA をほぼ分解する活性を示した (Fig. 3)。

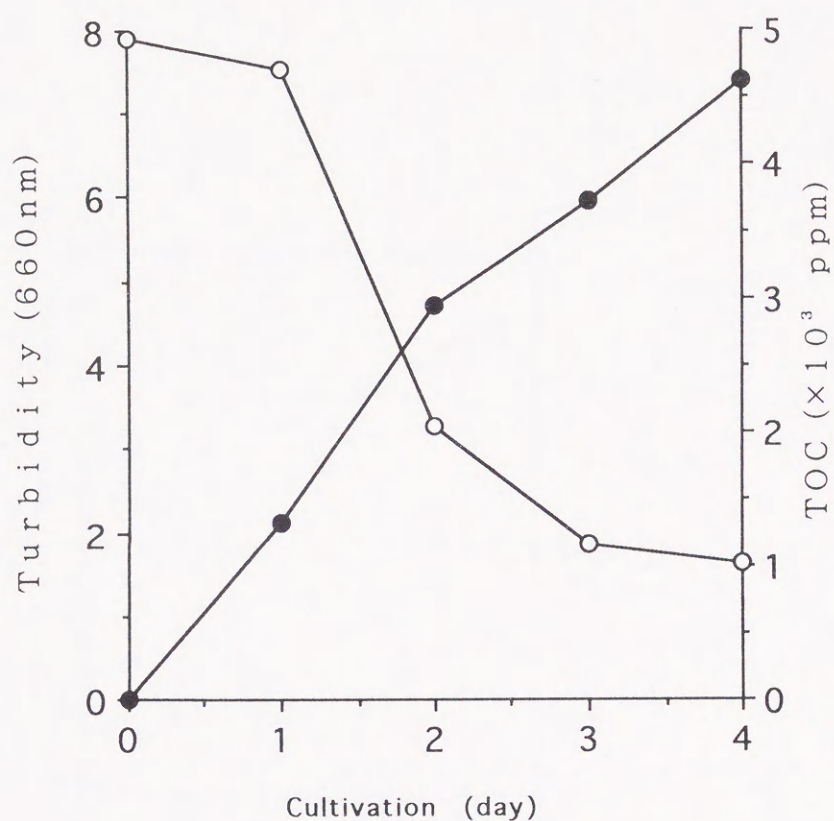


Fig. 3 PVA utilization of *Pseudomonas* sp. 113P3

Symbols ; ○, TOC ; ●, Turbidity

3. *Pseudomonas* sp. 113P3株のPQQ依存性

Pseudomonas sp. 113P3株の PQQ 依存性を検討した (Fig. 4)。本菌株は、PVA を唯一の炭素源とし PQQ 無添加条件下では生育せず、PQQ を添加すると菌の生育が認められ、この培養条件下では PQQ を産生できず必須栄養素として要求することが判明した。このことから 113P3株も嶋尾らの報告した PVA 分解機構と同様な結果となった。つまり、PQQ 産生菌との共生系によって PVA の微生物による分解・資化が行われていることが判明した。

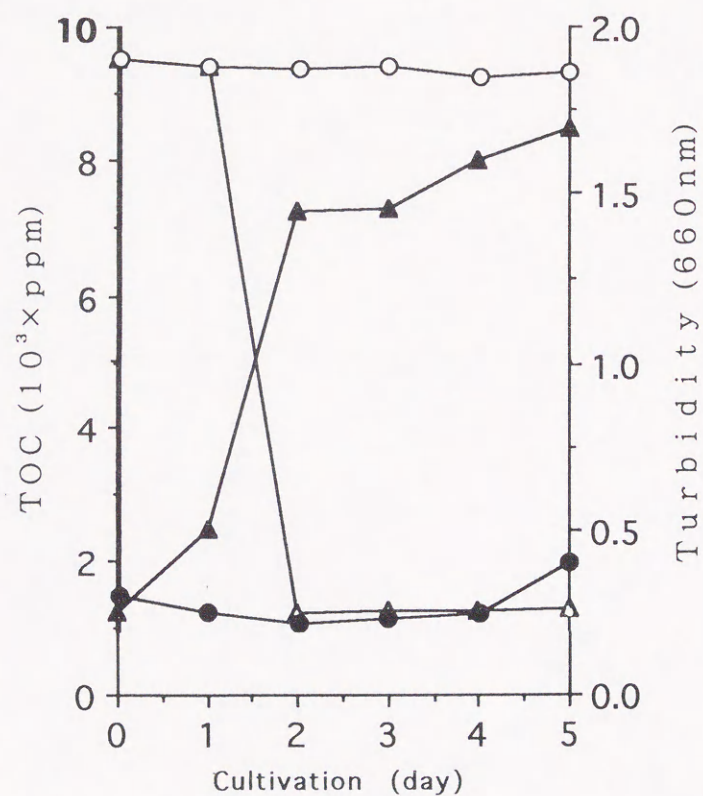


Fig. 4 Effect of PQQ on Growth of *Pseudomonas* sp.113P3

Symbols ; ○, no PQQ added (TOC) ; ●, no PQQ added (OD 660nm);
△, 10ng/ml added (TOC) ; ▲, PQQ 10ng/ml added (OD 660nm)

4. PVA 分解活性の確認

113P3株の PVA 分解活性を確認するために PVA を唯一の炭素源として 4日間培養した上精および Cell-free extract を酵素源とし PVA の分子量低下を指標として、その分解活性を確認した。その結果データの詳細は報告しないが、分解活性は、培養上精にはみられなかった。一方、Cell-free extract を酵素源とした場合のみに PVA の分子量低下が観察された (Fig. 5)。

また、4日間培養した上精および菌体の Cell-free extract の PVA Oxidase および PVADH 活性を測定したところ、Cell-free extract に PVADH の活性が認められた。PVA Oxidase の活性は、上精および Cell-free extract に認められず、113P3株の分解は PVADH によるものと示唆された。

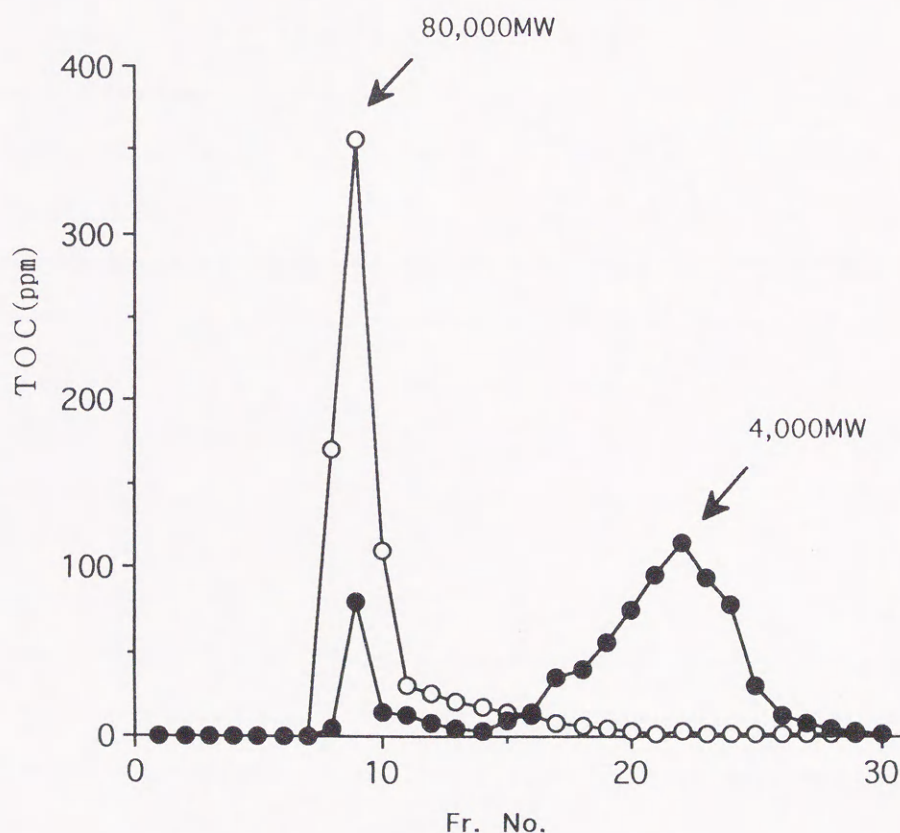


Fig. 5 Biodegradation of PVA by Cell-free extract of *Pseudomonas* sp. 113P3 grown in the presence of PVA

Symbols ; ○, 0 time ; ●, 24 hrs. after incubation

5. 炭素源の及ぼす影響

培地中の炭素源の PVADH 活性に及ぼす影響を検討した (Table 4.)。その結果、113P3株は、LB培地 (結果は省略)、PVA および glucose を炭素源にした場合に生育し、PVADH 活性は PVA および glucose を炭素源にした場合のみに活性が認められた。また、PVA を炭素源にした場合の Cell-free extract 中の PVADH 活性の経時変化を追ってみると、酵素活性は菌の生育とともに上昇していることが判明した (Fig. 6)。

Table 4. 113P3株の生育および PVADH 活性に対する炭素源の影響

Carbon source (w/v% in the medium) (%)	Growth (Turbidity) (660nm)	TOC concentration of medium (ppm)	PVADH activity (unit/mg protein)
2,4-pentanediol, 0.2%	0.10	100.0	not tested
1,2-butanediol, 0.2%	0.09	98.9	not tested
1,3-cyclohexanediol, 0.2%	0.05	100.0	not tested
PVA, 0.2%	1.21	36.0	0.070
PVA, 0.1% + glucose, 0.1%	1.77	15.0	0.054
glucose, 0.2%	1.62	11.1	0.035
glucose, 0.4%	2.69	10.2	0.044
glucose, 0.8%	5.23	8.6	0.070

After the cultivation for 3 days, growth of the culture, TOC concentration of the culture supernatant and the PVADH activity were measured.

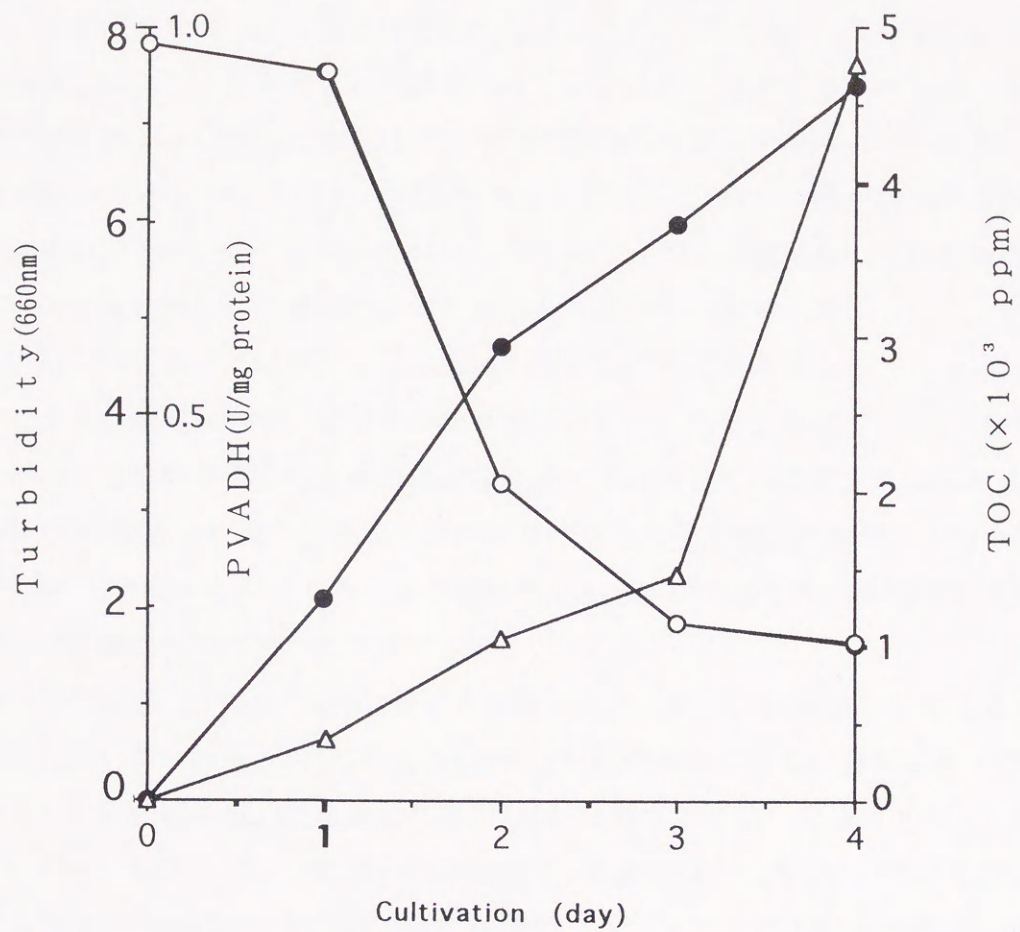


Fig. 6 Time Course of PVADH Activity
 Symbols ; $\circ$, TOC ; $\bullet$, Turbidity ; $\triangle$, PVADH (U/mg protein)

【考察の部】

PVA-ヨード複合体の呈色が消失し、PVA分解菌のコロニー周辺ではクリアゾーンが形成されることを利用したスクリーニング法¹⁶⁾によって従来の馴養培養によりPVA分解菌を濃縮・単離する方法と比較し、より簡便にPVA分解菌を得ることに成功した。クリアゾーン形成菌すべてが分解活性をもつとは言えないが、PVAに何らかの変化を生じさせる確率が高いことが示唆される結果となった。また、培地にあらかじめPQQを添加してスクリーニングしたため容易にPQQ依存性PVA分解菌を得ることが出来た。この事実は実際の汚泥中でもPQQ産生菌との共生系によってPVAの微生物分解が行われていることの傍証となった。菌学的性状についても113P3株と嶋尾らのVM15C株は、同じシュードモナスに属し、両者はよく似た菌学的性状をもつと言える。

113P3株をPVA培地で培養すると、分解が進むにつれて培養液中のPVAの濃度が低下していく現象が観察された。結果の詳細は示さないが、培養上清にはPVA分解中間体と思われるような低分子化されたものはゲルろ過カラム分析では観察されなかった。このことはPVAが菌体内に取り込まれて分解を受けることを示唆しており、その分解活性もCell-free extractに存在するという実験事実から、PVAの取り込み機構は興味をもたれるがその詳細は現在のところ不明である。

培地中の炭素源のPVADH活性に対する影響を検討したが、LB培地で生育するものの活性は見られないことから、113P3株のPVADH活性は構成的ではなく特定条件下でのみ誘導されるものと思われる。先に嶋尾らはPVADHは菌体内で電子伝達系とカップルしていることを証明しており¹⁰⁾、113P3株のPVADHも同様な働きを担っていることが示唆される。酢酸菌や*Pseudomonas*属菌等の酸化細菌のペリプラズムでは種々の糖質の酸化反応が行われることが知られており¹⁷⁾、ペリプラズミック酸化系の酸化還元酵素の多くがPQQおよび類縁キノン化合物を補欠分子族としていることも明らかとなっている¹⁷⁾、PVADHもそうした酵素の1種であることが推察される。

第2章 PVADH の精製

【序論】

第1章で、著者は PQQ 依存性 PVA 分解菌 113P3株の取得に成功し、その PVA 分解活性は、Cell-free extract に存在することを明らかにした。113P3株の Cell-free extract 中には PES, DCPIP を電子受容体として測定される PVADH 活性が存在しており、その活性の本体は PQQ 依存性 PVADH である可能性が示された。そこで PQQ 依存性 PVADH を精製することとしたが、PQQ 依存性のデヒドロゲナーゼは、PVA を基質とするもののみが知られている訳ではなく、メタノールデヒドロゲナーゼ¹⁸⁾、エタノールデヒドロゲナーゼ¹⁹⁾、ポリエチレングリコールデヒドロゲナーゼ²⁰⁾、グルコースデヒドロゲナーゼ²¹⁾、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびグリセロールデヒドロゲナーゼ²²⁾が知られている。これらの PQQ 依存性デヒドロゲナーゼの中には、 Ca^{2+} や Mg^{2+} を活性化に必要とし^{23), 24)}、反対に EDTA 等のキレート剤で容易に酵素はアポ化され、その作用は可逆的である性質をもつ酵素が知られている。これらの事実から、著者は 113P3株の Cell-free extract から PQQ 依存性 PVADH を簡便・高純度なものとして得るために apoenzyme form として精製することとし、PVADH のホロ化に必要である Ca^{2+} や Mg^{2+} を除く目的で EDTA 存在下にて実験を行うこととした。

【実験の部】

1. 試薬および機器

PQQ および PVA は第2章と同様のものを使用した。DEAE-Sepharose CL-6B および Sephadex G-75 は ファルマシアファインケミカルズ より、TSK gel G-3000SW は、(株)東ソーより購入した。タンパク質定量試薬は、Bio-Rad より、SDS-PAGE 用ゲルは、(株)TEFCO より購入し 10% アクリルアミドゲル濃度のものを用いた。SDS-PAGE 用分子量マーカーは、ファルマシアファインケミカルズ 製の LMW kit E を、使用し G-3000SW カラムによる high pressure liquid chromatography(HPLC) 分析用は、(株)オリエタル 酵母製のものを用いた。その他の試薬は試薬特級を使用した。100-L 容 ジャーファーメンター は、(株)関東理化学製の KP-100 を使用した。

2. *Pseudomonas* sp. 113P3株の培養条件

PVA 分解酵素を精製するために菌の大量培養を以下の条件で行った。種菌の培養は、500 ml 容坂口フラスコに PVA を 1.0(W/V%) を含む Table 1. に示す液体培地を 100 ml 入れ、同組成のスラント1本分の菌体を白金耳にて接種し、30 °C, 4日間振とう培養した。大量培養は100-L 容の ジャーファーメンター に同組成の培地 50 L に種菌 500 ml を接種し、30 °C, 4日間通気攪拌培養した。その際の攪拌条件は、250 rpm であり、通気量は 0.7 volume air/volume medium/minute(vvm) で行った。培養収量後 10,000 × g の連続遠心で菌体を得、これを PVADH の調製に用いた。

3. Cell-free extract の調製

ジャーファーメンター による大量培養により湿重量約 600 g の菌体を得た。この一部を用いて第1章と同様な方法で Cell-free extract を調製した。

4. PVADH の活性測定法

第1章記載の方法に従って行った。

5. Cell-free extract から PVADH の精製

PVADH の精製操作は全て 4°C で行った。

Step 1. DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー

Cell-free extract を 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH8.5) に対して 4°C, 16時間透析し、不溶物を遠心 (8,000 × g, 30分) で除きその上清を 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH8.5) で充分平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (6 × 20 cm) に添加した。2 カラム容量の 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl(pH8.5) で洗浄した後 PVADH 活性各分を 0 ~ 0.25 M の NaCl による直線濃度勾配により溶出し、7.5 ml/tube のサイズで分画した。

Step 2. 硫酸濃縮

活性画分を集め、酵素精製用硫酸を 60% 飽和になるように加え、4°C, 1時間攪拌した後遠心 (10,000 × g, 15分) し、その沈殿を最小量の 200mM NaCl, 100mM Potassium phosphate(pH 7.2) に溶かし、同緩衝液に対し一夜透析した。

Step 3. Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィー

上記の透析サンプルを限外膜にて 5 ml まで濃縮し、あらかじめ 1mM EDTA, 200 mM NaCl, 100mM Potassium phosphate(pH 7.2) で充分平衡化したSephadexG-75 カラム (3 × 20 cm) にかけた。同緩衝液で PVADH 活性画分を溶出し、2.0 ml/tube のサイズで分画し、活性画分を集め最後に EDTA を含まない 10mM Potassium phosphate(pH7.2) に対して一夜透析し、これを最終調製品として 4℃で保存した。この精製 PVADH は、4℃で数カ月安定であった。

6. Sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) による分析

SDS-PAGE による分析は、Laemli²⁵⁾ による方法に従い、泳動後、0.5% クマシーブリリアントブルー R250 により染色した後、メタノール/酢酸/水=50/75/875 の混合液により脱色した。分子量マーカーとして用いたタンパクは、Phosphorylase b, Albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Trypsin inhibitor および α -Lactalbumin である。

7. native PVADH の分子量測定

native PVADH の分子量測定は、High pressure liquid chromatography(HPLC) を用いた TSK gel G-3000SW カラムによる分析で行った。200mM NaCl, 100mM Potassium Phosphate(pH 7.2) を溶離液に用い流速 0.7ml/分, 検出波長 280 nm で行い、0.35ml/tube のサイズで分画し分子量マーカーとの保持時間の比較ならびに各画分の PVADH の活性を測定した。マーカーとして用いたタンパクを以下に示す。Glutamate dehydrogenase, Lactate dehydrogenase, Enolase, Adenylate kinase および Cytochrome c である。

【結果の部】

PVA を唯一の炭素源として培養した 113P3株の Cell-free extract から PVADH の精製を試みた。Cell-free extract を DEAE-Sepharose CL-6B カラムにかけた (Fig. 7)。その結果、PVADH 活性は、0.02~0.1 M NaCl の間に溶出画分に認められた。活性画分を硫酸濃縮し Sephadex G-75 カラムにかけ、最終調製サンプルを得た。最終調製サンプルの比活性は、Cell-free extract に比べ 13.4 倍に精製されており、収率は 55% と高い収率であった。最終調製サンプルの比活性は、19.8 unit/mg protein であった

(Table 5.)。このサンプルを TSK gel G-3000SW カラムによる分析を行ったところ、PVADH の分子量は、約 67 kD であった。また、Fig. 8 に DEAE-Sepharose CL-6B カラム活性画分および最終調製サンプルの SDS-PAGE 泳動図を示した。最終調製サンプルは、SDS-PAGE 上で単一バンドまで精製されていた。その分子量は、約 67 kD であり、TSK gel G-3000SW カラムによる分析結果と一致した。これらの結果から、PVADH は分子量 67 kD のモノマーであると考えられる。なお最終調製サンプルは、褐色を呈していた。

Table 5. Cell-free Extract から PVADH の精製

Fraction	Protein (mg)	Specific Activity (unit per mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell-free extract	1,650	1.5	100	1.0
DEAE-Sepharose CL-6B	196	8.0	62	5.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	134	14.5	78	9.8
Sephadex G-75	69	19.8	55	13.4

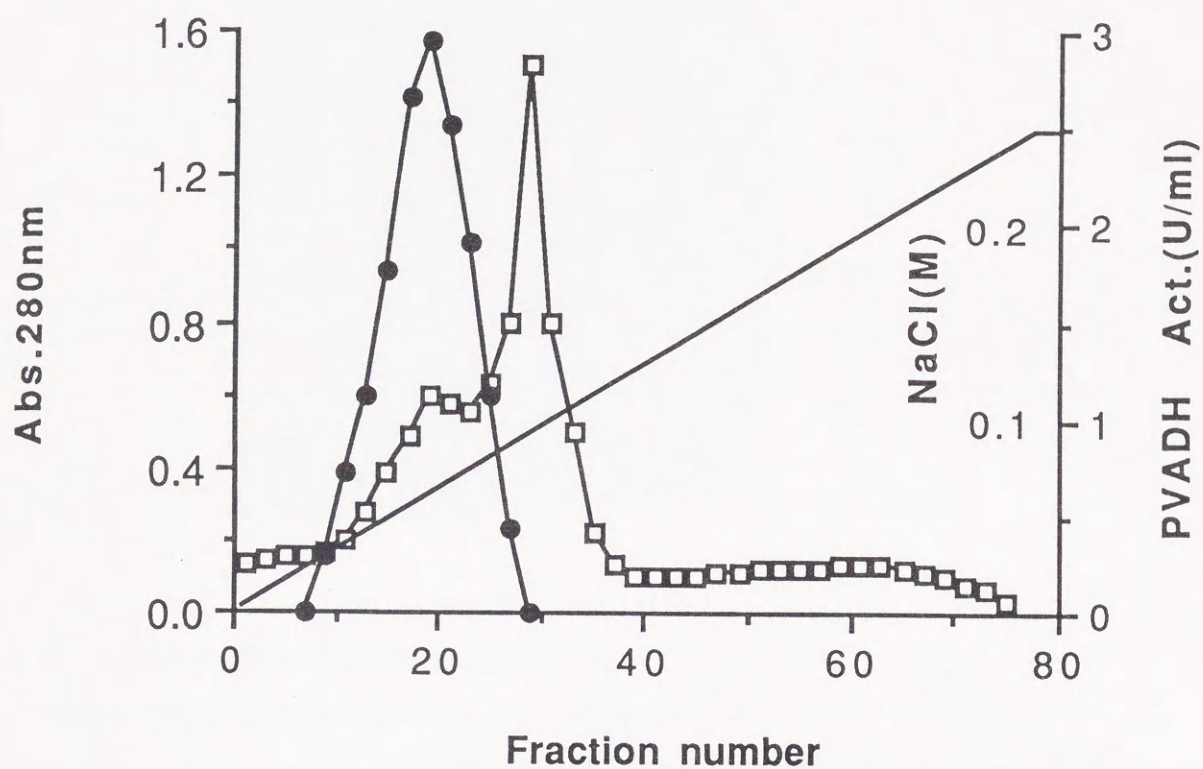


Fig. 7 DEAE-Sepharose CL-6B Column Chromatography of Cell-free Extract of *Pseudomonas* sp. 113P3.

The cell-free extract obtained from the cells of 50-1 cultures was put on to a column of DEAE-Sepharose CL-6B (6 x20 cm) and eluted with the buffer at a flow rate 0.75 ml per min. Eluents were collected in 7.5-ml fractions and the active fractions were combined for further purification.

Symbols : $\square$, protein concentration (Abs.280 nm) ; $\bullet$, PVADH activity ; —, NaCl concentration.

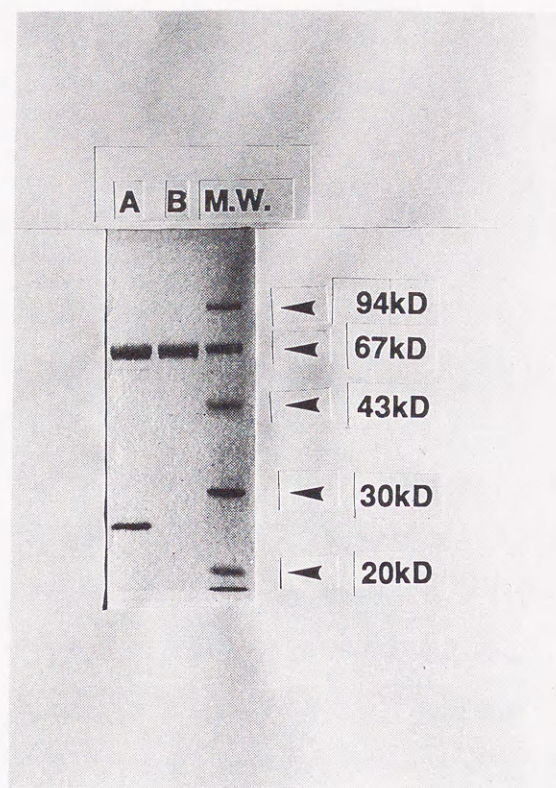


Fig. 8 SDS-PAGE of the Purified PVADH

Sample proteins were put on a 10% acrylamide gel.

(A), Active fractions from DEAE-Sephadex CL-6B column chromatography

(20 μ g of protein applied); (B), Active fractions from Sephadex G75

column chromatography (10 μ g of protein applied);

M.W.; molecular weight marker.

【考察の部】

113P3株の Cell-free extract から2段階のカラム操作と容易な手法で、純度よく55% と高収率で PVADH を精製することに成功した。SDS-PAGE および G3000SW カラム分析の結果から、本酵素は分子量約 67 kD のモノマーな酵素であることが判明した。最終調製 PVADH は、褐色を帯びており、補欠分子をもつ可能性が示唆された。次章で PAVDH の性状を明らかにすることとする。

第3章 PVADH の性状

【序論】

前章までに、PQQ 添加 PVA 培地で培養した 113P3株の Cell-free extract 中に分子量 67 kD のPVADH が存在することを明らかにした。PQQ 依存性デヒドロゲナーゼは、松下によると3つのタイプに分類される¹⁷⁾、Type I としては可溶性の酵素で PQQ のみを補欠分子族とするもの、Type II は、同じく可溶性で単一ペプチドに PQQ および heme *c* を各1分子含んでおりヘモキノプロテインと呼ばれる特異な構造をしたもの、Type III は膜結合型であり PQQ 1分子と heme *c* 1分子を含むキノプロテイン、2分子の heme *c* を含むジヘムチトクロム *c* および機能不明なサブユニットの3つのサブユニットからなっているとされている。本章では、113P3株の PVADH はモノマー酵素であるので Type I あるいは Type II のいずれの特徴を有する酵素であるのかを純化した PVADH を用いて検討する。また、種々のアルコール等のヒドロキシ化合物および PVA 関連高分子に対する基質特異性を純化した PVADH を用いて検討する。PVA は、酢酸ビニルを重合し、脱アセチル化（ケン化）し合成されるが、ケン化度（通例 degree of saponification で表し、この値が高い程脱アセチル化された割合が高いことを示す）が水溶性等の物性に大きく影響を与える。また、用いた合成法によっては、水酸基の立体規則性（タクティシティー）が変化する²⁷⁾。さらに、酢酸ビニルの重合は通常 head-to-tail 結合（1, 3-ジオールタイプ）で起こるが、重合中に微量の head-to-head 結合（1, 2-グリコール結合タイプ）が生成することが知られている²⁸⁾。これらの部分構造が PVADH 活性に与える影響を詳細に検討することとする。その方法は、Michaelis-Menten の式より導かれる Lineweaver-Burk plot から求めることができる K_m および V_{max} を種々の PVA 関連高分子基質について比較検討することとした。高分子の分子量は平均分子量であり、ここで用いる PVA 関連高分子は同一種の化合物とは厳密には言えないが、同様な手法により Polyethylene glycol (PEG) を基質とする Polyethylene glycol dehydrogenase (PEGDH) の場合において行われており²⁰⁾、本研究においてもその手法を流用し、PVADH活性と PVA の部分構造との関わりを検討することとした。また、PVADH による酸化 PVA の化学構造についても明らかにし、PQQ 依存性 PVA 分解系についても、酒井らの secondary alcohol oxidase と同様な β -ジケトン PVA タイプを生成するののかについて検討する。

【実験の部】

1. 試薬および機器

試薬等は、第1, 2章と同様のものを使用した。PVA 関連高分子は、全て(株)クラレで調製したものを用いた。なお、エチレンを含む PVA とは、エチレンと酢酸ビニルを共重合して得られるものであり、ポリマーの主鎖中にエチレン部分を含むものをさす。¹H-nuclear magnetic resonance(NMR) は、(株)日本分光製 GSX 270 スペクトルフォトメーターを用いた。

2. PVADH の活性測定法

第1章記載の方法に従って行った。

3. PVADH の吸収スペクトル測定

最終調製サンプル (7.8 nmol) を、10mM Potassium phosphate(pH 7.2) 1 mlに溶解し apoenzyme form の吸収スペクトルとして 220 nm から 700 nm まで測定した。また、同濃度の PVADH を 化学量論的に同量となる PQQ とともに 1mM CaCl₂, 10mM Potassium phosphate(pH 7.2) に溶解し、37℃, 10分間インキュベーションした後に PVA117 を 7.5mg/ml になるよう添加し、holoenzyme form として測定した。

4. ヘム分析

Bartishらの方法²⁶⁾によりヘムの種類およびヘムの結合性について分析した。この際、Alkaline pyridine ferrohemochrome of cytochrome c の分子吸光係数 (550 nm) として、 2.32×10^4 を使用した。

5. PVADH の PQQ 依存性

80 pmol の apoenzyme form の純化した PVADH を、PQQ (0~1200 pmol) とともに 1mM CaCl₂, 10mM Potassium phosphate(pH 7.2) に溶解し、37℃, 10分間インキュベーションし、第1章記載の方法にて活性測定を行った。

6. PVADH の低分子基質に対する基質特異性

純化した PVADH (0.23 units) を用い、PVA117 (30 mg/ml) およびその他の基質 (6.3 mg/ml) の場合の活性測定を行い relative activity を PVA117 を 100% として

求めた。また、反応性を示した基質に対しては基質濃度 (0 ~ 50 mg/ml) での反応速度を求めた。

7. PVADH の高分子基質に対する基質特異性

純化した PVADH (0.23 units) を用い、PVA 関連高分子 (0.12 ~ 75 mg/ml) の各濃度での活性測定を行い、Michaelis-Menten の式から導かれる Lineweaver-Burk plot により K_m (mg/ml) および V_{max} を求めた。

8. PVA のタクティシティーの測定法

PVA のタクティシティーについては、守谷ら²⁷⁾ による $^1\text{H-NMR}$ による測定法に基づいて、S diad% を求めた。

9. PVA の 1,2-glycol 結合量の測定法

PVA の 1,2-glycol 結合量については、井本ら²⁸⁾ による過ヨウ素酸による測定法に基づいて行った。なお文中断りがない場合の 1,2-glycol 結合量は、1.6 mol% 以下である。

10. PVADH による酸化 PVA の調製

純化した PVADH (25 units) を、PVA (1.775 g ~ 7.5 g) とともに 15mM MgCl_2 , 0.5mM CaCl_2 , 1 μM PQQ, 50mM Potassium phosphate (pH 7.2) 500 ml に溶解し、酸素を吹き込みながら、30°C, 24時間攪拌しながらインキュベートした。この後、4°C, 一夜サンプルを蒸留水に対して透析し、内容物を凍結乾燥して酵素酸化 PVA を得た。

なお、ここで用いた PVADH (25 units) は、純化した PVADH の specific activity が約 20 units / mg protein (table 5.) であるのでタンパク量として約 1.3 mg となる。また、純化した PVADH は SDS-PAGE 上で 1バンドであり、ここで用いた PVADH

(25 units) 中に含まれるタンパクとしては 2mg 以下であるので、他の分析には影響を与えない。

11. NaOCl による酸化 PVA の調製

NaOCl による酸化 PVA の調製は、Huang²⁹⁾ らの方法に従って行った。PVA (0.1 g/ml) を酢酸酸性水溶液に溶解し、過塩素酸 (7.5 ~ 30 mol%) を pH 4.0 に保つように滴下し、室温, 1時間攪拌した。反応産物をメタノールにより沈殿させ回収し、蒸留水に再溶解して、4°C, 一夜蒸留水に対して透析し、内容物を凍結乾燥して化学酸化 PVA を

得た。

1 2. 酸化 PVA の吸収スペクトル測定

PVADH による酸化 PVA および NaOCl による酸化 PVA を各 10mg/ml になるように 10mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 Buffer (pH 9.6) に溶解後直ちに吸収スペクトルを 240 nm ~ 300 nm まで測定した。コントロールとして、10mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.6) のかわりに 10 mM Acetate (pH 4.0) を用いた場合のスペクトルを同様に測定した。

1 3. NMR による PVA の酸化度算出法

サンプルを重水に溶解し、PVA の酸化度は、トータルメチレン由来のシグナルとカルボニル基の α -メチレン由来の比から算出した。また、各シグナルの帰属は、守谷ら²⁷⁾ による報告を基に同定した。

【結果の部】

1. PVADH の吸収スペクトル分析

PVADH 濃度として 7.8 μM に相当する apoenzyme および holoenzyme form の吸収スペクトルを測定した (Fig. 9)。PQQ および PVA とのインキュベーションによるホロ化の後に新たに 410 nm および 550nm の吸収極大が現れた。これらの吸収極大波長は、Alkaline pyridine ferrohemochrome of cytochrome c のものと同等であった。Alkaline pyridine ferrohemochrome of cytochrome c の分子吸光係数 (550 nm) および PVADH 濃度から、1モルの apoenzyme 当たり 1.03 mol の heme c が結合していると類推された。このヘムは、メチルエチルケトンによる抽出操作によって有機相へのヘムの移行を検討²⁶⁾したが、ヘム由来の吸収を示す物質は有機相に抽出されず、酵素タンパクとヘムは不可逆的に結合していることが示唆された。

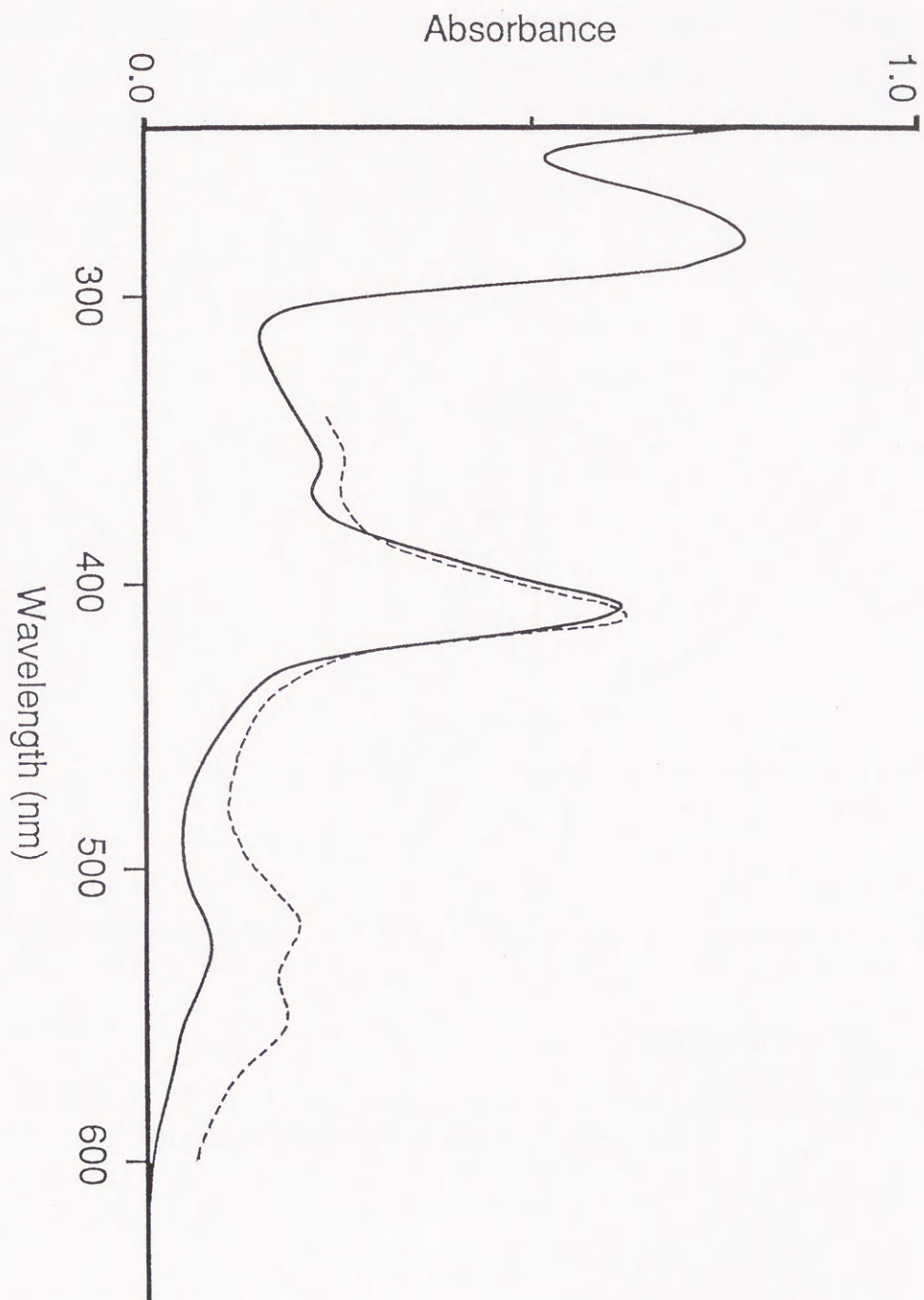


Fig. 9 Absorption Spectra of the PVADH
The absorption spectrum was measured with the purified enzyme (apoenzyme) dissolved in 10 mM potassium phosphate (pH 7.2).
The absorption spectrum of holoenzyme was measured after incubating apoenzyme with stoichiometric amounts of PQQ in the same buffer containing 1 mM CaCl_2 , followed by PVA (7.5 mg/ml) addition. Both spectra correspond with an enzyme concentration of 7.8 μM .
Symbols : —, apoenzyme ; ---, holoenzyme.

2. PVADH の至適温度および至適 pH

第1章記載の PVADH 活性測定法を基に、純化した PVADH の至適温度および至適 pH を測定した (Fig. 10)。示すように至適 pH は、Potassium phosphate の系で pH 7.2 であり、至適温度は Potassium phosphate の系で 37°C であった。

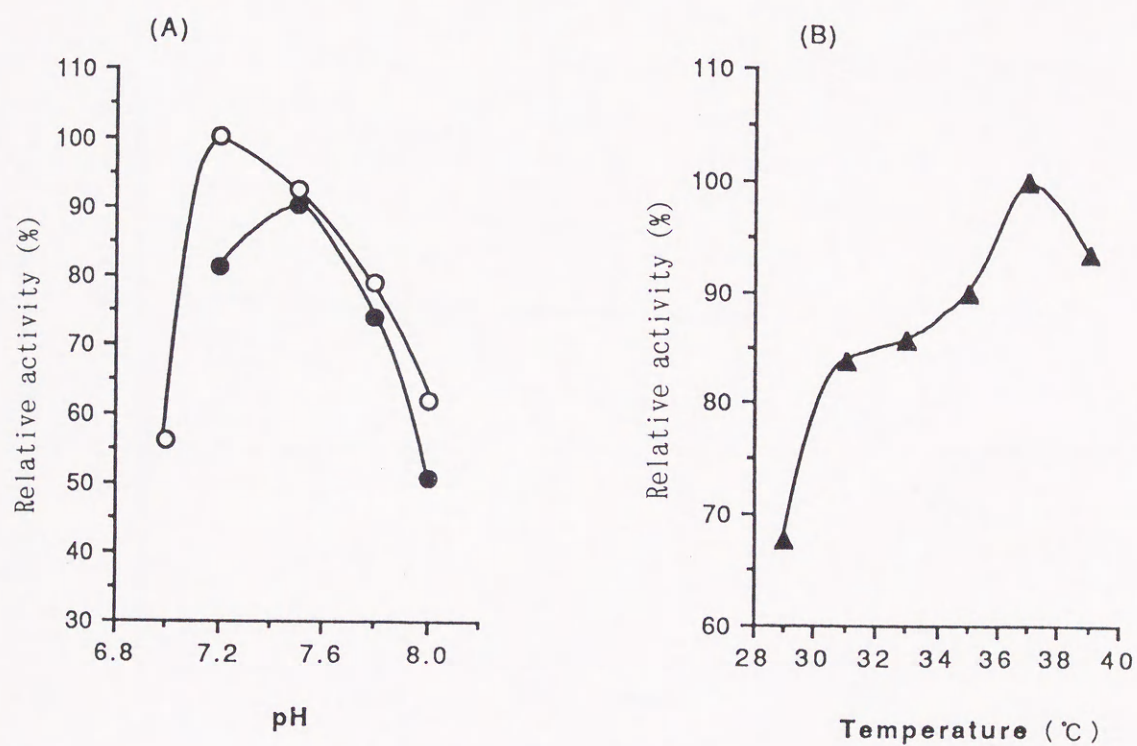


Fig. 10 Effects of pH (A) and Temperature (B) on the PVADH Activity.
Symbols : ○, Potassium phosphate ; ●, Tris-HCl.

3. PVADH の PQQ 依存性

第1章記載の PVADH 活性測定法を基に、純化した PVADH の PQQ 依存性を検討した (Fig. 11)。80 pmol の PVADH を用い、0 ~ 1250 pmol の PQQ とインキュベーションしたところ、等量の PQQ 濃度で酵素活性は飽和し 1 mol の PVADH 当たり 1 mol の PQQ が結合することが示唆された。

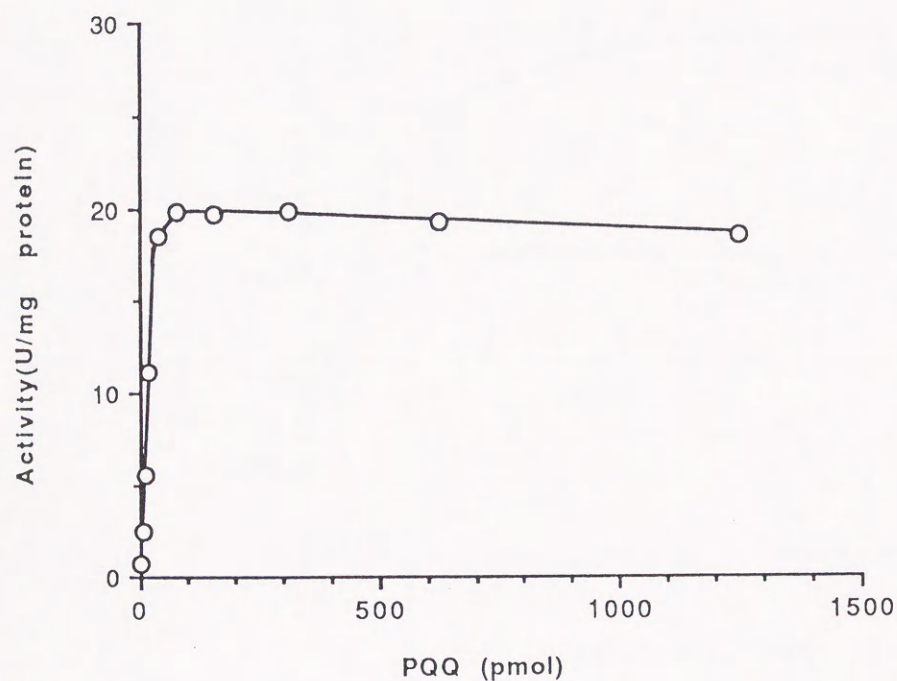


Fig. 11 Effects of PQQ on the PVADH Activity.
After incubation with PQQ at given amounts at 37 °C for 10 min, PVADH activity was assayed. Sample containing 80 pmol of apoenzyme was used.

4. PVADH 活性に対する金属の影響

第1章記載の PVADH 活性測定法を基に、純化した PVADH を用いて、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の PVADH 活性に対する影響を検討した (Fig. 12)。PVADH 活性は、これらの金属イオンによって、相対活性が約 1.5 ~ 2 倍に上昇し、この活性は添加した金属イオンと同量の EDTA によって可逆的に不活化されることも判明した。

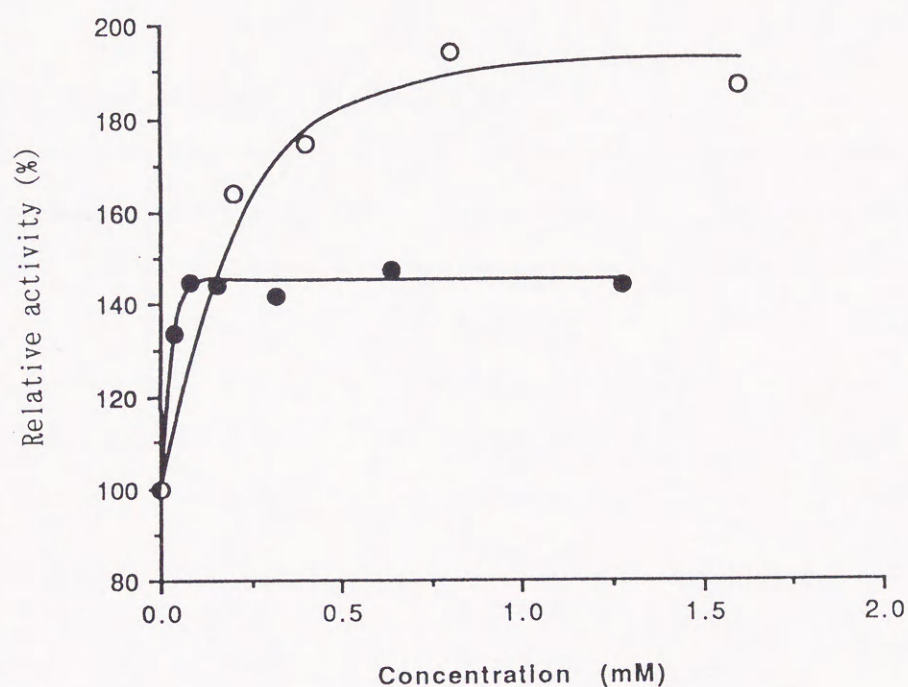


Fig. 12 Effects of Ca^{2+} ion and Mg^{2+} ion on the PVADH Activity. Activities were measured under the standard assay conditions with various concentrations of CaCl_2 and MgCl_2 . Symbols : ○, CaCl_2 ; ●, MgCl_2 .

5. PVADH の低分子基質に対する基質特異性

第1章記載の PVADH 活性測定法を基に、純化した PVADH を用いて、多価アルコールに対する酵素活性を測定した (Table 6.)。この結果から、PVADH は、1 級, 2 級アルコール類, 糖類には作用せず、PVA を最もよい基質とし、その他に反応性は低いながらも 2,4-Pentanediol および 1,3-Cyclohexanediol に作用することが明らかとなった (Table 6. および Fig. 13)。また、2,4-pentanediol の 3 種の光学異性体に対する反応性についても検討した (Fig. 14)。3 者の中で PVADH が作用したのは、*meso* isomer のみであり、水酸基の位置および立体配置により反応性が大きく影響されることが示唆された。

Table 6. PVADH の低分子基質に対する基質特異性

Substrate	Relative activity (%)	Substrate	Relative activity (%)
PVA117	100.0	Methanol	0.0
2,4-Pentanediol	1.5	Ethanol	0.0
2-Methyl-2,4-Pentanediol	0.0	1-Propanol	0.0
2,5-Pentanediol	0.0	2-Pentanol	0.0
1,2-Butanediol	0.5	2-Hexanol	0.0
1,3-Butanediol	0.9	4-Heptanol	0.0
1,4-Butanediol	0.0	Glucose	0.0
2,3-Butanediol	0.0	Sorbitol	0.0
2,5-Hexanediol	0.0	Mannitol	0.0
1,2-Cyclohexanediol	1.8	Erythritol	0.0
1,3-Cyclohexanediol	8.4	Xylitol	0.0
1,4-Cyclohexanediol	0.0	Lactic acid	0.0
		Malic acid	0.0
		Citric acid	0.0
		Tartaric acid	0.0

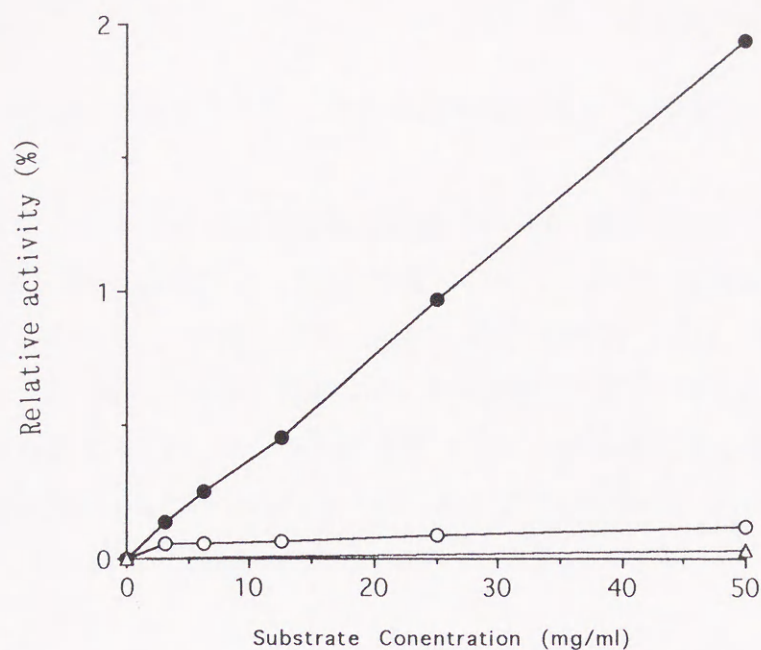


Fig. 13 Substrate Specificity of the PVADH toward Three Isomers of Cyclohexanediol

Activities were measured under the standard assay conditions with various concentrations of cyclohexanediol.

Symbols :○, 1,2-cyclohexanediol ; ●, 1,3-cyclohexanediol ;
△, 1,4-cyclohexanediol

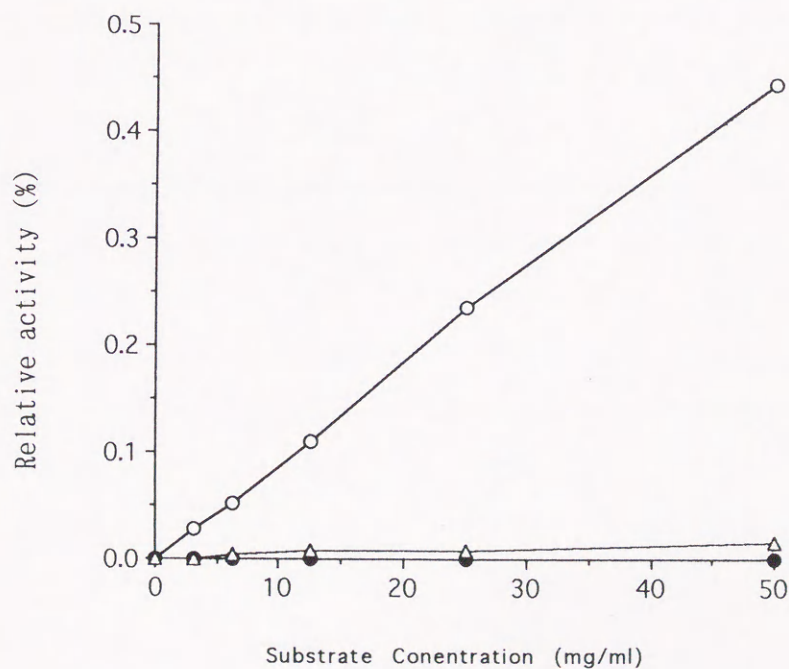


Fig. 14 Substrate Specificity of the PVADH toward Three Optical Isomers of 2,4-Pentanediol.

Activities were measured under the standard assay conditions with various concentrations of 2,4-pentanediol.

Symbols :○, meso isomer ; ●, R,R isomer ; △, S,S isomer.

6-1. PVADH の高分子基質に対する基質特異性 (ケン化度およびエチレン含量)

ケン化度およびエチレン含量の異なる種々の PVA 関連高分子について K_m および V_{max} を測定した (Table 7.)。ケン化度について、PVADH 活性は、同じ重合度をもつ PVA を比較した場合 (PVA103, 203, 403 および PVA105, 205, 405) ケン化度が低くなるにつれて、 K_m および V_{max} は減少し、 V_{max}/K_m は若干上昇した。

エチレン含量について (N4, N6 および N10)、同程度の重合度をもつ PVA に対し エチレンを含む PVA は、 K_m は低く、 V_{max} および V_{max}/K_m は高い値を示す傾向であった。Fig. 15 に N10 の Lineweaver-Burk plot を示す。

Table 7. ケン化度およびエチレン含量の酵素活性に与える影響

No.	degree of saponification (mol%)	ethylene content (mol%)	degree of polymerization	K_m (mg/ml)	V_{max}	V_{max}/K_m
PVA103	98.5	0.0	330	24.2	73.5	3.0
PVA203	88.5	0.0	330	7.2	29.1	4.0
PVA403	81.0	0.0	330	4.8	31.4	6.5
PVA105	98.5	0.0	550	21.1	53.0	2.5
PVA205	88.5	0.0	550	8.1	30.5	3.8
PVA405	81.0	0.0	550	5.8	28.6	4.9
PVA117	98.5	0.0	1,700	33.2	85.6	2.5
N4	>99.9	4.0	1,430	18.8	158.0	8.4
N6	>99.9	6.0	560	12.7	124.0	9.8
N10	>99.9	10.0	740	2.1	78.3	37.3

The value of tacticity of all polymers was 55.0 (s diad%).

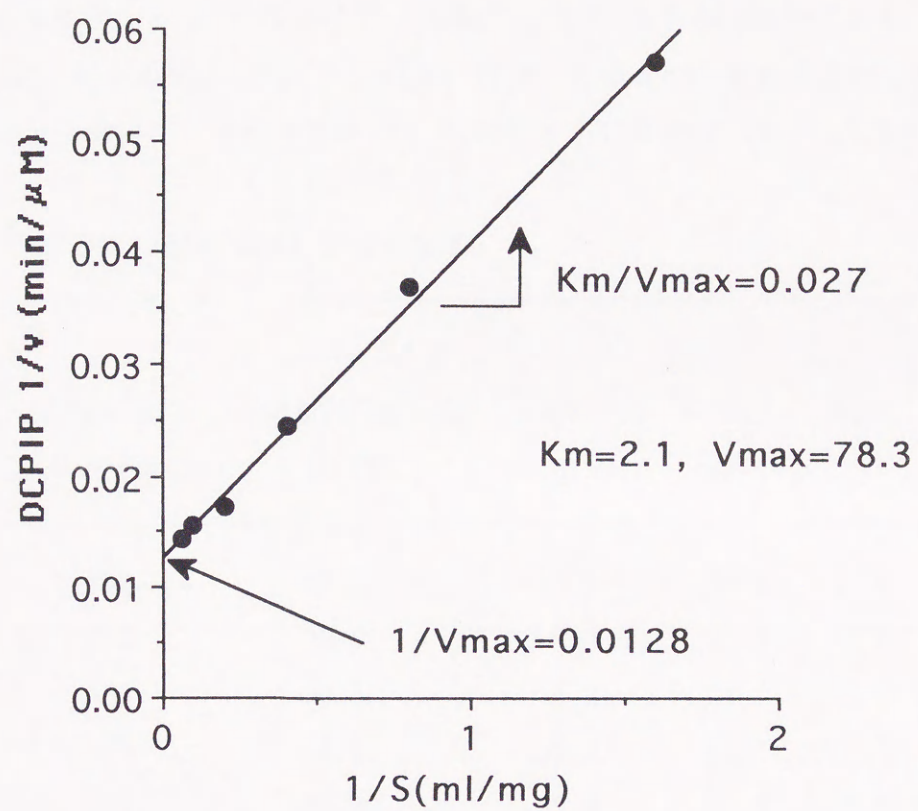


Fig. 15 Lineweaver-Burk plot of N10 for PVADH

6-2. PVADH の高分子基質に対する基質特異性 (重合度)

重合度の異なる種々の PVA 関連高分子について K_m および V_{max} を測定した (Table 8.)。アタクティック PVA (s diad が 50% 近辺の値をもつものを示す) について (PVA117-A010)、重合度が下がるにつれて K_m は減少し、重合度 28 の点で最小値を示した。アイソタクティック PVA について (LV384- LV022) も同様な傾向であり、重合度 30 の点で K_m は最小値を示した。一方 V_{max} は K_m の場合よりも重合度の影響を受けず、アタクティックおよびアイソタクティック PVA とともに重合度 100 近辺で最大となった。

Table 8. 重合度の酵素活性に与える影響

polymer code	degree of polymerization	degree of saponification (mol%)	tacticity (s diad%)	K_m (mg/ml)	V_{max}	V_{max}/K_m
PVA117	1,700	98.5	55.0	33.2	85.6	2.6
PVA105	550	98.5	55.0	21.1	53.0	2.5
PVA103	330	98.5	55.0	24.2	73.5	3.0
A138	138	>99.9	55.0	31.8	113.0	3.6
A114	114	>99.9	55.0	22.6	100.0	4.4
A042	42	>99.9	53.8	19.0	106.0	5.6
A035	35	>99.9	54.0	10.9	73.7	6.8
A028	28	>99.9	54.4	6.2	61.3	9.9
A026	26	>99.9	54.4	10.7	78.0	7.3
A020	20	>99.9	55.2	11.2	76.5	6.8
A010	10	>99.9	54.1	9.4	61.8	6.6
LV384	384	>99.9	32.1	9.3	72.6	7.8
LV339	339	>99.9	32.0	10.2	78.0	7.6
LV141	141	>99.9	30.7	8.6	86.9	10.1
LV102	102	>99.9	28.3	7.7	88.1	11.4
LV022	22	>99.9	35.8	2.8	67.5	24.1

6-3. PVADH の高分子基質に対する基質特異性 (タクティシティー)

タクティシティーの異なる種々の PVA 関連高分子について K_m および V_{max} を測定した (Table 9.)。アイソタクティック PVA は、アタクティック PVA と比較して K_m は低く、 V_{max}/K_m は高い傾向を示した。シンジオタクティック PVA (s diad が 50% よりも低い値をもつものを示す、S261) の V_{max} は、アタクティック PVA (PVA117) と比較して非常に低い値を示した。

Table 9. タクティシティーの酵素活性に与える影響

polymer code	tacticity (s diad%)	degree of polymerization	degree of saponification (mol%)	K_m (mg/ml)	V_{max}	V_{max}/K_m
AB111	12.0	1,700	>99.9	16.3	58.3	3.6
PVA117	55.0	1,700	98.5	33.2	85.6	2.6
S261	61.0	1,750	>99.9	33.1	5.0	0.2
LV339	32.0	339	>99.9	10.2	78.0	7.6
PVA103	55.0	330	98.5	24.2	73.5	3.0
LV141	30.7	141	>99.9	8.6	86.9	10.1
A138	55.0	138	>99.9	31.8	113.0	3.6
LV102	28.3	102	>99.9	7.7	88.1	11.4
A114	55.0	114	>99.9	22.6	100.0	4.4
LV022	35.8	22	>99.9	2.8	67.5	24.1
A020	55.0	20	>99.9	11.2	76.5	6.8

6-4. PVADH の高分子基質に対する基質特異性 (1,2-glycol 結合量)

1,2-glycol 結合量の異なる種々の PVA 関連高分子について K_m および V_{max} を測定した (Table 10.)。1,2-glycol 結合量が増加するのに従い、 K_m は増大する傾向を示した。

Table 10. 1,2-glycol 結合の酵素活性に与える影響

polymer code	1,2-glycol content (mol%)	degree of polymeri- zation(mol%)	degree of saponification (s diad%)	tacticity	K_m (mg/ml)	V_{max}	V_{max}/K_m
G111	n. d.	4,400	>99.9	43.9	36.3	134.0	3.7
PVA117	1.6	1,700	98.5	55.0	33.2	85.6	2.6
G115	3.7	2,140	98.1	43.9	179.0	296.0	1.7
G130	6.2	4,300	96.9	43.9	166.0	243.0	1.5

n. d. : not detectable

7. PVADH の酵素産物の構造

PVADH を PQQ とともに PES, DCPIP を電子受容体とし PVA を酸化すると酒井らの secondary alcohol oxidase と同様にアルカリ存在下で β -ジケトン構造に特有な UV スペクトル⁵⁾ が得られたが、PES, DCPIP の分解物と思われるものと反応し NMR 等の機器分析ではその構造の確認はできなかった（結果の詳細は省略）。そこで PQQ の存在下 O_2 を電子受容体として PVA の酸化を行ったところ反応は進行し H_2O_2 の生成が観測され、我々の PVADH は、オキシダーゼの機能ももつことが判明した。この反応を用い作製した PVADH の酵素産物の構造を 1H -NMR による分析 (Fig. 16) およびアルカリ存在下で UV スペクトルを NaOCl による化学酸化 PVA と比較検討した (Fig. 17)。 1H -NMR による分析では、カルボニル基の α -メチレン由来と思われるシグナル (2.8-3.0 ppm) が観測されたが、 β -ジケトンに挟まれたメチレンと思われるシグナルは観測されなかった。これは、 β -ジケトンが反応性に富み溶媒中の重水と置換し、観測されないことが原因である。また、酵素反応において基質である PVA 濃度を減少させると NMR 上のカルボニル基の α -メチレン由来と思われるシグナルは増大し、基質濃度が低いと酸化度は上昇することが判明した。UV スペクトルの比較では、あきらかに NaOCl による酸化 PVA と PVADH による酸化 PVA とはパターンが異なり、PVADH による酸化 PVA で観測されたアルカリ下での吸収極大波長の長波長側へのシフトおよび強度の増大は β -ジケトン構造特有のものであった。NMR による酸化度とアルカリ下での 300nm の吸光度とをプロットすると相関性が認められ (Fig. 18)、カルボニル基のうち一定の割合は、 β -ジケトンとして存在していることが示唆された。

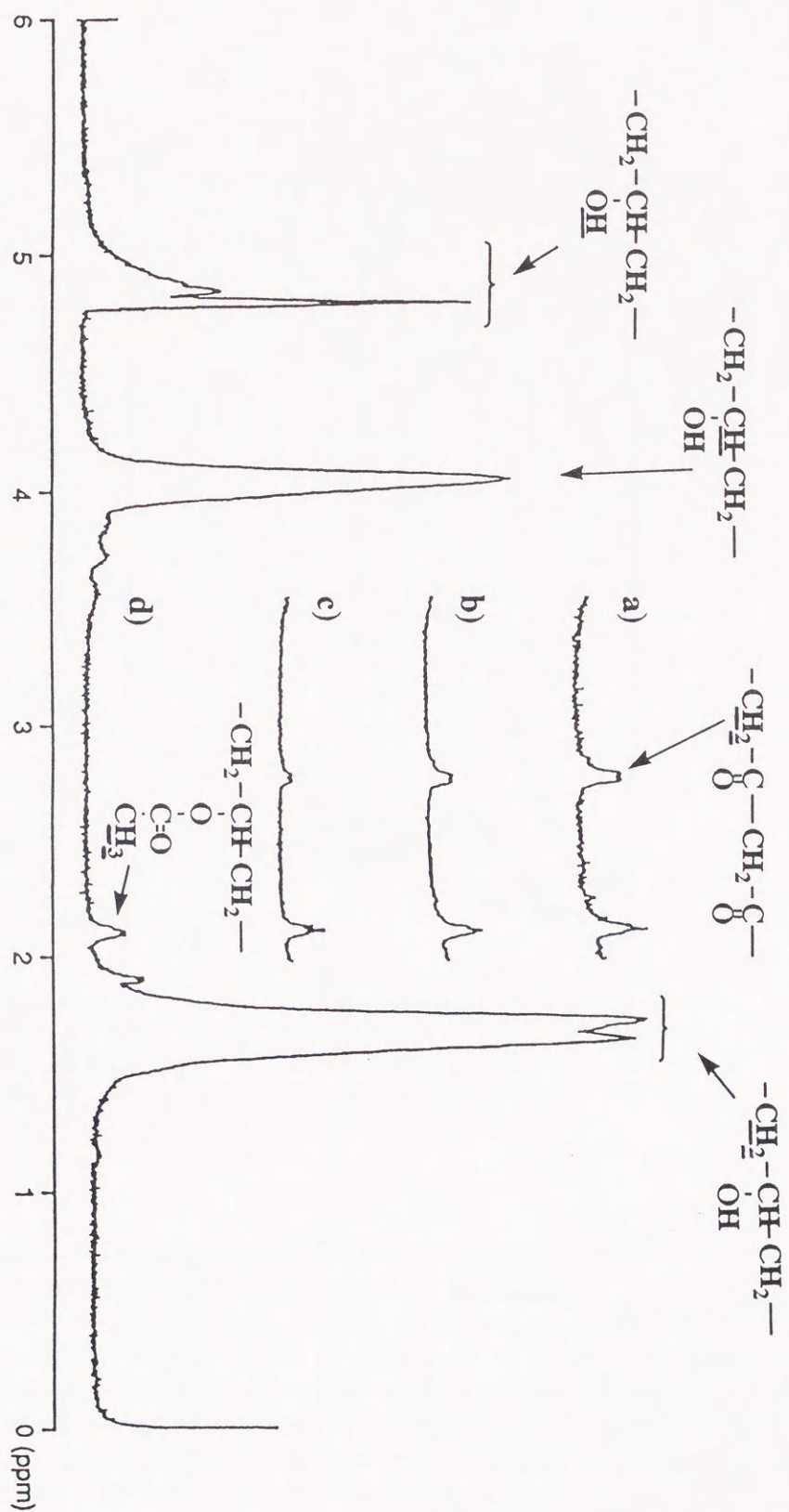


Fig. 16 ^1H -NMR Spectra of Enzymatically Oxidized PVA
 Samples were prepared with various concentrations of PVA in the
 oxidation reaction by PVADH as described in the text. All samples were
 analyzed at an concentration of PVA (10 mg/ml). The concentration of
 PVA in the enzyme oxidation reactions were : a) 3.75 mg/ml,
 b) 7.5 mg/ml, c) 15.0 mg/ml, and d) not oxidation with PVADH.
 The degree of oxidation were : a) 3.2 mol%, b) 2.2 mol%, c) 0.9 mol%,
 and d) 0.0 mol%.

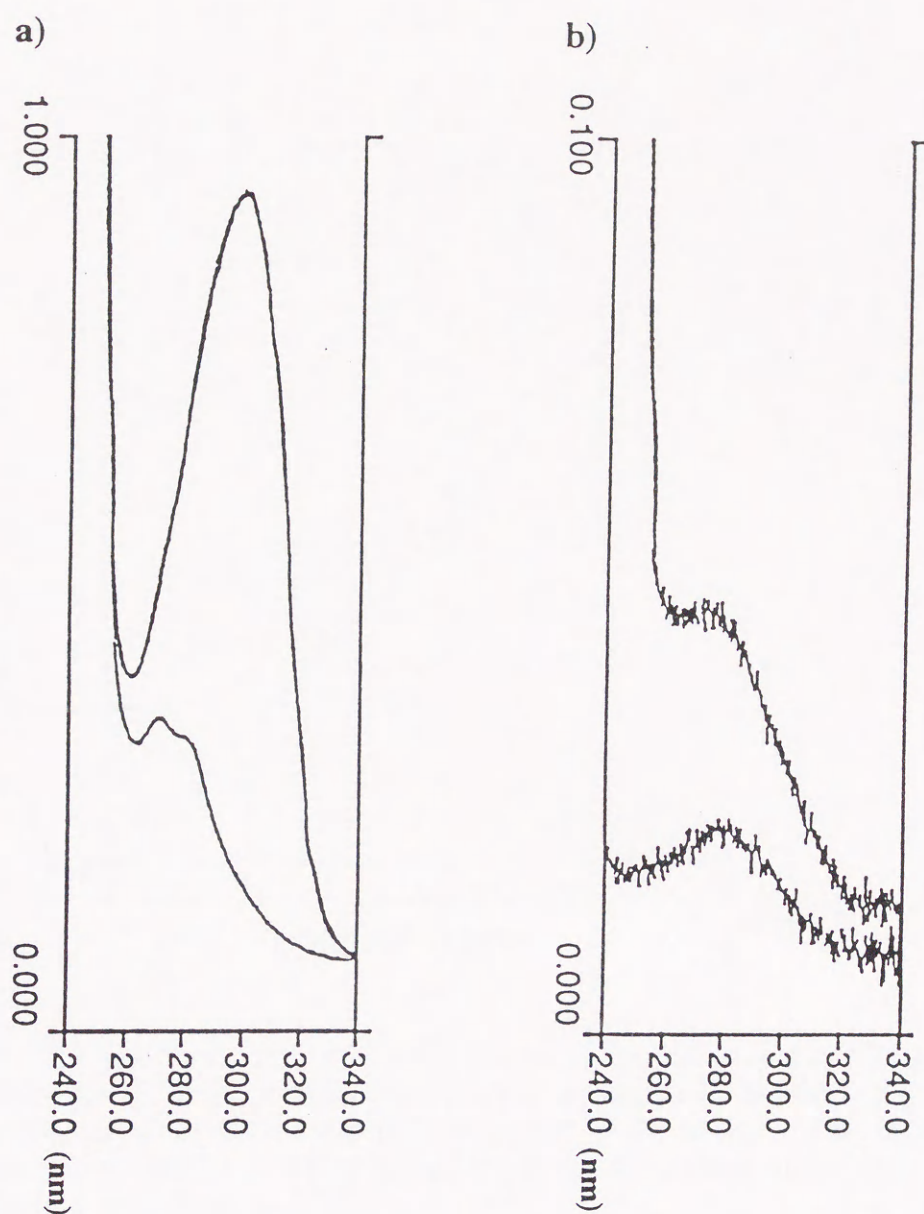


Fig. 17 UV-Spectra of Enzymatically Oxidized PVA (a) and Chemically Oxidized PVA (b) in the Alkaline Solution. Enzymatically oxidized PVA with a degree of oxidation (2 mol%) and chemically oxidized PVA with a degree of oxidation (4 mol%) were used. These samples were dissolved in the buffer at the concentration of 10 mg/ml. The upper lines showed the absorbance in the alkaline solution. The lower lines were of the controls, those were analyzed in an acetate(10mM, pH 4.0) instead of $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$.

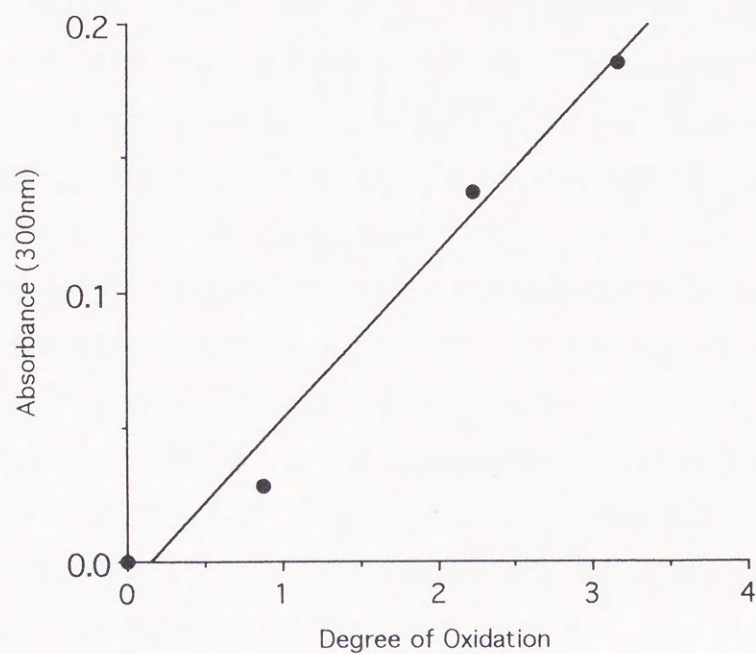


Fig. 18 The Relationship between Degree of Oxidation and the Value of Absorbance (300nm) in Alkaline Solution of Enzymatic Oxidized PVA
The degree of oxidation was determined by $^1\text{H-NMR}$ method. The value of absorbance (300nm) in alkaline solution was determined under the standard procedure.

【考察の部】

113P3株由来の PVADH は、PQQ および heme *c* を 1 分子ずつもつことから Type II alcohol dehydrogenase(ADH) の 1 種であることが初めて明らかにされた。Type II ADH には、*Comamonas Testosteroni* (ATCC15667) 由来の 1 級アルコールを基質とするものが Groen らによって報告されている³⁰⁾。この ADH と 113P3株由来の PAVDH は、分子量、吸収スペクトル、PQQ 依存性、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の要求性の全てが一致し、アルコール類に対する基質特異性のみが異なっていた。Groen らの ADH については、PVA との反応性が未検討であるので比較できないが、ADH と 113P3株由来 PVADH との各種性状の類似性と、PVADH は、PVA に対して非常に特異的であることから、多くのグラム陰性細菌に存在していると言われるペリプラズミック酸化系の PQQ 依存性 ADH が、排水処理場の活性汚泥中で PVA を大量に含む特殊環境下で何らかの変異を受け、PVA に対して非常に特異的に作用するようになっていった可能性が示唆される。

低分子のヒドロキシ化合物に対する基質特異性に関しては、酒井らの secondary alcohol oxidase や嶋尾らの PVA oxidase および PQQ 依存性 PVADH が 2 級アルコールを PVA 同様に良い基質とするのに対し、113P3株由来の PVADH は 1 級および 2 級アルコールを基質とせず 1,3-ジオール特異的で PVA との反応性が低分子基質と比較して非常に高い点が特徴的であり今まで報告されてきた PVA を酸化する酵素と大きく異なることが判明した。

PVA 関連高分子に対する基質特異性に関しては、ケン化度およびエチレン含有 PVA に対する結果から、ポリマーの疎水性が PVADH との反応性に大きく影響を与えることが判明した。すなわち acetyl基および ethylene基が増加することによりポリマーの疎水性が増加すると、 K_m が減少し $V_{\max}/K_m$ は増大した。acetyl基よりも ethylene基の方が反応性の向上により寄与している原因としては ethylene基 がポリマーの主鎖に入るのに対して、ethylene基と比較してより大きな acetyl基は主鎖からペンダント状に突出し酵素の近接を妨げる可能性が考えられる。このエチレン共重合 PVA の微生物による生分解性については今後の研究課題である。

重合度の影響に関しては、PVADH は PVA の重合度の影響を受けることが明らかとなった。この点に関しては、同じく PQQ 依存性である PEGDH に関して河合らの報告が PEG についてなされており、PEG が重合度 300-400 付近で K_m が最小となることが報告されている²⁰⁾。

タクティシティーに関しては、2,4-pentanediol の 3 種のアイソマーとの反応性およ

びタクティシティーの異なる PVA 関連高分子を用いた基質特異性の実験結果から、アイソタクティック PVA の易生分解性が判明した。この点については、松村らの報告によると、河川より単離した *Alcaligenes faecalis* KK314株を用いた培養実験により、PVA のアイソタクティックな部分から生分解されることが判明している^{1,2)}。また、*Alcaligenes faecalis* KK314株の Cell-free Extract 中にも PES, DCPIP を電子受容体とした PVADH 活性が存在し、その基質特異性は、113P3株由来の PVADH と同様であり、2,4-pentanediol の 3種のアイソマーのうち、アイソタクティックシークエン스에相当する *meso isomer* のみが基質となることと、*Alcaligenes faecalis* KK314株同様に *Pseudomonas* sp. 113P3株を用いた培養実験においても、アイソタクティック PVA の易生分解性が立証されている^{3,1)}。このアイソタクティック PVA のもつ易生分解性は、独立した場所で単離された2種の菌株の PVADH の基質特異性の類似性から、酵素による酸化のされ易さが寄与していると思われる。シンジオタクティック PVA (S261) の V_{max} がアタクティック PVA と比較して非常に低い値となっているのは、このポリマーの水溶性 (2.0w/v% 以下) と他のもの (7.5w/v% 以上) と比べて低く、ポリマー鎖の間が水素結合によって凝集しやすい性質をもつためであると思われる。

1,2-glycol 結合量の及ぼす影響は、1,2-glycol 結合量が増大する従って PVADH との反応性が低下することが明らかとなったが、3種の cyclohexanediol のアイソマーとの反応性から 1,2-ジオールは基質にならないことから水酸基の位置が PVADH との反応性に影響を与えることが判明した。以上の結果から、PVADH は PVA 生分解機構の Key enzyme であることが示唆される。

最後に PVADH による酸化 PVA は、 β -ジケトン構造をもつことが判明した^{3,2)}。これは PQQ 依存性 PVA 分解菌の PVA 分解機構が、酒井らにより単離された *Pseudomonas vesicularis* PD株由来の secondary alcohol oxidase により β -ジケトン構造をもつ PVA が生成するというスキームと同様であり、PVA 酸化酵素による β -ジケトン PVA の生成は、微生物による一般的な PVA 分解機構であることを示唆している。PVADH と secondary alcohol oxidase との違いは、PQQ の依存性は勿論であるが、PVADH は 1,3-ジオール特異的で一度に β -ジケトンを生成すると思われるのに対して、secondary alcohol oxidase は、モノケトンが作られた後更にモノケトンに隣接した水酸基が酸化されて β -ジケトンが出来るという点である⁵⁾。今後の課題としてその存在が推測される 113P3株由来の β -diketone hydrolase の解明が期待される。

第4章 PVADH 遺伝子のクローニング

【序論】

第3章で明らかになったように、PVADH は PQQ 依存性の Type II ADH の1種であることが判明した。この Type II ADH に属するのは *Comamonas Testosteroni* (ATCC 15667) 由来の ADH が知られているのみであるが、その遺伝子配列は現在のところ明らかとはしていない。両者は、基質特異性以外の性状がほぼ一致しており、その違いは酵素の1次配列のわずかな違いに起因している可能性がある。また、嶋尾らの VM15C株由来 PQQ 依存性 PVADH は、どのタイプに属するかは明らかではないが、この酵素と 113P3株由来の PVADH との比較においても、基質特異性の差が異なる点であり、1次配列の比較検討は興味のもたれる課題である。島尾らは VM15C株由来の PVADH の遺伝子配列を発表した。それによると、PVADH の構造遺伝子として分子量 68,045 のタンパクをコードした遺伝子配列を決定し、その配列中にはシグナル配列、ヘムの結合モチーフおよび PQQ の結合配列が存在するとのことである³³⁾。このことから、おそらく VM15C株由来の PVADH も

Type II ADH に属すると思われ、分子量的にも似通った 113P3株の PVADH 遺伝子との比較が待たれることとなった。そこでこの章では、PVADH のN末端アミノ酸配列およびプロテアーゼ消化した PVADH 断片のN末端アミノ酸配列を決定した後、その配列を基に DNA プローブを設計し PVADH 遺伝子のクローニングを検討する。

【実験の部】

1. 試薬および機器

試薬等は、第2, 3章と同様のものを使用した。制限酵素および DNA 修飾酵素は、マニュアル記載の方法に従って使用した。

N-末端アミノ酸配列決定は、(株) アプライド・バイオシステムズ社製のエドマン反応を用いた気相法によるプロテイン・シーケンサー (473A) を用いた。

塩基配列の決定は、(株) アプライド・バイオシステムズ社製の DNA シーケンサー (373A) を用い、同社の DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit のプロトコールに従って行った。

2. PVADH のN末端アミノ酸配列分析用サンプルの調製

最終調製 PVADH を、逆相カラム (Capcell Pak C18 [(株) 資生堂社製]) にかき、0.1% トリフル酢酸/蒸留水 ~ 0.1% トリフル酢酸/アセトリル の直線濃度勾配により流速 (1 ml/min) にて溶出し、測定波長 (280 nm) で検出を行いながら 1 ml/チューブ のサイズで分画した。PVADH を含む画分を濃縮し、Pro-Spin™ ([株] アプライド・バイオシステムズ社製) により PVDF 膜にブロットし、N末端アミノ酸配列分析用サンプルとした。

3. PVADH のプロテアーゼ消化断片の調製

最終調製 PVADH を 約 200 μ g を V8 Proteinase ([株] 和光純薬製, *Staphylococcus aureus* V8 由来) 0.02 unit とともに 2 mM EDTA, 100 mM (NH₄)HCO₃ (pH 7.8) の溶液に溶かし、37°C, 5時間インキュベートした。反応液を、18% SDS-PAGE にかき、PVDF 膜にエレクトロブロッティングし、クマシーブリリアントブルー R250 により染色した後、約 14kD の分子量を示すバンドを切り取り、N末端アミノ酸配列分析用サンプルとした。

4. 使用菌株およびプラスミド

Table 11-12. に使用菌株およびプラスミドを記載した。

Table 11. 使用菌株

Strain	Phenotype or genotype	Source or Reference
<i>Pseudomonas</i> sp. 113P3	wild	T. Hatanaka ^{34, 35)}
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>supE, hsdS(r_B⁻ m_B⁻), recA, ara, proA, lscY, galK, rpsL, xyl, mtl</i>	H. W. Boyer ³⁶⁾
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA, endA, gyrA, thi, hasR, supE, relA, Δ (lac-proAB) /F'[traD proAB+ lacIq lacZM15]</i>	C. Yanisch-Perron ³⁷⁾

Table 12. ベクタープラスミド

Plasmid	Size, anti-biotic resistance	Rep-origin, function	Source or Reference
pHC79	6.52kb, Ap ^r , Tc ^r	pBR322- <i>ori</i> , <i>cos</i> +	Hojin, B ³⁸⁾
pUC118/119	3.16kb, Ap ^r	pUC- <i>ori</i> , M13-IG, <i>lacZ</i>	J. Vieira ³⁹⁾
pHG397	2.23kb, Cm ^r	pUC- <i>ori</i> , M13-IG, <i>lacZ</i>	
pSTV29	2.99kb, Cm ^r	pUC- <i>ori</i> , M13-IG, <i>lacZ</i>	

5. DNA の単離・精製

大腸菌からのプラスミド DNA の単離法は、アルカリ SDS 法⁴⁰⁾、Hansen and Olsen 改良法⁴¹⁾ によった。分離したプラスミド DNA は、塩化セシウム-エチジウムブロマイド密度勾配遠心法 (60,000 rpm, 4時間) により精製した。

Pseudomonas sp. 113P3 の染色体 DNA の単離は、1.0w/v% PVA を含む培地で 30℃, 4 日間培養後、Marmur法⁴²⁾ に従った。

6. DNA の解析

DNA の電気泳動による解析は、TBE[10mM Boric acid, 2mM EDTA, 100mM Tris-HCl(pH 8.0)] を用い、0.1-0.3% 濃度のアガロースゲルで泳動した。その後、0.002% エチジウムブロマイドにより染色し、UV 照射下で DNA を解析した。

7. DNA の回収

アガロースゲルからの回収は、Prep-A-GeneTM DNA Purification Kit(Bio-Rad) または DNA 回収用フィルター付き遠心チューブ (SUPRECTM-01, (株) 宝酒造) を用いた。10 数kb の大きな DNA の回収は UEA 法 (International Biotechnologies, Inc.) を用いた。

蔗糖密度勾配遠心法による DNA 断片の回収は、10-40% の密度勾配で超遠心 (25,000 rpm, 24 時間) し、各画分より目的とするサイズの DNA 断片を得た。

8. 遺伝子ライブラリーの作製

in vitro packaging によるジーンライブラリーの作製には、 λ -DNA *in vitro* packaging Kit (Amersham International) を用いて行った。大腸菌への形質転換は、ルビジウム法^{4,3)} および塩化カルシウム法により行った。大腸菌への形質導入は、 λ -DNA *in vitro* packaging Kit のプロトコールに従った。

9. DNA のドットブロット法

検体 DNA を変性溶液 (0.4M NaOH, 10mM EDTA) 20 μ l に溶解し、100°C, 10分間加熱処理した後、等量の氷冷した 2M 酢酸ナトリウム (pH 7.0) を添加した。6 $\times$ SSC で膨張させたメンブランフィルター (バイオダイン B, (株) PALL社製) をドットブロッター (BIO-DOT APPARATUS, (株) Bio-Rad社製) にセットし、サンプル穴に TE Buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 500 μ l を入れ、減圧下調製した検体 DNA (50-500 μ l, DNA 濃度: 0.1-0.25 μ g/ μ l) と 0.4M NaOH 500 μ l を添加し、ブロッティングした。その後フィルターを 2 $\times$ SSC で洗浄し、80°C, 1時間焼き付けを行った。

1 $\times$ SSC : 150mM NaCl, 15mM Sodium Citrate (pH 7.0)

10. サザンブロット法

DNA を泳動したアガロースゲルを 0.25M HCl 溶液に 30分、1.5M NaCl, 0.5M NaOH 溶液に約 1 時間浸して DNA を変性させ、0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl (pH 7.5) 溶液に 30 分浸して中和した。これを VACUBLOT (American Bionetics) を用いてメンブランフィルター (バイオダイン B, (株) PALL社製) へブロッティングした。その後フィルターを 2 $\times$ SSC で洗浄し、80°C, 1時間焼き付けを行った。

11. DNA プローブ

本研究で用いたビオチン化合物オリゴヌクレオチドプローブは、(株) サワディテクノロジーに作製を依頼した。

12. ハイブリダイゼーション

DNA を固定した膜をハイブリパックに移し、プレハイブリダイゼーション溶液 (0.6M NaCl, 90mM Sodium Citrate, 0.1% ficoll, 0.1% polyvinyl pyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 0.5% SDS, pH 7.2) と 100°C, 5分間加熱変性させた サケ精子 DNA を終濃度 (100mg/ml) になるよう添加し、68°C, 1 時間プレハイブリダイゼーション

ンを行った。

ハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液に 100℃, 5 分間加熱変性させたビオチン化プローブを 1-5 ng 混合し 68℃, 16 時間以上行った。その後膜を、2×SSC, 0.1% SDS で洗浄 (5分間, 2回) 次いで、0.1×SSC, 0.1% SDS で洗浄 (15分間, 2回, 68℃) した。

検出は、ストレプトアビジン結合アルカリファスファターゼにより、PPD [3-(2'Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryxy)-phenyl-1,2-dioxetane] 試薬を基質した化学発光による方法を用い、PlexTM Luminescent Kit (NEB社製) のプロトコールに従った。X線フィルム (フジ写真工業, Fuji Medical X-RAY Film RX) 上で DNA を検出し、露光は約 1 時間行った。

1 3. 塩基配列決定用欠失組み換え体の作製

塩基配列決定のための各種欠失組み換え体の作製には、キロシーケンス用ディレイションキット [(株) 宝酒造製] を用いた。

1 4. データベース

DNA およびアミノ酸配列の相同性検索には CD-ROM データベース (GenBank R74.0, EMBLE R33.0, NBRF-PIR R35.0, SWISS-PROT R24.0) を用いた。

【結果の部】

1. PVADH の N 末端およびプロテアーゼ消化断片の N 末端アミノ酸配列

PAVDH および V8プロテアーゼ消化断片から得た N 末端アミノ酸配列と、その配列から当該する遺伝子の塩基配列を推定し、その一部の塩基配列を引用したビオチン化合物オリゴヌクレオチドをプローブとして設計した (Table 13.)。

Table 13. N 末端アミノ酸配列およびビオチン化合物オリゴヌクレオチドプローブ

PVADH N 末端アミノ酸配列	APQXGHAVPADQLD
プローブ 1	Biotin-GCG GT(TCAG) CC(CG) GC((TCAG) GA(TC) CA

V8プロテアーゼ消化断片 N 末端アミノ酸配列	FGPAADDGKVYAGV
プローブ 2	Biotin-GAC GAC GGC AAG GT(GC) TA

アミノ酸略記号は、A:Ala, D:Asp, C:Cys, Q:Gln, G:Gly, H:His, L:Leu, K:Lys, F:Phe, P:Pro, Y:Tyr, V:Val, N:Nnn を示し、アンダーラインはプローブに用いたアミノ酸領域を示す。

2 種のビオチン化合物オリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズする DNA 領域を *Pseudomonas* sp. 113P3 株染色体 DNA を各種制限酵素で切断後、アガロース電気泳動にかけ、サザンブロットハイブリダイゼーションした。その結果、前記に示した条件下で、プローブ 1 またはプローブ 2 とハイブリダイズする DNA 断片が多数確認された。プローブ 2 を用いた場合に、比較的シグナルの少ない *EcoRI* 消化で約 1kbp 断片の強いシグナルバンドが確認された (Fig. 19)。この断片に PVADH 遺伝子の一部がコードされていると考え *EcoRI-EcoRI* 1kbp 領域を含む DNA 断片のクローニングを試みた。

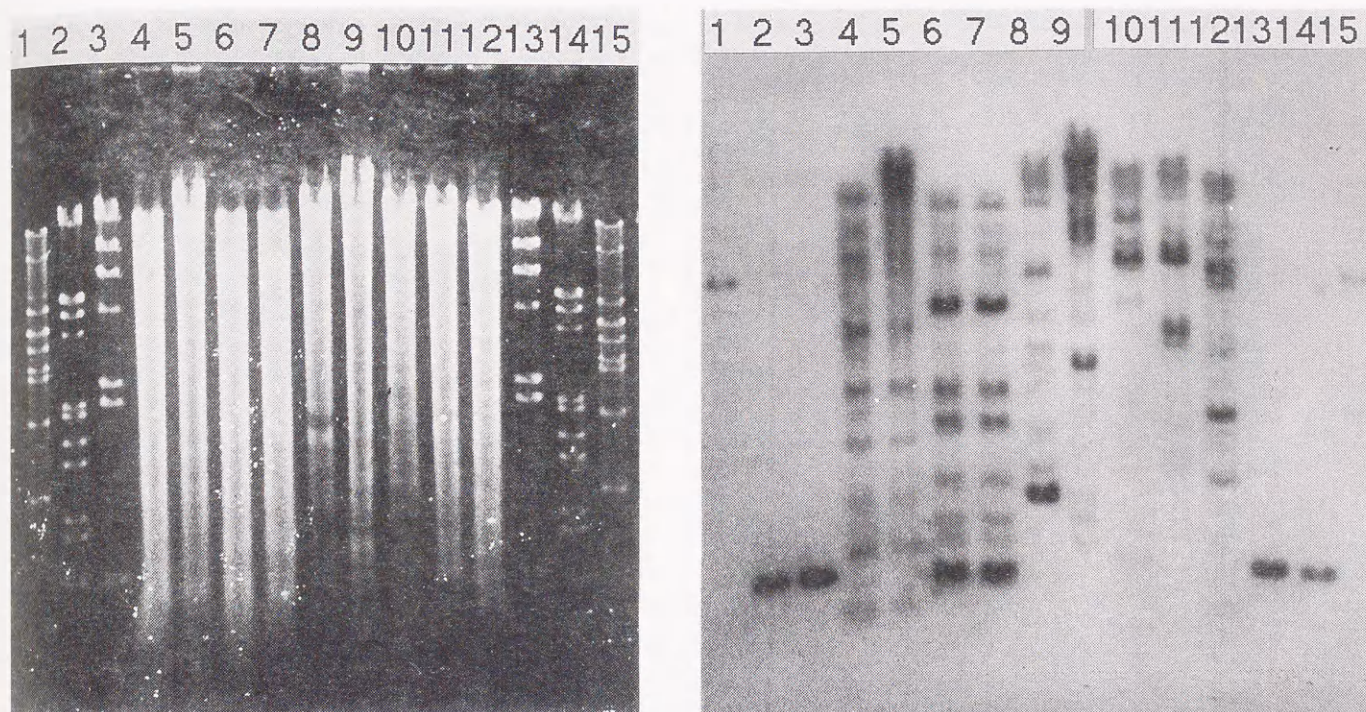


Fig. 19 The Agarose Gel Electrophoresis and the Southern Blotting of the Genomic DNA from *Pseudomonas* sp. 113P3 Probe 2 was used for southern blotting analysis.

Lane 1: λ -*EcoRI/BamHI* marker, 2: λ -*EcoRI/Hind* III marker, 3: λ -*Hind* III marker, 4: *SalI*, 5: *SalI*, 6: *XhoI*, 7: *XhoI*, 8: *EcoRI*, 9: *BamHI*, 10: *Hind* III, 11: *PstI*, 12: *SmaI*, 13: λ -*Hind* III marker, 14: λ -*EcoRI/Hind* III marker, 15: λ -*EcoRI/BamHI* marker

2. PVADH 遺伝子クローニングのストラテジー

プローブ 2 が強くハイブリダイズした *Pseudomonas* sp. 113P3 株染色体 DNA 上の *EcoRI*-*EcoRI* 1kbp 断片をクローニングするために、ジーンライブラリーの作製を行った。染色体 DNA を各種制限酵素で消化し、比較的良好に切断される制限酵素をアガロースゲル電気泳動により解析し、その結果 *Xho I* を選択した。そこで、PVADH 遺伝子クローニングのストラテジーを立てた。概略を Fig. 20 に示す。

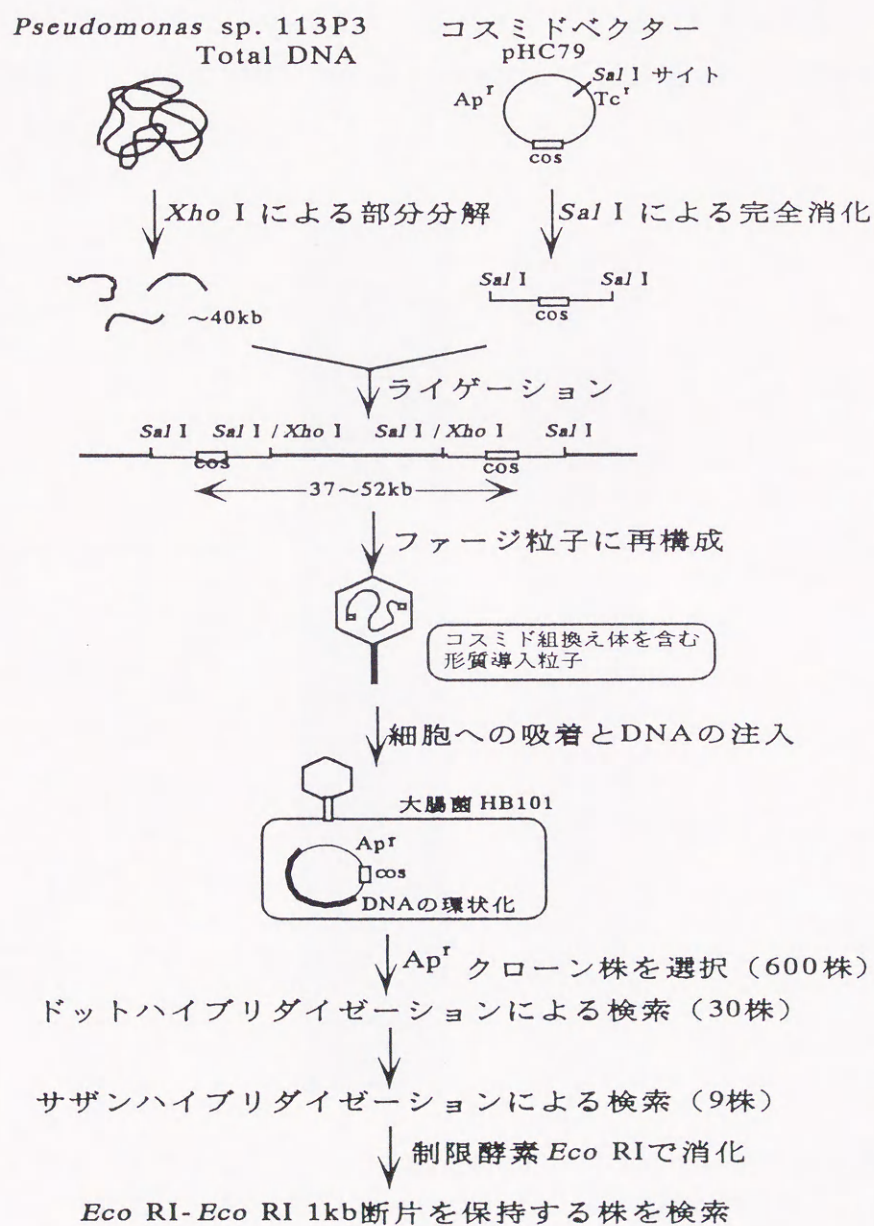


Fig. 20 The Cloning Strategy of PVADH Gene

Pseudomonas sp. 113P3株染色体 DNA の *Xho* I 部分消化断片を調製し、コスミドベクター pHC79 のテトラサイクリン耐性遺伝子領域内の *Sal* I サイトへ連結した。これを *in vitro* packaging により DNA を大腸菌 HB101 へ形質導入し、ジーンライブラリーを作製した。このライブラリーから組み換え DNA を単離精製し、ドットブロットハオブリダイゼーションによりプローブ 2 とハイブリダイズするクローンを選択した。陽性クローンについて、さらにプローブ 1 およびプローブ 2 とともにハイブリダイズするクローンを 9 株選択した。これらを *Eco*RI で完全消化しサザンブロットハイブリダイゼーションを行い、プローブ 2 と強くハイブリダイズする *Eco*RI-*Eco*RI 1kbp 断片を含むクローンを検索した。その結果、600 株の中から、*Eco*RI-*Eco*RI 1kbp 断片をもつクローン pMA23 を得た (Fig. 21)。

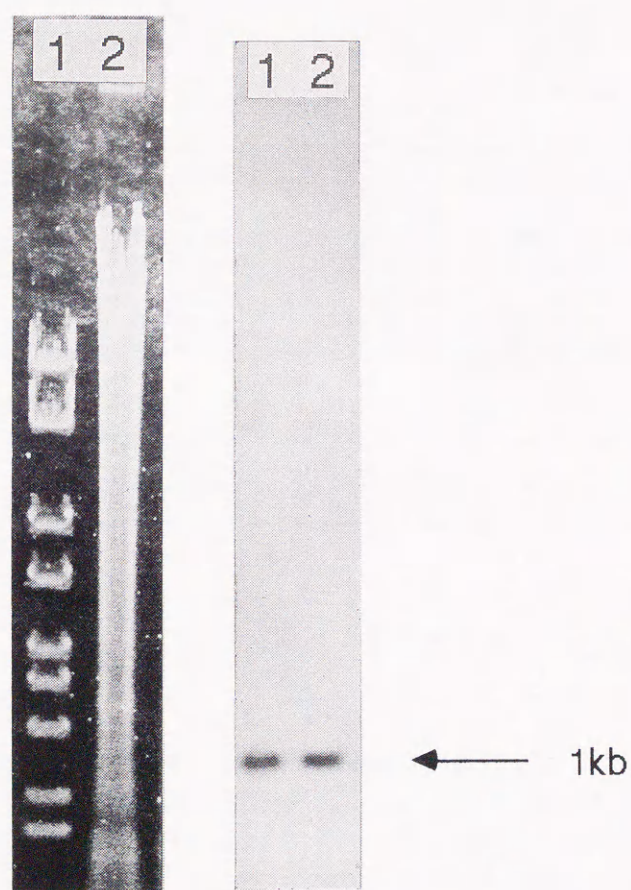


Fig. 21 The Agarose Gel Electrophoresis and the Southern Blotting of the Genomic DNA from *Pseudomonas* sp. 113P3 and pMA23
The genomic DNA from *Pseudomonas* sp. 113P3 and pMA23 were completely digested by *Eco*RI. Probe 2 was used for southern blotting analysis.
Lane 1:pMA23, 2:*Pseudomonas* sp. 113P3 genomic DNA, 3:pMA23, 4:*Pseudomonas* sp. 113P3 genomic DNA,

3. pMA23 の *EcoRI*-*EcoRI* 1kbp 断片の塩基配列決定

pMA23 の *EcoRI*-*EcoRI* 1kbp 断片の塩基配列決定のために、*EcoRI*-*EcoRI* 1kbp 断片を pSTV29 にサブクローニングし、組み換えプラスミド pSTM21 を作製した。さらにディレーションミュータントの作製を行い、塩基配列を決定した (Fig. 22)。得られた配列中にプローブ 2 の塩基配列が見い出された。また、塩基配列より類推されるアミノ酸配列から V8 プロテアーゼ消化断片の N 末端アミノ酸配列の一部が確認された。さらに 5' 側の *EcoRI* の 486 塩基下流にはストップコドンが確認された。これらより、*EcoRI*-*EcoRI* 1kbp 断片のさらに上流に開始コドンが存在することが示唆された。

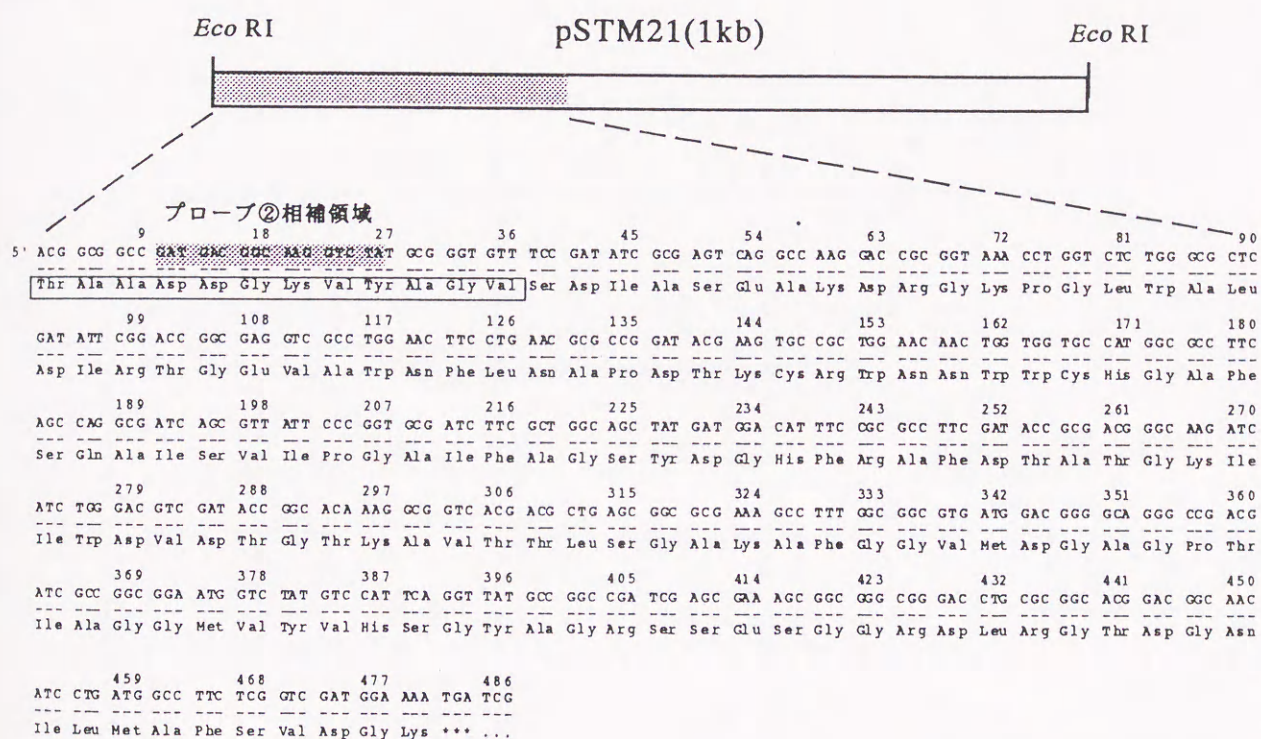


Fig. 22 The Sequence of *EcoRI*-*EcoRI* 1kbp Fragment from pMA23

The DNA sequence of probe 2 was identified in *EcoRI*-*EcoRI* 1kbp Fragment from pMA23. The N-terminal amino acid sequence was also determined in the deduced amino acid sequence from the DNA sequence of *EcoRI*-*EcoRI* 1kbp Fragment.

Symbols : GAT GAC ..., the complement sequence of probe 2 ; □, The N-terminal amino acid sequence of PVADH ; ***, stop codon

4. pMA23 の制限酵素地図作製

EcoRI–*EcoRI* 1kb 断片からさらに上流域の遺伝子配列を解析するために pMA23 の制限酵素地図を作製した (Fig. 23)。pMA23 の *EcoRI*–*EcoRI* 1kbp 断片の隣接領域を含む *Pst I*–*Pst I* 4kbp 断片を pSTV29 にサブクローニングし、組み換えプラスミド pSTM2 を作製した。組み換えプラスミド pSTM2 の塩基配列を決定するため、さらにサブクローンおよびディレーションミュータントの作製を行い、塩基配列を決定した (Fig. 22)。塩基配列の決定を行った領域を示す (Fig. 23)

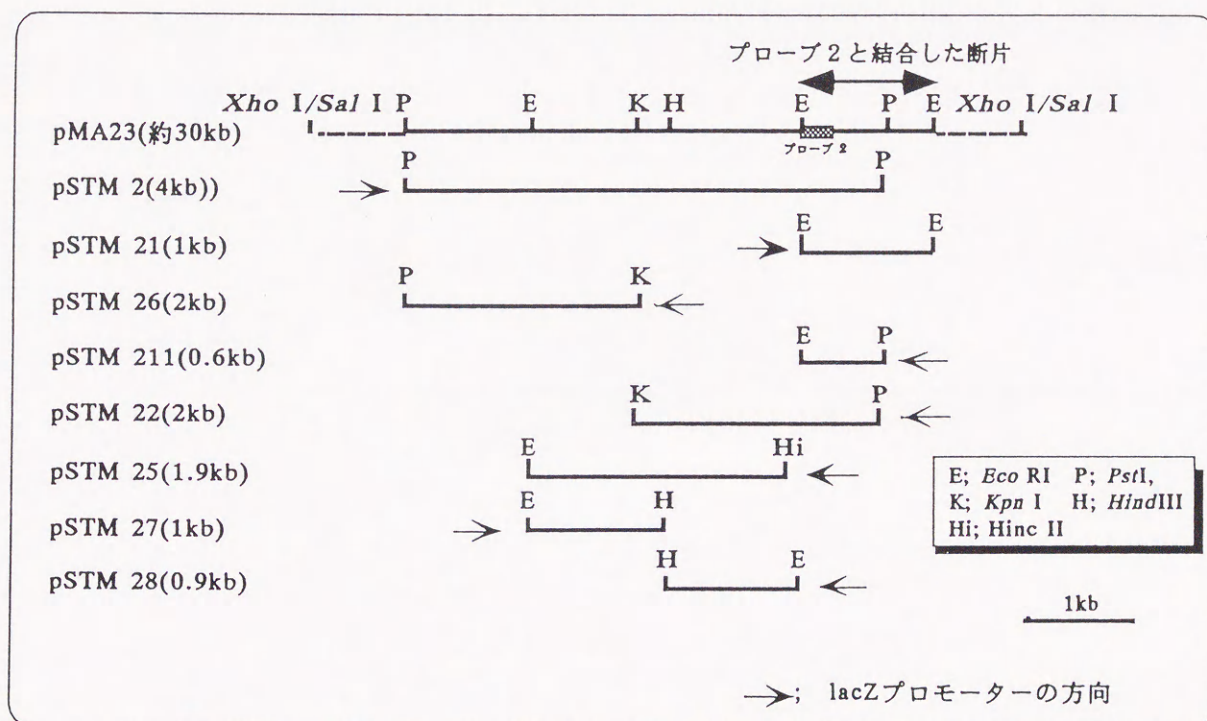


Fig. 23 The Restriction Fragment Map of pMA23

5. PVADH の遺伝子配列および推定アミノ酸配列

得られた塩基配列および推定アミノ酸配列を示す (Fig. 24)。決定された 2,837bp にリボソーム結合配列をもった構造遺伝子が見い出された。この ORF には開始コドンとして考えられるメチオニンが2つ存在していた。

この ORF にはプローブ 1 およびプローブ 2 の塩基配列が確認され、さらに塩基配列より類推されるアミノ酸配列からは PVADH および V8 プロテアーゼ消化断片の N 末端アミノ酸配列が見い出された。また、この ORF 内には PVADH に特徴的なヘムの結合モチーフ⁴³⁾と推定されるアミノ酸配列が存在していることが明らかとなった。

この塩基配列は、DDBJ, EMBL, GenBank nucleotide sequence data base のアクセッションナンバー D83772 で登録済みである。

また、ORF の終始コドンから 138 塩基下流に新たなリボソーム結合配列をもつ不完全な ORF の存在が見られた。

5'	CTG GGC CGG TGG AAT GCC GAT CTC GGG CGA ATG GTA TTC GAC GAA GGA CGA TGG	54
	AAG CAC CGT CCC CTT CCA GGA AAC GCG CAA GAT GGT GGC GGC CGC GCG GCA AGA	108
	TCT GGC AGG GCC GCG TCG GCC TAT CCC TTG CCG TCG AAG CTA GAC CCG ATG GTC	162
	GTG ATC ACT GTG TGG GGA GGC GAA AAG GAC TTG TGG GAC TGC GGG CCT CCG CTC	216
	GGT CTT TGC TCG GAC TAT CGC CCC ACC ACG CAG GCC AGT TCC AAC TAT TTC AGC	270
	TCG ATC TCC AAC GTC GTC CAT GTC GCG TGC AGC GCT ATC TGC ACG GAC ATA TGT	324
	GGC CGC AGT CAA TAC CGA CGC CTT CAA TCT CTG GGC TTT GAA CAC GAT GGC GTC	378
	GCA TCC CAA GGG CAG CTC GCC CAA GGA TTT CAA ACT CAC CGC CCC GCC GGA <u>AGG</u>	432
	<u>TTA TTC GTG CAA AAT CGG ACG ATT TAC GGA TCA TTA CAA ATG AGC AAG CTC ACA</u>	486
	<u>Met</u>	
	<u>GAA GCG ATG AGC CGG ATC ATG GGC TCC CAT GCT TGG GGC GGG GCT GTT TTT TCG</u>	540
	RBS <u>Met</u> Ser Arg Ile Met Gly Ser His Ala Trp Gly Gly Ala Val Phe Ser	
	GCA GCG ACA CTG ATC GCT TTC GGG TCG GTC GTA CAT GCA TCC GGC ACC GTG GCC	594
	Ala Ala Thr Leu Ile Ala Phe Gly Ser Val Val His Ala Ser Gly Thr Val Ala	
	GAA ACG GCG CCC CAA TCC GGG CAT GCT GTC CCG GCA GAC CAG CTC GAT GGC GAG	648
	Glu Thr <u>Ala Pro Gln Ser Gly His Ala Val Pro Ala Asp Gln Leu Asp</u> Gly Glu	
	PVAデヒドロゲナーゼN末端アミノ酸配列	
	ACC CTG TAC AAG GCG CGC TGT GCC GCC TGC CAC GAC AAT GCG GAA GGG CGT ACA	702
	Thr Leu Tyr Lys Ala Arg <u>Cys Ala Ala Cys His</u> Asp Asn Ala Glu Gly Arg Thr	
	ヘム結合部位	
	CCG AGC CGG GAG GTG CTT TCG AAG AAC CCG GCC AGT TTC ATC CTG CGC AAG CAT	756
	Pro Ser Arg Glu Val Leu Ser Lys Asn Pro Ala Ser Phe Ile Leu Arg Lys His	
	GCG AAC GGG CGC GAT GGT ACC GAT GCC GAA GGC CTG ACG CTC GAG GAA ATG ACC	810
	Ala Asn Gly Arg Asp Gly Thr Asp Ala Glu Gly Leu Thr Leu Glu Glu Met Thr	
	GCG ATC GCG CGT GCG GTC GGG AAG GCA GAC GCA AAA ACC GAC GAC GGC ATC GAC	864
	Ala Ile Ala Arg Ala Val Gly Lys Ala Asp Ala Lys Thr Asp Asp Gly Ile Asp	
	TTG CGC CGG ATC TGG GGC AAC AGC GTC GAA GGG ACG CCG CTT GAT GCA CCA CAA	918
	Leu Arg Arg Ile Trp Gly Asn Ser Val Glu Gly Thr Pro Leu Asp Ala Pro Gln	
	TGT TCT TCG GCG CCA ACG CCC GTC GAT CTC GGC GCG GCC AAC CAG TGG AAC GGC	972
	Cys Ser Ser Ala Pro Thr Pro Val Asp Leu Gly Ala Ala Asn Gln Trp Asn Gly	
	TGG AGC ACC GAA AAG GAT AAC GGC CGT TTC CAG CGC AAG CCC GCA CTG GAC GTC	1026
	Trp Ser Thr Glu Lys Asp Asn Gly Arg Phe Gln Arg Lys Pro Ala Leu Asp Val	
	GCC GAC ATA CCG AAG CTT AAA CTG AAA TGG GCA TTC CAG TAT CCC GGC TCG AAG	1080
	Ala Asp Ile Pro Lys Leu Lys Leu Lys Trp Ala Phe Gln Tyr Pro Gly Ser Lys	
	AAC GGG CAG GCG ACG GTC ATC GGC GAC AGG CTG TTC ACG ACC AGC ACG TCG GGC	1134
	Asn Gly Gln Ala Thr Val Ile Gly Asp Arg Leu Phe Thr Thr Ser Thr Ser Gly	
	GCG GTT TAT GCT CTC AAC GCC AAA ACC GGC TGC GTT TAT TGG CGG CAC CGC CGA	1188
	Ala Val Tyr Ala Leu Asn Ala Lys Thr Gly Cys Val Tyr Trp Arg His Arg Arg	

Fig. 24 The Sequence of PVADH

AGC GAA GCG CGC ACC AGC CCC GTC ATC GCG GCC CTG CCC GAA GCG CGC CAC AAG 1242
Ser Glu Ala Arg Thr Ser Pro Val Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Arg His Lys

ACC GCG CTC TTC TTC TCG GAC TTT ACC AAG GCG GCT GTC GCA CTT GAT GCC GAA 1296
Thr Ala Leu Phe Phe Ser Asp Phe Thr Lys Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Glu

ACC GGC AAG CAG CTC TGG AAG ACG GTG GTC GAC GAC CAG CCG GCG TTG CAG ATG 1350
Thr Gly Lys Gln Leu Trp Lys Thr Val Val Asp Asp Gln Pro Ala Leu Gln Met

ACC GGT TCG ATT ACA TAT TGG GAC GGT AAG ATC TAT GTG CCG ATC TCG TCG GGC 1404
Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Trp Asp Gly Lys Ile Tyr Val Pro Ile Ser Ser Gly

ACC GAG GCA TTT GCG CAA ATC CCG ACA TGG GAA TGC TGC AAG TTC CGG GGC GCG 1458
Thr Glu Ala Phe Ala Gln Ile Pro Thr Trp Glu Cys Cys Lys Phe Arg Gly Ala

CTT GTG GCG CTC GAT GCT GCG ACG GGC AAA ATC CTC TGG AAG CGC TAC ACA ACC 1512
Leu Val Ala Leu Asp Ala Ala Thr Gly Lys Ile Leu Trp Lys Arg Tyr Thr Thr

GAA CAG GAA CCG AGG CCG TTC AAG CTC AAC AAG GCC GGC CGG CAA ATG TGG GGA 1566
Glu Gln Glu Pro Arg Pro Phe Lys Leu Asn Lys Ala Gly Arg Gln Met Trp Gly

CCT TCG GGC GGC GCG ATC TGG GTA ACG CCG ACG GTC GAT GAG GCG CGC CGC CTC 1620
Pro Ser Gly Gly Ala Ile Trp Val Thr Pro Thr Val Asp Glu Ala Arg Arg Leu

ATC TAT GTG GGA ACG TCG AAC AGC TAT ACC GAT GTT CCC TAC GAC AAT TCT GAC 1674
Ile Tyr Val Gly Thr Ser Asn Ser Tyr Thr Asp Val Pro Tyr Asp Asn Ser Asp

TCG GTG ATG GCC ATC GAT GCC GAC ACC GGC GCC GTT CGC TGG ACC GTG CAA CTG 1728
Ser Val Met Ala Ile Asp Ala Asp Thr Gly Ala Val Arg Trp Thr Val Gln Leu

CTC GCC GAC GAC AAT TAT ATC GAC GGC TGC TGG CAG AAG GGG AAG GAG CAT GCG 1782
Leu Ala Asp Asp Asn Tyr Ile Asp Gly Cys Trp Gln Lys Gly Lys Glu His Ala

AAC TGC CCC AAC CCG CTT GGC CCC GAC TTC TCG ATC GGC CGT GCG CCG TAT TTA 1836
Asn Cys Pro Asn Pro Leu Gly Pro Asp Phe Ser Ile Gly Arg Ala Pro Tyr Leu

CAG GAA GAT GGC GGA CGG AAA GGA GTT TCT CCT TGT CGG GCA GAA ATC GGG CAT 1890
Gln Glu Asp Gly Gly Arg Lys Gly Val Ser Pro Cys Arg Ala Glu Ile Gly His

GAT CTA CGC GCT CGA TTC CGG CCA ACA AGG GCG CGA AGA TTC TGG GAG CGG CAG 1944
Asp Leu Arg Ala Arg Phe Arg Pro Thr Arg Ala Arg Arg Phe Trp Glu Arg Gln

CTG AGC CTT GGT AGC GCG CTT GGC GGC ATG GAA TTC GGT ACG GCG GCC GAT GAC 1988
Leu Ser Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Met Glu Phe Gly Thr Ala Ala Asp Asp

プロープ2

GGC AAG GTC TAT GCG GGT GTT TCC GAT ATC GCG AGT CAG GCC AAG GAC CGC GGT 2052
Gly Lys Val Tyr Ala Gly Val Ser Asp Ile Ala Ser Gln Ala Lys Asp Arg Gly

v8プロテアーゼ消化断片N末端アミノ酸配列

AAA CCT GGT CTC TGG GCG CTC GAT ATT CGG ACC GGC GAG GTC GCC TGG AAC TTC 2106
Lys Pro Gly Leu Trp Ala Leu Asp Ile Arg Thr Gly Glu Val Ala Trp Asn Phe

CTG AAC GCG CCG GAT ACG AAG TGC CGC TGG AAC AAC TGG TGG TGC CAT GGC GCC 2160
Leu Asn Ala Pro Asp Thr Lys Cys Arg Trp Asn Asn Trp Trp Cys His Gly Ala

TTC AGC CAG GCG ATC AGC GTT ATT CCC GGT GCG ATC TTC GCT GGC AGC TAT GAT	2214
Phe Ser Gln Ala Ile Ser Val Ile Pro Gly Ala Ile Phe Ala Gly Ser Tyr Asp	
GGA CAT TTC CGC GCC TTC GAT ACC GCG ACG GGC AAG ATC ATC TGG GAC GTC GAT	2268
Gly His Phe Arg Ala Phe Asp Thr Ala Thr Gly Lys Ile Ile Trp Asp Val Asp	
ACC GGC ACA AAG GCG GTC ACG ACG CTG AGC GGC GCG AAA GCC TTT GGC GGC GTG	2322
Thr Gly Thr Lys Ala Val Thr Thr Leu Ser Gly Ala Lys Ala Phe Gly Gly Val	
ATG GAC GGG GCA GGC CGA CGA TCG CCG GCG GAA TGG TCT ATG TCC ATT CAG GTT	2376
Met Asp Gly Ala Gly Arg Arg Ser Pro Ala Glu Trp Ser Met Ser Ile Gln Val	
ATG CCG GCC GAT CGA GCG AAA GCG GCG GGC GGG ACC TGC GCG GCA CGG ACG GCA	2430
Met Pro Ala Asp Arg Ala Lys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Ala Ala Arg Thr Ala	
ACA TCC TGA TGG CCT TCT CGG TCG ATG GAA AAT GAT CGC TAA TGC CTG TCG GGC	2484
Thr Ser ***	
GAG GAT CAA GTG GAG AGC GTT GGA TGA ATG ATG CGT GCA AGT TGA CTG TTT TCG	2538
GAT CGG TCG GTG CCT TCC TTG TAG CGA CCC TCA CGG TCG <u>AGA</u> CCG ATG CAT CGG	2592
RBS Met His Arg	
CTA AGG CCC TGC ACG CCG GCC GCA TTC GCC CGA TGT GCA GCT TGC CAT TCG GTG	2646
Leu Arg Pro Cys Thr Pro Ala Ala Phe Ala Arg Cys Ala Ala Cys His Ser Val	
GTT CCG GCG CGC CCA ATA AAA TGG GTC CGA ACC TTG CCG GGA TCG TCG GGA GTA	2700
Val Pro Ala Arg Pro Ile Lys Trp Val Arg Thr Leu Pro Gly Ser Ser Gly Val	
AGG CCG CCA CGC GTC CGG GTG GCC GAT ATT CGC CGG CGC TCA AGA AGA GCG GCA	2754
Arg Pro Pro Arg Val Arg Val Ala Asp Ile Arg Arg Arg Ser Arg Arg Ala Ala	
TTG TCT GGA ACA AGG CCA ATC TCG CCG CCT ATC TCA AGA ACA CCC AGA CGA CTG	2808
Leu Ser Gly Thr Arg Pro Ile Ser Pro Pro Ile Ser Arg Thr Pro Arg Arg Leu	
TCC CCG GCA CGA CTA TGC CCA ATC CGA 3'	2835
Ser Pro Ala Arg Leu Cys Pro Ile Arg	

= : プロモーター配列、RBS : リボゾーム結合配列、 : プローブ結合部位、- : PVAデヒドロゲナーゼのN-末端アミノ酸配列とV8プロテアーゼで消化した断片のN-末端アミノ酸配列、 : ヘム結合部位、*** : 終始コドンを示している。

【考察の部】

PVADH の遺伝子配列を明らかにすることを目的として、PAVDH および V8プロテアーゼ消化断片から得たN末端アミノ酸配列と、その配列から当該する遺伝子の塩基配列を推定し、その一部の塩基配列を引用したジオチン化合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、これらとハイブリダイズすることと指標として PVADH 遺伝子のクローニングを行った。*Pseudomonas* sp. 113P3株染色体 DNA のジーンライブラリーから組み換え体 pMA23 を得、その *Pst* I-*Pst* I 4kb 断片をサブクローニングし、組み換え体 pSTM2 を作製した。この組み換え体 pSTM2 の塩基配列の解析によりリボソーム結合配列をもつ ORF が確認された。この ORF 内には、クローニングの指標としたプローブ 1 およびプローブ 2 の塩基配列が確認され、また塩基配列から類推されるアミノ酸配列からは PVADH および V8 プロテアーゼ消化断片のN末端アミノ酸配列が見い出された。さらに *Acetobacter aceti* 等の膜結合型 ADH⁴⁴⁾ に存在するチトクロム *c* のヘム結合のコンセンサスアミノ酸配列 (CysXXCysHis) が見い出された。このように、この ORF 内には PVADH 遺伝子の特徴的な情報が全て存在することから、本研究で決定した ORF は PVADH をコードする遺伝子であると結論した。

この PVADH 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性検索をデータベース (Gen Bank R74.0, SWISS-PROT R24.1) を用いて行ったところ、*P. denitrificans* の methanol dehydrogenase 遺伝子⁴⁵⁾ と塩基数 1874 において塩基レベルで 48.5%、*A. polyoxogenes* の ADH (EC 1.1.99.8) および cytochrom *c* 遺伝子と塩基数 1667 において塩基レベルで 45.3% の相同性が見られた。また、アミノ酸レベルでは、両酵素ともに 30% 程度の相同性を示した。これらのことから、得られた ORF はヘムを補欠分子族としてもつデヒドロゲナーゼ遺伝子をコードしていることを示唆しており、本遺伝子配列が PVADH をコードするものであることを示していると考ええる。

またこの ORF には、Magnesium and Cobalt transport protein のアミノ酸 10 に対して 70% 相同性を示す部分があり、本酵素の活性因子に関係した配列であると考えられる (Fig. 25)。これは第3章で示した Ca^{2+} および Mg^{2+} による活性化の事実とよく符合し、この領域に Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} および PQQ が結合し apoenzyme form が holoenzyme form へ変化すると思われる。この変換については、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 17933) 由来の PQQ 依存性 ethanol dehydrogenase を用いた検討がなされている^{2,3)}。

検索遺伝子 : MAGNESIUM AND COBALT TRANSPORT PROTEIN Match%70.0	
	10 20 30 40 50 60
PVADHS遺伝子	MGSHAWGGAVFSAATLIAFGSVVHASGTVAETAPQSGHAVPADQLDGETLYKARCAACHD
検索遺伝子	RERELPAFRLYMRARSQAMVDGNAYELLLDLFETKIEQLADEIENIYSDLEKLSRVIME
	110 120 130 140 150 160
	70 80 90 100 110 120
PVADHS遺伝子	NAEGRTSPSREVL SKNPASFILRKHANGRDGTDAEGLTLEEMTAIARAVGKADAKTDDGID
検索遺伝子	GHQGD EYDEALSTLAELEDIGWKVRLCLMDTQRALNFLVRKARLPGGQLEQAREILRDIE
	170 180 190 200 210 220
	130 140 150 160 170 180
PVADHS遺伝子	LRRIWGN SVEGTPLDAPQCSSAPTPVDLGAANQWNGWSTEKDNGRFQRKPALDVADIPKL
検索遺伝子	SLLPHNESLFQKVNFLMQAAMGFINIEQNRIIKIFSVVSVVFLPPTLVASSYGMNFEFMP
	230 240 250 260 270 280
	190 200 210
PVADHS遺伝子	KLKWAFQYPGSKNGQATVIGDRLFTTSTSGAV
	X::: :X.
検索遺伝子	ELKWSFGYPGAIIFMILAGLAPYLYFKRKNWL
	290 300 310

: はマッチした箇所を示している。

Fig. 25 The Candidate of the Metal Ion Binding Site in PVADH

グラム陰性菌のタンパク質分泌機構は、細胞質膜をタンパク質が透過する機構で、タンパク質のN末端にシグナルペプチドをもった前駆体として合成される。シグナルペプチドは 20 ~ 30 個のアミノ酸からなっており膜透過後シグナルペプチダーゼによって切断除去される。グラム陰性菌は、細胞質膜の外側に外膜が存在するため細胞膜を透過したタンパク質はペリプラズムにとどまるか、外膜内に取り込まれる。シグナルペプチドには5つの特徴があり⁴⁶⁾、シグナルペプチドのN末端部位には、グラム陰性菌では1個か 3 個の塩基性アミノ酸残基が存在すること、この塩基性領域に続いて 10 個程度の疎水性アミノ酸配列があり、通常 1 ~ 2 個のプロリンかグリシンが存在すること、疎水性領域に続いて 1 ~ 2 個のセリンあるいはトレオニンが存在すること、最後に切断部位と呼ばれるシグナルペプチドのC末端部はアラニンかグリシンで側鎖の非常に小さいアミノ酸から成っていることの5点である。決定された PVADH 遺伝子の塩基配列を解析したところ、翻訳開始点から 33 個のアミノ酸配列の後に PVADH のN末端アミノ酸配列が存在していたが、これはシグナルペプチドに特徴的である。また、シグナルペプチドの特徴である疎水性アミノ酸配列のクラスターが確認された。プロモーター配列からPVADH のN末端アミノ酸配列までに開始コドン (ATG) が3つ存在したが、シグナルペプチドのN末端部の特徴から推定すると、472 塩基または 493 塩基から始まるメチオニンが翻訳開始点ではないかと考えられる。

られた。代謝に関与する遺伝子群は一般にクラスターを形成するか、ポリシストロンを形成することが多いことから、この ORF は PVA 代謝に関与するタンパク質をコードした遺伝子である可能性が高く、今後詳細に検討する必要がある興味をもたれた。この不完全な遺伝子領域 (249 bp) について DNA およびアミノ酸配列の相同性検索をデータベース (GenBank R74.0) を用いて解析したところ 216 塩基中に Yeast (*S. pombe*) の cytochrom *c* 遺伝子と塩基レベルで 57.4% の相同性が見られた。このことは PVADH 同様にシトクロム *c* が関与した呼吸鎖に関連した遺伝子である可能性が高いと思われる。

上記のことから、本研究でこれまでに報告されていない PVADH 遺伝子がクローニングされた。この内容については、現在投稿準備中である⁴⁶⁾。PVA 分解に関与する遺伝子の塩基配列の報告は、*Pseudomonas vesicularis* PD株由来の secondary alcohol oxidase および *Pseudomonas* sp. VM15C株由来 PVADH 遺伝子³³⁾ に次ぐ報告である。今後、VM15C株由来の PVADH 遺伝子配列との比較検討ならびに 今回得られた PVADH 遺伝子を用いた組み換え PVADH の発現および 113P3株由来の β -diketone hydrolase の解明が課題として残されている。

第5章 総括

PQQ 依存性 PVA 分解菌の PVADH の性状および PVA 関連高分子に対する基質特異性を明らかにし、PVA の部分構造と生分解性との関わりを明らかにする目的で、PVA 分解菌の取得、菌体の Cell-free extract から PVADH の精製、PVADH の性状、基質特異性、酵素産物の構造確認、さらに遺伝子のクローニングについて検討を行った。

1. PQQ 依存性 PVA 分解菌の取得

PVA および PQQ を含む培地を用いて染色工場廃水処理場活性汚泥から、PVA-ヨード反応を応用したクリアゾーンの形成を指標に、PQQ 依存性 PVA 分解菌 (*Pseudomonas* sp. 113P3株) の取得に成功した。

本菌株は、PVA を唯一の炭素源とした場合、PQQ を必須栄養素として要求し、PVA の分解活性は Cell-free Extract 中に存在していた。その Cell-free Extract 中には PES, DCPIP を電子受容体とする活性測定系で PVADH 活性が見られた。

2. PVADH の精製

PVA を唯一の炭素源として培養した 113P3株の Cell-free Extract から 2 種のカラム操作により簡便、高収率、高純度な PVADH を SDS-PAGE 上単一なまで精製することに成功した。本酵素は、SDS-PAGE およびゲルロカカラム分析により分子量 (67 kD) のモノマー酵素であり、最終調製品は、褐色を呈していた。

3. PVADH の性状

本酵素は、PQQ および heme *c* を 1 分子ずつ補欠分子族としてもつ分子量 (67 kD) の PQQ 依存性 Type II ADH の 1 種であることが判明した。

基質特異性から、1,3-ジオール特に PVA を良い基質とし、水酸基の位置 (1,3 位) および立体配置 (*meso* シークエンス) 特異的であった。

PVA 関連高分子に対する基質特異性から、PVADH の反応性はポリマーの疎水性、タクティシティーおよび 1,2-glycol 結合量により影響を受け、エチレン含有 PVA およびアイソタクティック PVA は通常の PVA に比較して高い反応性を示した。

PVADH により PVA は酸化され、 β -ジケトン PVA が生成し、この β -ジケトン PVA の酵素による生成が微生物による一般的な PVA 生分解機構であることが判明した。

4. PVADH の遺伝子クローニング

PAVDH および V8プロテアーゼ消化断片から得たN末端アミノ酸配列と、その配列から当該する遺伝子の塩基配列を推定し、その一部の塩基配列を引用したビオチン化合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、これらとハイブリダイズすることを指標として PVADH 遺伝子のクローニングを行った。その結果、決定された塩基配列から類推されるアミノ酸配列中には、PVADH および V8 プロテアーゼN末端アミノ酸配列、ヘモキノプロテイン特有のヘム結合モチーフ、活性化因子部位、シグナル配列および PQQ 結合部位をもつ 1944bp (648 アミノ酸) の構造遺伝子を明らかにした。

以上、本研究において、著者は PVA 分解菌の PVA 分解機構で重要な役割を担っている PQQ 依存性 PVADH の性状、基質特異性、PVADH による酸化 PVA の構造および遺伝子配列を明らかにした。

参考文献

- 1) 鈴木智雄, 太宰宙朗, 御園光信. 1973. 醸工. 51:692-698.
- 2) Morita, M. and Watanabe, Y. 1977. Agric. Biol. Chem. 14:1535-1537
- 3) Morita, M., Hamada, N., Sakai, K. and Watanabe, Y. 1979. Agric. Biol. Chem. 43:1225-1235
- 4) Sakai, K., Morita, M., Hamada, N. and Watanabe, Y. 1981. Agric. Biol. Chem. 45:63-71
- 5) Sakai, K., Hamada, N. and Watanabe, Y. 1986. Agric. Biol. Chem. 50:989-996
- 6) Sakai, K., Hamada, N. and Watanabe, Y. 1987. 化学と工業 61:372-377
- 7) Shimao, M., Saimoto, H., Kato, N. and Sakazawa, C. 1983. Appl. Environ. Microbiol. 46:605-610
- 8) Shimao, M., Fujita, I., Kato, N. and Sakazawa, C. 1984. Appl. Environ. Microbiol. 48:751-754
- 9) Shimao, M., Ninomiya, K., Kuno, O., Kato, N. and Sakazawa, C. 1986. Appl. Environ. Microbiol. 51:268-275
- 10) Shimao, M., Onishi, S., Kuno, O., Kato, N. and Sakazawa, C. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55:275-278
- 11) Matsumura, S., Ii, S., Shigeno, H., Tanaka, T., Okuda, F., Shimura, Y. and Toshima, K. 1993. Makromol. Chem. 194:3237-3246

- 12)Matsumura, S., Shimura, Y., Terayama, K. and Kiyohara, T. 1994. *Biotech. Lett.* 16:1205-1210
- 13)Mori, T., Sakimoto, M., Kagi, T. and Sakai, T. 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:330-332
- 14)Teranishi, Y., Tanaka, A., Osumi, M. and Fukui, S. 1974. *Agric. Biol. Chem.* 38:1213
- 15)Bonet-Maury, P. 1944. *Compt. Rend.* 218:117
- 16)辻正男, 畑中唯史, 井上伸一, 表田行恵. 1994. 生分解性高分子 (筏 義人編), 高分子刊行会. 85-94
- 17)松下一信. 1992. *農化.* 66:1653-1656
- 18)Anthony, C. 1982. p.137. In *The Biochemistry of Methylootrophs*, Anthony, C., Academic Press.
- 19)Duine, J. A., and Frank, Jzn, J. 1987. *Adv. Enzymol.* 59:169-212
- 20)Yamanaka, H. and Kawai, F. 1989. *J. Ferment. Bioeng.* 67:324-330
- 21)Hauge, J. G. 1991. *J. Biol. Chem.* 239:3630
- 22)Ameyama, M. and Adachi, O. 1982. *Methods Enzymol.* 89:491-497
- 23)Mutzel, A. and Gorisch, H. 1991. *Agric. Biol. Chem.* 55:1721-1726
- 24)Groen, B., W., Frank, J. and Duine, J. A. 1984. *Biochem. J.* 223:921
- 25)Laemmli, U. K. 1970. *Nature.* 227:690-685

- 26)Bartsch, R. G. 1971. *Methods Enzymol.* 23:344-363
- 27)Moritani, T., Kuruma, I., Shibatani, K. and Fujiwara, Y. 1972.
Macromolecules. 5:577-580
- 28)井本三郎, 浮田純二, 小南次夫. 1957. *高分子化学.* 14:214-218
- 29)Huang, S. J., Wang, I-F. and Quinga, E. 1983. *Polym. Sci. Technol.* 21:75-83
- 30)Groen, B. W., Van Kleef. M. A. G. and Duine, J. 1986. *Biochem. J.* 234:611-615
- 31)Matsumura, S., Shimura, Y., Toshima, K., Tsuiji, M. and Hatanaka, T. 1995
Macromol. Chem. Phys. 196:3437-3445
- 32)Shimao, M., Tamokami, T., Nishi, K. and Harayama, S. 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:1056-1062
- 33)Hatanaka, T., Hashimoto, T., Kawahara, T., Takami, M., Asahi, N., and Wada, R. To be accepted in 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(11)
- 34)Hatanaka, T., Kawahara, T., Asahi, N. and Tsuji, M. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1229-1231
- 35)Hatanaka, T., Asahi, N. and Tsuji, M. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1813-1816
- 36)Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D. 1969. *J. Mol. Biol.* 41:459-472
- 37)Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing. J. 1985. *Gene.* 33:103-119
- 38)Hojin, B. & C., J. 1980. *Gene.* 11:291

- 39)Vieira, J. and Messing, J. 1987. *Methods Enzymol.* 153:3-11
- 40)Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. p90-91
- 41)Hansen, J. B. and Olsen, R. H. 1978. *J. Bacteriol.* 135:227-228
- 42)Marmur, J. 1961. *J. Mol. Biol.* 3:208-218
- 43)高木康敬. 1982. 遺伝子操作マニュアル. 講談社サイエンティフィク. p47-50
- 44)Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M. and Yano, K. 1990. *J. Ferment. Bioeng.* 70:58
- 45)Harms, N., de Vries, G. E., Maurer, K., Hoogendijk, J. and Stouhomer, A. H. 1987. *J. Bacteriol.* 169:3969-3975
- 46)水島昭二. 1987. タンパク質の膜内輸送と膜透過. 東京化学同人. 10:3-19
- 47)Takizawa, N., Matsumiya, A., Hatanaka, T., Tsuji, M., Takakura, K. and Kiyohara, H. (in preparation, to be submitted in gene)

謝 辞

本論文作成にあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部生理化学教室大森晋爾教授に慎んで感謝の意を表します。

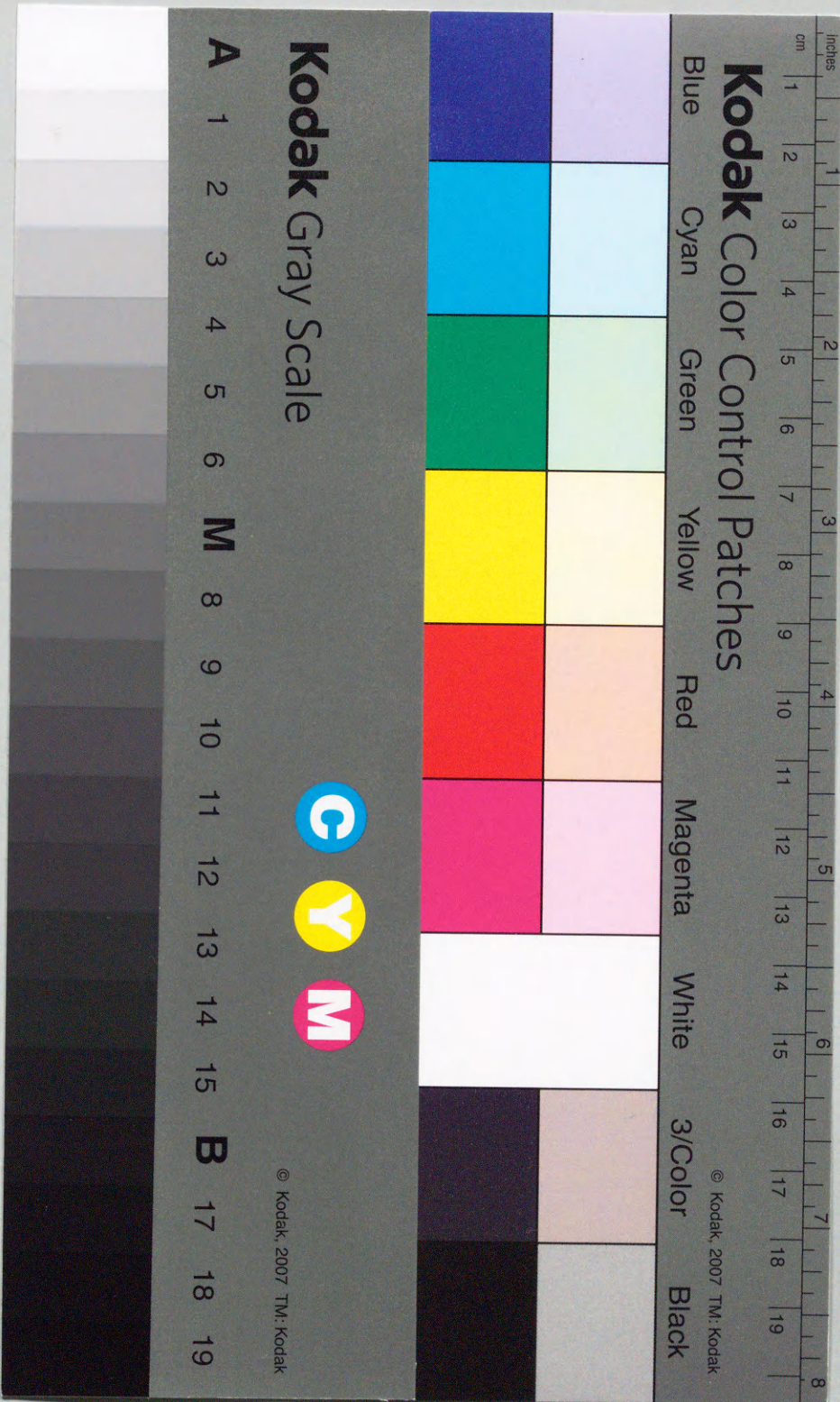
また、常に御協力、御助言いただきました坪井誠二助教授、大塚正人助手、並びに河瀬美知技官に感謝します。

PVADH 遺伝子のクローニングに際し、御協力いただきました岡山理科大学工学部浄原法蔵教授、滝沢昇助教授並びに松宮章子修士に深く感謝致します。

酵素の基質特異性の比較に際し、御協力いただきました慶応義塾大学理工学部松村秀一教授に深く感謝します。

最後に、本研究に御協力いただきました(株)クラレ 辻正男氏、和田良一氏、川原孝春氏、橋本正氏、旭範子氏並びに高見正明氏に感謝します。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

© Kodak, 2007 TM: Kodak