

DA
2255
1990
(HG)

Comamonas acidovorans TB-35株由来のポリウレタン分解酵素の解析

筑波大学大学院
農学研究科
応用生物化学専攻

茂野 ゆき枝

寄贈
茂野ゆき枝氏

00003561

本論文では以下の略語を用いる。

AChE	: acetylcholinesterase
Amp	: ampicillin
bp	: base pair(s)
CBD	: cellulose-binding domain
CBS	: culture-broth-secreted
EDTA	: ethylenediamine tetraacetic acid
GC	: gas chromatography
IPTG	: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
ORF	: open reading frame
pDEGA	: poly(diethylene glycol adipate)
PHA	: poly(hydroxyalkanoate)
PHB	: poly(3-hydroxybutyrate)
PUR	: polyurethane
SD配列	: Shine-Dalgarno配列
TDI	: tolylene diisocyanate
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

目次

第1章 序論

第1節	微生物によって分解されるプラスチック	1
第2節	ポリウレタンとは	3
第3節	ポリウレタンの微生物分解	3
第4節	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35株について	6
第5節	高分子分解酵素について	7
第6節	本研究の目的	8

第2章 *Comamonas acidovorans* TB-35株におけるポリウレタン分解酵素の局在

第1節	緒言	10
第2節	実験材料及び実験方法	
2-1	供試菌株及び試薬	10
2-2	供試ポリウレタン	10
2-3	培養条件及び酵素画分の調製	11
2-4	菌体からの酵素抽出に用いる界面活性剤の検討	11
2-5	酵素活性の測定	14
2-5-1	ポリウレタン分解活性の測定	14
2-5-2	エステラーゼ活性の測定	14
第3節	実験結果	
3-1	エステラーゼ活性及びポリウレタン分解活性の測定	14
3-2	菌体からの酵素抽出に用いる界面活性剤の検討	14
第4節	考察	17

第3章 菌体付着型エステラーゼの精製及び諸性質

第1節	緒言	18
第2節	実験材料及び実験方法	
2-1	供試菌株及び試薬	18
2-2	供試ポリウレタン	18
2-3	培地及び培養条件	18
2-4	酵素活性の測定	19
2-4-1	ポリウレタン分解活性の測定	19
2-4-2	エステラーゼ活性の測定	19
2-5	タンパク質量の測定	19

2-6	酵素精製	19
2-6-1	菌体からの酵素抽出	20
2-6-2	硫酸アンモニウム沈殿法による粗分画	20
2-6-3	疎水性担体への吸着と溶出	20
2-6-4	陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	21
2-7	分子量の測定	21
2-8	基質特異性の検討	22
2-9	N末端アミノ酸配列の決定	22
第3節	実験結果	
3-1	菌体付着型エステラーゼの精製	22
3-2	精製酵素によるポリウレタンの分解	24
3-3	分子量の測定	24
3-4	酵素的性質の検討	24
3-4-1	酵素活性に及ぼすpHの影響	24
3-4-2	酵素活性に及ぼす温度の影響	29
3-4-3	酵素の安定性に及ぼす温度の影響	29
3-5	基質特異性	29
3-6	界面活性剤の影響	29
3-7	酵素濃度の影響	29
3-8	N末端アミノ酸配列の決定	34
第4節	考察	34
第4章	培養上清遊離型エステラーゼの精製及び諸性質	
第1節	緒言	39
第2節	実験材料及び実験方法	
2-1	供試菌株及び試薬	39
2-2	培地及び培養条件	39
2-3	酵素活性の測定	39
2-4	酵素の精製	39
2-4-1	硫酸アンモニウム沈殿法による粗分画	40
2-4-2	疎水カラムクロマトグラフィー	40
2-4-3	ゲル濾過カラムクロマトグラフィー	40
2-5	分子量の測定	40
2-6	N末端アミノ酸配列の決定	41
2-7	プロテアーゼによる限定分解	41
2-8	酵素の疎水性の測定	41

第3節	実験結果	
3-1	酵素の精製	41
3-2	分子量の測定	43
3-3	酵素的性質の検討	43
3-4	N末端アミノ酸配列の決定	43
3-5	基質特異性	43
3-6	プロテアーゼによる限定分解	46
3-7	酵素の疎水性	46
第4節	考察	46
第5章	ポリウレタン分解酵素遺伝子のクローニング	
第1節	緒言	51
第2節	実験材料及び実験方法	
2-1	供試菌株及び試薬	51
2-2	培地及び培養条件	52
2-3	コンピテントセルの作製	52
2-4	TB-35株の全DNAの調製	52
2-5	プラスミドDNAの調製	55
2-6	DNAプローブの作製	55
2-7	サザンハイブリダイゼーション	55
2-8	塩基配列の決定	56
2-9	活性測定	56
2-9-1	エステラーゼ活性	56
2-9-2	プレートアッセイ	56
2-10	ポリウレタン分解酵素遺伝子のクローニング	57
第3節	実験結果	
3-1	ポリウレタン分解酵素遺伝子のクローニング	58
3-2	全塩基配列決定	58
3-3	ポリウレタン分解酵素遺伝子の発現	63
第4節	考察	63
第6章	組換型ポリウレタン分解酵素の精製及び諸性質	
第1節	緒言	67
第2節	実験材料及び実験方法	
2-1	供試菌株及び試薬	67
2-2	培地及び培養条件	67

2-3	酵素活性の測定	68
2-4	酵素の精製	68
2-4-1	粗酵素液の調製	68
2-4-2	硫酸アンモニウムによる粗分画	68
2-4-3	疎水カラムクロマトグラフィー	69
2-4-4	エステラーゼ(I)の精製	69
2-4-5	エステラーゼ(II)の精製	69
2-5	分子量の測定	70
2-6	N末端アミノ酸配列の決定	70
2-7	プロテアーゼによる限定分解	70
2-8	酵素の疎水性の測定	70
第3節	実験結果	
3-1	酵素の精製	70
3-2	SDS-PAGE	71
3-3	基質特異性	71
3-4	プロテアーゼによる限定分解	71
3-5	酵素の疎水性	71
第4節	考察	77
第7章	ポリウレタン分解酵素遺伝子の解析	
第1節	緒言	79
第2節	実験材料及び実験方法	
2-1	塩基配列及びアミノ酸配列の解析	80
2-2	発現系の構築	80
2-3	組換型酵素の発現	82
2-4	組換型酵素の精製	82
2-5	酵素活性の測定	82
2-6	PCRを用いた変異導入	82
第3節	実験結果	
3-1	相同性（ホモロジー）検索	82
3-2	活性中心付近の一次配列の比較	82
3-3	Ser ¹⁹⁹ 、His ⁴³³ 及びGlu ³²⁴ への変異導入	82
3-4	<i>T. californica</i> 由来のアセチルコリンエステラーゼとの二次構造の比較	85
3-5	<i>T. californica</i> 由来のアセチルコリンエステラーゼとの疎水性プロフィールの比較	85
第4節	考察	85

第8章 総括	96
引用文献	99
謝辞	104
付記	105