



Title	微生物によるフタル酸の分解 : Pseudomonas putida におけるフタル酸分解遺伝子
Author(s)	野村, 恭稔
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38695
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文につい てをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 野 村 恭 稔

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 9 6 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 10 月 29 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 微生物によるフタル酸の分解：

Pseudomonas putida におけるフタル酸分解遺伝子

(主査)

論 文 審 査 委 員 教 授 大嶋 泰治

教 授 高野 光男 教 授 新名 惇彦 教 授 卜部 格

教 授 山田 靖宙 教 授 今中 忠行 教 授 吉田 敏臣

論 文 内 容 の 要 旨

微生物によるフタル酸分解経路のひとつである4,5-ジヒドロキシフタル酸経路に含まれる代謝中間体の多くは、その化学構造上、有機合成法では製造が容易ではなく、微生物による大量生産が可能となれば、医薬中間体や高機能性プラスチック等の合成素材としての利用が期待される。本論文はそれら代謝中間体の大量生産に適した微生物の育種を目指し、強力なフタル酸資化性細菌の工場廃水よりの分離と同定を行い、その1分離株である *Pseudomonas putida* NMH 102-2 株のフタル酸分解に関与する遺伝子のクローニングを行い、関係する遺伝子の解析を行った成果をまとめたもので、緒論と本文5章から構成されている。

緒論では、本研究に関連するこれまでの知見をまとめ、本論文の目的とその概要について述べている。

第1章では、フタル酸資化性菌の分離および同定を行い、その工場廃水における分布を明らかにしている。

第2章では、フタル酸の初期段階の経路のうち、4,5-ジヒドロキシフタル酸経路における酵素活性を簡単に検出する方法について述べている。

第3章では、第1章の研究で得られた強力なフタル酸資化性菌である *Pseudomonas putida* 種の1株 NMH 102-2 株が保有するプラスミドに、フタル酸分解に関与する遺伝子群がコードされていることを示し、このプラスミドが他の *P. putida* 種へ接合伝達を行うことについて明らかにしている。さらに、4,5-ジヒドロキシフタル酸経路に必要な遺伝子が、そのプラスミド DNA 上の7 kbp の *EcoRI* 断片内に限定されることを示唆している。

第4章では、第3章で限定した7 kbp の *EcoRI* 断片の全塩基配列を決定し、同一方向に読まれる5個のタンパク質コード領域を認め、幾つかのフタル酸資化能欠損株を用いた相補性試験、あるいはスイス・プロット・データベースに対して行った推定アミノ酸配列との相同性を比較することにより、それら5個のタンパク質コード領域に由来するタンパク質について考察している。

第5章は、総合考察であり、本研究で得られた成果を総括している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、物質の微生物変換による新しい工業原料の生産を目指し、安価なフタル酸を対象に取り上げ、その資化性細菌について行った研究をまとめたものであり、主な成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 過去約20年間に於ける石油化学工業の進展とともに、フタル酸及びその誘導体が自然環境へ放出され、関連する工場にはこれらの物質に対する資化性菌が集積されていると考えられる。この考えに基づいて、廃水処理施設の活性汚泥あるいは排水溝のヘドロを試料として、フタル酸資化性菌の検索分離を行い、多くのグラム陰性細菌を分離同定し、それらの多くが *Pseudomonas* 属細菌であることを明らかにしている。
- (2) フタル酸の代謝アナログであるキノリン酸は、フタル酸資化の初期代謝過程を司る酵素、phthalate 4,5-dioxygenase と 4,5-dihydro-4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase により水酸化され、この物質はジアゾ化 *p*-ニトロアニリンとの反応により赤色を呈する。この反応を応用して、寒天平板上の細菌コロニーについて簡単に初期代謝過程の活性を検出する方法を考案し、以後の解析を容易にしている。
- (3) 分離したフタル酸資化性細菌のうち特に強力な資化活性を示す *P. putida* NMH102-2 株について解析を行い、トランスポゾン Tn5 の挿入法により、フタル酸の初期代謝を司る遺伝子が 7 kbp の *Eco*RI 断片上にコードされ、しかもそれが PHT と命名した 200 kbp の分子量をもつ大型伝達性プラスミド上にあることを明らかにしている。
- (4) 上記の 7 kbp の *Eco*RI 断片の全塩基配列の決定により、この DNA 断片上には 5 個のタンパク質コード領域が同方向に並び、フタル酸資化性欠損プラスミドに対する相補性試験及び推定されるタンパク質のアミノ酸配列をデータベースと比較することにより、それらは phthalate oxygenase, phthalate oxygenase reductase, 4,5-dihydro-4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase, 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase 及びこれら遺伝子の発現調節を行うタンパク質あるいはフタル酸トランスポーターをコードすると示唆している。

以上のように、本論文はフタル酸の分解に関与する微生物及びその遺伝子について多くの知見を与えており、これらの成果は芳香族化合物の微生物分解はもとより、微生物を用いた合成化学材料の大量生産への応用を考える上で貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。