

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## *Ralstonia eutropha* H16 の新規細胞内 3-ヒドロキシ酪酸オリゴマー分解酵素

小林照幸<sup>1,3</sup> 内野圭一<sup>1</sup> 安部智子<sup>1</sup> 齊藤光實<sup>1,2</sup>

### Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Ralstonia eutropha* H16

Teruyuki Kobayashi<sup>1</sup>, Keiichi Uchino<sup>1</sup>, Tomoko Abe<sup>1</sup> and Terumi Saito<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E. mail: kobayt43@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** *Ralstonia eutropha* H16 mobilizes intracellularly accumulated poly(3-hydroxybutyrate) with intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases. Different types of depolymerase, PhaZ1 and its homologs, account for the mobilization significantly but incompletely, and it is proposed that further unknown depolymerases or related enzymes complement the mobilization. A novel hydrolase was therefore investigated. The amino acid sequence of the intracellular 3HB-oligomer hydrolase of *Acidovorax* sp. SA1 and the genome sequence of *Ralstonia solanacearum*, a close relative of *R. eutropha*, revealed a candidate for the hydrolase gene. The DNA sequence of its hydrolase was used for the design of a pair of primers. With chromosomal DNA of *R. eutropha* as a template, these primers were used to amplify about a 1.3-kbp fragment including the equivalent gene, *phaZc*. Then the *phaZc* gene was cloned by Southern hybridization using the amplified DNA fragment as a probe. The hydrolase (PhaZc) was purified from *Escherichia coli* overexpressing *phaZc* and characterized. Immunoblot analysis revealed that PhaZc exists mainly in the cytosolic fraction of *R. eutropha*. PhaZc degraded various 3-hydroxybutyrate-oligomers at a high rate and artificial amorphous poly(3-hydroxybutyrate) at a lower rate. A *phaZ*-null mutation enhanced the deposition of PHB in the logarithmic phase in a nutrient-rich medium. PhaZc differs from the previously reported hydrolases in *R. eutropha* and is a novel type of intracellular 3HB-oligomer hydrolase, which participates in the mobilization of PHB along with other hydrolases.

**Keywords:** *Ralstonia eutropha* H16, poly(3-hydroxybutyrate), PHB, intracellular 3HB-oligomer hydrolase

## 序論

ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は多くの細菌が細胞内に炭素/エネルギー源として蓄積するポリエステルであり、生分解性プラスチックとして知られている<sup>1)</sup>。PHB 蓄積菌は細胞内に PHB 分解酵素を持つ事が知られており、これまでにいくつかの細菌において PHB 分解酵素の精製、遺伝子のクローニングなどの報告がなされている。PHB 蓄積菌として最も研究されている。

*Ralstonia eutropha* H16 においては、PHB 分解

酵素である PhaZa1<sup>2)</sup> と、そのホモログである PhaZa2, 3, 4, 5<sup>3,4)</sup>、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) オリゴマー分解酵素である PhaZb<sup>5,6)</sup> が見つかっている。PhaZa1 及び PhaZb については蛋白質の精製がなされており、どちらの酵素も PHB を分解するが PhaZb は効率よく 3HB オリゴマー を分解し、モノマーを生じる。これらの遺伝子の欠損株では PHB 蓄積量が上昇するが両方の遺伝子の欠損株においても PHB の分解が見られる。一方、*R. eutropha*

の細胞質中には PhaZa1、PhaZb とは異なる性質の PHB 分解酵素が存在する事が分かっている。これらの結果から、さらに別の PHB 分解酵素の存在が示唆されている<sup>9)</sup>。

*Acidovorax* sp. SA1 は PhaZb と異なるタイプの 3HB オリゴマー分解酵素を持つ事が報告されている<sup>9)</sup>。今回、このアミノ酸配列を基に BLAST search を行った結果、ゲノムプロジェクトが進行中である *Ralstonia* 属の細菌において類似したアミノ酸配列を持つ蛋白質が見つかった。この蛋白質は新規の 3HB オリゴマー分解酵素である可能性が考えられた。また、*R. eutropha* も同様の蛋白質を持っていると考えた。

PHB 蓄積菌として最もよく研究されている *R. eutropha* においても未だ PHB 分解系の全容は明らかになっていない。我々は PHB 分解系の解明を目的として *Acidovorax* sp. SA1 の 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列を基に、新規 3HB オリゴマー分解酵素の探索と得られた分解酵素の性質の検討を行った。

## 材料と方法

### 3HB オリゴマー分解酵素遺伝子 (*phaZc*) のクローニングと大腸菌での発現、遺伝子産物の精製

*Acidovorax* sp. SA1 の 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列をプローブとし、BLAST search を行った。その結果 *Ralstonia* 属で見つかった蛋白質の塩基配列を基にプライマーを作製した。このプライマーを使用し、*R. eutropha* の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。得られた DNA 断片をプローブにして RI でラベルし、サザンハイブリダイゼーションを行った。シグナルの見られた部分の DNA 断片をベクターに繋ぎ、コロニーハイブリダイゼーションによって 3HB オリゴマー分解酵素の遺伝子が含まれている DNA をクローニングした。この DNA 断片の塩基配列を決定した後に、新たに ORF 部分のみを PCR により増幅し、発現ベクターに繋いだ。このベクターで大腸菌を形質転換した。大腸菌を培養後、発現誘導を行った。この大腸菌を集菌した後に超音波処理によって菌を破碎した。PhaZc は遠心分離後の上清から Toyopearl Ether-650M、Toyopearl DEAE-650M を用いて精製した。

### PhaZc の細胞内局在

PHB を蓄積する条件で *R. eutropha* を培養した後に菌を破碎した。破碎液を蔗糖密度勾配遠心分離により各画分に分けた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 後、免疫染色によって PhaZc

を染色した。可溶性画分、PHB 画分のマーカーとして、それぞれ 3HB デヒドロゲナーゼ、PhaZa1 を使用した。

### *phaZc* 欠損株の作製

*phaZc* の N 末端 300 bp と C 末端 300 bp を PCR により増幅した後に連結し suicide ベクターに繋いだ。このベクターで大腸菌を形質転換した後に接合により *R. eutropha* の染色体上にベクターを組み込んだ。蔗糖を含む培地で *R. eutropha* を培養する事によりベクター部分を含まず欠損のみを生じた *phaZc* 欠損株を得た<sup>8)</sup>。欠損株と野生株の PHB 蓄積量の違いは HPLC を用いて調べた。

## 結果

### *phaZc* のクローニング

*Acidovorax* sp. SA1 の 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列をプローブとし、BLAST search を行った結果 *Ralstonia* 属で類似したアミノ酸配列を持つ蛋白質が見つかった。これらの蛋白質の塩基配列を基にプライマーを作製し、*R. eutropha* の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った結果、予測される大きさ (1.3 kbp) の断片が増幅した。この断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った後に得られた DNA 断片の塩基配列を決定した結果、3HB デヒドロゲナーゼの遺伝子と *phaZc* を含んでいる事が分かった。*phaZc* 遺伝子の ORF は 898 bp からなり、これから予測される蛋白質の分子質量は 31542 Da. であった。PhaZc の一次構造中にはセリンエステラーゼに見られるリパーゼボックス (Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly) と呼ばれる配列が存在していた。

### PhaZc の性質

大腸菌での発現誘導後、細胞質画分の SDS-PAGE を行った結果、約 32 kDa の蛋白質が生産されている事が分かった。2種類のカラムクロマトグラフィーを行う事によって SDS-PAGE 上で均一なバンドを示す蛋白質を得る事が出来た (図 1)。精製酵素の N 末端は最初のメチオニンが欠如していたが、それ以降の配列は塩基配列から予測される PhaZc のアミノ酸配列と同じであった。また、免疫染色の結果 *R. eutropha* においても同一の分子質量を示す事が分かった。

PhaZc の基質特異性を表 1 に示した。3HB オリゴマーを効率よく分解し、その量体数が高くなるに従い分解活性も高くなった。また、人工アモルファス PHB をわずかに分解し 3HB モノマーを生じ

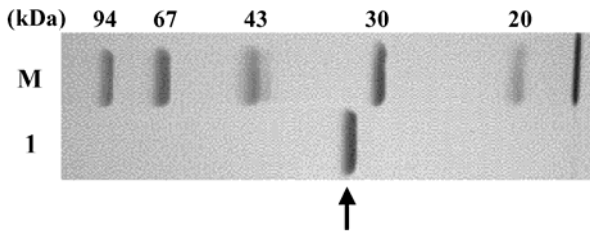


図 1. 精製 PhaZc の SDS-PAGE 分析. レーン 1: 精製 PhaZc (1 μg), レーン M: 分子質量マーカー. 矢印は PhaZc を示す.

た。p-ニトロフェルエステル化合物はわずかに分解した。結晶 PHB、native PHB、olive oil は分解しなかった。セリンエステラーゼの阻害剤である DFP によって阻害された。PHB の分解において PhaZb と PhaZa1 は相乗効果を示したが<sup>9)</sup>、PhaZc では PhaZb 及び PhaZa1 との相乗効果はみられなかった。

表 1. PhaZc の基質特異性

基質	比活性 (μmol/min/mg)
<b>3HB-oligomer</b>	
Dimer	31
Trimer	200
Tetramer	240
Pentamer	310
<b>PHB</b>	
Artificial amorphous PHB	3.0
Native PHB granules	< 0.1
Semicrystalline PHB	< 0.1
<b>p-nitrophenyl ester</b>	
Acetate	1.0
Butyrate	6.0
Palmitate	< 0.01
Olive oil	< 0.5

### 細胞内局在

PHB 蓄積時の局在性を調べる為に PHB 蓄積条件で 2 日間培養した後、細胞破砕液を蔗糖密度勾配遠心分離法により分画した。その結果、PhaZc は大部分が細胞質中に存在し、わずかに PHB 上にも存在する事が分かった (図 2)。PhaZc の局在性は PhaZa1、PhaZb どちらとも異なっていた<sup>9)</sup>。

### phaZ 欠損株の PHB 代謝

PhaZc が実際に PHB の代謝に関わっているかを調べる為に phaZc 欠損株の PHB 蓄積量を野生株と比較した。*R. eutropha* は富栄養培地で培養した場合、対数増殖期に一時的に PHB を蓄積する事が知られており<sup>7)</sup>、phaZc 欠損株においても同様の結果が得られた。しかし、野生株と比較して欠損株では対数増殖期の PHB 蓄積量が増加していた。定常期において phaZc、phaZb 欠損株では PHB 含量

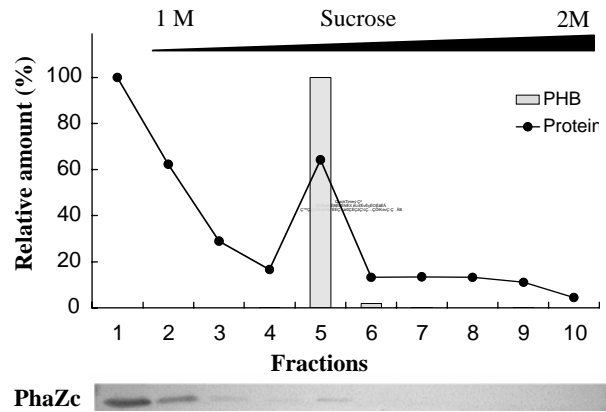


図 2. PhaZc の局在性. PHB を蓄積した菌を破砕し、蔗糖密度勾配遠心法により分画した。SDS-PAGE の後に免疫染色を行なった。

が野生株よりも多かったが phaZbc double 欠損株では野生株と同程度まで減少した。PHB 蓄積条件で培養した場合には富栄養培地で培養した時の対数増殖期と同じ現象が見られた。全ての条件において phaZb 欠損株の PHB 蓄積量が最も増加していた (図 3)。

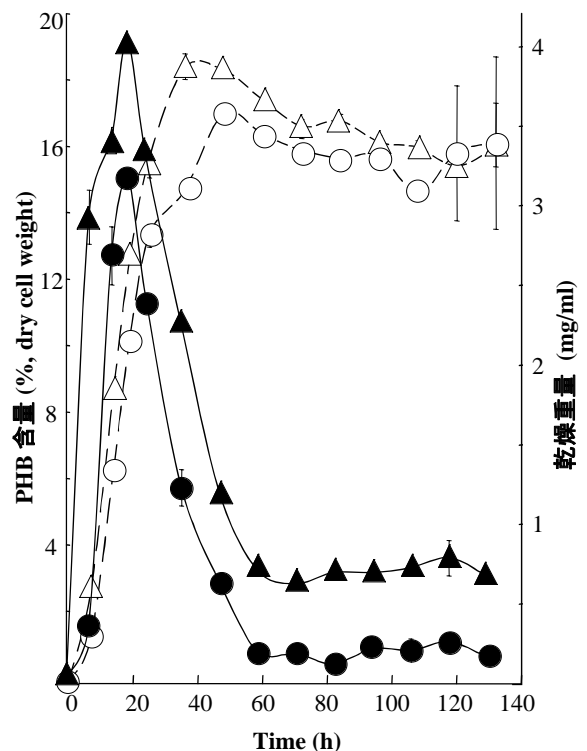


図 3. 富栄養培地における phaZc 欠損株の生育と PHB の蓄積. 点線: 乾燥重量, 実線: 乾燥重量あたりの PHB 含量 (%). Wild-type (○, ●); phaZc 欠損株 (△, ▲). 結果は 3 点の平均であり, 誤差棒は標準偏差を示している。

## 討論

*R. eutropha* は PhaZa、PhaZb の異なるタイプの細胞内 PHB 分解酵素を持っている事が知られており、今回、新たに PhaZc の存在を示した。PhaZa1 とそのホモログ、PhaZb、PhaZc は、それぞれ分子質量、アミノ酸配列が異なっている。PhaZa1 とそのホモログは分子質量が約 45 kDa の蛋白質であり、全ての細胞外 PHB 分解酵素に見られるようなリパーゼボックスが存在しない。その活性中心にはセリンの代わりにシステインが存在している。一方、PhaZb と PhaZc の活性中心はリパーゼボックス中のセリンである。PhaZb は分子質量が約 78 kDa の蛋白質であり、*Ralstonia pickettii* A1 の細胞外 3HB オリゴマー分解酵素<sup>9)</sup>とアミノ酸配列が似ている。PhaZc の分子質量は PhaZb の半分程度である 32 kDa であり、*Acidovorax* sp. SA1 の細胞内 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列と似ている。これらの事から PhaZa, b, c はそれぞれ異なるグループに属すると考えられる。

最近、光合成細菌である *Rhodospirillum rubrum* のペリプラズム画分から PHB 分解酵素が精製され、その遺伝子もクローニングされた<sup>10)</sup>。そのアミノ酸配列は細胞外 PHB 分解酵素の触媒領域と類似している。*R. eutropha* にも、この酵素と似た性質を示す PHB 分解酵素が存在している可能性がある。

PhaZc は基質特異性から特異性の広いエステラーゼもしくはリパーゼの一種ではなく 3HB オリゴマーに作用する特異的な分解酵素であると考えられる。PHB の分解を *in vitro* で調べた結果では PhaZc と PhaZa1、PhaZb の間に相乗効果は見られなかったが、PhaZa1 と PhaZb は相乗的に PHB を分解していると言う事が分かっている。人工アモルファス PHB を分解する事から細胞内においては、PHB を分解しているかもしれない。これらの結果から、細胞内において PhaZa1、PhaZb、PhaZc は効率よく働き PHB、3HB オリゴマーを分解していると思われる。

*R. eutropha* の野生株と *phaZc* 欠損株の PHB 蓄積量には十分な違いが見られた。この結果は PhaZc が PHB 代謝に貢献している事を示している。PHB の合成と蓄積は同時に起こっている事が知られており、欠損株においては、そのバランスが崩れ、その結果、PHB 蓄積量の増加が見られると考えられる。*PhaZb*<sup>9)</sup> と *phaZc* 欠損株の間に見られる蓄積量の違いは細胞内局在性によるものと思われる。*PhaZb* は約半分が PHB 上に存在している為、細胞内において PhaZc よりも PHB の分解に

働いているかもしれない。

PhaZb、PhaZc は共に 3HB オリゴマーを効率よく分解する事から細胞内の 3HB 濃度が変化している事は明らかであり、この事から PHB の代謝は 3HB 濃度によって調節されている可能性が考えられる。以上の理由から PHB の代謝は環境変化による窒素源、炭素源の濃度変化による調節だけではなく、3HB もしくは 3HB オリゴマーの濃度によっても調節されていると考えられる。

*R. eutropha* の PHB 代謝系は非常に複雑であり、未だ不明な点が多く、更なる研究が必要である。

## 文献

- 1) Anderson AJ and Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic roles, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbial. Rev.* **54**: 450-472.
- 2) Saegusa H, Shiraki M, Kanai C and Saito T (2001) Cloning of an intracellular poly [D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.* **183**: 94-100.
- 3) York GM, Lupberger J, Tian J, Lawrence AG, Stubbe JA and Sinskey AJ (2003) *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly [D- (-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J. Bacteriol.* **185**: 3788-3794.
- 4) Pötter M, Müller H, Reinecke F, Wiczorek R, Fricke F, Bowien B, Friedrich B and Steinbüchel A (2004) The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* **150**: 2301-2311.
- 5) Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, Sugiyama A and Saito T (2003) Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol.* **185**: 3485-3490.
- 6) Saegusa H, Shiraki M and Saito T (2002) Cloning of an intracellular D (-) -3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and identification of the activity site serine residue by site-directed mutagenesis. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 106-112.
- 7) Sugiyama A, Shiraki M, Kobayashi T, Morikawa G, Yamamoto M, Yamaoka M and Saito T (2002) Cloning and Sequencing of an intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Acidovorax* sp. strain SA1 and purification of the enzyme. *Curr. Microbiol.* **45**: 123-127.
- 8) Lenz O and Friedrich B (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12474-12479.
- 9) Zhang K, Shiraki M and Saito T (1997) Purification of an extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain

A1 and cloning and sequencing of its gene. *J. Bacteriol.* **179**: 72-77.

- 10) Handrick R, Reinhardt S, Kimmig S and Jendrossek D (2004) The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)depolymerase of *Rhodospiril-*

*lum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* **186**: 7243-7253.